

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL PULPİTİS MODELİNDE BENFOTİAMİNİN
ANTIENFLAMATUVAR VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dt. Emre ÇİÇEK

Doktora Tezi

I. Danışman

Doç.Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

II. Danışman

Yrd. Doç. Dr. Halil AŞCI

Bu tez TÜBİTAK tarafından 114S836 proje numarası ve ÖYP tarafından ÖYP05238-DR-12 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 132

2015-İSPARTA

KABUL ve ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Endodonti Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2015

Tez Danışmanı I : Doç.Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD

Tez Danışmanı II : Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI

SDÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Farmakoloji AD.

Üye : Prof.Dr. Tayfun ALAÇAM

Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD

Üye : Prof.Dr. A.Diljin KEÇECİ

SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD.

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa SAYGIN

SDÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Fizyoloji AD.

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

“Ratlarda Deneysel Pulpitis Modelinde Benfotiaminin Antienflamatuvar ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması” adlı doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez nerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Arş. Gör. Dt. Emre IEK

mza

Danışman I

Doç.Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

mza

Danışman II

Yrd. Doç. Dr. Halil AŞCI

mza

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca benden bilgi ve desteğini esirgemeyen, çeşitli bilimsel faaliyetlerde cesaretlendiren, manevi desteğiyle özgüvenimi artıran, merak duygumu geliştiren ve araştırma isteğimi teşvik eden danışman hocam **Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA'** ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda değerli bilgilerinden bizzat yararlandığım, önemli noktalarda tecrübeleriyle çözüm yolları üreten deney aşamalarında yardımlarını eksik etmeyen sayısız toplantılarla destek olan ikinci tez danışmanım **Yrd. Doç.Dr Halil AŞCI'** ya ve **Yrd. Doç. Dr Mustafa SAYGIN'** a; histopatoloji ve immünohistokimyasal değerlendirmenin tüm aşamalarında teorik ve pratik destekleri için **Prof. Dr Özlem ÖZMEN'e**; tez izleme komitemde yer alan ve çalışmamızın zorluğunun farkında olup önerileri ve cesaretlendirmeleriyle anabilimdalı başkanımız **Prof. Dr Ayşe Diljin KEÇECİ'** ye teşekkürü bir borç bilirim. Doktora eğitimime katkıda bulunan **Doç. Dr. Murat MADEN'** e, **Doç. Dr. Gül ÇELİK ÜNAL'** a, **Doç. Dr. Nejdet ADANIR'** a ve **Yrd. Doç. Dr. Feyza ÖZDEMİR KISACIK'** a teşekkür ederim. Deney aşamalarındaki yardımlarından dolayı kıymetli arkadaşlarım **Dr. İ. Furkan ERTUĞRUL'** a ve **Dt. Erdal SARITEKİN'** e; doktora eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **Dt. Aml TEKE**, **Dt. C. Emre ERİK**, **Dt. Arife YARAN** ve tüm Endodonti AD ailesine teşekkür ederim. Tez projeme maddi destek sağlayan **TUBİTAK (Proje No: 114S836)** ve **ÖYP'ye (Proje No: ÖYP05238-DR-12)** ayrıca teşekkür ederim. Hayatım boyunca sonsuz sevgilerini ve özverilerini bir an bile eksik etmeden, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren **aileme** ve hayatımın her anını farklı hissettiren, her şeyiyle beni tamamlayan, sevgisini, desteğini yardımlarını eksik etmeyen sevgili eşim **Yasemin ÇİÇEK'** e sonsuz teşekkür ederim.

Emre ÇİÇEK

Isparta/2015

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	ii
BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pulpa.....	4
2.1.1. Pulpanın Fonksiyonları.....	4
2.1.1.1. İndüksiyon.....	4
2.1.1.2. Oluşum.....	4
2.1.1.3. Beslenme.....	5
2.1.1.4. Savunma.....	5
2.1.1.5. Duyu.....	5
2.1.2. Pulpanın Hücreleri.....	5
2.1.2.1. Rezerv hücreler (farklılaşmamış mezenşimal hücreler).....	5
2.1.2.2. Fibroblastlar.....	6
2.1.2.3. Savunma Hücreleri.....	7
2.1.2.3.1. Makrofajlar ve Histiositler.....	7
2.1.2.3.2. Polimorfonükleer Lökositler.....	7
2.1.2.3.3. Lenfositler	8
2.1.2.3.4. Mast Hücreleri.....	9
2.1.2.4. Odontoblastlar.....	10
2.1.3. Pulpanın Fibrilleri ve Anayapı.....	11

2.2 İrritanlar.....	11
2.2.1. Mekanik İrritanlar.....	11
2.2.2. Kimyasal İrritanlar.....	12
2.2.3. Mikrobiyal İrritanlar.....	12
2.3. Virülans faktörleri	13
2.3.1. Lipopolisakkarit (LPS)	13
2.3.2. Peptidoglikan	15
2.3.3 Lipoteikoik asit (LTA).....	15
2.3.4. Fimbriya.....	15
2.3.5. Kapsüller.....	15
2.3.6. Ekstrasellüler Veziküller.....	15
2.3.7. Ekzotoksinler.....	16
2.3.8. Ekstraselüler proteinler	16
2.3.9. Kısa zincirli yağ asidi.....	16
2.3.10. Poliaminler.....	16
2.3.11. Süperoksit anyon.....	16
2.4. Enfeksiyon Yolları.....	17
2.4.1. Dentin tübülleri.....	17
2.4.2. Açık kavite.....	17
2.4.3. Periodontal membran.....	17
2.4.4. Anakorezis.....	17
2.4.5. Hatalı Restorasyon.....	18
2.4.6. Yayılma.....	18
2.5. Pulpanın Enflamasyonu	18
2.5.1. Pulpadaki Hemodinamik Değişiklikler.....	20
2.5.1.1. Vasküler Permeabilite	20
2.5.1.2. Kan Akımı.....	21
2.5.1.3. İnterstisyel Sıvı Basıncı.....	21

2.5.2. Nöronal Değişiklikler.....	22
2.6. Enflamatuvar Mediyatörler.....	23
2.6.1. Araşidonik Asit Metabolitleri ve Prostaglandinler.....	23
2.6.2. Nöropeptidler.....	24
2.6.3. Sitokinler.....	26
2.6.4. Bradikinin.....	28
2.6.5. Histamin.....	29
2.7. Endodontide Ağrı ve Ağrının Algılanması.....	29
2.8. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	30
2.8.1. Antioksidan Savunma Sistemi.....	32
2.8.1.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	32
2.8.1.1.1 Süperoksit Dismutaz.....	32
2.8.1.1.2 Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	33
2.8.1.1.3 Katalaz (CAT).....	34
2.8.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	34
2.8.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehid (MDA).....	34
2.9. Benfotiamin.....	35
2.9.1. Benfotiaminin Farmakokinetiği	37
2.10. Ratlar.....	38
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3. 1. Deney Hayvanları.....	41
3.2. Deney Grupları.....	43
3.3. Deneysel Pulpitis Modelinin Oluşturulması.....	43
3.4. Benfotiaminin hazırlanması ve uygulanması.....	44
3.5. Hayvanların Ötenazisi.....	49
3.6. Örneklerin Hazırlanması.....	49
3.7. Histopatolojik Değerlendirme.....	49
3.8. İmmünohistokimyasal Analiz.....	50

3.9. İstatistiksel Analiz.....	51
4.BULGULAR	52
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	52
4.1.1. Ön Çalışmaya ait Histopatolojik Bulgular.....	52
4.1.2. Histopatolojik Bulguları.....	54
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	56
4.2.1. İmmünohistokimyasal Bulgular (CGRP).....	56
4.2.2. İmmünohistokimyasal Bulgular (IL-6).....	57
4.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular (PGE2).....	58
4.2.4. İmmünohistokimyasal Bulgular (SOD, MDA).....	59
4.3.5. İmmünpozitif Hücre Ortalamaları.....	62
5. TARTIŞMA.....	101
5.1. Çalışmada kullanılan antienflamatuvar ve antioksidan ajanın seçimi.....	101
5.2. Antienflamatuvar ve antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin seçimi.....	102
5.3. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi	105
5.4. CGRP için İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi.....	107
5.5. IL-6 için İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi.....	110
5.6. PGE2 için İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi.....	112
5.7. SOD ve MDA için İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi.....	114
6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	116
ÖZET.....	119
ABSTRACT.....	120
KAYNAKLAR.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	146
EKLER.....	147
Etik Kurul İzni.....	147

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans analizi
BK	: Bradikinin
CAT	: Katalaz
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
COX	: Siklooksijenaz
Cu	: Bakır
CuZn-SOD	: Bakır Çinko-Süperoksit dismutaz
DAP	: 3,3 diaminobenzidine
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon reduktaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Glutatyonun okside formu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HE	: Hemotoksilen eozin
IFN	: İnterferon
IFNγ	: İnterferon gama
IL	: İnterlökin
LOX	: Lipoksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
LTA	: Lipoteik asit
MDA	: Malondialdehid

Mg	: Magnezyum
MMP	: Matriks metalloproteinaz
Mn	: Manganez
Mn-SOD	: Manganez-Süperoksit dismutaz
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NKA	: Nörokinin A
NPY	: Sempatik fibrillerden nöropeptid Y
NSAİİ	: Non-steroid antienflamatuvar ilaçlar
PAF	: Platelet aktive eden faktör
PBS	: Fosfat–Buffer Solusyonu
PG	: Prostaglandin
PGE2	: Prostaglandin E2
PKC	: Protein kinaz C
PNL	: Polimorfonükleer lökosit
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
Se	: Selenyum
SOD	: Süperoksit dismutaz
SP	: P maddesi
SR	: Serbest radikal
Tc	: Sitotoksik T hücreleri
TGF	: Transforming büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktör
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör

VIP : Vazoaktif intestinal polipeptit

Zn : Çinko

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Ramların bazı fizyolojik değerleri.....	40
Tablo 2: Çalışmada kullanılan rat ağırlıkları ve bu ağırlıklara göre hesaplanan anestezi ve benfotiamin uygulama dozları.....	42
Tablo 3: Deney Grupları.....	44
Tablo 4: Histopatolojik skora kriterleri.....	50
Tablo 5: Grupların zamana göre ortalama histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama skorları	62
Tablo 6: Gruplara ve zamana göre immünpozitif hücre tiplerinin dağılımı (%).....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Araşidonik asit metabolitlerinin sentezlenmesi.....	24
Şekil 2: Tiaminin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 3: Benfotiaminin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 4: McClanahan enflamasyon skorlarının gruplara göre dağılımı.....	55
Şekil 5: Gruplara göre CGRP (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.....	57
Şekil 6: Gruplara göre IL-6 (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.....	58
Şekil 7: Gruplara göre PGE2 (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.....	59
Şekil 8: Gruplara göre SOD (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.....	60
Şekil 9: Gruplara göre MDA (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.....	61

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Rat keser dişleri ve dudakları.....	39
Resim 2: Rat ağırlıklarının ölçülmesi.....	45
Resim 3: Intraperitoneal anestezi uygulaması.....	45
Resim 4: Deney protokolünün uygulandığı ortam.....	46
Resim 5: Parmak sıkıştırma testiyle anestezi kontrolü.....	46
Resim 6: Alt ve üst rat keser dişlerinde izolasyon ve pulpa kavitelerinin hazırlanması.....	47
Resim 7: Pulpa enflamasyonunun indüklenmesinde LPS uygulaması.....	47
Resim 8: Pulpa kavitelerinin geçici dolgu maddesi ile kapatılması.....	48
Resim 9: Oral (gavaj yöntemi) benfotiamin uygulaması.....	48
Resim 10: Ön çalışma örnekleri.....	52
Resim 11: Pulpadan geçmeyen defekt (yıldız).....	53
Resim 12: Pulpadan geçen defekt (yıldız) ve pulpitis oluşumu.....	53
Resim 13: Resim 3'ün yakından görünümü, pulpitis oluşumu.....	54
Resim 14: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü.....	63
Resim 15: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü.....	63
Resim 16: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü.....	64
Resim 17: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü.....	64
Resim 18: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü.....	65
Resim 19: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü.....	65
Resim 20: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü.....	66
Resim 21: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü.....	66
Resim 22: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü.....	67
Resim 23: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	67

Resim 24: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	68
Resim 25: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	68
Resim 26: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	69
Resim 27: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	69
Resim 28: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	70
Resim 29: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	70
Resim 30: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	71
Resim 31: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması.....	71
Resim 32: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	72
Resim 33: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	72
Resim 34: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	73
Resim 35: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	73
Resim 36: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	74
Resim 37: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	74
Resim 38: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	75
Resim 39: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	75
Resim 40: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması.....	76

Resim 41: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	76
Resim 42: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	77
Resim 43: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	77
Resim 44: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	78
Resim 45: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	78
Resim 46: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	79
Resim 47: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	80
Resim 48: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	81
Resim 49: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması.....	82
Resim 50: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	83
Resim 51: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	84
Resim 52: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	85
Resim 53: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	86
Resim 54: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	87
Resim 55: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	88
Resim 56: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	89
Resim 57: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	90

Resim 58: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması.....	91
Resim 59: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	92
Resim 60: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	93
Resim 61: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	94
Resim 62: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	95
Resim 63: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	96
Resim 64: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	97
Resim 65: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	98
Resim 66: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	99
Resim 67: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması.....	100

1. GİRİŞ

Dişin damar-sinir paketini içinde bulunduran pulpanın enflamasyonuna pulpitis adı verilir. Pulpada bir iltihabın oluşumuna neden olan etiyolojik etkenler mikrobiyal, fiziksel, kimyasal veya iyatrojenik nitelikte olabilir (1, 2).

Dental pulpada enflamasyonun başlaması ile birlikte sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer enflamatuvar medyatörler fibroblastlar, endotel hücreleri ve immün hücreler tarafından salgınmaya başlar. Sağlıklı pulpada interlökin-1 α (IL-1 α), ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gözlenebilirken enflamasyon varlığında interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 β (IL-1 β), prostaglandin E2 (PGE2), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi moleküller de gösterilmiştir. Bu moleküller enflamasyonun yayılması ve yara iyileşmesi aşamalarında önemli rol oynarlar (3).

Sitokinler; lökositler, nöronlar ve glia hücreleri gibi değişik hücre tipleri tarafından sentezlenen ve salgılanan düzenleyici proteinlerin diğer bir grubudur. Özellikle TNF- α ve interlökinlerden IL-1 β , IL-6 ve IL-8' in hiperaljeziye öncülük eden ve enflamasyonlu dokuları innerve eden nosiseptörlerde meydana gelen nöroplastik değişikliklerde rol oynadığı düşünülür (4).

Duysal ve otonomik sinirler uyarıldıklarında ortama nöropeptid adı verilen biyolojik olarak aktif peptidler salarlar. Bu nöropeptidler nöral aktivitede önemli role sahiptir. Pulpada periferel duysal fibrillerden (A γ ve C fibrilleri) kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP), P maddesi (SP) ve nörokinin A (NKA); sempatik fibrillerden nöropeptid Y (NPY) salgılanmaktadır. Dental pulpada CGRP üreten sinir fibrilleri SP üreten sinir fibrillerinden 4 kat daha fazla bulunmaktadır. CGRP üreten duysal sinir fibrilleri sıklıkla odontoblast tabakasına, predentine ve dentin tübüllerinin 100 μ m kadar içerisine kadar uzanırlar (3). CGRP ve P maddesinin benzer etkileri vardır. CGRP'nin başlıca etkisi nötrofil kemotaksisini kolaylaştırmasıdır. CGRP ve SP; mast hücrelerini, polimorfonükleer lökositleri (PNL), monositleri ve fibroblastları olay yerine davet eder. Endotel hücrelerinin büzüşmesiyle damar permeabilitesini artırır. CGRP damarlar üzerine vazodilatör etkilidir (3, 5).

Pulpada enflamasyonun başlamasını takiben şiddeti arttıran ve aynı zamanda ağrıya sebep olan medyatörler salgılanmaktadır. Bu medyatörler arasında en iyi bilinenleri, siklooksijenaz (COX) enzim sistemi aracılığıyla araşidonik asitten elde edilen prostaglandinlerdir (PG). COX-1, böbreklerdeki kan akımının düzenlenmesi, tromboksan A2' nin oluşumu gibi fonksiyonları olan PG' leri üretir (4, 6). COX-2 enflamasyonlu dokularda sentezlenir, proenflamatuvar PG'lerin üretiminde önemlidir. Tek başına ağrı oluşturamamasına rağmen, PG'lerin periferik nosiseptörleri duyarlılaştırdığı bilinir (4). Bu yüzden enflamasyonlu pulpa ve periradiküler dokulardaki PG konsantrasyonunun benfotiaminle azaltılması sağlanırsa enflamasyonun şiddeti ve postoperatif ağrının azalabileceği düşünülmektedir.

Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (7). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubunu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevirerek hücre içindeki serbest radikal düzeylerini azaltır. Organizmada bir antioksidan olarak görev yapar (8, 9).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden birisi malondialdehid' (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (10-13). Pulpal enflamasyonda SOD ve MDA miktarlarının arttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (14-17).

Benfotiamin, B1 vitamininin yağda eriyebilen bir formudur. Tiamin (vitamin B1) suda çözündüğünden dolayı uzun süre vücutta depolanamaz ve hızla idrar

yoluyla atılır (18, 19). Benfotiamin hücre zarından geçebilmesini sağlayan açık tiyazol halkasına sahiptir (20). Benfotiaminin oral uygulaması kan ve dokulardaki tiamin seviyelerini suda çözünen formlarından daha fazla artırır (19, 20). Antioksidan etkileri olduğu (20-22), aynı zamanda fosfolipaz A2, COX-2, lipoksijenaz-5'in inhibisyonuna neden olduğu PGE2, tromboksan A2, prostasiklin sentezini önlediği ve antinositif etkinliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (23, 24).

Hastalar sıklıkla pulpa ağrısı şikayeti ile endodonti kliniklerine başvurmakta ve pulpitis teşhisi konulmaktadır. Pulpa enflamasyonunun derecesi klinik testler ile tam olarak değerlendirilemez, ancak histolojik incelemeler ile enflamasyonun derecesi belirlenebilmektedir. Etrafi sert doku ile çevrili pulpada enflamasyon damar sinir paketinin hızla zarar görmesi ile şiddetlenmekte ve pulpanın canlılığını tamamen kaybetmesi ile sona ermektedir. Enflamasyonun başlamasını takiben kullanabilecek antiinflamatuvar bir ajanın enflamasyon şiddetini baskılayarak pulpada meydana gelebilecek hasarı ve beraberinde ağrı medyatörlerinin salgılanmasını azaltabileceği düşünülmektedir. Pulpa enflamasyonunun baskı altına alınabilmesi belki de halen tam olarak sağlığını kaybetmeden kalabilmiş pulpa dokusunun kendini tamir edebilme şansını artıracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulpa

Pulpa, kendisini mikroorganizmalarca zengin ağız ortamından koruyan ve ona güçlü bir destek sağlayan dentin, mine ve sement içerisindeki boşluğa yerleşmiş dokudur (25). Pulpa nöral krest hücrelerinden kaynaklanır (ektomezenşimal). Bu hücrelerin proliferasyonu ve yoğunlaşması ilerde olgun pulpayı oluşturacak dental papilin meydana gelmesine öncülük eder. Olgun pulpa ana yapı, fibriller, iyi farklılaşmış odontoblast hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücrelerden oluşmuştur. Bu yapıyla bağ dokusuna büyük benzerlik gösterir (26).

Pulpa temel olarak 4 bölgede incelenebilir. En merkezde santral bölge bulunur. Bu bölge gevşek bağ dokusu içerisinde damar ve sinirleri barındırır. Farklılaşmamış mezenşim hücrelerini ve fibroblastları içeren hücreden zengin tabaka santral bölgenin etrafına yerleşmiştir. Hücreden fakir bölge (subodontoblastik bölge) hücreden zengin bölgeyi çevreler ve kalınlığı zamanla azalır, dentin yapımının hızla devam etmesiyle ortadan kaybolabilir. Pulpanın dördüncü bölgesi ise odontoblast tabakasıdır, odontoblast hücrelerini içerir (27).

2.1.1. Pulpanın Fonksiyonları

2.1.1.1. İndüksiyon

Pulpa dentin oluşumunun başlangıcına ve gelişimine katılır. Mine epiteli odontoblastların farklılaşmasını indükler, odontoblastlar ve dentin ise mine oluşumunu başlatır. Bu süreçler birbirine bağlıdır ve sonuçta diş gelişimi tamamlanır (28).

2.1.1.2. Oluşum

Dentin, pulpada bulunan odontoblast hücreleri tarafından oluşturulur. Diş gelişimi sırasında dentin daha hızlı sentezlenir (primer dentin). Diş olgunlaştıktan sonra, dentin daha az miktarda ve asimetrik olarak üretilmeye devam eder (sekonder dentin). Çürük, dental girişimler, travma gibi sebeplerle odontoblastlarda yaralanma

meydana gelebilir. Bu yaralanmaya cevap olarak yaralanma bölgesinde odontoblast hücreleri tarafından daha az organize olmuş dentin salgılanır. Buna tersiyer dentin adı verilir. Yaralı odontoblastlar tarafından üretilen reaksiyoner tersiyer dentin ve farklılaşmış kök hücreler tarafından üretilen tamir dentini olmak üzere iki türü vardır (28).

2.1.1.3. Beslenme

Pulpa kendi bütünlüğünü korumak ve canlılığını sürdürebilmek için ve dentin yapımında gerekli besinleri sağlar (28).

2.1.1.4. Savunma

Çürük, erezyon, travma, restoratif işlemler gibi sebeplerle dişte dentin kaybı meydana gelebilir veya pulpa açığa çıkabilir. Bu gibi durumlarda odontoblastlar tarafından dentin üretilerek pulpa savunulmaya çalışılır. Pulpa aynı zamanda yabancı cisimleri, bakterileri ve toksinlerini tanıyarak bu maddelere karşı immün yanıtın oluşmasını sağlar. İnsan dişi dentin tübüllerine bakteri invazyonuna karşı; canlı dişlerin kanal tedavili dişlere göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir (28, 29).

2.1.1.5. Duyu

Pulpa dişe gelen fizyolojik uyarılara cevap verebilir. Bu uyarılar dişte ağrı hissine neden olur. Pulpada miyelinli ve myelinsiz duyuşal sinir lifleri bulunur. Miyelinli A tipi δ sinir lifleri ani ve keskin ağrıdan sorumluyken miyelinsiz C lifleri künt ve yavaş ağrıdan sorumludur (1, 28).

2.1.2. Pulpanın Hücreleri

2.1.2.1. Rezerv hücreler (farklılaşmamış mezenşimal hücreler)

Hücreden zengin tabakada kan damarları boyunca görülen bu hücreler gereksinime göre pulpadaki olgun hücre tiplerinin birçoğuna dönüşebilir. Frank bu hücrelerin bir miktar kollajen ürettiğini kanıtlamıştır (30). Baume bu hücreler ile odontoblastlar arasında bazı bağlantıların olduğunu ve odontoblastlarda yaralanma, ölüm meydana geldiği zaman bu bağlantılar aracılığıyla rezerv hücrelerin

odontoblastlara veya odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabileceğini bildirmiştir (31). İltihap esnasında makrofajlara veya odontoklastlara dönüşebilirler. Kuafaj tedavisinde kuafaj materyalinin altında odontoblast benzeri hücrelere dönüşürler ve gerçek bir dentin olmasa da dentine benzer kalsifiye doku yaparlar. Atrisyon, abrazyon, restorasyon, çürük gibi durumlarda tübül tabanlarında da bu hücreler gözlemlenmiştir (27, 32).

2.1.2.2. Fibroblastlar

Pulpada en fazla görülen hücrelerdir. Odontoblastlar gibi mezenşimden köken alırlar. Fusiform şeklinde olup oval çekirdeklere sahiptir. Bu hücreler glikozaminoglikan ve proteoglikanların yanısıra tip 1 ve tip 3 kollajen sentezlerler. Böylece pulpadaki hücre dışı bileşenlerin çoğunu sentezler ve salgılar (33). Weinstock ve Leblond klasik otoradyografi ile kollajen sentezlenme sürecini ve fibroblastlar tarafından salgılanmasını göstermiştir (34). Fibroblastlar kollajen sentezinin yanı sıra lizozomal enzimleriyle fazla kollajenin ortadan kaldırılmasını da sağlarlar (35). Kobay ve insan pulpalarında iyi gelişmiş organeller ve pürüzlü yüzeyli endoplazmik retikulumlar gözlenmiştir. Ribozomlar sıralar ve kümeler oluşturmuştur. Golgi aygıtı fazla gelişmiş olup çok sayıda vesikül ve vakuoller gösterir. Büyük mitokondriye sahiptirler (36, 37). Kan damarları, sinirler ve kollajen fibrillerindeki artışla pulpadaki fibroblastların sayısında göreceli bir azalma olur (33).

Pulpal fibroblastların pulpada sinyal yollarında aktif rol aldığı görülmüştür. Örneğin; fibroblastların büyümesi ve sentezlenmesi nöropeptidler aracılığıyla uyarılır, sonrasında fibroblastlar enflamasyon sırasında sinir büyüme faktörü (NGF) ve proenflamatuvar sitokinleri salgılar. NGF, yaralanmaya karşı olası odontoblast ve sinirsel cevabın düzenlenmesinde rol alır (38).

2.1.2.3. Savunma Hücreleri

2.1.2.3.1. Makrofajlar ve Histiositler

Kan damarları etrafındaki farklılaşmamış mezenkimal hücreler uygun uyarılma altında sabit veya dolaşan histiositlere dönüşebilir (Stanley HR). Dolaşan histiositler yani makrofajlar damarlardan göç eden monositlerden de farklılaşabilir. Bu hücrelerin yüksek fagositik özellikleri vardır. Bakterileri, ölü hücreleri, yabancı cisimleri ve diğer debrisleri ortadan kaldırırlar (39).

Makrofajlar; bakteri ve bakteri ürünleri, interferon γ ile aktive olabilir. Lizozomal enzimler, koagülasyon faktörleri, biyoaktif lipidler, reaktif oksijen ürünleri, kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve anjiogenez faktörleri gibi farklı ürünleri üretirler. Başlıca görevleri arasında yabancı cisimler ve mikroorganizmaların fagositozu, enflamatuvar medyatörlerin üretimi, enflamatuvar cevabın başlatılması, nekrotik hücre ve doku artıklarının temizlenmesi, sistemik etkilerin (ateş, akut faz reaksiyonu, kaşeksi) indüklenmesi, antibakteriyel ve antiviral savunma ile yara iyileşmesindeki vasküler gelişimde etkili molekül ve sitokinlerin sentezi yer alır. Ömürleri birkaç haftadan birkaç aya kadar değişebilir. Makrofajlar hücre yüzeyindeki kompleman C3b ve IgG'nin Fc fragmanları için bulunan reseptörler ve toll-like reseptörler aracılığıyla mikroorganizmaları tanırlar (40).

2.1.2.3.2. Polimorfonükleer Lökositler

Pulpa enflamasyonunda bazofil ve eozinofiller tespit edilmiş olmasına rağmen en baskın görülen lökositler nötrofillerdir. Nötrofiller normalde sağlıklı pulpada bulunmamalarına rağmen yaralanma anında yakın bölgedeki kapiller ve venüllerden hızlıca göç ederler (41).

Polimorfonükleer lökositler kemik iliği kök hücrelerinden köken alır. Nötrofillerin sitoplazmalarında lobüler çekirdekleri ile primer (elastaz, myeloperoksidaz) ve sekonder (lizozim ve diğer proteazlar) granülleri bulunur. Nötrofiller sadece kan dolaşımında bulunurlar. Perivasküler bölgeye kan damarları

aracılığıyla ilk göç eden lökositlerdir ve doğrudan hasarlı bölgeye yönelirler. 24 ile 48 saat arasında en yüksek düzeye ulaşırlar.

Kan damarlarından perivasküler bölgeye nötrofilik lökositlerin göçü kompleks bir hücresel ve moleküler biyoloji ile açıklanabilir. Vazodilatasyonu ve artmış vasküler permabilitiyi takiben damar içinde lökosit marjinasyonu, yuvarlanması (rolling), yapışma (capture) ve aktivasyonu ile sonrasında damar dışına göçü lökosit (L-selektin, integrin) ve endotel üzerindeki (P ve E selektin, ICAM, VCAM, PECAM-1) moleküller aracılığıyla meydana gelir. Nötrofil yuvarlanması (gevşek tutunma) endotel hücre yüzeyindeki P-selektin ile lökosit selektin ligandları arasındaki etkileşimle meydana gelir. Lökosit yapışması ise endotel yüzeyindeki ICAM, VCAM ile L- integrin arası etkileşim sonucu gerçekleşir. Lökosit geçişi ise hem endotel hücreleri hem de lökosit üzerinde bulunan PECAM-1 arasındaki etkileşim ile oluşur. Nötrofiller; kemokinler (IL-8), bakteriyal ürünler, C3a, C5a, lökotrien B4, platelet-aktive edici faktör ve ölü hücreler aracılığıyla doğrudan uyarılabilirler (40).

Nötrofilik lökositler kısa ömürlü olup, ömürleri birkaç saat ile birkaç gün arasındadır. Çoğu nötrofil lökosit akut enflamatuvar cevapta apoptozisin bir sonucu olarak ölürler. Apoptozise uğrayan nötrofiller makrofajlar tarafından fagosite edilirler (42). Ancak bazı nötrofilik lökositler mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadele sonrasında ölür ve intraselüler proteolitik lizozomal enzimler, oksijen kaynaklı aktif metabolitler, nitrik oksit, proinflamatuvar sitokinler, eikazonoidler ve metalloproteinazlar doku içerisine salınır ve doku hasarına sebebiyet verirler. Nötrofil lökositlerin temel fonksiyonları; fagositoz, bakterilerin öldürülmesi, enfeksiyonun yayılmasını önlemek ve daha fazla lökositin ortama çağırılmasını sağlamak amacıyla enflamatuvar medyatörlerin salgılanmasını uyarmaktır (40).

2.1.2.3.3. Lenfositler

Lenfositler, antijene özgül cevap verebilen 6-10 µm büyüklüğünde hücrelerdir. Enflamasyonla birlikte dokudaki yoğunlukları artar. Yüzeylerinde immun haberleşmede kullandıkları CD (cluster of differentiation) adı verilen özel reseptörleri vardır. Lenfoid hücreler doğumdan önce karaciğer ve kemik iliğinde;

doğumdan sonra primer lenfoid organlarda olgunlaşırlar. T hücreleri timusta, B hücreleri kemik iliğinde farklılaşmakta ve olgunlaşmaktadır. Olgunlaşan lenfositler kan dolaşımı ile sekonder lenfoid organlara yerleşirler (5, 43).

B lenfositler, toplam lenfositlerin %5-15'ini oluşturur. B lenfositlerin belirteçleri olarak CD19, CD20, CD22 molekülleri kullanılmaktadır. B lenfositler antijenik uyarı sonrası plazma hücrelerine dönüşür ve immünglobulinleri (Ig) salgılar (43). Her gruptan antikoru sentezleyip salabilmekle birlikte yüzeylerinde sadece IgM ve IgD tipinde antikor taşırlar. Antijen ile karşılaştıklarında kendilerine herhangi bir sunulma olmadan IgM tipinde antikor salgırlar. Humoral bağışıklıktan sorumludur (5).

Timusta pre T hücreleri CD-2, CD-5, CD-7 taşıırken, olgun T lenfositleri CD4 ve CD8 olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Olgun T lenfositlerinin %75'i helper (CD4) %25'i sitotoksik (CD8) T hücreleridir. Bu hücreler postkapiller venül yoluyla dolaşıma geçerler (43) . T helper hücreler ise Th-1 ve Th-2 olarak sınıflandırılırlar. Th1 hücreler IL-2 ve IFN- γ salgılayarak sitotoksik T hücresi ve gecikmiş aşırı duyarlılık yanıtı gibi fonksiyonları güçlendirici işlevler görürler. Th-2 ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 sentezleyerek B hücre yanıtlarını düzenler. T lenfositler hücre sel bağışıklıktan sorumludur (44). T lenfositlerin (özellikle süpresor T8 lenfositler) normal insan diş pulpasında bulunduğu tespit edilmiştir (45). Etkilenmiş pulpada da lenfositlerin varlığı gözlenmiştir (46). B lenfositler normal pulpada çok nadir bulunurlar (40).

Doğal öldürücü hücreler (natural killer, NK) CD16, CD56 yüzey antijeni eksprese eden büyük granüler lenfositlerdir. Virüsle enfekte hücreleri veya tümörleri doğrudan sitotoksik etki ile öldürmektedir. NK hücreleri ayrıca antikora bağlı hücre sel sitotoksisiteyi de düzenlemektedir (47).

2.1.2.3.4. Mast Hücreleri

Sağlıklı pulpada nadiren (48), enflamasyonlu pulpada daha yaygın görülür (49, 50). Histamin içeren granülleri vardır ve enflamasyon sırasında bu granüllerini etrafındaki doku sıvısına bırakır (49). Histamin damar düz kaslarında vazodilatasyon

yapar ve damar permeabilitesini artırır. Böylece doku sıvısı ve lökositlerin geçişi kolaylaşır (32).

2.1.2.4. Odontoblastlar

Odontoblastlar hem diş gelişiminde hem de ömür boyu dentin yapımından sorumlu olan, dentin pulpa kompleksinin en tipik ve özelleşmiş hücreleridir. Dentinogenezis sırasında dentini ve dentin tübüllerini oluşturur. Dentin tübüllerinde bulunmaları dentini yaşayan, duyarlı bir doku yapar (51, 52).

Odontoblastlar, osteoblastlar ve sementoblastlar pek çok açıdan benzerlik gösterirler. Hepsi de kollajen fibriller, kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanlar içeren ve sonrasında mineralize olacak bir matris üretirler. Bu hücrelerin gelişmiş granüllü endoplazmik retikulumları, belirgin bir golgi kompleksi, granülleri ve çok sayıda mitokondrileri vardır. Ayrıca bol RNA içerirler ve çekirdekleri bir veya daha çok çekirdekçikten oluşur. Bu özellikler protein salgılayan çoğu hücrede bulunur (33).

Odontoblastlar, osteoblastlar ve sementoblastlar arasındaki temel fark ise morfolojik yapılarında ve ürettikleri mineralize yapıdadır. Osteoblastlar ve sementoblastlar çokgen ve kubik formda iken koronal pulpada tam gelişmiş bir odontoblast uzun kolumnar bir hücredir. (53, 54). Osteoblastlar ve sementoblastlar salgıladıkları matris içinde hapsolarak osteosit ve sementosit adını alır. Odontoblastların gövdeleri ise mineralize dokunun dışındadır (33).

Odontoblastlar son derece diferansiye olmuş hücrelerdir bu yüzden bölünemezler. Koronal bölgede sayıları fazladır, apikaldekilere nazaran daha silindirik ve büyüktür. Kökün orta bölgesinde kısa silindirik şekilde olup apikale gittikçe yassılaşmaya başlarlar. Hücre gövdeleri predentin sınırındadır, uzantıları ise dentin kanalcıklarında seyrederek değişik mesafelere uzanabilir (27, 28). Odontoblastlar çeşitli şekillerde birbirleriyle bağlantı gösterirler. Bu bağlantı şekilleri:

- Sıkı Bağlantılar (tight junctions): Sıkı bağlantı bölgelerinin esas görevi bir grup doku hücrelerinin iç ortamını dış ortamdan farklı tutarak geçirgenliği engellemektir.

- Desmozomal Bağlantılar (spot desmosom): Hücreleri mekanik olarak birbirine bağlar, yapışık bir katman haline getirir, beraberce görev yapmalarını sağlar.
- Açık Bağlantılar (gap junctions): Hücreler arasındaki madde alışverişine olanak sağlar (27,28).

Odontoblastlar, ekstraselüler matrikste küçük miktarlarda tip V kollajen tespit edilmiş olsa da esas olarak tip I kollajen sentezlerler (55). Proteoglikan ve kollajenlere ilaveten dentin sialoproteini ve yüksek miktarda fosforlanmış bir fosfoprotein olan fosforin salgılar (56). Fosforin dentine hastır ve diğer mezenşimal hücre tiplerinde bulunmaz (57). Odontoblastlar aynı zamanda asit fosfataz ve alkalın fosfataz da salgılar. Görevleri tam olarak anlaşılamamış olsa da alkalın fosfatazın mineralizasyonla ilgili olduğu düşünülür. Lizozomal bir enzim olan asit fosfotazın ise predentin matriksden rezorbe olan maddelerin sindirilmesinde görev alabileceği düşünölmektedir (58).

2.1.3. Pulpanın Fibrilleri ve Anayapı

Tip I kollajen dentinde en fazla bulunan kollajendir. Bununla beraber pulpada Tip II kollajen de bulunur. Fibroblastlar pulpada Tip I ve Tip III kollajen yapmaktadırlar. Pulpada az miktarlarda Tip V kollajen de bulunmuştur (27, 28).

Vücudumuzun diğer bölgelerindeki bağ dokusuna benzer şekilde pulpanın ana yapısı da su, protein ve karbonhidrat komplekslerinden oluşmaktadır. Bu kompleksler hyaluronik asit, kondroidin sülfat ve diğer glikoproteinleri içeren glikozaminoglikanların kombinasyonundan oluşur (59, 60).

2.2 İrritanlar

2.2.1. Mekanik İrritanlar

Tedavi amacıyla yapmış olduğumuz çoğu dental girişim (kavite preperasyonu, ortodontik hareketler, periodontal küretaj vb.) pulpaya zarar verebilir. Sıcaklık, kavitenin derin olması, dehidratasyon, su soğutmasız olarak çalışmak pulpaya zarar verebilecek etkenlerdendir (60). Pin yerleştirme işlemleri, geniş

restorasyonlar sonrası dişlerde kırık ve çatlak oluşabilir. Asit uygulamaları ve adeziv diş hekimliği prosedürlerin uygulanmasıyla smear tabakası ortadan kalkarak bakterilerin dentin tübüllerine girmesine izin verilebilir (61,62)

Travma ve bunun sonucunda oluşan kırıklar mikroorganizmaların kök kanal sistemini enfekte etmesine veya kan akımını engelleyerek pulpanın nekrozuna sebep olabilir. Travmanın şiddetine, kök uçlarının kapanıp kapanmamış olmasına ve hastanın yaşına bağlı olarak pulpa canlı kalabilir (63).

2.2.2. Kimyasal İrritanlar

Diş hekimliğinde kullanılan dolgu maddelerinin içeriğinde bulunan hassasiyet gidericiler ve dentini sterilize etmede kullanılan ajanlar pulpanın kimyasal irritanları arasında bulunur. Dentin sterilizasyonunda kullanılan gümüş nitrat, fenol, öjenol gibi kimyasallar pulpada enflamatuvar etki oluşturabilirler (64).

2.2.3. Mikrobiyal İrritanlar

Bakteriyel enfeksiyonlar, pulpa ve periapikal hastalıkların en yaygın sebebidir (65, 66). Bakteriler diş çürükleri, dental anomaliler (dens invaginatus gibi), yan kanallar (67), dişte kırık veya çatlak (68), restorasyon ve diş arasındaki marjinal sızıntı (69) aracılığıyla pulpaya ulaşabilir. Pulpa boşluğunda pek çok farklı türde bakteri bulunabilse de anaerobik flora daha baskındır (65, 66).

Pit ve fissürlerdeki yüzeyel çürükler dahi pulpa enflamasyonuna sebep olabilir (64). Bakteri toksinleri, enzimler, antijenler, kemotoksinler, organik asitler ve doku yıkım ürünleri dentin tübülleri aracılığıyla pulpada irritasyon yapabilir (69).

Pulpa dokusu bakterilere maruz kaldığında bölgeye öncelikli olarak polimorfonükleer lökositler gelir ve likefaksiyon nekroz alanı oluşturur (70). Pulpanın açılmasını takiben mikroorganizmalar oluşan nekroz alanına yerleşir. Pulpa uzun süre bu şekilde iltihaplı kalabileceği gibi hızlı bir şekilde nekroz da olabilir. Bu durum bakterilerin virülansına, pulpa iç basıncındaki artışın engellenmesi için enflamatuvar sıvıları serbest bırakma yeteneğine, konak direncine, dolaşım miktarına ve lenf drenajına bağlıdır (71).

Sonuç olarak bakterilerin pulpa ve periradiküler hastalıklardaki payı büyüktür. Bakteriyel kontaminasyon olmadan pulpa ve periradiküler patolojinin gelişmeyeceği uzun yıllardan beri bilinmektedir (72, 73).

2.3. Virülans faktörleri

Bakterilerin endodontik enfeksiyonlarda rol almasını sağlayan enflamatuvar yanıt oluşturabilen belirli özellikleri vardır. Bu özellikleri virülans faktörleri olarak adlandırılır (74). Bazı virülans faktörleri aşağıda anlatılmıştır.

2.3.1. Lipopolisakkarit

Endotoksin olarak da bilinen Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakteri hücre duvarının bir parçasıdır (75). Başlıca 3 kısımdan oluşur. Bu bölgeler yapısı ve fonksiyonları itibariyle birbirinden ayrılır (76). Lipid kısmına lipid-A denir ve toksik özelliktedir. Oligosakkarit çekirdekler ve O-özümlü polisakkarit zincir diğer kısımlarıdır.

Dıştaki O-özümlü polisakkarit zincir genellikle 6 karbonlu şekerlerden oluşan, türe bağlı olarak sekiz farklı şeker içerebilen polimerize tekrarlayan birime sahiptir. Bu zincir, genellikle türe özümlü olmak üzere antijenik özellik gösterir. Oligosakkarit çekirdekler iç ve dış olmak üzere iki bölgeden oluşur, yaklaşık on şeker sahiptir. Dış bölge heksozlar veya heksozaminler gibi yaygın şekerleri içerirken iç bölge heptoz ve keto-deoksioktulozonat gibi sıradışı şekerleri içerir ve iyi muhafaza edilmiş bölgedir (76). Lipid A, LPS molekülünü dış membrana bağlayan kısımdır. Fosfatlar gibi bazı anyonik gruplar, lipid A ve iç kısım bölgelerinde bulunurlar (77). Lipid A, LPS'ye immünolojik ve endotoksik özellikler sağlar (76).

Yapısal özelliklerine göre LPS' nin 2 ana tipi vardır: düz tip ve kaba tip. Düz tip yukarıda bahsedilen 3 parçayı da içerirken, kaba tipte O-özümlü polisakkarit parça eksiktir (78). LPS bakteri hücre duvarının yapısında bulunur ve dışarıya salınmazlar. Bu yönüyle ekzotoksinlerden farklıdır. LPS bakteri lizisi meydana geldikten sonra ortama bırakılır (79) ve konak dokunun harabiyetine sebep olan mekanizmaların harekete geçirir. LPS, kompleman sistem aktivasyonuna, vasküler permabilite

artışına, vazodilatasyona, PNL ve makrofajların kemotaksisine ve etkinliğinin artmasına sebep olur (80) ve pulpa kaynaklı ağrı, periapikal enflamasyon, periapikal kemik yıkımı ile ilişkilendirilmektedir (81-83).

Apikal periodontitisli dişlerin pulpalarında yüksek seviyelerde LPS bulunduğu bildirilmiştir (84). LPS mononükleer fagositler başta olmak üzere pek çok enflamatuvar hücreyi TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi medyatörlerin üretilmesi ve salgılanması için uyarabilir (85-87).

LPS çeşitli çalışmalarda farklı doku ve hücreleri uyarak enflamatuvar cevabı başlatmak için kullanılmıştır. Takuda ve ark (2001) hücre kültürü çalışmalarında insan diş pulpa hücrelerini uyarmak için *Prevotella intermedia* LPS'sini kullanmışlar ve uyarılan hücrelerin daha fazla IL-6 sentezlediğini tespit etmişlerdir (86). Başka bir hücre kültürü çalışmasında, Yadav ve ark (2010) *Escherichia coli* LPS'si ile uyarılan makrofajların kaspaz-3, reaktif oksijen ürünleri, NF- κ B, NO, PGE2 seviyelerini incelenmiş ve bu parametrelerde artış olduğunu rapor etmişlerdir (24).

Yadav ve ark (2009) subkutenoz LPS injeksiyonu yaparak gözde enflamasyon modeli oluşturmuşlardır. LPS uygulamasının gözde nötrofil infiltrasyonuna sebep olduğunu sitokinlerin, kemokinlerin, NF- κ B, NO ve PGE2 seviyelerinde artışı göstermişlerdir (88). Pita ve ark (2009) rat keser dişlerinde pulpalari ekspozede edecek şekilde açtıkları kavitelere LPS uygulamasının nitrik oksit sentaz, PGE2 ve matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) aktivitesinde artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir (89). Ohkura ve ark (2014) rat keser dişlerinin koronal kısımlarını kaldırdıktan sonra kalan kısımda 7 mm'lik kavite hazırlamışlar ve kavitelere 20mg/mL konsantrasyonunda LPS emdirilmiş 5 mm uzunluğundaki kağıt konları yerleştirerek pulpa enflamasyonunu başlatmışlardır. Nötrofil infiltrasyonunda ve PGE2 miktarında artış olduğunu rapor etmişlerdir (90). LPS' nin oksidatif stresi ve enflamasyonu başlatmak için iyi bir ajan olduğu yukarıdaki pek çok çalışmayla gösterilmiştir.

2.3.2. Peptidoglikan

Peptidoglikan gram pozitif hücre duvarının önemli bir bileşenidir. Hücre parçalandıktan sonra serbest kalır ve immün sistemle etkileşir. T hücrelerinde proenflammatuvar ve antienflammatuvar sitokinlerin uyarılmasına neden olur (91). Peptidoglikan virülans etkisi LPS varlığında güçlenir (92).

2.3.3 Lipoteikoik asit (LTA)

Gram pozitif bakterilerin bir hücre duvarı bileşenidir (93). LTA patojenik özellikleri bakımından LPS'lere benzerlik gösterir (94). LTA hücrenin parçalanması sonucu serbest kalır ve hedef hücrelere bağlanarak, kompleman kaskadını aktive eder doku hasarına sebep olur (74).

2.3.4. Fimbriya

Fimbriya birçok gram negatif bakteri yüzeyinde bulunan uzun, filamentli makromoleküllerdir. Fimbriya diğer bakterilerle etkileşime girmeye ve yüzeylere tutunmaya yarar (95).

2.3.5. Kapsüller

Kapsül genellikle polisakkaritler ve diğer maddelerden oluşmuş, hücre duvarı dış kısmında gayet iyi düzenlenmiş bir katmandır. Kapsüller fagositoz, bakteriyel virüsler ve deterjanlar gibi hidrofobik toksik maddelere karşı bakterilerin korunmasını kolaylaştırmak için hizmet vermektedir. Bakteriler ve mantarlar kompleman aktivasyonunu inhibe etmek ve fagositler tarafından yutulmasına direnmek için kapsül formasyonunu kullanırlar (74).

2.3.6. Ekstrasellüler Veziküller

Ekstrasellüler veziküller gram negatif bakteriler tarafından üretilir ve hücre dışı ortama kendi ürünlerinin salınmasına izin verir. İçeriği protein ve lipidlerdir (96).

2.3.7. Ekzotoksinler

Ekzotoksinler T hücrelerinin aşırı ve anormal aktivasyonunu tetikleyebilen canlı bir hücre tarafından salınan toksinlerdir (97). Bakteriyel toksinler diğer bakterileri hedef alabilir, bakteriler tarafından üretilen protein benzeri toksinler diğer bakterilere bakteriosid veya bakteriostatik olabilir (98).

2.3.8. Ekstraselüler proteinler

Bu hücre dışı proteinlerin çoğu bakteriler tarafından üretilen enzimlerdir. İmmünglobulin ve kompleman bileşenlerini nötralize eden proteazları içeren bu enzimler bakteriyel hücre parçalanması esnasında açığa çıkmaktadır ve enfeksiyonun yayılmasına katkıda bulunur (99). Hyaluronat liyaz, kondroitin sülfataz, beta glukuronidaz, DNaz ve asit fosfataz gibi enzimler dokuların bütünlüğünü kaybetmesine katkıda bulunur (74).

2.3.9. Kısa zincirli yağ asidi

Bunlar zorunlu anaeroblar tarafından gerçekleştirilen fermantasyon ürünleri olup, bütirik asit ve propiyonik asiti içerir. Bu asitler, enflamatuvar cevabı ve enflamatuvar sitokin üretimini uyarır (100, 101).

2.3.10. Poliaminler

Poliaminler sinüs yollarının oluşumu ve klinik ağrı gibi semptomların oluşumuna (perküsyon ağrısı dahil) katkıda bulunan putresin, kadaverin, spermidin ve spermin gibi küçük, polikasyonik moleküllerdir (102).

2.3.11. Süperoksit anyon

Süperoksit anyonlar biyolojik olarak toksiktirler ve çok reaktif serbest radikallerdir. Bunlar bazı bakteri türleri ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilmektedir. Eritrositlerin lizisine neden olurlar ve türler arası etkileşime katılırlar (103).

Bazı bakterilerin yüzey antijenleri genetik olarak farklılık gösterebilir böylece bu bakterilerin immun sistem tarafından tespit edilmesi zordur. Bu virülans

faktörlerinin tam olarak anlaşılması, endodontik enfeksiyonlarda tedavi hedeflerini belirlemeye yardımcı olur (74).

2.4. Enfeksiyon Yolları

Mikroorganizmalar pulpaya çeşitli yollarla ulaşabilmekte ve pulpayı enfekte edebilmektedirler. Bu yolları şu şekilde sıralayabiliriz (104).

2.4.1. Dentin tübülleri

Bakterilerin çapları dentin tübüllerinin çaplarından daha küçüktür. Bir çürük lezyonundan sonra veya dental işlemler sırasında, mikroorganizmalar pulpaya ulaşmak için dentin tübüllerini kullanabilirler. (105, 106). Çürük lezyonu ile pulpa sınırı arasındaki dentin mesafesi 0,2 mm veya daha az olduğunda da bakteriler pulpaya kolayca ulaşabilir (107).

2.4.2. Açık kavite

Kuron kırıkları gibi travmatik sebepler veya dental işlemler sonrası pulpayı örten bariyer ortadan kalkabilir ve pulpa ağız ortamıyla temas haline geçebilir. Mikroorganizmalarca zengin ağız ortamı pulpada enflamasyonu başlatabilir (74).

2.4.3. Periodontal membran

Mikroorganizmalar gingival sulkus ve periodontal membran yoluyla yan kanallardan veya apikal foramenden pulpa boşluğuna ulaşabilir (108).

2.4.4. Anakorezis

Geçici bakteriyemi sağlıklı bir bireyin normal bir günü boyunca herhangi bir sebepten oluşabilir. Çürük, travma veya dental işlemler sonrası pulpa ekspoz olmamasına rağmen kanda bulunan bakteriler diş pulpasına ulaşabilir. Bu durum ‘‘anakorezis’’ olarak bilinmektedir (109).

2.4.5. Hatalı Restorasyon

Geçici dolgu sızdırırsa, daimi restorasyondan önce diş yapısında bir kırılma olursa veya daimi restorasyon yetersizse bakteriler periapikal dokulara ulaşabilir. Guttaperka ve kanal patı ile doldurulmuş kanallarda 6 hafta içinde periapikal bölgeye okluzal bölgeden tükürük kontaminasyonunun olduğu gösterilmiştir (110).

2.4.6. Yayılma

Mikroorganizmalar enfekte diştten komşu dişe doğru göç ederek sağlıklı diş pulpasına ve/veya yan kanallarına ulaşabilir, böylece pulpayı enfekte edebilir (74).

2.5. Pulpanın Enflamasyonu

Bakteriyel, kimyasal ve mekanik sebeplerle pulpa zarar görebilir. Pulpa yaralanması hücre ölümü ve enflamasyonla sonuçlanabilir. Başlangıç çürükleri ve yüzeysel kaviteler gibi hafif ve orta seviyeli yaralanmalarda pulpa kendisini odontoblastlar tarafından yapılan sklerotik dentin ve tamir dentini ile savunur. Ancak uzamış irritasyonlar veya ciddi yaralanmalar odontoblastların ölümüne sebep olabilir ve pulpa enflamasyonunun şiddeti artabilir. Pulpanın enflamasyonu da periapikal dokuların ve vücudumuzdaki diğer bağ doku enflamasyonuna benzerlik gösterir. İrritasyonun şiddetine göre pulpanın yanıtı geri dönüşümlü pulpitisten nekroza kadar değişebilir. Bu durum ağrısız olarak da meydana gelebilir (111, 112).

Pulpa hastalıklarından sıklıkla bakteriler sorumlu tutulmuştur (72). Dental plakta bulunan karyojenik bakteriler ürettikleri asit ve enzimler aracılığıyla mine ve dentindeki mineralleri çözer sonrasında ise organik matriksi sindirir. Minerallerin çözünmesi mineyi daha geçirgen hale getirir ve bakteriler kavitenin derinliklerine daha kolay ilerler. Dentine ulaştıktan sonra öncelikli olarak bakteri toksinleri daha sonrasında bakterilerin kendileri dentin tübülünde ilerlemeye başlar. Mine ve dentin kalınlığı ile dentin tübüllerinin açıklık derecesi bu toksinlerin pulpaya ulaşma oranını belirleyecektir. Vital dişlerde bu harekete dentin sıvısının dışa doğru hareketiyle karşı konulmaya çalışılır. Ancak toksinler nihayetinde pulpaya ulaşabilir. Brannstrom ve Lind (1965) çekilmiş dişleri incelemişler ve dişlerin % 50' sinde

çürük olmamasına rağmen spot lezyonlara rastlamışlar ve histolojik olarak inceledikleri dişlerde enflamasyonun varlığını göstermişlerdir (113).

Dentin tübüllerinde ilerleyen bakteri toksinleriyle ilk temasa geçen hücreler odontoblastlardır. Bazı çalışmalarda enflamasyonun erken safhalarında odontoblast tabakasında yapısal değişiklikler tarif edilmiştir ancak bunların günümüzde histolojik kesit alma işlemlerinden kaynaklanan hatalar olduğu düşünülmektedir. Bugün odontoblastların toksinlere cevap olarak reaksiyona geçen dentin bariyeri yaptığını bilmekteyiz (114).

Hemotoksilen eozin boyamada dentritik hücreler ayırt edilemezken makrofajlar ve nötrofiller ayırt edilebilirler. Makrofajlar yabancı bir antijeni fark ettiğinde o antijenin detaylarını lenf nodlarına iletir. Ancak bu durum histolojik olarak gösterilemez. Dinlenme halindeki makrofajlar (monositler) büyür ve aktive olurlar. Nötrofiller kan damarlarından reaksiyon bölgesine doğru göç etmeye başlarlar. Nötrofiller ortamda biriken fagositik hücrelerin çoğunluğunu teşkil eder. Loblu çekirdekleriyle histolojik kesitlerde kolaylıkla fark edilebilirler (114). Bakteri ve ölmüş hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırırlar. Ancak bu sırada lizozomal enzimlerini etrafa saldıkları için sağlıklı çevre dokulara da zarar verirler (32). Örneğin fibrin ve kollajenin hidrolizinden oluşan yan ürünler artmış vasküler permeabiliteye ve vazodilatasyona sebep olan kininler gibi davranabilirler (115, 116). Mast hücreleri de ortamda bulunabilir ancak narin yapılarından dolayı rutin işlemler sırasında tespit edilebilmeleri zordur. Enflamasyonda vasküler ve nöronal değişiklikler de meydana gelir (117). Hemotoksilen ve eozin boyamada nöronlar iyi görülemez. Nöronların incelenmesi için ayrı teknikler kullanılır. Kan damarlarında damarsal değişiklikler gözlemlenebilir (114). Enflamasyon sırasında görülen damarsal ve sinirsel değişiklikler ayrı başlık altında anlatılacaktır.

İmmün yanıt, enflamatuvar cevaptan daha sonra aktive olan daha özgül bir savunma mekanizmasıdır. Eğer antijenle daha önce karşılaşılmağı ise birkaç gün içinde yeni lenfosit hatları oluşur. Pulpada antijen sunan hücreler (APC) MHC II'ler (*major histocompatibility complex class II*) aracılığıyla antijenik proteinleri yakalar ve lenf nodlarında antijene özgül T helper lenfositlere sunar. Aktive olan T helper hücreleri (CD4+ T helper lenfositler) hızlıca çoğalırlar ve klonlar oluştururlar.

Sonrasında bu hücreler memory T hücelere farklılaşırlar (CD45RO+ memory T lenfositler) ve kan damarları veya lenfatik akım aracılığıyla pulpa dokusuna göç ederler (118, 119). CD4+ T helper hücreler aktive olduktan sonra antijenin pulpaya tekrar girişinde bu hücrelerin tepkisi daha çabuk olur etkili bir immün yanıtı tetikler. Sitokin üretimine göre CD4+ /CD45RO+ T lenfositler özgül antijenlere karşı antikor üreten CD20+ B lenfositleri, diğer CD+ T helper hücreleri ve makrofajların aktive edilmesini ve göç etmesini uyarabilirler (118). Antijen ister yeni tanınmış isterse bilinen olsun dokunun histolojik görüntüsü aynıdır tek fark zaman skalasında olacaktır. Bu safhada pulpa dokusundaki baskın hücreler lenfositlerdir. Klinik semptomların şiddetiyle birlikte lenfositlerin sayısı artar (120).

Pulpa güçlü bir dokudur. Tersiyer dentin üretimiyle inatçı çürük ataklarından kendisini koruyabilir. Eğer çürük tedavi edilmezse ve irritanların da artmasıyla pulpada irreversibl değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler abse formunda olabilir ve belirli bir bölge ile sınırlıdır. Dokunun etrafı sağlıklı görülebilir. Bu lokal nekroz kontrol edilmedikçe tüm pulpa dokusuna ve ardından periapikal dokulara doğru ilerler. Pulpa içindeki doku hasarının ilerleyişi bakteri toksinlerinin yayılması ve varlığıyla ilgilidir, kan damarlarının “boğulması” ile ilgili değildir (114).

2.5.1. Pulpadaki Hemodinamik Değişiklikler

2.5.1.1. Vasküler Permeabilite

Enflamatuvar bir uyarana karşı akut vasküler değişiklikler vazodilatasyon ve artmış vasküler permeabilitedir. İkisi de pulpa interstisyel doku sıvı basıncını artırır. Nöropeptidler, histamin, bradikinin, prostaglandin gibi enflamatuvar medyatörlerin salgılanmasından sonra vasküler permeabilitede artışa bağlı olarak pulpada vasküler sızıntı meydana gelir ve bu durumda da doku basıncı artar (121, 122)

Bakterilerden kaynaklanan LPS ve LTA aktive olmuş pulpa hücrelerinden vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) salgılanmasına sebep olur (123, 124). VEGF vasküler permeabiliteyi artırır ve pulpa damarlarından plazmanın damar dışına çıkmasına neden olur (125). VEGF'nin vasküler permeabiliteyi arttırmada histaminin 50000 katı fazla etkili olduğu tahmin edilir (126). Enflamasyon sırasında pulpa doku sıvısından alınan örnekler TNF- α , IL-1 gibi sitokinlerin, pulpa

fibroblastlarında VEGF mRNA' larında artış meydana getirdiğini göstermektedir (127).

Vasküler permeabilitenin artmasıyla damarlardan dokuya protein geçişi de olur. Bu durum dokuda koloidal osmatik basıncın artmasına sebep olur. LPS ile uyarılmış akut pulpitiste pulpa kolloid osmatik basıncının plazma kolloid osmotik basıncına ulaşabildiği başka bir deyişle plasma ile doku arasındaki bariyerin ortadan kalktığı gösterilmiştir (128).

2.5.1.2 Kan Akımı

Pulpada akut enflamasyonda kan akımında hızlı bir artış olur ve vasküler permeabilite artışını takiben kontrol kan akımının % 200 büyüklüğüne ulaşabilir (129).

Diş pulpasının kan akımını ölçmek deney hayvanlarında dahi zor bir işlemdir. Kim ve ark (121) rat keser dişlerinde plak özütlerini kullanarak pulpiti başlatmış ve orta seviyeli pulpitiste kan akımında % 40' lık bir artış; parsiyel nekrozlu dişlerde ise % 35' lik bir azalma tespit etmiştir. Bletsa ve ark. LPS ile indükledikleri pulpalarda 10 dk sonra gerçekleşen ve deneyin 3 saati boyunca devam eden kan akımında azalma tespit etmişlerdir (128).

2.5.1.3 İnterstisyel (Dokular Arası) Sıvı Basıncı

Sağlıklı pulpanın interstisyel basıncı 5-10 mm Hg arasındadır (130, 131). Enflamasyon sırasındaki önemli değişikliklerden birisi damarlardan interstisyel boşluğa doğru gerçekleşen sıvı hareketidir. Fizik kanunları çerçevesinde rijit bir ortamda sıvı birikimi basınç artışına sebep olacaktır. Uzun süre pulpadaki basınç artışının kan damarlarında staz ve neticede nekroz yaptığı düşünülmüştür. Bakteri toksinlerinden doğrudan etkilenmeyen pulpanın apikal bölgesinde damarlarda boğulma olabileceği düşünülmüştür. Tonder (130) ve Van Hassel (132) deney hayvanlarının pulpalarında interstisyel sıvı basıncını ölçmüş ve hasar bölgesinin hemen altında çok az bir artış (2 mmHg) tespit etmiş fakat basınç yine normal sınırlarında bulunmuştur. İnterstisyel sıvı basıncındaki artışa rağmen intraluminal (damar boşluğu) basıncın da artmasından dolayı damarlar belirgin kalmıştır.

Kapillerlerdeki permeabilite artışı düşünülürken buradaki sıvı değişim oranını hızlandırması sebebiyle interstisyel sıvı basıncının artışı yararlı dahi olabilir (133). Doku sıvısındaki net artışlar pulpada varlığı tartışmalı olsa da çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan lenfatikler (134, 135) tarafından kaldırılacaktır.

2.5.2 Nöronal Değişiklikler

Sempatik sinirler apikaldeki sfinkterlerin kasılmasına sebep olarak kan akımını kontrol altında tutar (136). Sempatik aktivite proenflamatuvar stokinlerin üretilmesini engeller, antiinflamatuvar sitokinlerin salgılanması uyarır (137) ve bölgeye enflamatuvar hücrelerin göçünde etkilidir (138). Aynı zamanda odontoklastları inhibe eder ve reperatif dentin yapımını uyarır.

Trigeminal sinirden kaynaklanan afferent duysal fibriller yaralanma veya toksinlere karşı verilen cevapta önemli role sahiptirler. Afferent fibriller CGRP ve SP gibi 2 önemli nöropeptid salgılar. İkisi de vasodilatasyona ve kapiller permeabilitede artışa sebep olurlar. Sempatik aktivite vazokonstrüksiyon ve afferent fibrillerden bu peptidlerin salgılanmasının azalmasına sebep olur. Bu açıdan sempatik sinirler ve afferent fibriller birbirine zıt çalışırlar (114).

Yaralı pulpada NGF ve reseptörleri artmıştır. Afferentlerin filizlenmesi ve nöropeptidlerin artışı da enflamasyonla beraber artar (139). Afferent fibrillerin filizlenmesi dental yaralanmadan hemen sonra 1 gün içinde meydana gelir ve sempatik sinirlerin filizlenmesine kadar 3-4 hafta boyunca devam eder (140).

Yaralanmayı takiben pulpanın dışında da nöronal değişiklikler meydana gelir. Trigeminal ganglionda nöropeptidlerin (141), ağrı ile ilişkilendirilen TrkB reseptörlerinin (142) ve nitrik oksit miktarının arttığı rapor edilmiştir (143). Pulpa yaralanmasının trigeminal nükleusta dejeneratif değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (144).

2.6. Enflamatuvar Medyatörler

2.6.1. Araşidonik Asit Metabolitleri

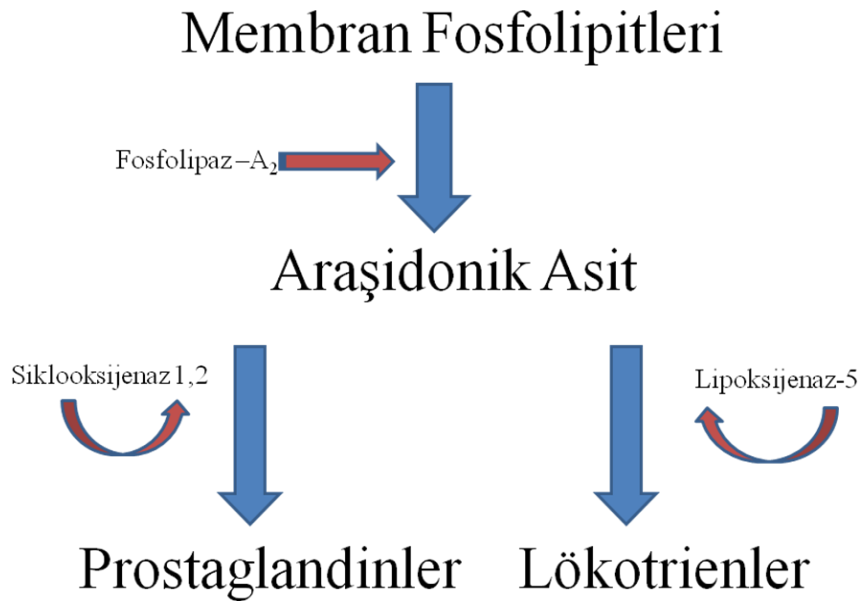
Araşidonik asit hücre zarının çeşitli sebeplerle zarar görmesiyle birlikte hücre zarının yapısında bulunan fosfolipidlerden açığa çıkar. Fosfolipaz enzimi araşidonik asitin oluşumunda rol alan enzimdir. Araşidonik asitten ise siklooksijenaz (COX) yoluyla PG' ler ve tromboksanlar meydana gelirken lipoksijenaz yoluyla lökotrienler (LT) meydana gelmektedir (4, 6, 145, Şekil 1).

İnsan COX enzimlerinin en az iki formu olduğu bilinir, bunlar COX-1 ve COX-2 dir. COX-1; gastrik hücre koruma (sitoproteksiyon), böbreklerdeki kan akımının düzenlenmesi, tromboksane A₂ nin oluşumu gibi fonksiyonları olan PG leri üretir. COX-2 enflame dokularda (pulpayı da içeren) sentezlenir, prostasiklin (PGI) proinflatuar PG'lerin üretiminde önemlidir (4).

PG'ler son derece bioaktif moleküllerdir. Enflamatuvar medyatörler arasında önemli role sahip olan PG'ler fizyolojik ve patofizyolojik pek çok olayda rol alırlar (146). Temel olarak makrofajlardan, fibroblastlardan ve dentritik hücrelerden, odontoblastlardan ve diğer pulpa bağ dokusu hücrelerinden salgılanır (147, 148). PG'ler lokal olarak venüllerin dilatasyonuna, kapiller permeabilitenin artmasına, ağrı reseptörlerinin aktive edilmesine ve sinir uçlarının duyarlılaşmasına sebep olur. Bağırsak hareketlerini artırmalarının yanı sıra midede asit salgılanmasını azaltır. Enflamasyon sırasında ağrı şiddetindeki değişimlerden sorumlu tutulmuşlardır (4,149, 150). PGE2 iki farklı yolla ağrı duyarlılığının artmasına katkıda bulunur. Birincisi nosiseptif sinir uçlarını duyarlılaştırabilir, ikincisi ise bradikinin gibi diğer ağrı medyatörlerine karşı oluşan ağrı cevabını artırabilir (151, 152).

Hayvan deneylerinde pulpa dokusunda enflamasyon sırasında PGE2 seviyelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (153-155). İnsan dişlerinin enflamasyonlu pulpalarında PGE2 miktarının klinik olarak sağlıklı dişlerin pulpalarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (156). Ayrıca PGE2 düzeyi pulpa enflamasyonunun histolojik derecesiyle ilişkili bulunmuştur (157). COX enzimini inhibe ederek PG sentezinin azaltması, ağrının kontrolü ve diğer antienflamatuvar etkilerinden dolayı

NSAİİ'ler diş hekimliğinde kullanılan ilaçlar arasında önemli bir yere sahiptir (158, 159). Ratlarda LPS ile indüklenmiş pulpitis modelinde NSAİİ'lerin PGE2 ve vasküler permeabilite artışını azalttığı tespit edilmiş ve PGE2 damar geçirgenliğiyle ilişkilendirilmiştir (153). Kedilerde sistemik NSAİİ kullanımının uyarılmış intradental sinir aktivitesini inhibe ettiği bulunmuş ve bu durum PGE2 baskılanması ile açıklanmıştır (160). Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde PGE2'nin pulpa enflamasyonu, konak doku cevabı ve dental ağrıda etkin rol aldığını ve önemli bir enflamasyon parametresi olduğunu göstermektedir.



Şekil 1: Araşidonik asit metabolitlerinin sentezlenmesi

2.6.2. Nöropeptidler

Duysal ve otonomik sinirler uyarıldıklarında ortama nöropeptid adı verilen biyolojik olarak aktif peptidler salarlar. Bu nöropeptidler nöral aktivitede önemli role sahiptir ve peptidler doku yaralanması, kompleman aktivasyonu, antijen-antikor reaksiyonları gibi çeşitli uyarımlarla salgılanmaya başlayabilir (161, 162). Uyarıldıklarında histamin ve bradikinine benzer etki göstererek damarlarda vasodilatasyona sebep olur ve vasküler permeabiliteyi artırır (4, 5).

Pulpada periferel duysal fibrillerden (A δ ve C fibrilleri) CGRP, SP ve NKA, sempatik fibrillerden NPY salgılanmaktadır. CGRP üreten duysal sinir fibrilleri sıklıkla odontoblast tabakasına, predentine ve dentin tübüllerinin 100 μ m kadar içerisine kadar uzanırlar. SP üreten fibriller genellikle pulpa merkezinde konumlanan C fibrilleridir. Nöropeptid salgılayan sinir fibrilleri immün hücreler ile yakın komşulukta bulunurlar bu sayede aralarında etkileşimler gözlenir (3).

SP 15 kilodaltonluk bir proteindir ve kan damarında düz kaslar üzerinde dilatör etki gösterir. Bu şekilde kapiller dilatasyon gerçekleşir. Ayrıca damar endotelini vazoaaktif medyatörlere ve immün hücelere karşı geçirgen hale getirir. Hargreaves ve arkadaşları, kendi geliştirdikleri bir mikrodializ probunu yaralı doku içerisine yerleştirerek bu peptidleri saptamışlardır (163). Deneysel olarak enjekte edilen P maddesi o bölgede kuvvetli bir ödem oluşturmaktadır ve histamin, PGE₂, kollagenaz, IL-1, IL-6 ve TNF üretimini sağlamaktadır (5).

Dorsal kök ganglia sinirlerinin % 40-50'sini CGRP immünreaktif hüceler oluşturmaktadır (164). Trigeminal kökenli CGRP içeren primer afferent nöronlar *spinal trigeminal nukleus*'ta sonlanır. CGRP + duysal nöronlar temel olarak nispeten yavaş iletim hızları olan miyelinsiz C fibrilleri ve küçük, miyelinli A δ fibrilleridir. Çok az bir kısmı (sadece %10-15 CGRP + hücre) hızlı iletimden sorumlu nöronlarda (A α / β fibrilleri) pozitif reaksiyon vermiştir (165). Pek çok çalışma CGRP salgılayan trigeminal afferent fibrillerin diş pulpasını innerve ettiğini göstermiştir (166-168). İmmünohistokimyasal kesitlerde CGRP immünreaktif sinirlerin koronal pulpada pulpa boynuzuna yakın kısımlarda dallandığı ve dentine 0,1 mm kadar girdiği görülmektedir (169). CGRP ayrıca dişeti oluşu sıvısında da tespit edilmiştir (170).

CGRP ve SP benzer etkiler gösterir. Fakat CGRP'nin başlıca etkisi nötrofil kemotaksisini kolaylaştırmasıdır. CGRP ve SP mast hücelerini, PNL'leri, monositleri ve fibroblastları olay yerine davet eder. IL'ler ve makrofajlardan salınan PG'ler ile birlikte damar endotel hücelerinin büzüşmesine sebep olur. Böylece hüceler arasında mikro açıklıklar oluşur ve damar serumu bu açıklıktan dışarı sızarak pulpa iç basıncını artırır. Bu seviyede pulpaya gelen hüceler PNL, makrofaj, mast hüceleri gibi akut iltihap hüceleri olup nöropeptidler (CGRP, SP) tarafından hem davet edilir hem de aktive edilirler (5). Bu nöropeptidler nörojenik

enflamasyonun ana başlatıcıları olduğu düşünülür (171). İnsan pulpalarında SP ve CGRP seviyeleri pulpitisli dişlerde sağlıklı dişlere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (168).

CGRP reseptörlerinin farmakolojik özellikleri çeşitli dokularda incelenmiştir. CGRP için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri beyin, kalp, dalak, karaciğer, iskelet kası, akciğer ve diş pulpası gibi doku ve organlardır (172-174). CGRP reseptörlerinin bilinen iki formu vardır; CGRP1 ve CGRP2. İlginç bir şekilde CGRP 1 reseptörü olgun rat molarlarında tespit edilememiştir, bu durum CGRP1 reseptörünün esas olarak kan damarlarıyla ilişkili olduğunu düşündürmüştür (175). Kalsitonin reseptör benzeri reseptörler (CRLR) CGRP1 reseptör kompleksinin önemli bir parçasıdır. CRLR mRNA proteinleri insan diş pulpası ve trigeminal nöronlarında PCR ile tanımlanmıştır (176). İmmunohistokimyasal metotların kullanıldığı bir çalışma CGRP1 reseptörlerinin ameloblast fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve mine formasyonunda rol aldığını göstermiştir (175). CRLR mRNA proteinleri insan osteoblastları ve rat osteojenik sarkoma hücre hatlarındaki varlığı *in vitro* olarak tespit edilmiştir (177). Ayrıca CGRP'nin osteoblast hücre hatlarında siklik adenozin mono fosfatı uyardığı ve kemik dokusundaki CGRP reseptörlerinin varlığını onaylayarak kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (178, 179). Sağlıklı, akut geri dönüşümsüz pulpitisli ve indüklenmiş enflamasyonlu pulpitisli dişlerden alınan insan pulpa dokusu örneklerinde CGRP reseptörlerinin karşılaştırıldığı bir radyoreseptör analizinde CGRP reseptörlerinin enflamasyon sırasında belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (174).

2.6.3. Sitokinler

Sitokinler; lökositler, nöronlar ve glia hücreleri gibi değişik hücre tipleri tarafından sentezlenen ve salınan düzenleyici proteinlerin bir grubudur. Polipeptid yapıdaki bu medyatörler immün ve enflamatuvar cevapta modülatör olarak görev alırlar. Enflamatuvar ve anti-enflamatuvar etkili olabilirler. IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α ve IFN- γ enflamatuvar etkiliyken IL-4, IL-10 ve IL-13 anti-enflamatuvar etkilidir (180).

Sitokinlerin sentezi, bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler, fiziksel yaralanmalar ve çeşitli enflamatuvar olaylar sonucu başlar ve genellikle salgılandıkları hücrelerin etrafında görülür. İmmün hücrelerin ilgili alana göç etmesini, gelişmesini, başka hücrelere farklılaşmasını ve yaralı bölgede tamir olayının başlamasını sağlarlar. Bir sitokin başka bir sitokin için başlatıcı veya durdurucu olabilir (5,181).

Aktive makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- α akut faz proteinlerinin artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybından sorumludurlar. TNF- α , immünoenflamatuvar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda lokal etki gösteren güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicidirler. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. IL-8 kuvvetli kemoatraktan medyatör olup nötrofillerin kemotaksisi ve aktivasyonuna neden olur (182-185). TNF- α ve interlökinlerden IL-1 β , IL-6 ve IL-8'in, hiperaljeziye öncülük eden ve enflame dokuları innerve eden nosiseptörlerde meydana gelen nöroplastik değişikliklerde rol oynadıkları düşünülür (4).

IL-6 yaklaşık 26 kDa'luk bir sitokindir (186). IL-6'nın monositler, makrofajlar, fibroblastlar, B ve T lenfositler, osteoblastlar, keratinositler gibi çeşitli hücrelerden sentezlendiği bilinmektedir (187). Ayrıca endotel hücreleri ve epitel hücrelerinde de üretilir (186). Konak savunmasında enflamatuvar reaksiyonlarda ve antijene özgül immün cevabın düzenlenmesinde görev alır, akut faz reaksiyonlarında ve hematopoezide önemli rol oynar (187). B lenfositlerin üzerine bilinen etkileri vardır ve bu hücrelerin antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesinde etkilidir (187). IL-6, B lenfositlerin ayrışım sıralamasının geç dönemlerinde B lenfositleri için büyüme faktörü gibi davranır ve bu hücrelerin immunglobulin salınımı için bir kofaktör olarak rol oynar. Ayrıca IL-6; T hücreleri ve timositler üzerinde de kostimulatör etkisi *in vitro* olarak gösterilmiştir. IL-6 diğer sitokinlerle birlikte kemik iliği hemopoetik ana hücreleri için erken dönemde büyüme kofaktörü olarak etki gösterir (188).

IL-6 hepatik C-reaktif protein üretiminin önemli bir düzenleyicisi ve uyarandır (189). Plazma IL-6 düzeyleri Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık gelişimi açısından prediktif (presemptomatik) özelliğe sahiptir (190). Endotelden

adezyon moleküllerinin salınmasında artış yaptığı gibi karaciğerde fibrinojen ve prokoagülan maddelerin üretimini de artırır (191).

IL-6 enflamasyonlu pulpada ve periapikal dokularda lokal olarak üretilir (192). Araştırmalarda pulpitisli ve periapikal lezyonlu hastaların pulpalarında IL-6'nın artmış miktarları tespit edilmiş (192, 193) ve pulpa hücrelerinden ve pulpa fibroblastları tarafından sentezlendiği rapor edilmiştir (194). Pulpa enflamasyonu sırasında adezyon kuvvet moleküllerini artırır ve anjiogenezi uyarır. Buna ilaveten pulpa odasında vasküler geçirgenliğin artmasına ve enflamatuvar ödeme sebep olur; nötrofil kemotaksisini uyararak bu hücrelerin enflamatuvar bölgeye infiltrasyonunu sağlar (195). Periapikal lezyonlu dişlerde; apikal eksudadan alınan örneklerden izole edilen PNL lerin ve epitel örneklerinden izole edilen vasküler endotel hücrelerinin yüksek seviyelerde IL-6 salgıladıkları rapor edilmiştir (196, 197). Ayrıca IL-6'nın enflamasyon sırasında C3 gibi akut faz proteinlerini uyardıkları bilinmektedir (198).

IL-6 kemik erimesinde sistemik bir artışa öncülük eder, osteoklastları uyarır ve osteoklastların sayılarında artışa sebep olur (199). Periapikal lezyonlarda lokal olarak özellikle kemik rezorbsiyon alanlarının kronik enflamasyonlu bölgelerinde sentezlendiği ve salgılandığı tespit edilmiştir (192, 197). Enflamasyon sırasında IL-6'nın fazla sentezlenmesi bu sitokinin periodontitis ve romatoid artrit gibi ciddi enflamatuvar hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir (200, 201).

2.6.4. Bradikinin

Bradikinin (BK) gezici plazma proteinlerinden elde edilen ve nosiseptif nöronların doğrudan aktivasyonuna neden olarak ağrıya yol açan bir proinflatuar medyatördür (4). Enflame diş pulpasında, BK'nin artmış seviyeleri gösterilmiş ve enflamasyonla ilişkili büyüme faktörlerinin varlığının, geçici reseptör potansiyel vanilloid-1 (TRPV1) ve geçici reseptör potansiyel ailesi alt grup A1 (TRPA1) gibi diğer reseptörlerde olduğu gibi, fare trigeminal ganglionunun temel kültürlerinde B1 ve B2 reseptörlerini şifreleyen mRNA ekspresyonunda bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (202, 203). TRPV1, kapsaisin reseptörüdür ve enflamatuvar ağrıda anahtar rol oynar. TRPA1 kapsaisin duyarlı nöronlardan salgılanır ve TRPV1 ile etkileşir

(202). Bradikinin TRPV1 ve TRPA1 üzerine etkisi vasıtasıyla nosiseptif nöronların duyarlılığını arttırır (4).

2.6.5. Histamin

Kan damarlarına bitişik bağ doku içerisindeki mast hücrelerinde daha fazla bulunmakla birlikte kan bazofilleri ve trombositlerde de bulunur. Travma, sıcak-soğuk gibi fiziksel uyarılar, mast hücrelerine antikor bağlanması, nötrofillerden salgılanan katyonik lizozomal proteinler ve bazı nöropeptidler mast hücrelerinden histamin serbestleşmesine neden olur. Histamin damarlarda vasodilatasyon, vasküler permeabilitenin artması ve eozinofiller için kemotaktik etki gösterirler (181).

2.7. Endodontide Ağrı ve Ağrının Algılanması

Diş hekimliğinde ağrı gerek hekim gerek hasta için istenmeyen bir durum ve üstesinden gelinmesi gereken bir problemdir. Ağrı sistemi doku hasarı yapan ve ağrıya sebep olan uyarının tespitiyle başlayan, elde edilen verilerin omurilikte işlenmesi ve beyine iletilmesiyle devam eden, serebral korteks gibi yüksek beyin bölgelerinde algılanan son derece karmaşık bir sistemdir. Ağrı sistemini doğru bir şekilde anlayan klinisyen iyi bir endodontik prosedür ve analjeziklerle birlikte bu sorunun üstesinden gelebilir (204).

Pulpa dişe gelen fizyolojik uyarılara cevap verebilir. Bu uyarılar dişte ağrı hissine neden olabilir. Pulpada miyelinli ve miyelinsiz duysal sinir lifleri bulunur. Miyelinli A tipi δ sinir lifleri ani ve keskin ağrıdan sorumluyken miyelinsiz C lifleri künt ve yavaş ağrıdan sorumludur (4,28). Dişe gelen zararlı uyarılar voltaj geçişli sodyum kanalları aracılığıyla nosiseptörlerin depolarizasyonuna sebep olabilir ve böylece aksiyon potansiyeli oluşur. Voltaj geçişli sodyum kanalları enflamasyonda pulpadaki sinir uçlarının hassaslaşmasında önemli role sahiptir hatta zararlı olmayan bir uyarı dahi ağrı algısına sebep olabilmektedir (205).

Zararlı uyarıların tekrarı ve ortamdaki medyatörlerin etkisiyle miyelinli A δ lifleri ve miyelinsiz C lifleri duyarlılaşmaya başlar. Bu duyarlılaşma süreciyle birlikte hasta normalde ağrı oluşturmayan bir etkenle ağrı hissedebilir (allodini) veya

ağrıya sebep olan bir etkene karşı normalde hissedilenden daha fazla şiddette ağrı hissedebilir (hiperaljezi). Bunların dışında sinirlerde ateşlemeler kendiliğinden oluşarak hastanın ağrı hissetmesine sebep olabilir. Enflamasyon sırasında sinirlerde meydana gelen bu duyarlılaşmaya periferal sensitizasyon adı verilir (4, 204, 206).

Periferal nosiseptörlerin uyarılmasını takiben oluşan impulslar maksiller ve mandibular sinirler aracılığıyla trigeminal gangliyon (145) ve buradan da medullada bulunan trigeminal çekirdek kompleksine ulaşır (207-209). Komplekste anatomik pozisyonlarından dolayı oral, interpoler ve kaudal çekirdekçikler olarak adlandırılan 3 farklı çekirdekçik bulunur. Pulpadan gelen impulslar diğer çekirdekler (oral ve interpoler) tarafından da alınmasına rağmen temel olarak kaudal çekirdek seviyesinde alınır (210).

Kaudal çekirdek ‘medulla dorsal boynuz’ olarak da adlandırılmaktadır. Burası primer afferent duyu sinir fibrillerinden gelen sinyallerin yüksek potansiyelli işleme yeri olarak servis yapar ve beyinde yüksek merkezlere bilgi göndermektedir (4). Bu bölgeden çıkan veriler arttırılabilir (hiperaljezi), azaltılabilir (analjezi) veya yanlış (yansıyan ağrı) yorumlanabilmektedir (211).

Gövdeleri kaudal çekirdek’te bulunan ikinci derece sinirlerin uzantıları orta hattı geçtikten sonra talamus çekirdeği ile sinaps yaparlar. Üçüncü derece sinirler talamustan serebral kortekse bilgi gönderir. Burası, trigeminal ağrı yollarındaki son anatomik adımdır. Sinyal kortekse ulaşır ulaşmaz ağrı olarak algılanabilir (4).

2.8. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

1954 yılında Gerschman ve ark. oksijen kullanımı sırasında meydana gelen bazı reaktif ürünlerin vücudumuzda zararlı etkiler oluşturabileceğini ileri sürmüştür (212, 213). Birçok fizyolojik ve patolojik olay sırasında üretilen bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunan, pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral yapıda olabilen bu ürünler serbest radikal (SR) olarak adlandırılırlar. Nitrojen veya oksijen kaynaklı olabilirler, oksijen kaynaklı olanlara reaktif oksijen ürünleri (ROS) denir. Biyolojik sistemlerde ROS önemli role sahiptir (213, 214).

Oksidanlar, tek elektron eksiklikleri nedeniyle kolayca elektron alışverişi yapabilenler yani radikaller ve elektron eksiklikleri olmamasına rağmen başka moleküllerle radikallerden daha zayıf olarak birleşebilenler yani nonradikaller olmak üzere iki grupta incelenebilirler (215). Hidroksil, alkoksil, peroksil ve hiperoksi radikalleri radikal oksidanlar arasında yer alırken; hidrojen peroksit, nitrik oksit ve hipoklorit non-radikal oksidanlar arasında yer alırlar (215, 216).

Vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki denge değişebilir ve serbest radikaller hücrel makromolekülleri okside ederek zarar verebilirler. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (7, 213). Oksidatif stres lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyonuna, DNA kırıklarına, sitotoksik etkilere, sinyal iletiminde bozulmaya neden olabilir bununla birlikte oksidatif stres yaklaşık elli farklı hastalık patogeneziyle ilişkilendirilmiştir (212, 217, 218).

Enflamasyon hücrelerinin varlığında, hücrel metabolizmanın hızlandığı durumlarda (zorlu egzersiz), hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı, toksik ürünlere maruz kalma, radyasyon, iskemi durumları ve yaşlanma süreci gibi durumlarda ROS miktarında artış olmakla birlikte normal koşullarda yaklaşık % 1 oranında ROS oluşur (217). Aslında fizyolojik seviyedeki ROS çeşitli hücre fonksiyonları ve immün savunma için gereklidir. Çeşitli moleküllerin kontrollü oksidasyonuna sebep olur. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, immün reaksiyonlar ve sinyal iletimi gibi olaylarda rol oynarlar (212, 218).

Enflamasyon sırasında ortamda artan medyatörler nötrofiller, monositler ve eozinofiller gibi savunma hücrelerini aktive ederek ortama gelmesini sağlar. Bu hücreler aktive olduktan sonra ortama oksidan molekülleri salarlar. Oksidan moleküller enfeksiyöz ajanlarla mücadelede önemli rol almasına rağmen fazla salınırsa zararlı olmaya başlar (219, 220).

2.8.1. Antioksidan Savunma Sistemi

Karbonhidrat, yağ, protein ve DNA gibi vücudumuzda bulunan maddelerin oksitlenmesini engelleyen veya geciktiren böylece zararlı etkilerini azaltan bazı moleküller vardır. Bunlar genel olarak antioksidanlar olarak adlandırılırlar (221).

İyi bir antioksidanda bulunması gereken özellikleri şöyle sıralayabiliriz (213, 222):

- Serbest radikallerin olumsuz etkilerini o radikale özgül olarak engelleyebilmeli
- Redoks metalleri ile şelat oluşturabilmeli,
- Gen ekspresyonu üzerine olumlu etkileri olmalı,
- Diğer antioksidanlarla ilişkide bulunarak onları rejenere edebilmeli,
- Kolay absorbe edilebilmeli,
- Doku ve vücut sıvılarında uygun seviyelerde bulunabilmeli,
- Membranlarda ve sıvı ortamlarda fonksiyon gösterebilmelidir.

Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak incelenebilir. SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler enzimatik antioksidanlara örnektir. Vitaminler (A, C, K, E), çeşitli mineraller (Se, Zn) ise nonenzimatik antioksidanlar arasında yer almaktadır. Ayrıca antioksidanlar endojen (melatonin, SOD, GSH-Px, CAT), ve eksojen ((karoten, C, A ve E vitamini) olarak da sınıflandırılabilir (223-226).

2.8.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.8.1.1.1 Süperoksit Dismutaz

Bakırlı bir enzim olan SOD son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubunu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevirerek hücre içindeki

serbest radikal düzeylerini azaltır. Organizmada bir antioksidan olarak görev yapar (8, 9).

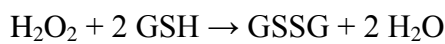
En etkin hücre içi enzimatik antioksidanlardan biridir. Hücresel SOD çeşitli metalloenzimlerin bir grubudur. SOD beş farklı formdadır. Vücutta en bol olarak CuZn-SOD bulunur ve hücre içinde sitoplazmada yer alır. Mn- SOD ise mitokondride yer almaktadır. SOD, ROS'lardan süperoksit bir elektron vererek H₂O₂'ye indirirken; katalaz ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx) ise H₂O₂'yi suya indirir. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile Fe³⁺ 'ün, Fe²⁺ 'ye indirgenmesi sonucunda hidroksil radikalinin oluşmasının engellenmesi şeklindedir (227).



CuZn-SOD enziminin pulpa enflamasyonu ile olan ilişkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. CuZn-SOD enzim aktivitesi hayvan ve insan diş pulpalarında gösterilmiş ve (228) CuZn-SOD enzim aktivitesinin ekstirpe edilmiş insan pulpa dokusunda enflamasyonla birlikte arttığı tespit edilmiştir (14). Sağlıklı ve enflamasyonlu pulpalarda CuZn-SOD enzim dağılımı immünohistokimyasal olarak lokalize edilmiş ve miktarları enflamasyonlu pulpa hücrelerinde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (229). Baumgardner ve ark pulpa enflamasyonu oluşturulan ratlarda SOD enziminin antiinflamatuvar etkili olduğunu histolojik değerlendirmeye göstermişlerdir (230). Çalışmacılar SOD miktarlarındaki değişimlerin pulpa enflamasyonu ile ilişkilendirmişler ve inflamatuvar durumun üstesinden gelebilmek için SOD aktivitesinde artış olduğunu düşünmüşlerdir (229).

2.8.1.1.2 Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon redoks döngüsü hidroperoksitlerin indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır. GPx, kofaktör olarak selenyuma ihtiyaç duyar. Glutatyonu (GSH) okside eder ve hidrojenperoksiti suya indirir (231, 232).

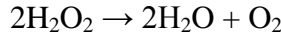


Glutasyon reduktaz (GR) da glutasyonun okside formunun (GSSG) tekrar GSH'ye indirgenmesinde görev alır (231,232).



2.8.1.1.3 Katalaz

CAT ve GPx, hidrojen peroksidi su ve atomik oksijene indirgemektedirler:



Bu enzimlerin aktiviteleri artmadan SOD'un aktivitesinin artması hidrojen peroksite birikmesine ve böylece hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur. CAT, kofaktör olarak demir gibi geçiş metallerine ihtiyaç duyar. Hayvansal organizmaların aerobik hücrelerinde (karaciğer ve eritrositlerde) daha fazla bulunur (231,232).

2.8.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar genellikle düşük molekül ağırlıklı olup okside olarak başka bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde önlerler veya geciktirirler. Endojen (glutasyon, koenzim Q10 gibi) veya eksojen (askorbik asit, karotenoidler ve polifenoller gibi) kaynaklı olabilirler (212, 233).

Vitaminler (A, C, K, E), çeşitli mineraller (Se, Zn), karotenoidler (β -karoten, α karoten, likopen, lutein, zeaksantin), organosülfür bileşikleri (allium, allil sülfid, indoller), düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GPx, ürik asit), antioksidan kofaktörler (ko-enzim Q10) ve polifenoller enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer almaktadır (223-226).

2.8.2. Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehid (MDA)

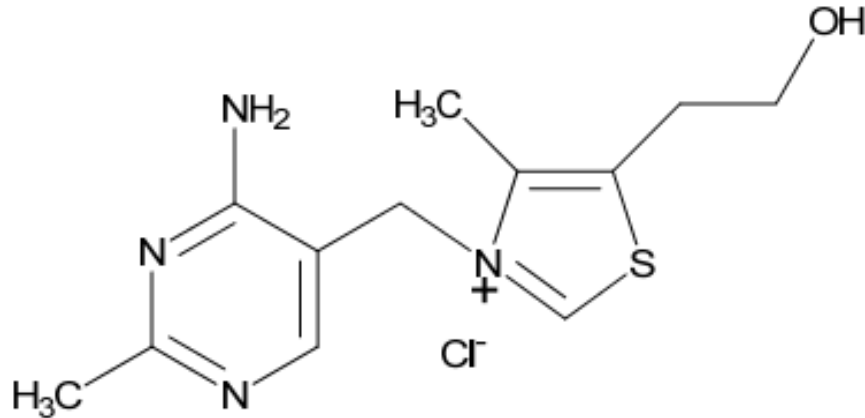
Süperoksit grupları tarafından oluşturulan singlet oksijen hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Bunun sonucunda peroksit, alkol, aldehit, etan, pentan ve hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünleri oluşur. Lipid hidroperoksitlerin

yıkımı ile meydana gelen ve son derece aktif olan aldehitler hücre seviyesinde metabolize olurlar veya difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak ikincil bozukluk göstergesi olabilirler (234).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (10-13, 234). Ge ve ark (1996) normal ve enflamasyonlu insan diş pulpalarında MDA miktarı ve SOD aktivitesini araştırmıştır. Sonuç olarak enflamasyonlu pulpalarda superoksit radikal ve lipit peroksit reaktivitesinde artış tespit edilmiş, bu parametrelerin enflamasyonla birlikte arttığı gösterilmiştir (15).

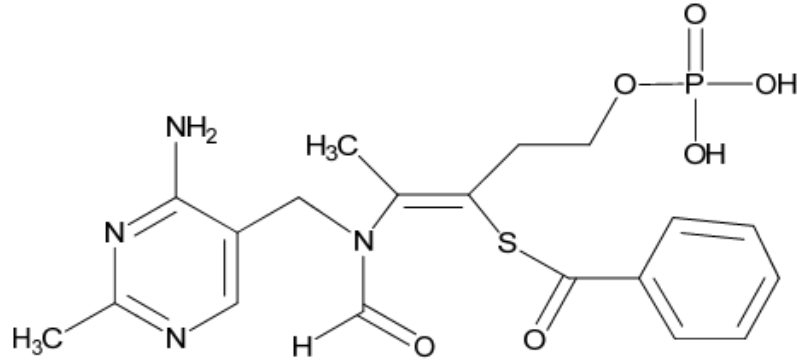
2.9. Benfotiamin

Tiamin yani B1 vitamini uzun yıllardan beri çeşitli hastalıkların (nörolojik hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler komplikasyonlar gibi) tedavisinde kullanılmaktadır (235-238). Tiamin suda çözündüğü için vücutta uzun süre depolanamaz ve hızla idrar yoluyla atılır. (18, 239).



Şekil 2: Tiaminin kimyasal yapısı (240)

1954 yılında Fujiwara bir grup yağda çözünen tiamin türevlerini keşfetmiştir. Bu tiamin türevleri soğangiller (*Allium*. Örn: soğan, sarımsak vb. gibi) ailesinden elde edildiği için ‘‘allitiaminler’’ olarak adlandırılmıştır (241). Yağda çözünen tiamin türevlerinin biyoyararlanımları ve absorbe olmaları suda çözünen formlarına göre daha yüksektir (19,20). Benfotiamin (Şekil 3, Kimyasal adı; S-benzoylthiamine-O-monophosphate. Moleküler formülü; $C_{19}H_{23}N_4O_6PS$. Moleküler ağırlık; 466.5 g/mol), B1 vitamininin yağda çözünen formlarından bir tanesidir (240). Etkili bir antioksidan olduğu bulunmuş ve farmakolojik uygulamalar için biyoyararlanımları geliştirilmiştir (18, 242).



Şekil 3: Benfotiaminin kimyasal yapısı (240)

Benfotiamin, kendisinin hücre zarından geçmesine izin veren açık tiyazol halkasına sahiptir (19). Benfotiaminin oral uygulaması, kan ve dokulardaki tiamin seviyesini suda çözünen formlarına göre daha fazla artırır (19,20). Benfotiamin, LPS ile makrofajların uyarıldığı bir çalışmada PGE_2 , tromboksan oluşumundan sorumlu COX-2 enzimi ile lökotrien B_4 oluşumundan sorumlu lipoksijenaz-5 (LOX-5) enzimini ve bu yolla oluşan medyatörlerin (PGE_2 , tromboksan, lökotrien B_4 vb gibi) oluşumunu engellemiştir. Böylece araşidonik asit metabolitlerinin oluşumundaki antienflamatuvar rolü gösterilmiştir (23).

Çeşitli çalışmalarda benfotiaminin heksozamin yolağı, ileri glikasyon son ürünlerin oluşumu, protein kinaz C yolağı gibi metabolik yolları bloke ederek mikroanjyopati, nöropati gibi diyabetik komplikasyonları önlediği bildirilmiştir (243, 244).

Benfotiamin pentoz fosfat yolu enzimi transketolazın aktivasyonu aracılığıyla fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat' dan kaynaklanan glikozu ortadan kaldırır (243). Ayrıca nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu engelleyerek deneysel diyabetik retinopatiyi önler (243). Başka bir çalışmada benfotiaminin ratlarda enflamasyonu ve nöropatik ağrıyı azalttığı gösterilmiştir (245).

Yapılan pek çok çalışmada benfotiaminle ilgili bir yan etki saptanamamış (246-249). Bir çalışmada 40 mg benfotiamin almış hastaların (90 mg pridoksin hidroklorid ve 250 µg syanokobalamin ile birlikte 12 hafta boyunca) % 8.4'ünde 12. haftada mide bulantısı, baş dönmesi, mide ağrısı ve kilo alımı rapor edilmiştir (250). Ancak yine de benfotiaminle ilgili yapılan bir panelde benfotiaminin güvenli kullanımı ile ilgili verilerin yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır (240).

2.9.1. Benfotiaminin Farmakokinetiği

Allitiaminlerin eşsiz özellikleri, Allium ailesindeki sebzelerde bulunan sülfür bileşikleri ile reaksiyona girmesi üzerine tiaminin tiyazol halkasının açılması sonucunda meydana gelmektedir (251). Benfotiaminin sindirim sisteminde defosforilasyonu hücre membranından kolayca difüze olmasını sağlayan lipofilik bir molekül oluşur ve suda çözünen tiamin tuzlarına göre daha iyi absorbe edilir (240, 251, 252). Hücre içine alındıktan sonra hücre içi sülfhidril bileşikleri ve/veya enzimatik debenzolizasyon aracılığıyla katalitik indirgeme işlemine tabi tutulur (251, 252). Tiyazol halkası kapatılır, aktif tiamin hücre içine ve dolaşıma katılır (251). Debenzolizasyon sonucunda benzoik asit bir ürün olarak üretilir (251, 252).

Benfotiaminin alımından sonra tiaminin maksimum plazma seviyeleri tiamin hidrokloride göre 5 kat; bioyararlanımları ise 3.6 kat daha fazladır ve bu özellikleri diğer lipofilik tiamin türevlerinden de daha iyidir (240). İnsan ve hayvan çalışmaları göstermiştir ki benfotiaminin bioyararlanımları ve bioaktiviteleri vitaminin standart suda çözünen formlarına göre çok daha yüksektir (18, 253, 254).

Benfotiamin, tam kan, plazma, kırmızı kan hücreleri ve dokulardaki aktif tiamin miktarını suda çözünen formlarına göre daha fazla artırır. Plazma yarılanma

ömrü tiamından daha yüksektir. Artmış biyoyararlanımları kas (5 kat) ve beyinde (25 kat) daha belirgin olmakla birlikte karaciğer, böbrek gibi diğer organlarda da % 10-40 oranında daha iyidir (240).

2.10. Ratlar

Ratlar pek çok fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda kullanılmış deney hayvanlarıdır. Tercih edilmesinde pek çok sebep sayılabilir (255, 256, 257) :

- Kolay üreyebilirler.
- Deney uygulamalarında kullanımı ve bakımı kolaydır.
- Ekonomik olarak avantajlıdır.
- Kısa sürede genetik açıdan benzer nitelikte gruplar oluşturulabilir.
- Genetik haritası çıkarılmış olduğundan genetik çalışmalarda tercih edilebilir.

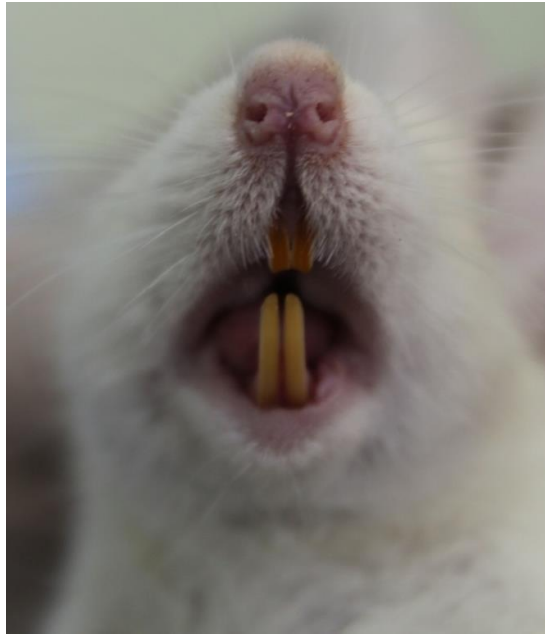
Ratların pulpa ve periodontal dokuları insanların pulpa ve periodontal dokularına benzerlik göstermektedir. Oral mikroflorası diğer deney hayvanlarıyla karşılaştırıldığında insan oral mikroflorasına daha yakındır (258-261). Endodontik çalışmalara ek olarak ortodontik (262), periodontal (263), dişlerin embriyogenezis safhalarının incelenmesi (264) ve diş pulpasının koruyucu tedavisini içeren çalışmalarda kullanılmıştır (257, 258).

Ratlar genellikle gece ve sabaha doğru daha aktiftirler. Soylar arasında farklılık göstermekle birlikte saldırgan davranışlarda bulunmazlar. Meraklı hayvanlardır ve eğitilebilirler. Sık sık ele alınırsa ve dokunulursa saldırganlıkları daha da azalır, deney koşullarına daha rahat uyum sağlarlar (265). Yeni ortamlara uyum sağlayabilirler ancak 3-7 günlük alışma süresine ihtiyaç duyulabilir. Koku alma duyuları gelişmiştir (266). Albino ratların görme duyuları çok gelişmemiştir ve hareket eden cisimleri iyi algılayamazlar (267).

Ratlar kemirgendir ve keser dişleri iyi gelişmiştir. Alt dudakları tamdır ve üst dudaklarında yarık bulunur (Resim 1). Premolar ve kanin dişleri bulunmaz. Her yarım çenede üç adet molar dişi vardır. Diş formülü 1003 (1 adet keser, kanin ve

keser dişleri yok, 3 adet molar; her yarım çene için) şeklinde ve toplam 16 dişe sahiptir. Keser ve molarlar arasında diestema bulunur (Resim 1). Bu boşluk yanak tarafından doldurulur ve arkadaki yanak boşluğunu kapatarak kemirme mekanizmasında sınır oluşturur (268). Ratlar omnivordur (hem etle hem de otl beslenen) , yemlerinde bu duruma dikkat edilmelidir. İyi gelişmiş enzimsel sindirimi ve sekumu sebebiyle etkili fermentatif sindirim yapabilirler (266). Ratların bazı fizyolojik değerleri tablo 1' de gösterilmiştir.

Ratlar farklı hastalık modelleri ile diş hekimliği dallarında sıklıkla kullanılan deney hayvanlarındandır. Ortodontide, ortodontik hareketler ve kök rezorbsiyonlarının incelenmesi (269), periodontolojide alt molar dişlerin gingival seviyelerinde ipek ligatr yerleştirerek periodontitis (270) ve endodontide molar dişlerde kavite açılıp ağız ortamına açık bırakılarak apikal periodontitis (271) deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Literatürde ayrıca rat dişlerinin pulparını ekspoz ederek veya keser dişlerinde hazırlanan kavitelere LPS uygulayarak pulpitis modelinin oluşturulduğu araştırmalar da bulunmaktadır (89, 272).



Resim 1: Rat keser dişleri ve dudakları

Tablo 1: Ratların bazı fizyolojik değerleri (273)

Ratların bazı fizyolojik değerleri	
Erişkin vücut ağırlığı (dişi)	200-300 g
Erişkin vücut ağırlığı (erkek)	300-500 g
Doğum ağırlığı	5-6 g
Vücut yüzey alanı	230 cm ² /50 g ; 250 cm ² /130 g ; 325 cm ² /200 g
Vücut sıcaklığı	35.9-37.5 °C
Yaşam süresi	2.5-3.5 yıl
Gıda tüketimi	5-6 g/100 g CA/gün
Su tüketimi	10-12 ml/100 g CA/gün
Gastrointestinal kanal geçiş zamanı	12-24 saat
Seksüel olgunluk (dişi)	65-110 gün (13 hafta)
Seksüel olgunluk (erkek)	65-110 gün (13 hafta)
Siklus uzunluğu	4-5 gün
Östrus süresi	14 gün
Gebelik süresi	21-23 gün
Yavru sayısı	6-12
Doğurganlık süresi	350-440 gün
Işık periyodu (aydınlık / karanlık)	12 / 12
Oksijen tüketimi	(250 g CA için) 0.84 (0.68-1.10) ml/g/saat
Kalp atım sayısı	250-500/dak
Kan volümü	54-70 ml/kg
Kan basıncı	84-134/ 60-68 mmHg
Kan volümü	57.5-69.9 ml/kg
Eritrosit sayısı (RBC)	5-10 x 10 ⁶ /mm ³
Hematokrit (PCV)	% 36-57
Hemoglobin (Hb)	11-18 g/dl
Ortalama alyuvar hacmi (MCV)	46.0-65.0 fl
Ortalama alyuvar Hemoglobini (MCH)	11.9-19.0 pg
Ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)	25.9-35.1 g/dl
Lökosit sayısı (WBC)	3-17 x 10 ³ /mm ³
Nötrofil	% 9-34
Lenfosit	% 65-85
Eozinofil	% 0-6
Monosit	% 0-5
Bazofil	% 0-1.5
Trombosit sayısı (PLT)	500-1300 x 10 ³ /mm ³
İdrar pH	7.3-8.5
İdrar miktarı	5.5 ml/24 saat
İdrarın özgül ağırlığı	1040-1070

3. GEREÇ ve YÖNTEM

“Ratlarda deneysel pulpitis modelinde benfotiaminin antienflamatuvar etkilerinin araştırılması” başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirmek için gerekli olan “Deney Hayvanları Uygulama Sertifikası” programına katılım sonrası bu alanda uygulama yeterlilik belgesi temin edildi (SDÜ HADYЕК No: 2013/016).

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’na ait laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul’un 14/08/2014 tarih ve 01 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3. 1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda 54 adet 250-300 gr ağırlığında yetişkin erkek Wistar Albino Rat, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Deney hayvanlarının tümü, 21-23° C sabit ortam sıcaklığında, %55-60 nem sağlanan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde, yem ve su kısıtlamasının olmadığı Euro type-IV kafesler içerisinde deney süresince Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı’nda barındırıldı.

54 adet yetişkin erkek ratların alt ve üst çenelerinden toplam 216 adet orta kesici dişleri seçildi, hayvanların canlı ağırlıkları ölçülerek kuyruk kısımlarından numaralandırıldı ve anestezi dozları hesaplandı (Tablo 2).

Deney hayvanlarına anestezi için intraperitoneal olarak enjekte edilen % 10 Ketamin (Brema % 10, Bremer Pharma GmbH, Almanya) / % 2 Xylazin (Xylazin Bio 2%, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulandı (Resim 3) ve anestezi derinliği parmak kısırtma testi ile kontrol edildi (Resim 5). Anesteziyi takiben ratların ağız içleri ile alt ve üst kesici dişleri iyodin solüsyonu ile dezenfekte edildi. Çalışma alanında kullanılacak aletler daha önceden otoklavda steril edildi.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan rat ağırlıkları ve bu ağırlıklara göre hesaplanan anestezi ve benfotiamin uygulama dozları

Ratlar	Negatif Kontrol			Pozitif Kontrol			Benfotiamin		
	6.saat	12.saat	24.saat	6.saat	12.saat	24.saat	6.saat	12.saat	24.saat
Ağırlık (gr)	281	252	269	296	297	295	260	284	288
1									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	29.6 2.96	29.7 2.97	29.5 2.95	26 2.6	28.4 2.84	28.8 2.88
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	78	85.2	86.4
Ağırlık (gr)	300	260	257	286	285	298	293	276	299
2									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	28.6 2.86	28.5 2.85	29.8 2.98	29.3 2.93	27.6 2.76	29.9 2.99
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	87.9	82.8	89.7
Ağırlık (gr)	292	253	278	288	296	293	298	281	287
3									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	28.8 2.88	29.6 2.96	29.3 2.93	29.8 2.98	28.1 2.81	28.7 2.87
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	89.4	84.3	86.1
Ağırlık (gr)	294	297	288	292	300	286	300	285	296
4									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	29.2 2.92	30 3	28.6 2.86	30 3	28.5 2.85	29.6 2.96
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	90	85.5	88.8
Ağırlık (gr)	296	288	252	295	266	275	270	286	290
5									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	29.5 2.95	26.6 2.66	27.5 2.75	27 2.7	28.6 2.86	29 2.9
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	81	85.8	87
Ağırlık (gr)	282	298	286	278	275	282	300	296	300
6									
Ketamin/ Xylazine (mg)	-	-	-	27.8 2.78	27.5 2.75	28.2 2.82	30 3	29.6 2.96	30 3
Benfotiamin (mg)	-	-	-	-	-	-	90	88.8	90

3.2. Deney Grupları

Ratların ağız açıklıklarının, diş boyutlarının, çalışma pozisyonunun, manipulasyon yeterliliğini laboratuvar şartlarında test edebilmek ve pulpa perforasyonunu histolojik olarak değerlendirebilmek amacıyla Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'unun 14/08/2014 tarih ve 01 sayılı kararı ile bir ön çalışma yapılmıştır. Ön çalışmada 4 adet rat kullanıldı. İki rat pozitif kontrol 2 rat ise benfotiamin grubu olarak kullanılmıştır. Ratlar 3. ve 6. saatlerde sakrifiye edilerek histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu ön çalışma sonucunda ratlarda oluşturulacak sınıf V kavite, pulpal perforasyon boyutları ve ratların sakrifiye edilme zamanları belirlendi.

Çalışmamızda kavite preperasyonu öncesi ratların ağızları sıvı ve katı cisim aspirasyonunu önlemek amacıyla örtüldü (Resim 6-8). 36 adet ratın alt ve üst kesici dişlerinde serum fizyolojik soğutmalı düşük devirli döner alete (35.000 devir/dk) takılan ISO 010 ve 006 (NTI, Kahla, Almanya) çelik rond frezler ile labial yüzlerde diş eti seviyesinde kavite hazırlanarak pulpa perforasyonları oluşturuldu.

18 adet ratta herhangi bir işlem uygulanmadı ve bu ratlar negatif kontrol grubu olarak ayrıldı. Alt ve üst kesici dişlerin labial yüzlerinde kavite açılarak pulpa perforasyonu oluşturulan 36 adet ratın pulpa kavitelerine lipopolisakkarit (LPS; 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA) uygulanarak pulpa enflamasyonu indüklendi. Pulpa enflamasyonu indüklenen ratlardan 18 adedine de işlemden 3 saat sonra oral yoldan benfotiamin (B9636; Sigma, St. Louis, MO, USA) 300mg/kg tek doz olarak verildi (245). Buna göre ratlar (n=54) 3 ayrı gruba ayrılmış oldu (Tablo 3). Her gruptan 6'şar adet rat 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi (Tablo 3).

3.3. Deneysel Pulpitis Modelinin Oluşturulması

Ratların alt ve üst kesici dişlerin labial yüzlerinde diş eti sınırında kavite hazırlanarak pulpa perforasyonları oluşturuldu. Koronal pulpa odası K eğeleri (15-40) (Thomas, Fransa) kullanılarak 40 no'lu eğeye kadar genişletildi. *Escherichia coli* bakterisinden elde edilmiş lipopolisakkarit (LPS; 0111:B4, Sigma, St. Louis,

MO, USA), her kavite için 10 µg/mL olacak şekilde pulpa odasına damlatıldı. Kaviterler geçici dolgu maddesi ile kapatıldı (Cavit G; ESPE, Seefeld, Germany).

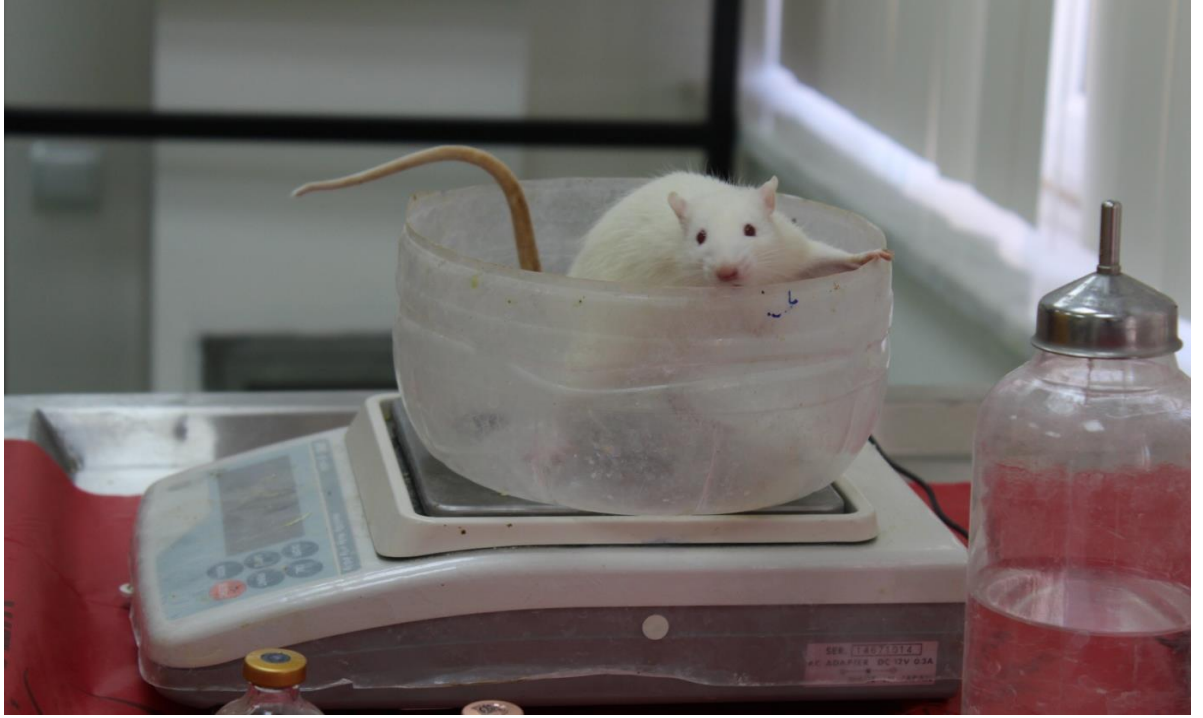
3.4. Benfotiamin hazırlanması ve uygulanması

Benfotiamin (B9636; Sigma, St. Louis, MO, USA), %1 karboksimetil selüloz içerisinde 75 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon, ratların ağırlıklarına göre 300mg/kg olacak şekilde pulpa enflamasyonunun indüklenmesinden 3 saat sonra oral yoldan tek doz (4ml/kg) olarak verildi (Tablo 2, 245).

Tablo 3: Deney Grupları

Deney Grupları	Uygulanan İlaç	6. saat*	12. saat*	24. saat*
I: Negatif kontrol	_	6 hayvan	6 hayvan	6 hayvan
II: Pozitif kontrol	LPS	6 hayvan	6 hayvan	6 hayvan
III: Benfotiamin	LPS+Benfotiamin	6 hayvan	6 hayvan	6 hayvan

* Sakrifiye edilecek hayvanların ötenazi zamanları



Resim 2: Rat ağırlıklarının ölçülmesi



Resim 3: Intraperitoneal anestezi uygulaması



Resim 4: Deney protokolünün uygulandığı ortam



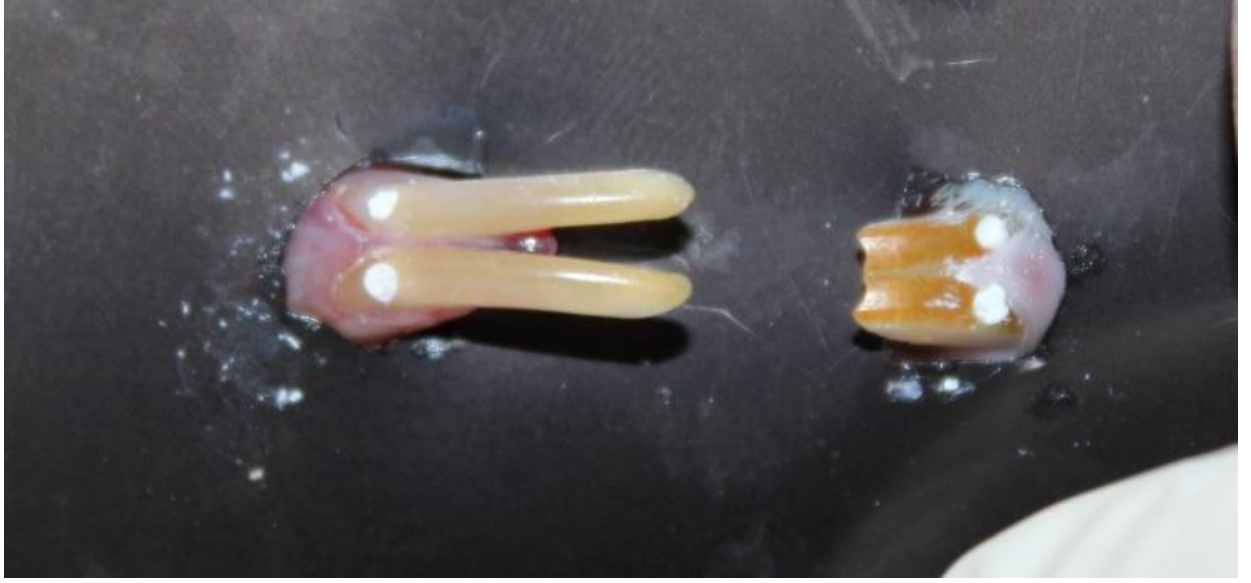
Resim 5: Parmak sıkıştırma testiyle anestezi kontrolü.



Resim 6:Alt ve üst rat keser dişlerinde izolasyon ve pulpa kavitelerinin hazırlanması.



Resim 7: Pulpa enflamasyonunun indüklenmesinde LPS uygulaması



Resim 8: Pulpa kavitelerinin geçici dolgu maddesi ile kapatılması



Resim 9: Oral (gavaj yöntemi) benfotiamin uygulaması

3.5. Hayvanların Ötenazisi

Her gruptan 6'şar hayvan, pulpal enflamasyonun indüklenmesinden sonra 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte % 10 Ketamin (Brema % 10, Bremer Pharma GmbH, Almanya) / % 2 Xylazin (Xylazin Bio 2%, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) anestezisini takiben sakrifiye edildi. Ötenazi yöntemi olarak eksanguinasyon (kanatma) yöntemi kullanıldı.

3.6. Örneklerin Hazırlanması

Ratların ötenazisi sonrası üst ve alt keser dişer alveol kemikleri ile birlikte kafatasından ayrıldı ve çevre yumuşak doku artıkları temizlendi. Örnekler daha önceden hazırlanan numaralandırılmış, % 10'luk formaldehid (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, ABD) içeren steril kaplara yerleştirilerek Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarına taşındılar. Örnekler ilk olarak % 14 EDTA (Sigma, St. Louis, MO, ABD) içerisinde 3 hafta boyunca dekalsifiye edildi ve her bir rata ait alt ve üst keser dişleri doku takip kasetleri içerisine yerleştirildi. Dekalsifikasyon sonrası EDTA artıklarını uzaklaştırmak için 1 saat boyunca akan su altında yıkanan örnekler otomatik doku takip cihazına (Leica, Nussloch, Germany) yerleştirildi. Örneklerin bir gece boyunca doku takip cihazında düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek yağının alınması ve sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Dokular ertesi sabah parafine gömülerek blokları sağlandı. Dört-beş saat soğutmanın ardından bloklardan rotary mikrotomda 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı (Leica 2155 rotary microtome; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Almanya). Her bir dokudan pulpada hazırlanan defekt ve çevresini kapsayan 24 adet kesit alındı.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Her diş için alınan 24 kesitin 4'ü histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Histopatolojik değerlendirmeler fotoataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ve görüntü analiz programı

ile (Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) yapıldı.

Pulpa dokusunda enflamasyon, McClanahan ve ark. (274)'nın kullandığı semikantitatif skorlama yöntemi modifiye edilerek değerlendirildi ve skorlandı (Tablo 4).

Tablo 4: Histopatolojik skorlama kriterleri

Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3
Normal pulpanın, sağlam odontoblastların bulunduğu, infiltrasyonun, hiperemi ve ödemin bulunmadığı durumlarda	Hafif infiltrasyon, hafif hiperemi ve ödem durumlarında (Mikroskop alanının % 1-33' ü)	Orta şiddette infiltrasyon, hiperemi ve ödemin bulunduğu veya hafif nekrozun olduğu durumlarında (Mikroskop alanının % 34-66' sı)	Şiddetli infiltrasyon, hiperemi ve ödemin bulunduğu veya belirgin nekrozun olduğu durumlarında, kullanıldı. (Mikroskop alanının % 67- 100' ü)

3.7. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal inceleme ile IL-6 [Anti-IL-6 antibody (ab6672), Abcam, 1/100 dilüsyon]; CGRP [Anti CGRP antibody [4901] (ab81887), Abcam, 1/100 dilüsyon]; Prostaglandin [Anti-Prostaglandin E2 antibody (ab2318) Abcam, 1/100 dilüsyon); MDA [Anti MDA-5 antibody (ab69983), Abcam, 1/100 dilüsyon] ve SOD [Anti-SOD2 antibody (ab13534), Abcam, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için her bir diş için 20 ayrı seri kesit (değerlendirilmek istenilen her bir parametre için her diştten 5 kesit) polilizinli lamlara çekilerek streptavidin biotin kompleks peroksidaz metoduna göre boyandı. Değerlendirilmek istenen her bir parametre için her bir diştten elde edilen bu kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek dehidre ve deparafinize edildi. Dokular 10 dakika süreyle akan suda

yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamale edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle fosfat tamponlu tuzlu suda (PBS) yıkandı. Gereken antikorlar için mikrodalga fırında sitrat tampon çözeltisi (pH 6) ile 700'lük ayarda 5 dakika süreyle iki defa kaynatıldı. Dokular 10'ar dakika süreyle 2 defa PBS'de yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'de yıkandı, takiben biotinli serum ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'de 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemden sonra dokular streptavidin ile 30 dakika süreyle inkübe edildi ve tekrardan yıkandı. Örnekler 3,3'- diaminobenzidine (DAP) kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris'in hematoksileni kullanıldı ve preparatlar fotoataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ve görüntü analiz programı ile (Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) incelendi.

İmmünohistokimyasal inceleme sonuçlarının değerlendirilmesinde semikantitatif yöntem kullanıldı ve skorlamada; negatif (0), hafif pozitif (1), orta şiddette pozitiflik (2) ve şiddetli pozitiflik (3) olarak değerlendirildi. İmmunpozitif hücre sayılarının hesaplanmasında her bir dişte yüzer adet olmak üzere odontoblastlar, pulpa bağ dokusu hücreleri (bağ doku ve damar hücreleri) ile enflamatuvar hücreler sayılarak pozitif hücre sayıları belirlenerek ortalamaları alındı ve bir üst tam sayıya yuvarlandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen skora istatistik inceleme yapılarak gruplar arası farklar belirlendi. Sonuçların istatistik incelemesinde one-way ANOVA yöntemi gruplar arasındaki farkların incelenmesinde Bonnferroni-Dunn testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistik açıdan önemli olarak kabul edildi. Sonuçlar tablo halinde sunuldu.

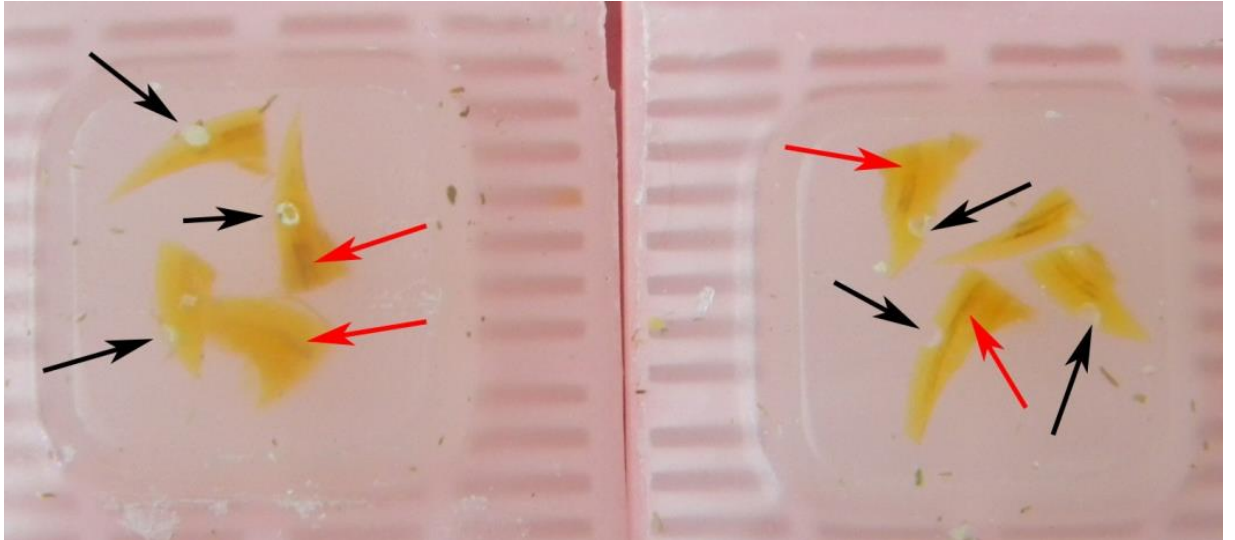
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Ön Çalışmaya ait Histopatolojik Bulgular

Ön çalışmaya ait histopatolojik incelemede keser dişlere açılan kavitelerin bazılarının pulpaya ulaşmadığı gözlemlendi (resim 10). Pulpaya ulaşmayan defektlerde pulpa enflamasyonu izlenmedi (resim 11). Pulpaya ulaşan kavitelerin olduğu kesitlerde ise defekt çevresinde nekrotik alanın şekillendiği, hipereminin ve hafif enflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunduğu, enflamatuvar reaksiyonun olduğu gözlemlendi (resim 12 ve 13).

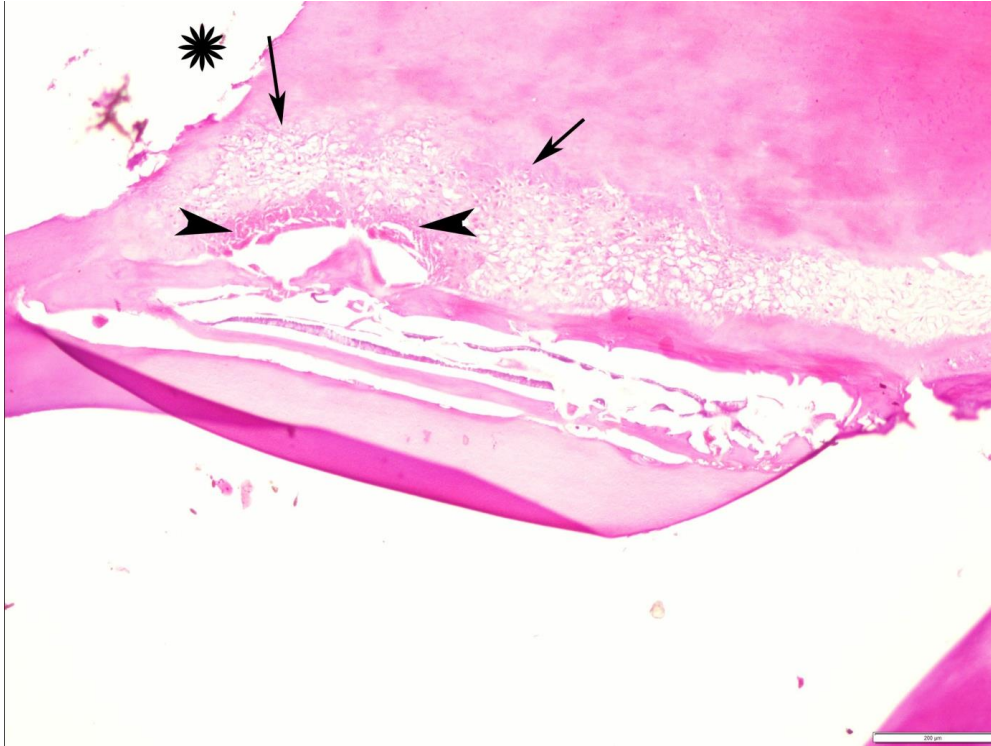
Yapılan ön çalışma sonucunda kavitenin pulpaya ulaştığı örneklerde pulpada enflamasyon geliştiği ve kavitelerin gingivaya 1-2 mm yakın olacak şekilde hazırlanması gerektiği anlaşıldı.



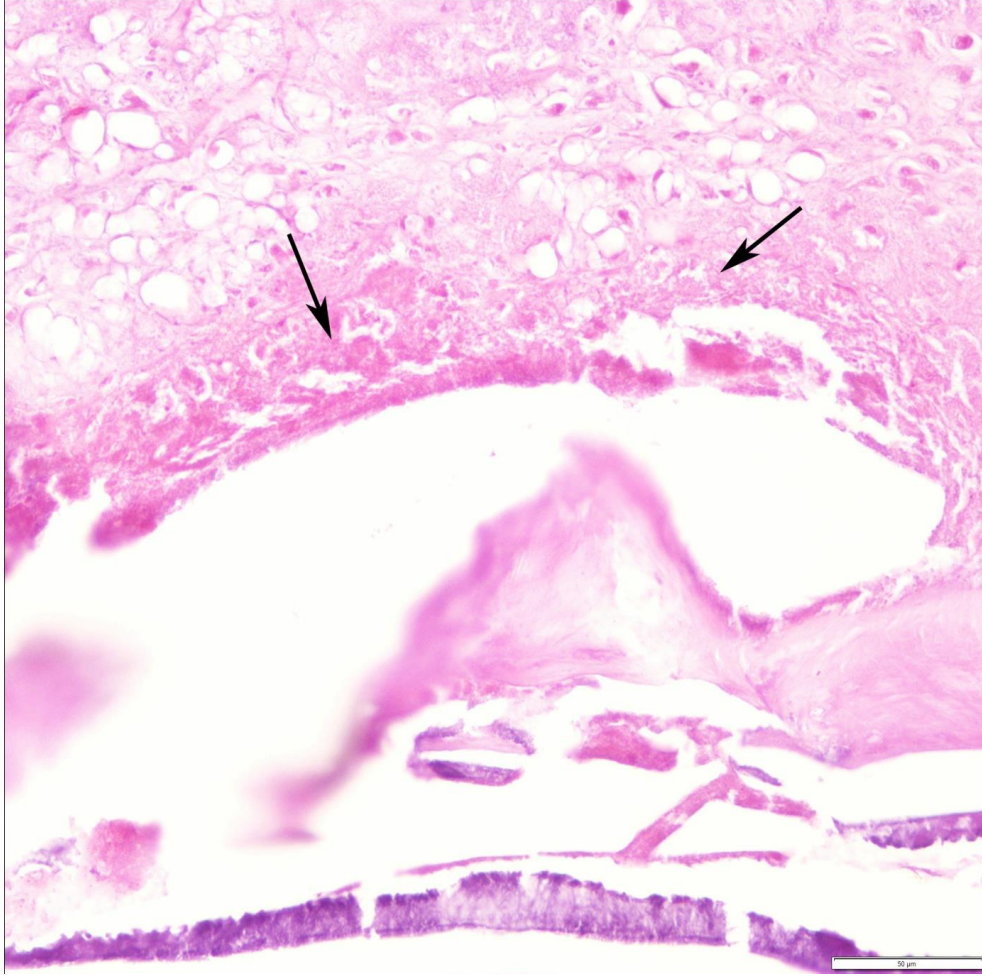
Resim 10: Ön çalışma örnekleri, servikal kavite (siyah oklar) ve pulpa dokusu (kırmızı oklar)



Resim 11: Pulpadan geçmeyen defekt (yıldız), HE, Bar= 500μm



Resim 12: Pulpadan geçen defekt (yıldız) ve pulpitis oluşumu, nekrotik alan (ok başları) ve enflamatuvar reaksiyon (oklar) HE, Bar= 500μm



Resim 13: Resim 12'nin yakından görünümü, pulpitis oluşumu, HE, Bar= 50µm

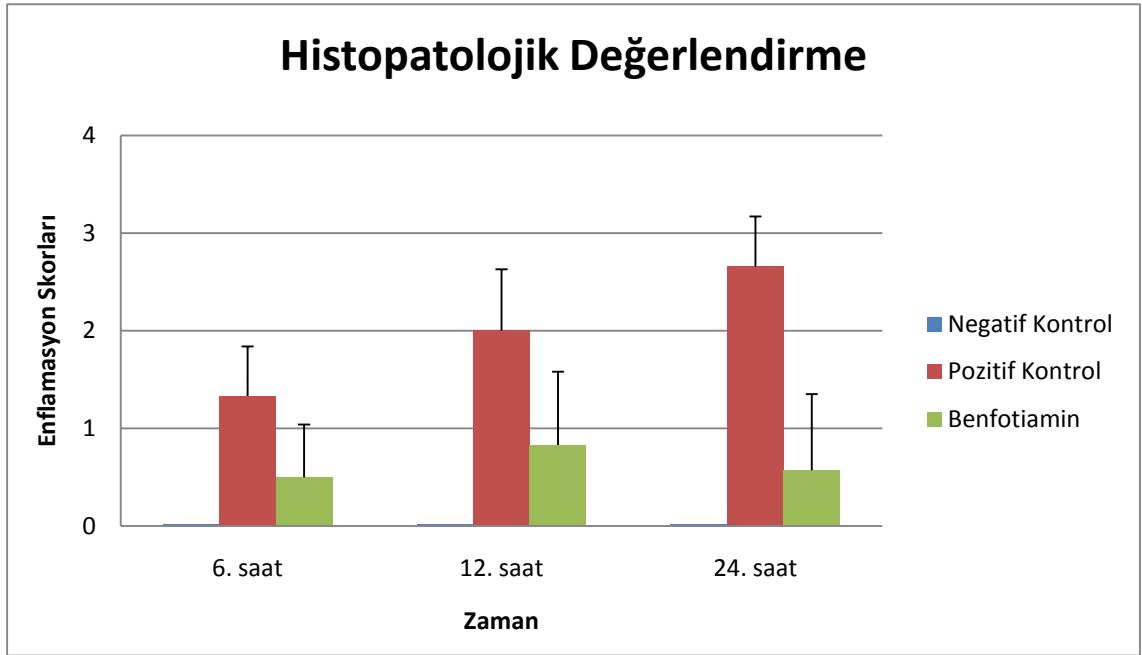
4.1.2. Histopatolojik Bulgular

Negatif kontrol grubundaki ratlarda 6., 12. ve 24. Saatlerde histopatolojik değerlendirmelerde sağlıklı pulpa dokusu gözlemlendi ve skorlandı (Resim 14-16).

Grupların 6. saatteki histopatolojik incelemelerinde pozitif kontrol grubunda özellikle nötrofil lökositlerden oluşan infiltrasyonlar ve ödem varlığı dikkat çekti (Resim 17). Benfotiamin grubunda az sayıda nötrofil lökositte rastlandı (Resim 18) ve semi-kantitatif değerlendirmede benfotiamin grubunun, pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük skor değerleri aldığı tespit edildi ($p < 0,001$) (Tablo 5).

Grupların 12. saatteki reaksiyonlarına bakıldığında pozitif kontrol grubunda nötrofil infiltrasyonu, ödem ve hipereminin belirginleştiği (Resim 19), benfotiamin grubunda ise bazı hayvanlarda hiç infiltrasyon saptanmazken (Resim 20) bazılarında çok hafif nötrofil infiltrasyonları dikkat çekti. Benfotiamin grubunun enflamasyon skorları pozitif kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$) (Tablo 5).

Pozitif kontrol grubu rat pulpa dokusunda 24. saatte nötrofil infiltrasyonunun ve ödemin belirginleştiği (Resim 21), benfotiamin grubunda çok hafif bir enflamatuvar reaksiyon olduğu gözlemlendi (Resim 22). Benfotiamin grubunda rat pulpa dokusunda 24. saat incelemede enflamasyon skorlarının pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$, Tablo 5, Şekil 4).



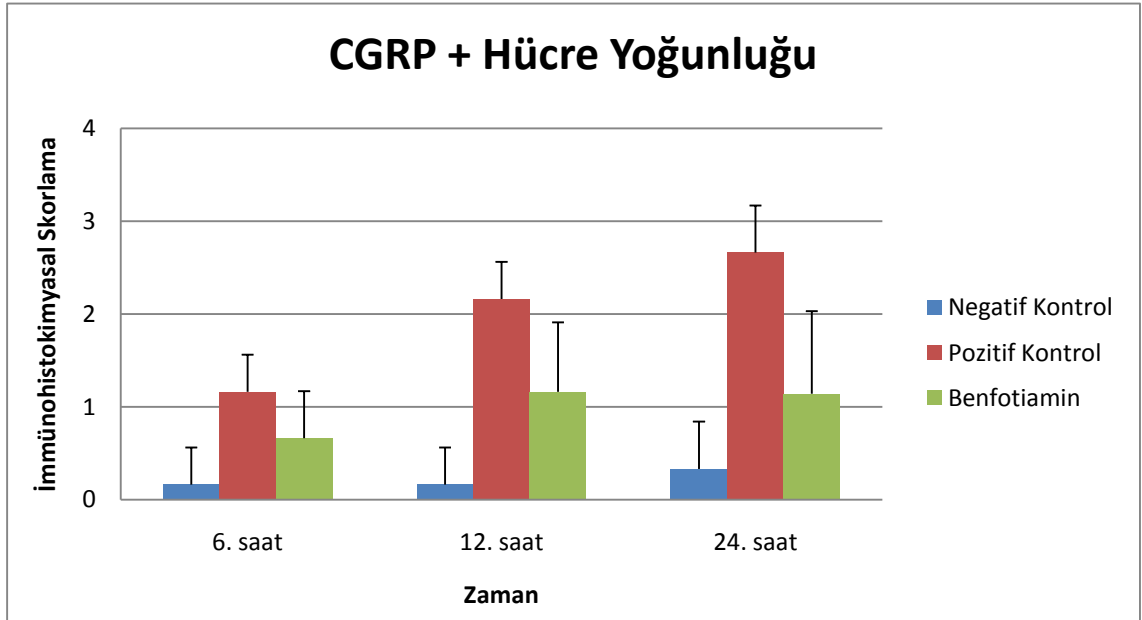
Şekil 4: McClanahan enflamasyon skorlarının gruplara göre dağılımı

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. İmmünohistokimyasal Bulgular (CGRP)

İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda 6. saatte pozitif kontrol grubu ve negatif kontrol grubunda CGRP (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Çalışmanın 12. ve 24. saatlerinde pozitif kontrol grubunda CGRP (+) hücre yoğunluğunun negatif kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Ortalama CGRP (+) hücre yoğunluğu skorları 24. saatte 12. saate göre daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 5, Tablo 5).

Benfotiamin grubunda 6. saate CGRP (+) hücre yoğunluğu skorlarının pozitif kontrol grubuna göre daha az olduğu ($p>0,05$), 12. ve 24. saatlerde ise CGRP (+) hücre yoğunluğu skorlarının pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görüldü ($p<0,001$, Şekil 5, Tablo 5). Tüm zamanlarda benfotiamin grubu ile negatif kontrol grubu arasında CGRP (+) hücre yoğunluğu skorları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 5, Tablo 5).

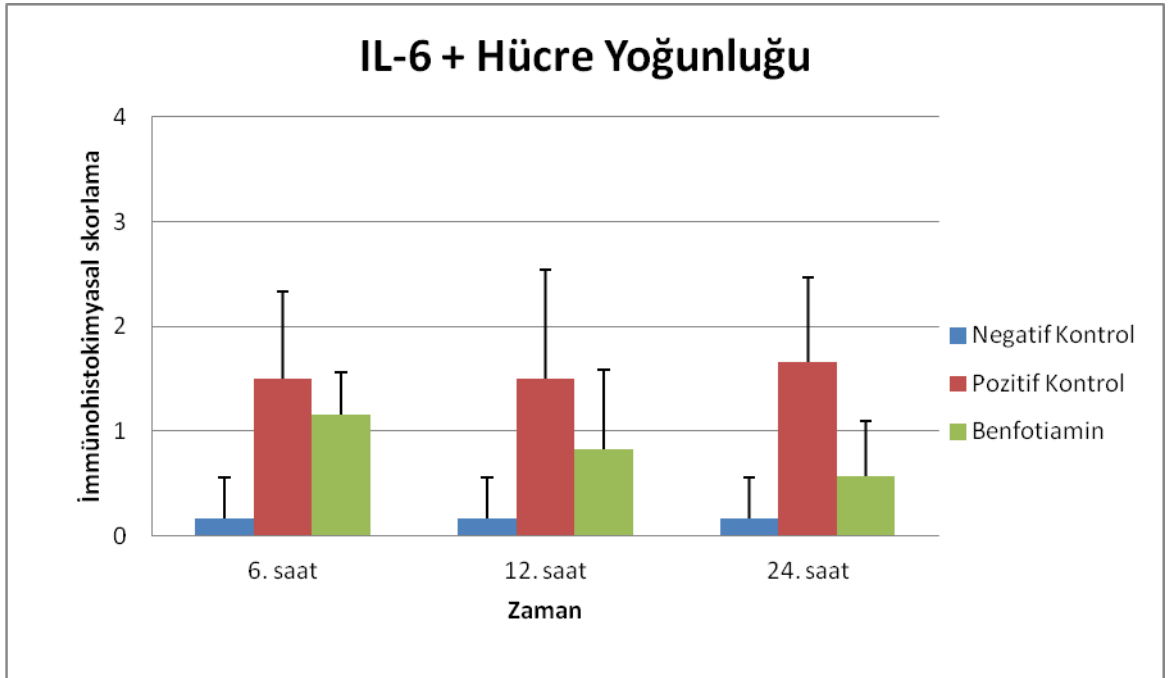


Şekil 5: Gruplara göre CGRP (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları.

4.2.2. İmmünohistokimyasal Bulgular (IL-6)

İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda 6., 12., ve 24. saatlerde pozitif kontrol grubunda negatif kontrol grubuna göre IL-6 (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,01$). Pozitif kontrol grubunda 6., 12. ve 24. saatlerdeki IL-6 (+) hücre yoğunluğu skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 6, Tablo 5).

Benfotiamin grubunda IL-6 (+) hücre yoğunluğu skorlarının 6. saatte diğer saatlere göre en yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,01$) (Şekil 6, Tablo 5). Benfotiamin grubunda 6. saatte IL-6 (+) hücre yoğunluğu skorlarının pozitif kontrol grubuna göre daha az olduğu ($p>0,05$), 12. ve 24. saatlerde ise IL-6 (+) hücre yoğunluğundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,001$, Şekil 6, Tablo 5). Onikinci ve 24. saatlerde benfotiamin grubu ile negatif kontrol grubu arasında IL-6 (+) hücre yoğunluğu skorları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 6, Tablo 5).

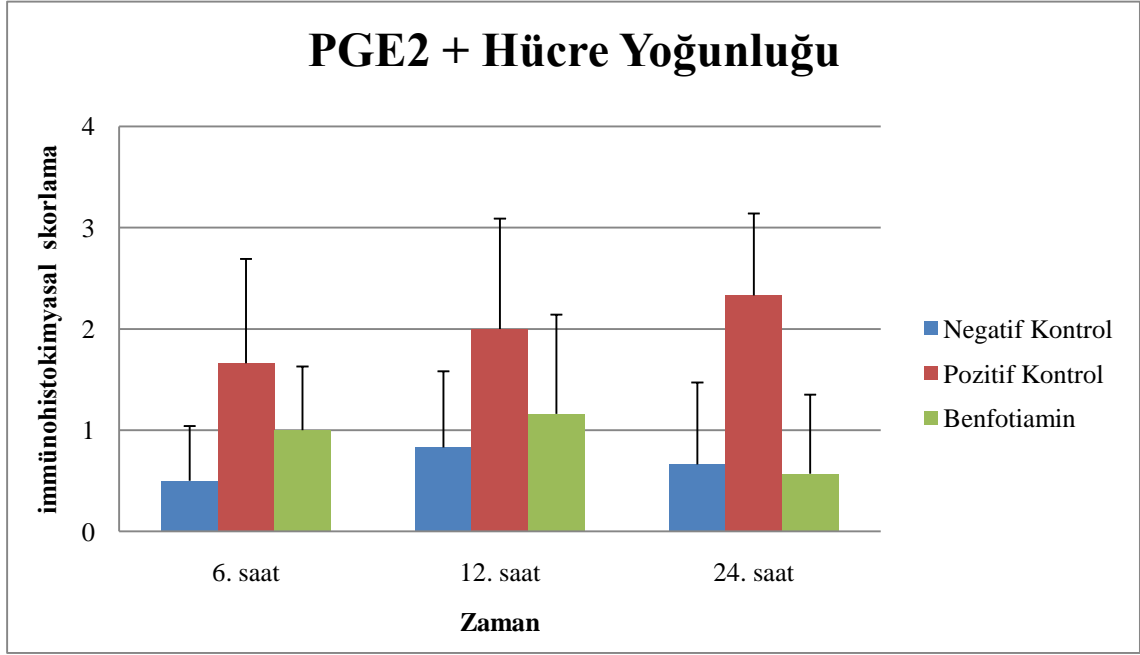


Şekil 6: Gruplara göre IL-6 (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları

4.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular (PGE2)

İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda 6. saatte pozitif kontrol grubu ve negatif kontrol grubunda PGE2 (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Çalışmanın 12. ve 24. saatlerinde pozitif kontrol grubunda PGE2 (+) hücre yoğunluğunun negatif kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Ortalama PGE2 (+) hücre yoğunluğu skorları 24. saatte 12. saate göre daha yüksek olmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 7, Tablo 5).

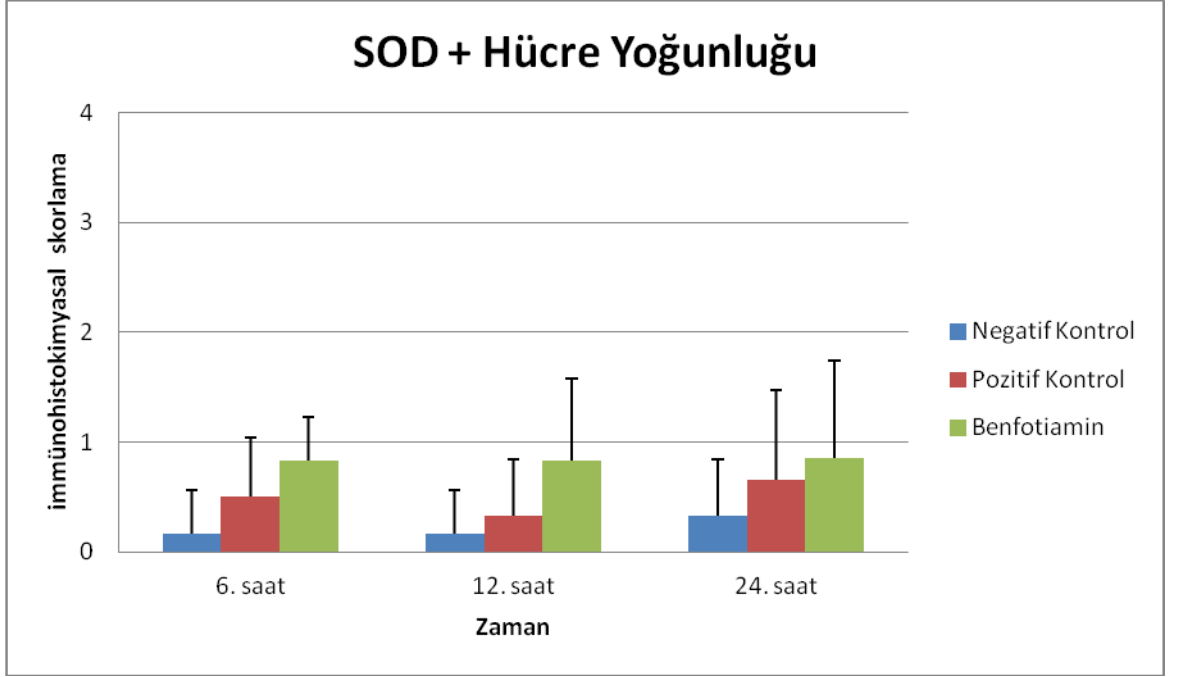
Benfotiamin grubunda 6., 12. ve 24. saatlerdeki PGE2 (+) hücre yoğunluğu skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 7, Tablo 5). Benfotiamin grubunda 6. saate PGE2 (+) hücre yoğunluğu skorlarının pozitif kontrol grubuna göre daha az olduğu ($p>0,05$), 12. ve 24. saatlerde ise benfotiamin grubundaki PGE2 (+) hücre yoğunluğu skorları, pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktü ($p<0,001$, Şekil 7, Tablo 5). Tüm zamanlarda benfotiamin grubu ile negatif kontrol grubu arasında PGE2 (+) hücre yoğunluğu skorları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$, Şekil 5, Tablo 5).



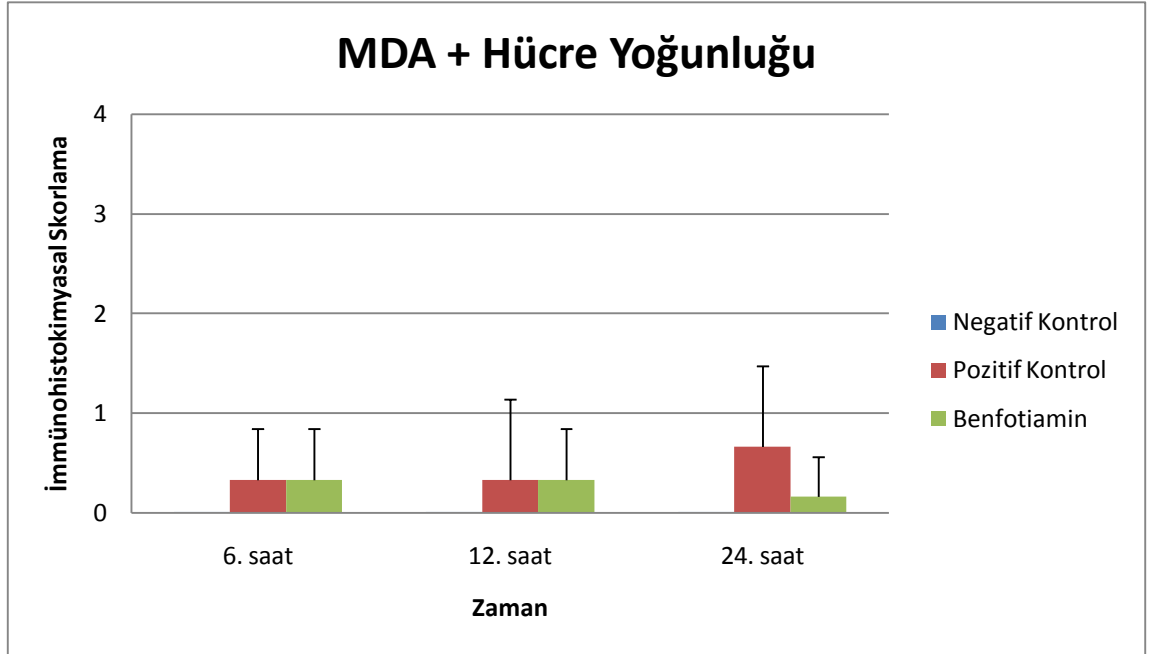
Şekil 7: Gruplara göre PGE2 (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları

4.2.4. İmmünohistokimyasal Bulgular (SOD, MDA)

İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda 6., 12. ve 24. saatlerde pozitif kontrol, negatif kontrol ve benfotiamin grupları arasında SOD (+) ve MDA (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubunda, 6., 12. ve 24. saatlerdeki SOD (+) ve MDA (+) hücre yoğunluğu skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Benfotiamin grubunda, 6., 12. ve 24. saatlerdeki SOD (+) ve MDA (+) hücre yoğunluğu skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). (Şekil 8 ve 9, Tablo 5).



Şekil 8: Gruplara göre SOD (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları



Şekil 9: Gruplara göre MDA (+) hücrelerin zamana göre immünohistokimyasal boyama yoğunluğu skorları

Table 5. Grupların zamana göre ortalama histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama skorları

		Enflamatuvar medyatörlerin , MDA (+) ve SOD (+) hücrelerin ortalama immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları					
	Zaman	McClanahan					
	(saat)	skorları	IL-6	PGE2	CGRP	MDA	SOD
Negatif Kontrol	6	0.00±0.00 ^a	0.16±0.40 ^a	0.50±0.54 ^a	0.16±0.40 ^a	0.00±0.00	0.16±0.40
	12	0.00±0.00 ^a	0.16±0.40 ^a	0.83±0.75 ^a	0.16±0.40 ^a	0.00±0.00	0.16±0.40
	24	0.00±0.00 ^a	0.16±0.40 ^a	0.66±0.81 ^a	0.33±0.51 ^a	0.00±0.00	0.33±0.51
Pozitif Kontrol	6	1.33±0.51 ^b	1.50±0.83 ^b	1.66±1.03 ^a	1.16±0.40 ^a	0.33±0.51	0.50±0.54
	12	2.00±0.63 ^b	1.50±1.04 ^b	2.00±1.09 ^b	2.16±0.40 ^b	0.33±0.81	0.33±0.51
	24	2.66±0.51 ^b	1.66±0.81 ^b	2.33±0.81 ^b	2.66±0.51 ^b	0.66±0.81	0.66±0.81
Benfotiamin	6	0.50±0.54 ^a	1.16±0.40 ^b	1.00±0.63 ^a	0.66±0.51 ^a	0.33±0.51	0.83±0.40
	12	0.83±0.75 ^a	0.83±0.75 ^a	1.16±0.98 ^a	1.16±0.75 ^a	0.33±0.51	0.83±0.75
	24	0.57±0.78 ^a	0.57±0.53 ^a	0.57±0.78 ^a	1.14±0.89 ^a	0.16±0.40	0.85±0.89
P		<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	>0.05	>0.05

* Aynı sütundaki benzer üst simgeler istatistik açısından gruplar arasındaki farkın anlamsız , farklı üst simgeler önemli olduğunu göstermektedir ($p > 0.05$).

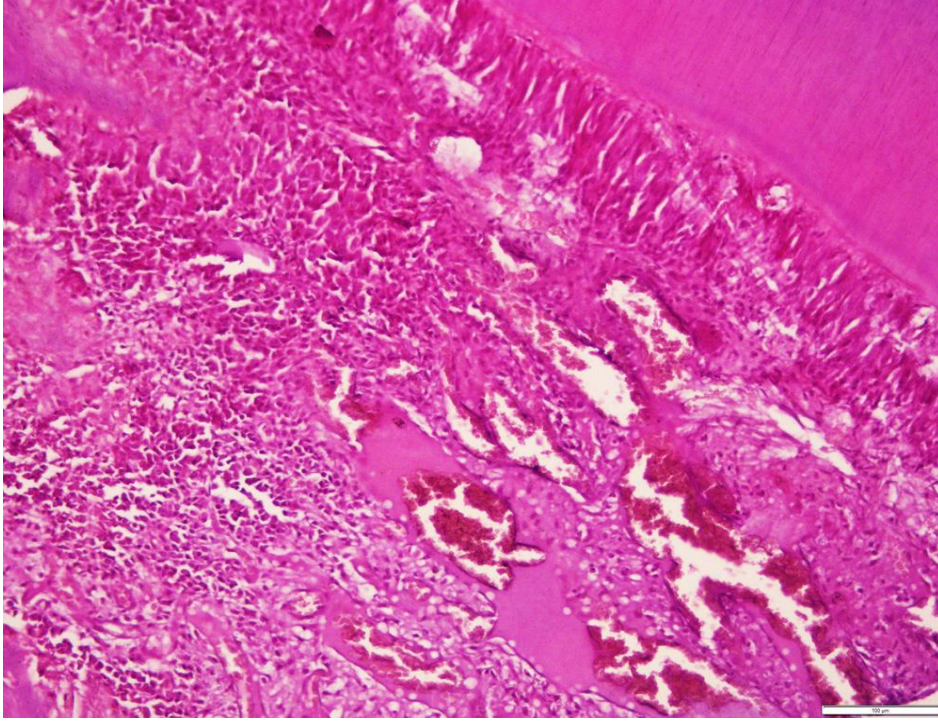
4.3.5. İmmünpozitif Hücre Ortalamaları

İmmünohistokimyasal değerlendirmede tüm gruplar için immünpozitif hücreler tipleri odontoblast hücreleri, pulpa hücreleri ve enflamatuvar hücreler olarak üç ana grupta sınıflandırıldı. Pozitif kontrol grubunda 6. ve 12. saatlerde CGRP (+) en çok pulpa hücreleri iken, IL-6 (+) ve PGE2 (+) hücreleri enflamatuvar hücrelerdir. 24. saatte ise enflamatuvar hücreler CGRP, IL-6 ve PGE2 için en fazla boyanan hücre tipi olmuştur (Tablo 6).

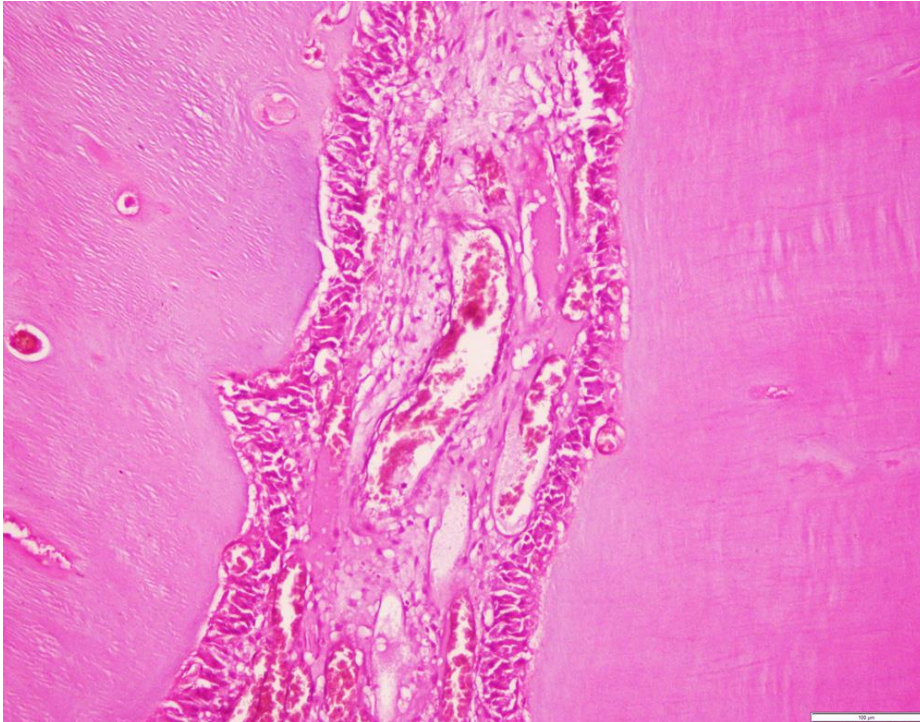
Benfotiamin grubunda 6., 12. ve 24. Saatlerde CGRP (+), IL-6 (+) ve PGE2 (+) hücreler en yoğun olarak enflamatuvar hücreleridir (Tablo 6). MDA (+) ve SOD (+) hücreler en çok pozitif kontrol grubunda 12. ve 24. Sattlerde gözlenmiş ve her ikisi içinde enflamatuvar hücreler en yoğun olarak boyanan hücre tipidir (Tablo 6).

Tablo 6: Gruplara ve zamana göre immünpozitif hücre tiplerinin dağılımı (%)

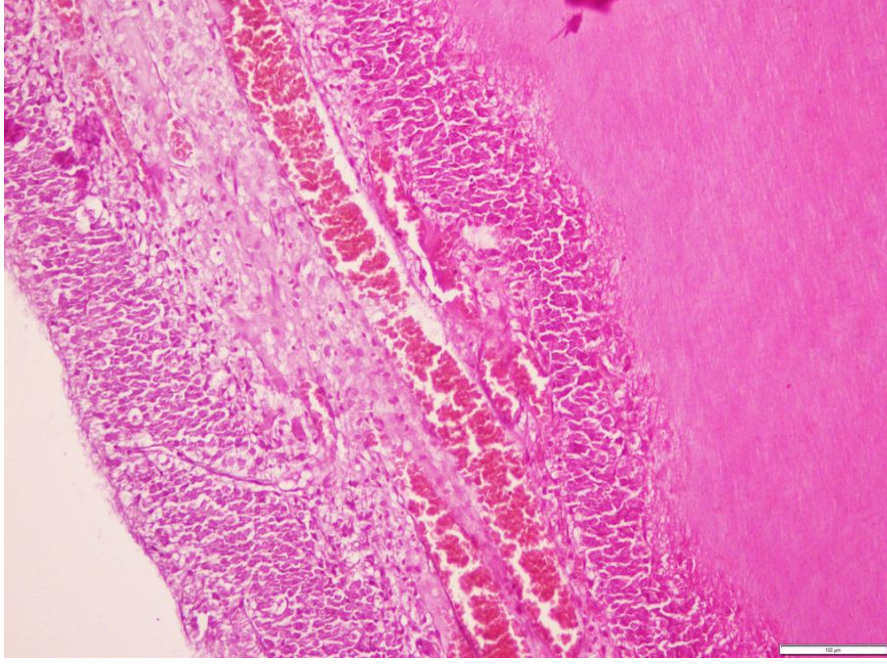
Saat	Gruplar	Hücreler	CGRP (%)	IL-6 (%)	PGE2 (%)	MDA (%)	SOD (%)
6	Negatif Kontrol	Odontoblast	0	0	0	0	0
		Bağ dokusu hücreleri	1	2	1	0	0
		Enflamatuvar hücreler	0	0	0	0	0
	Pozitif Kontrol	Odontoblast	38	56	25	0	0
		Bağ dokusu hücreleri	42	63	39	0	2
		Enflamatuvar hücreler	35	79	46	1	5
	Benfotiamin	Odontoblast	20	13	13	0	2
		Bağ dokusu hücreleri	19	29	22	0	1
		Enflamatuvar hücreler	25	32	30	0	1
12	Negatif Kontrol	Odontoblast	0	1	1	0	0
		Bağ dokusu hücreleri	2	2	2	0	2
		Enflamatuvar hücreler	0	1	0	0	0
	Pozitif Kontrol	Odontoblast	49	82	37	8	3
		Bağ dokusu hücreleri	57	75	39	12	5
		Enflamatuvar hücreler	50	90	55	15	9
	Benfotiamin	Odontoblast	15	10	11	0	2
		Bağ dokusu hücreleri	10	18	13	0	2
		Enflamatuvar hücreler	18	21	21	2	5
24	Negatif Kontrol	Odontoblast	0	5	0	0	2
		Bağ dokusu hücreleri	5	4	3	0	2
		Enflamatuvar hücreler	1	3	0	0	1
	Pozitif Kontrol	Odontoblast	72	85	45	3	12
		Bağ dokusu hücreleri	79	79	49	7	19
		Enflamatuvar hücreler	84	91	58	8	22
	Benfotiamin	Odontoblast	10	7	6	0	7
		Bağ dokusu hücreleri	7	9	9	0	8
		Enflamatuvar hücreler	12	15	12	1	12



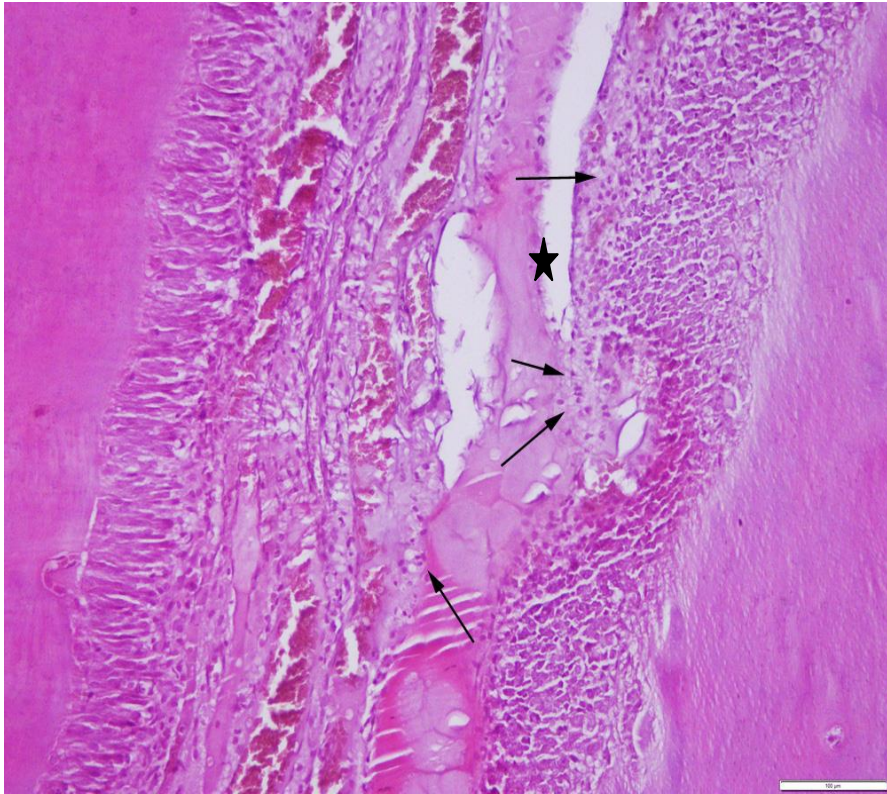
Resim 14: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü. Sağlıklı pulpa, HE, Bar=100 μ m.



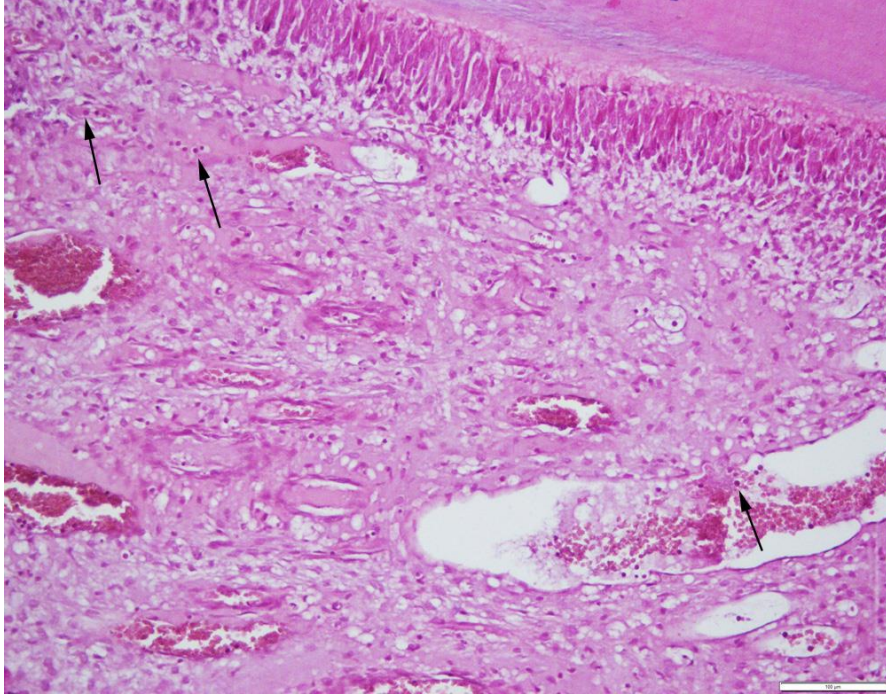
Resim 15: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü. Sağlıklı pulpa, HE, Bar=100 μ m.



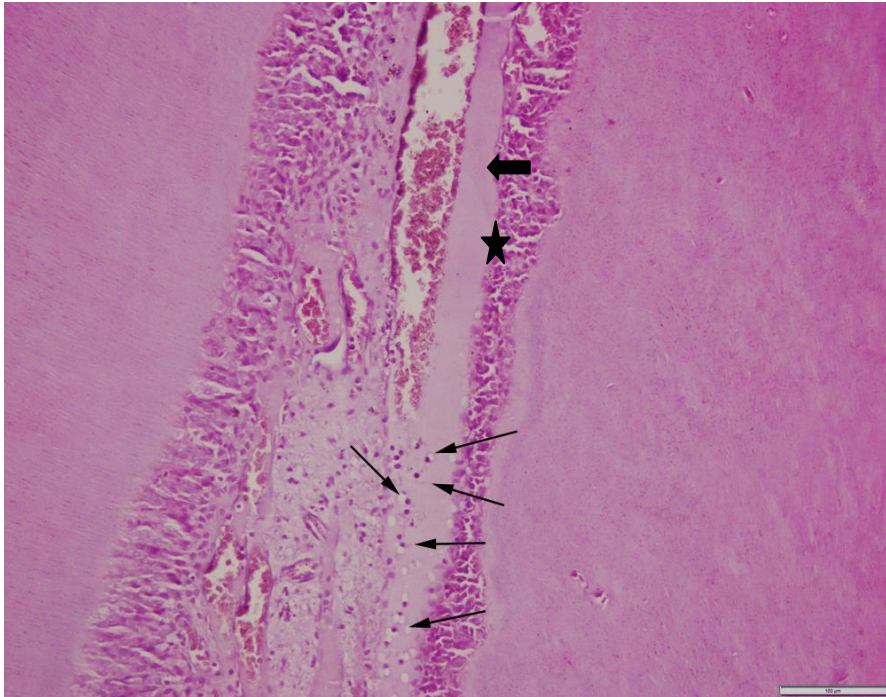
Resim 16: Negatif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü. Sağlıklı pulpa, HE, Bar=100 μ m.



Resim 17: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü. Nötrofil lökosit infiltrasyonu (oklar), ödem varlığı (yıldız). HE, Bar=100 μ m.



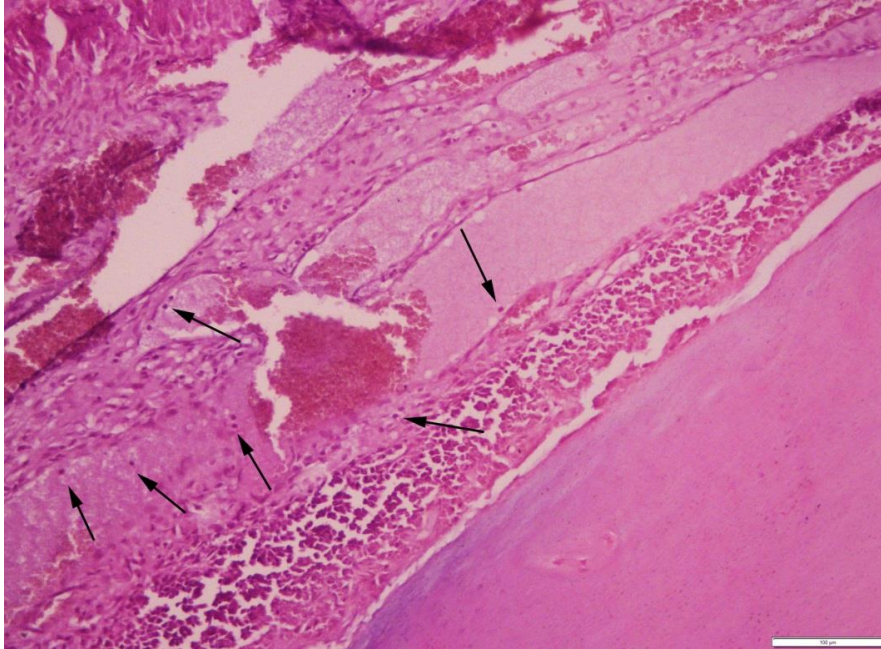
Resim 18: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 6. saat histopatolojik görünümü. Az sayıda nötrofil lökosit infiltrasyonu (oklar), HE, Bar=100 μ m



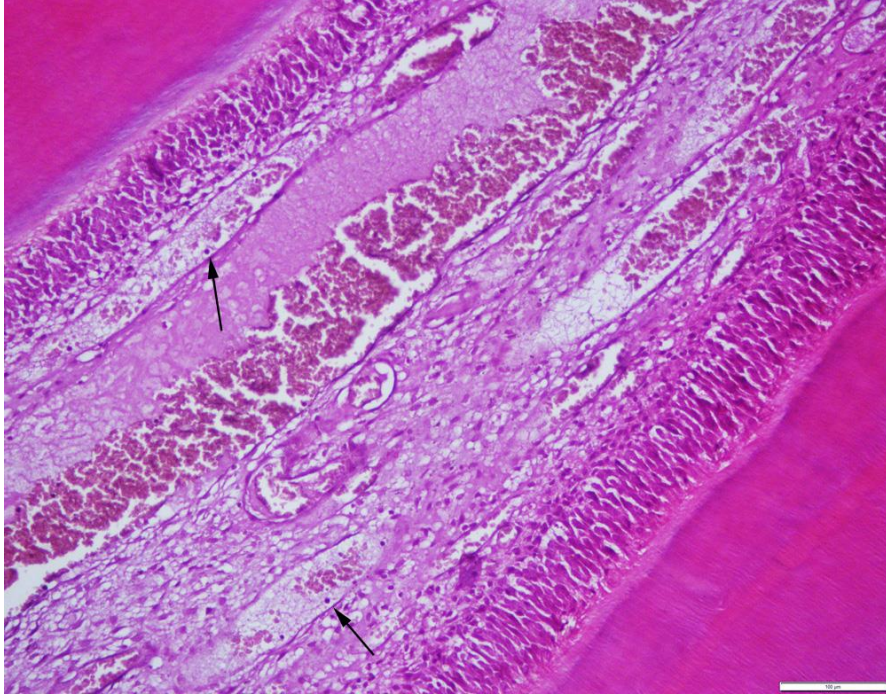
Resim 19: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü. Belirgin nötrofil lökosit infiltrasyonu (ok), damar çeperlerine migrasyon, hiperemi (kalın ok), ödem (yıldız). HE, Bar=100 μ m



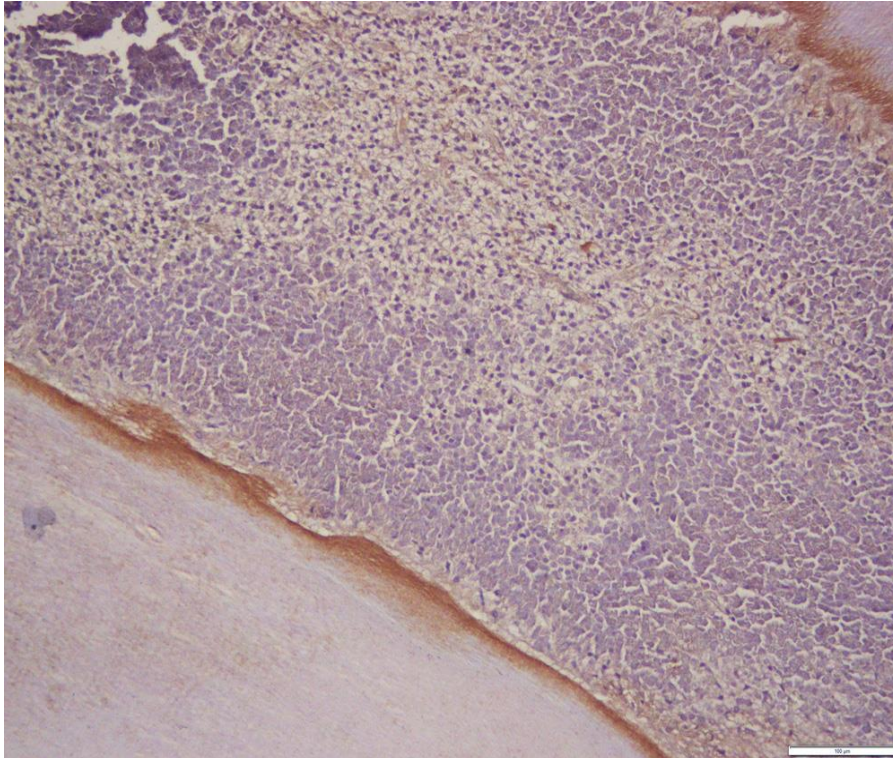
Resim 20: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 12. saat histopatolojik görünümü. Nötrofil lökosit infiltrasyonu yok, hiperemi yok, ödem yok. HE, Bar=100µm



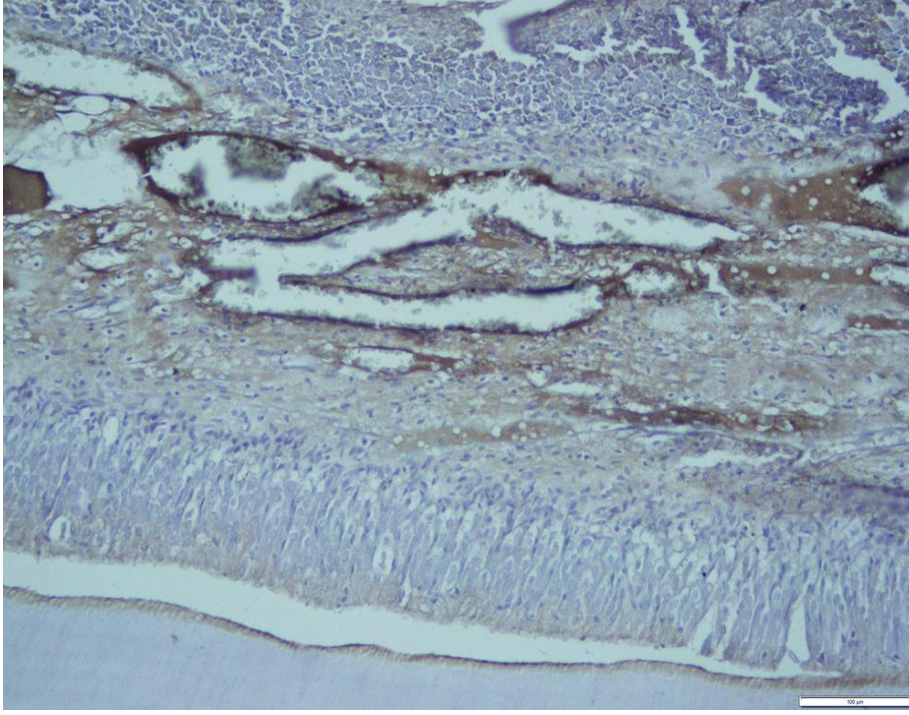
Resim 21: Pozitif kontrol grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü. Belirgin nötrofil lökosit infiltrasyonu (oklar), damar çerperlerine migrasyon. HE, Bar=100µm



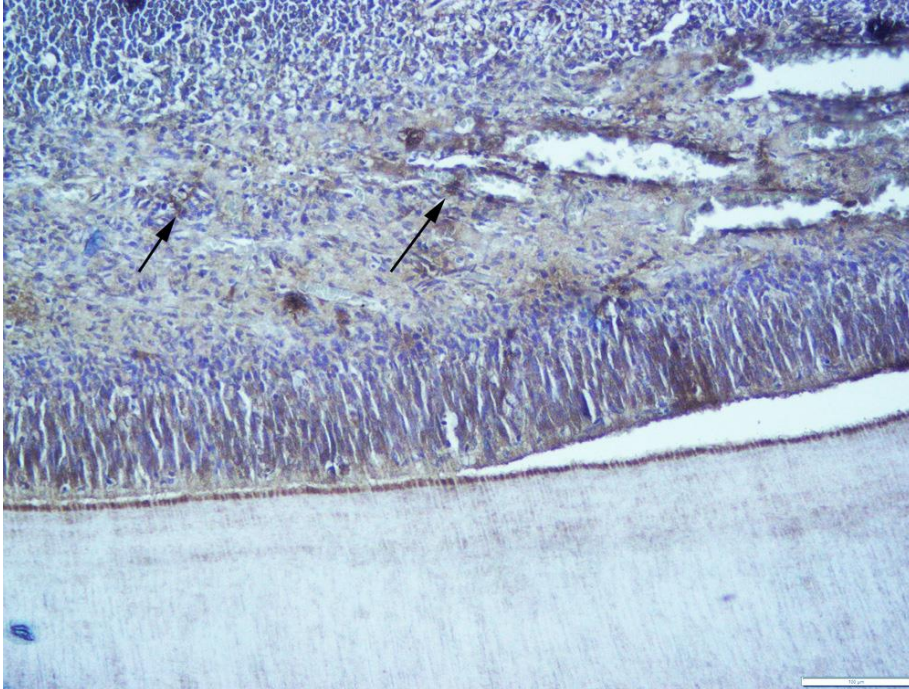
Resim 22: Benfotiamin grubundaki bir rat pulpasının 24. saat histopatolojik görünümü. Azalmış nötrofil lökosit infiltrasyonu (oklar), HE, Bar=100 μ m



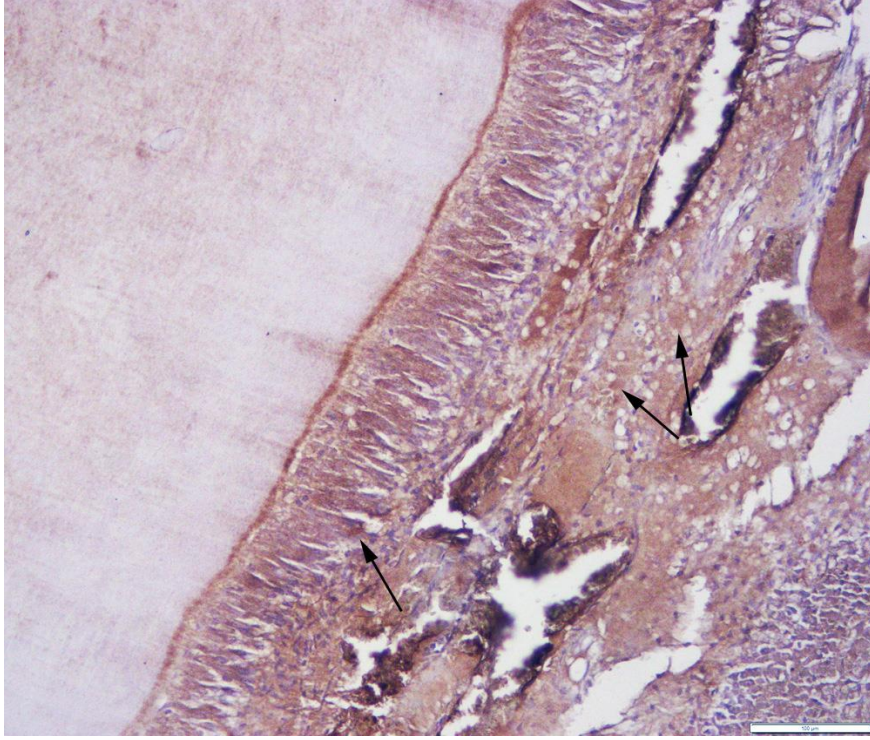
Resim 23: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



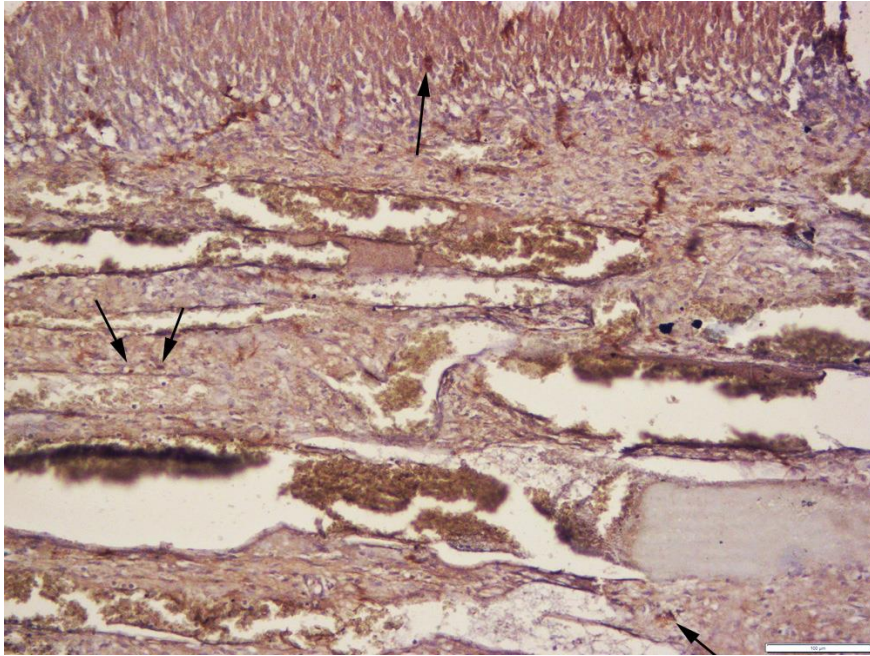
Resim 24: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m.



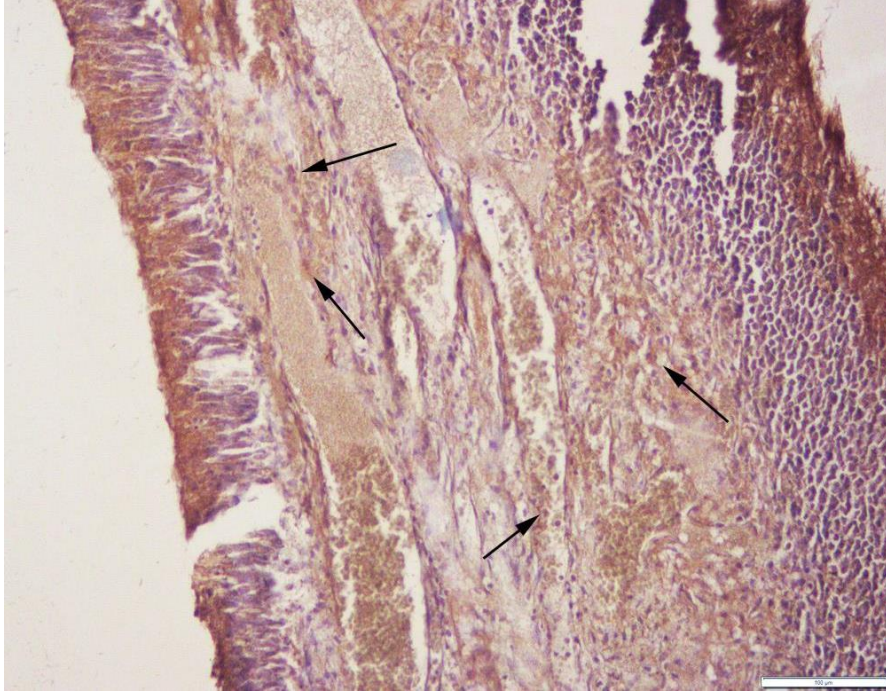
Resim 25: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde hafif pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



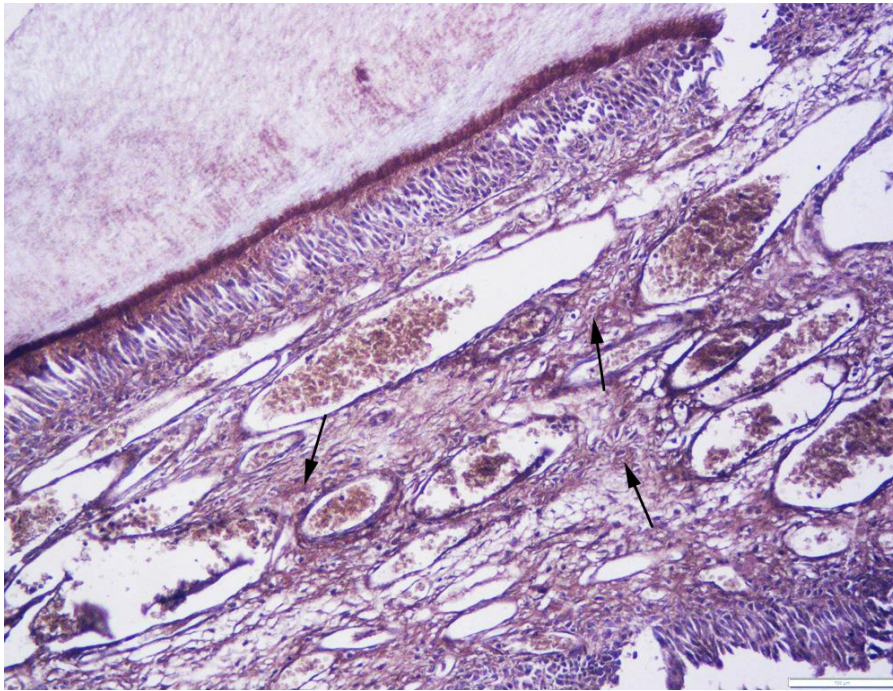
Resim 26: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, çok sayıda hücrede (oklar) pozitif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



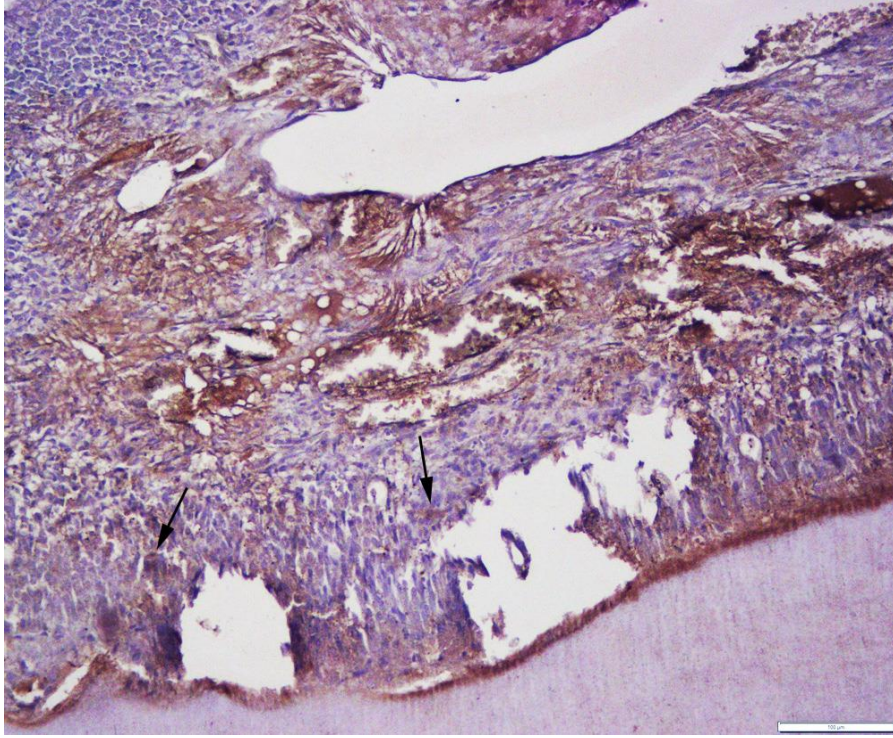
Resim 27: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, birçok hücrede pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



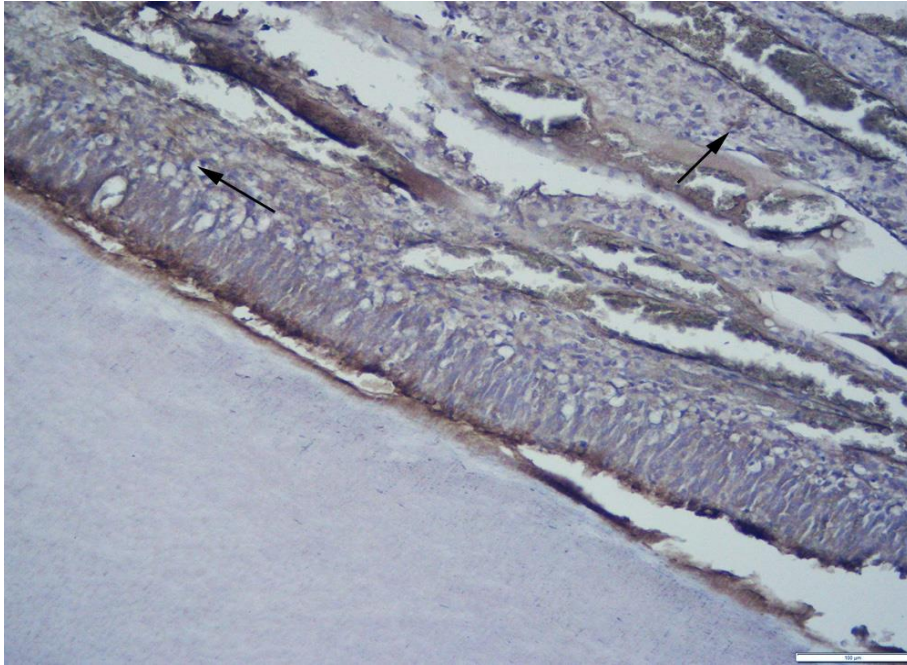
Resim 28: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, çok sayıda hücrede pozitif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



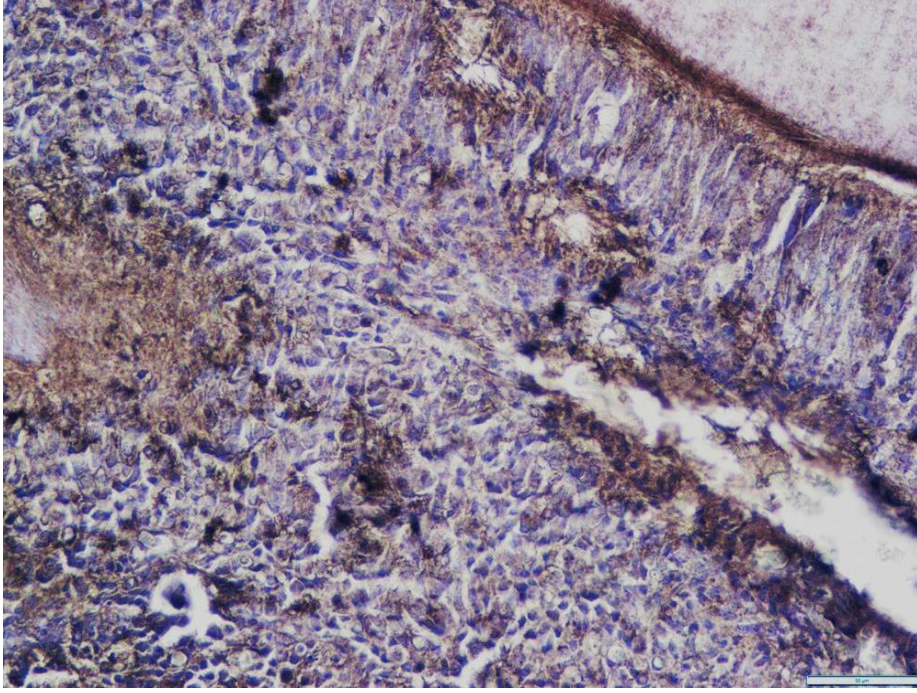
Resim 29: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, hafif pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



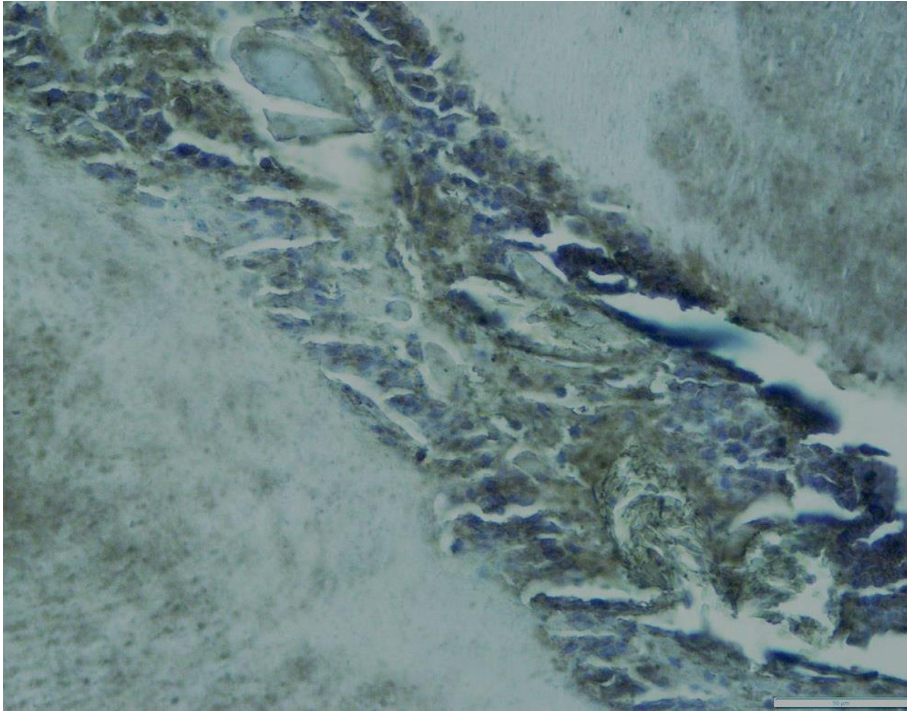
Resim 30: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, azalmış pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



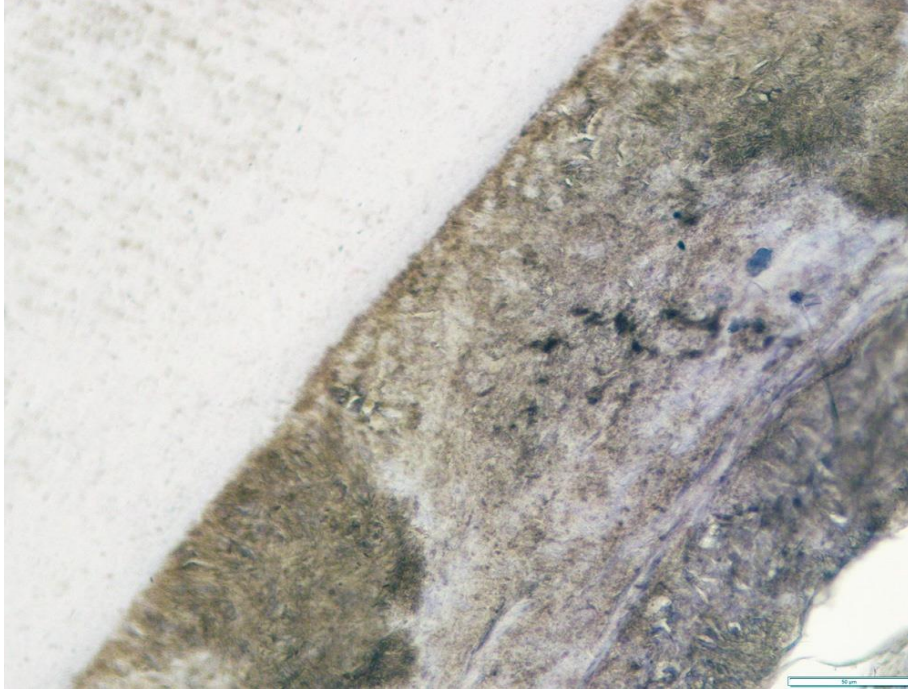
Resim 31: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat CGRP ile immunohistokimyasal boyaması, iyice azalmış pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



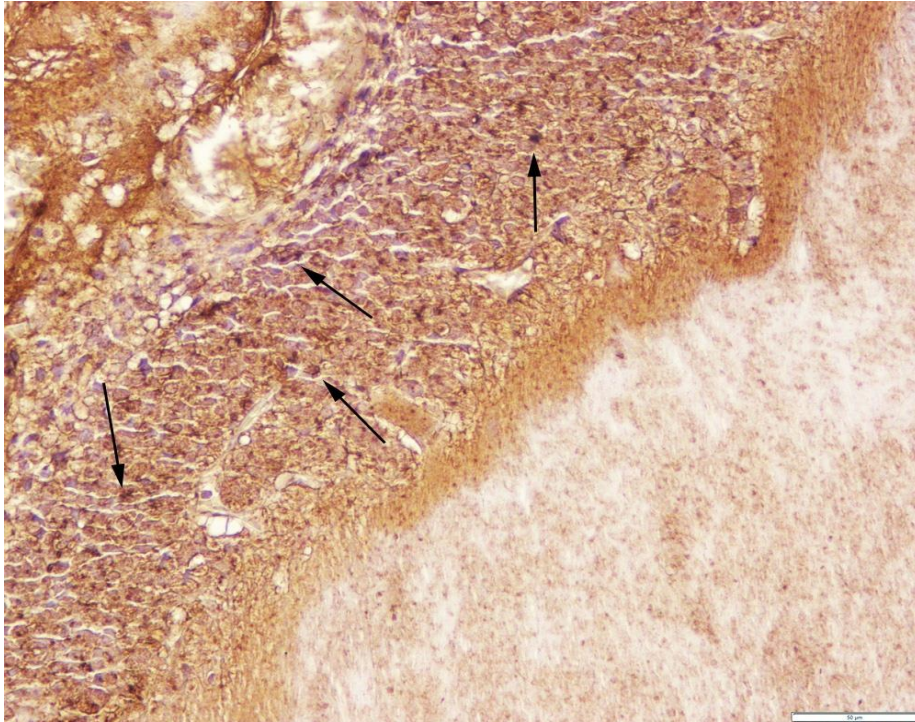
Resim 32: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, negatif immunoreaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



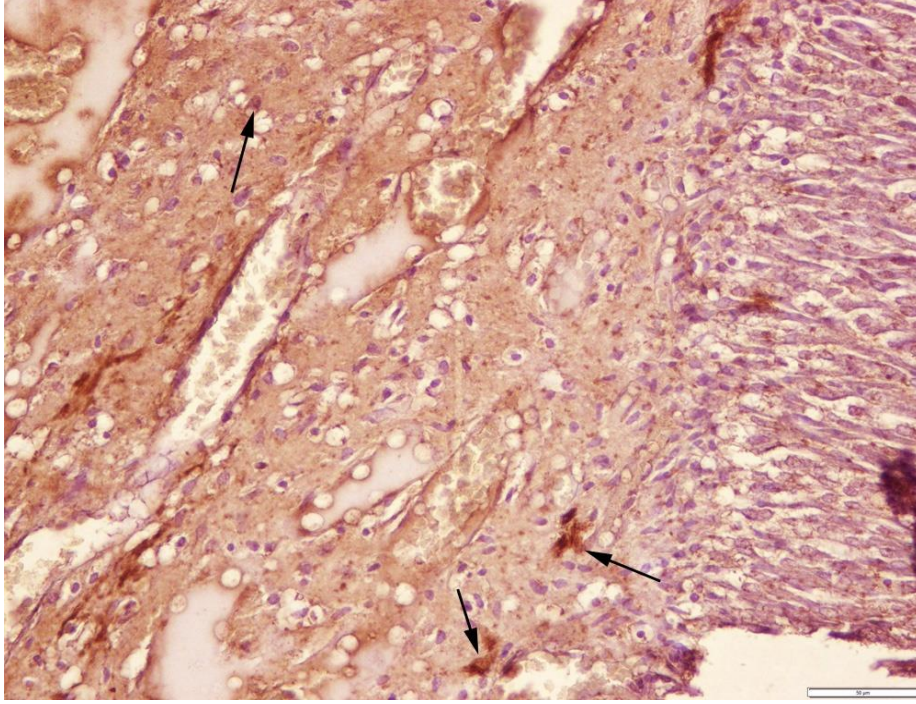
Resim 33: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde hafif pozitif immunoreaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



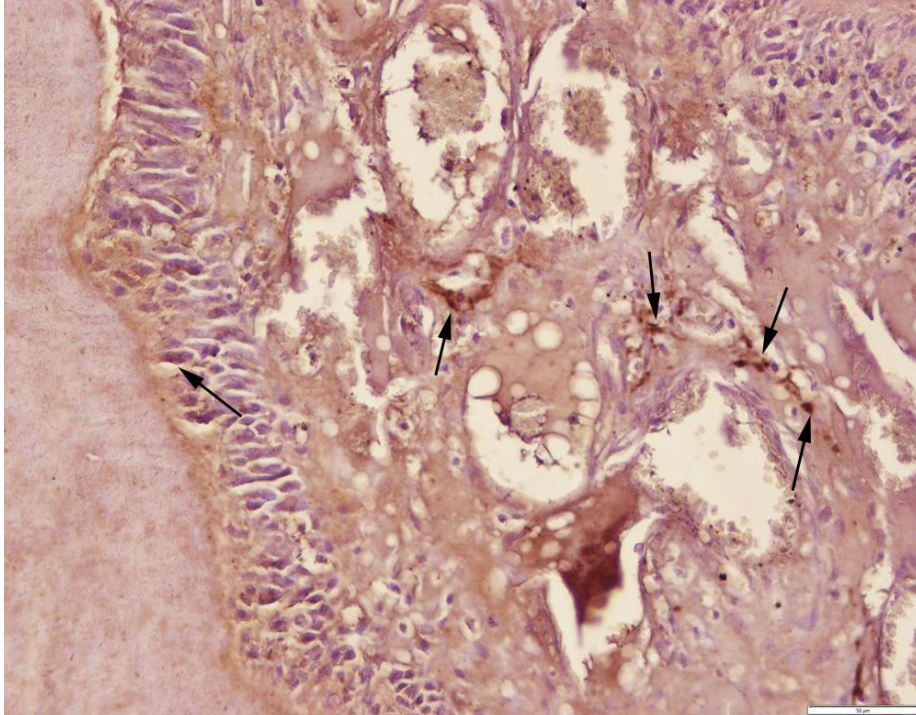
Resim 34: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, hücrelerde hafif pozitif immunoreaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



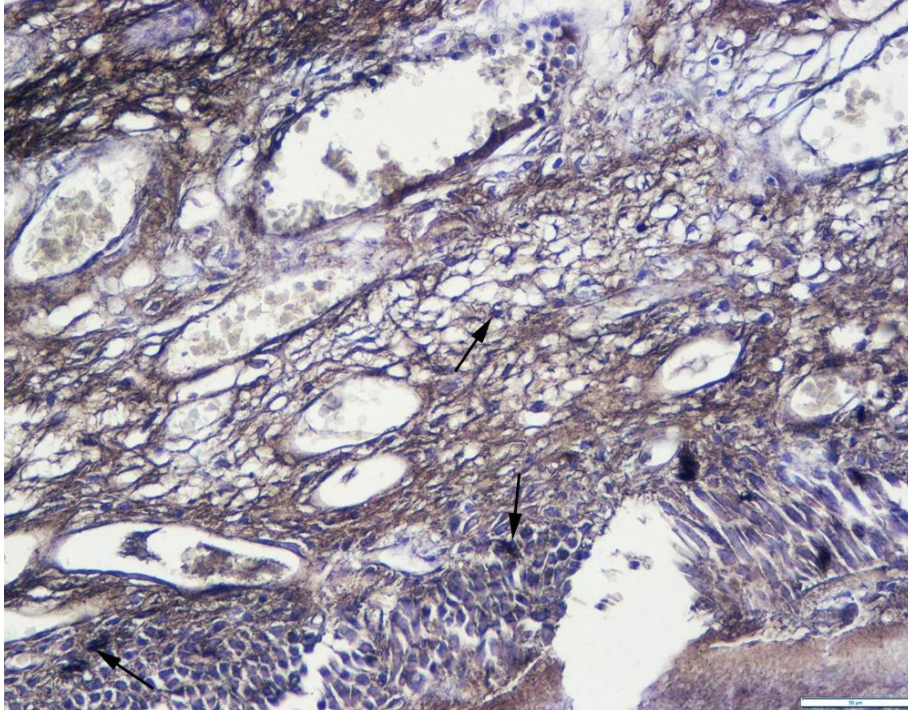
Resim 35: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, birçok hücrelerde belirgin immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



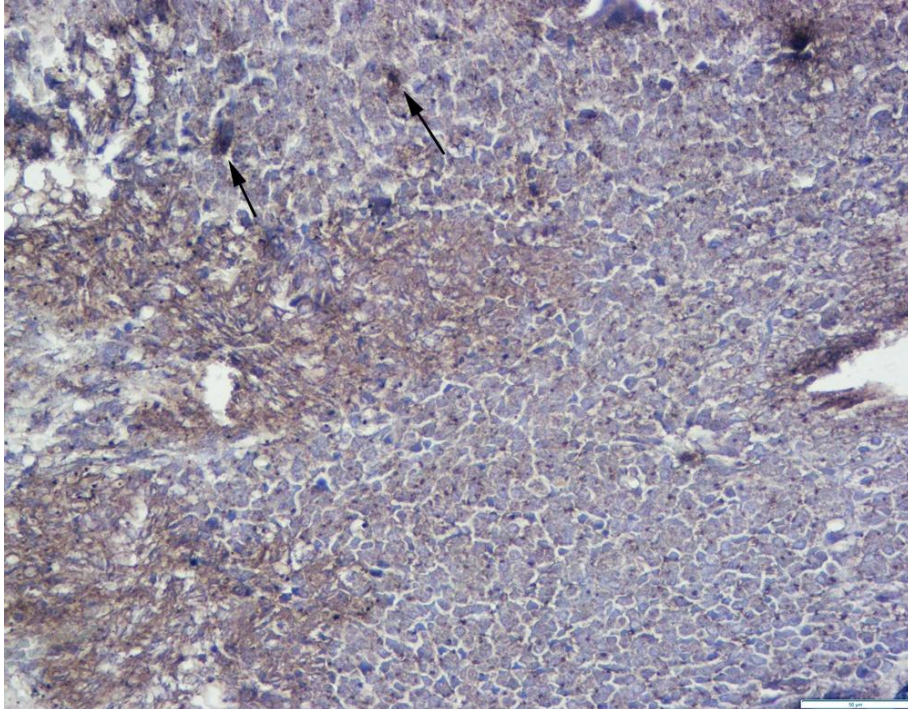
Resim 36: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde şiddetli immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



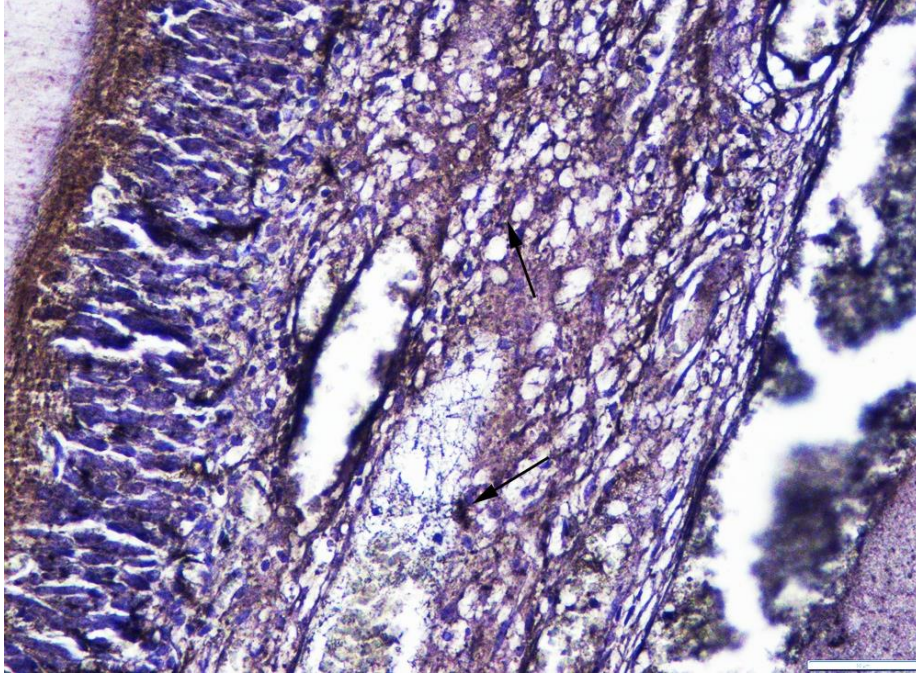
Resim 37: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde belirgin immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



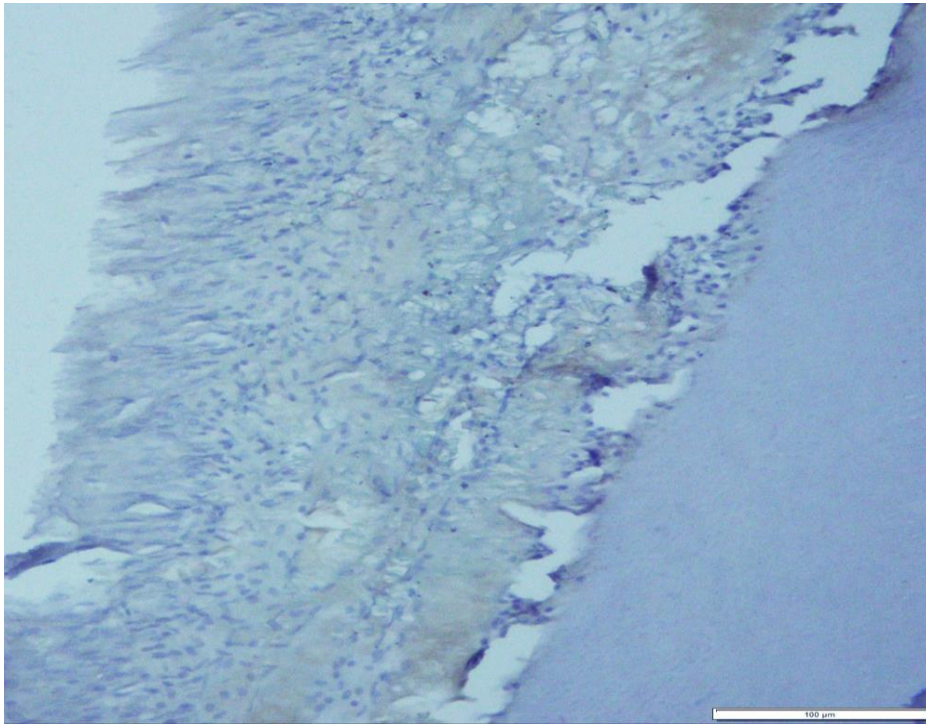
Resim 38: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



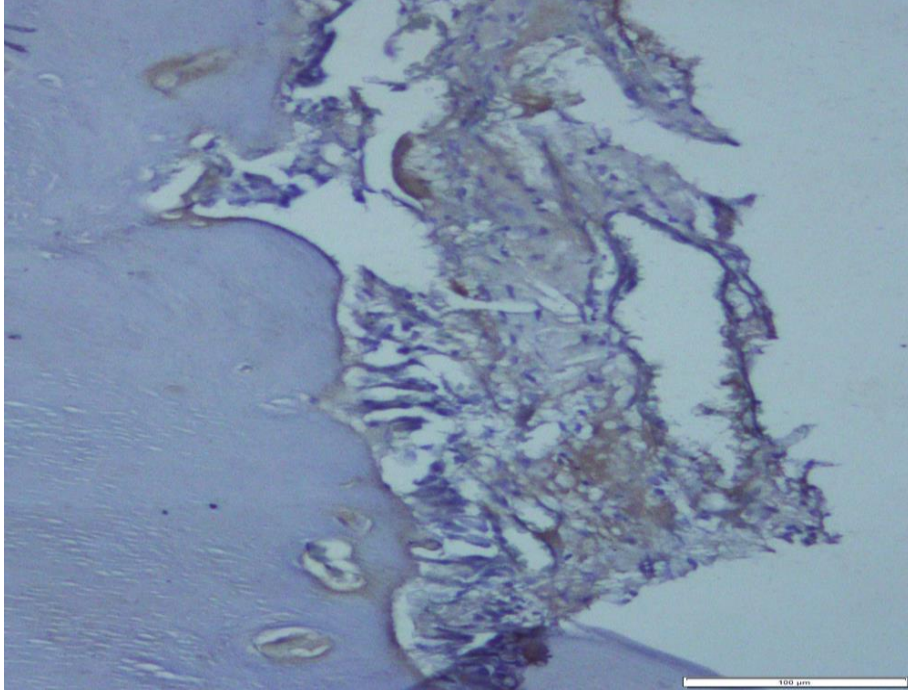
Resim 39: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, belirgin şekilde azalmış immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



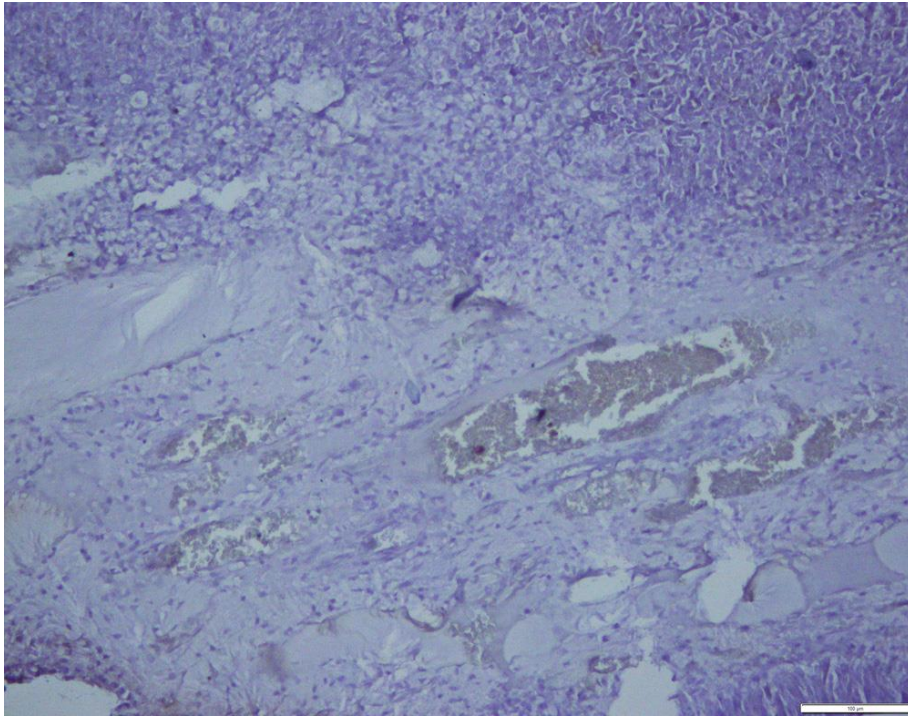
Resim 40: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat IL-6 ile immunohistokimyasal boyaması, az sayıda hücrede immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



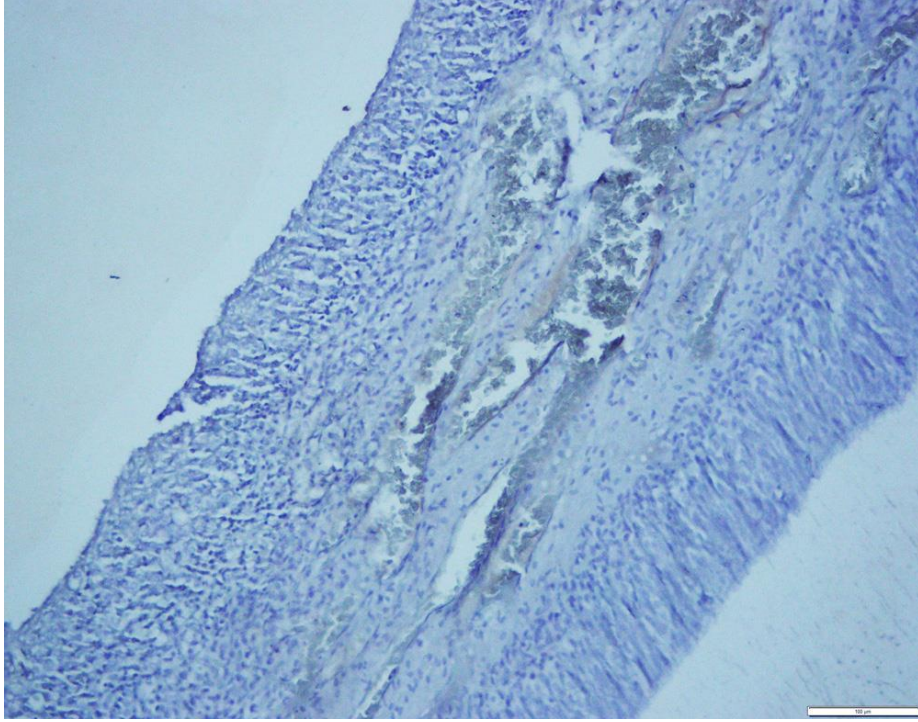
Resim 41: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



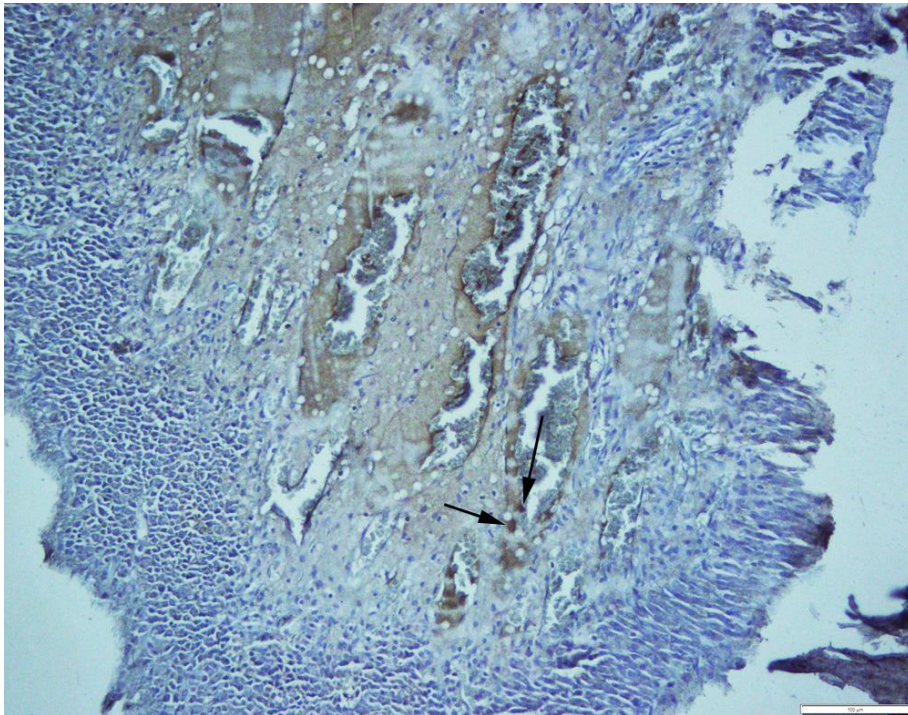
Resim 42: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



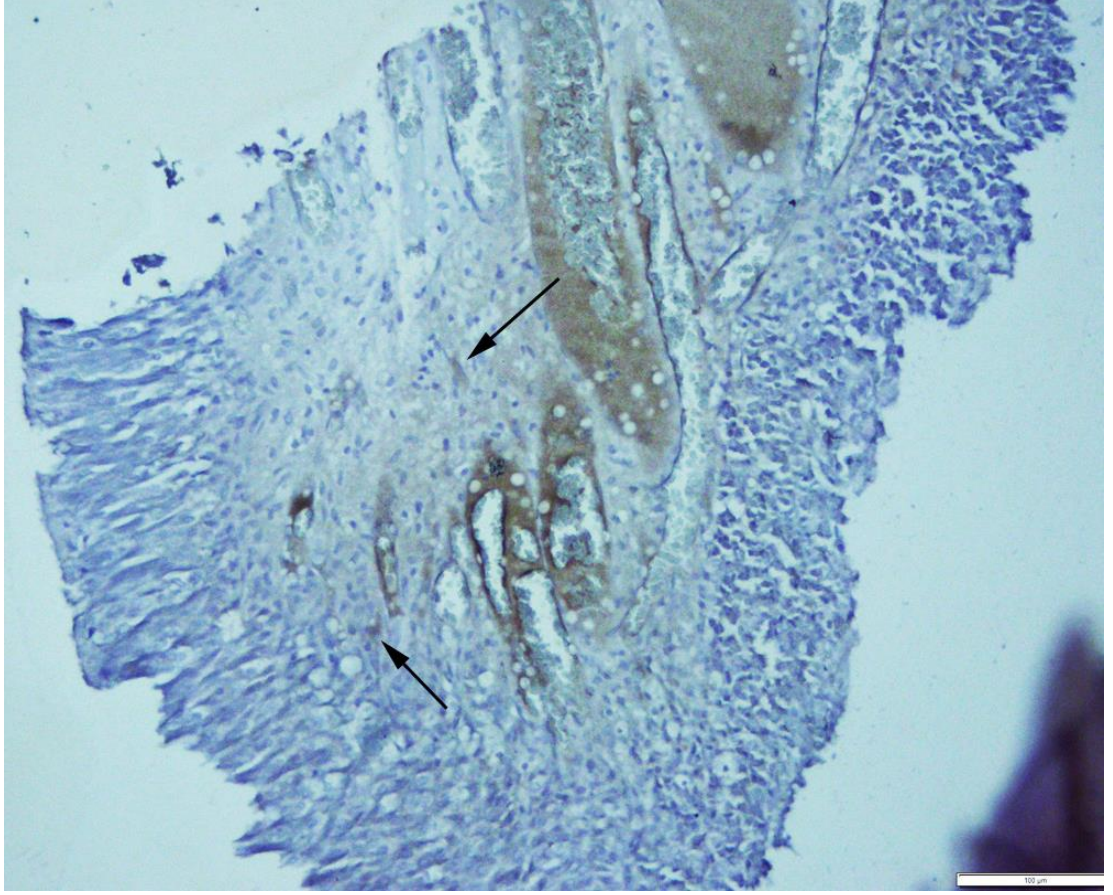
Resim 43: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



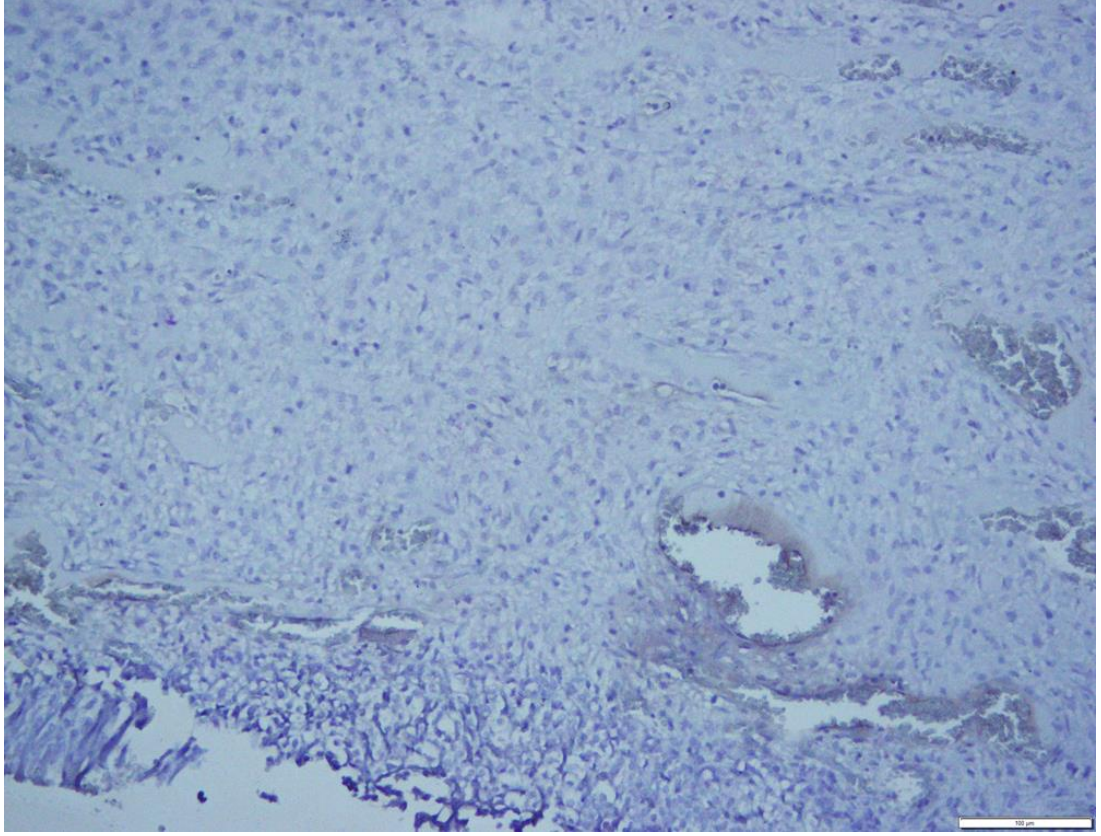
Resim 44: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



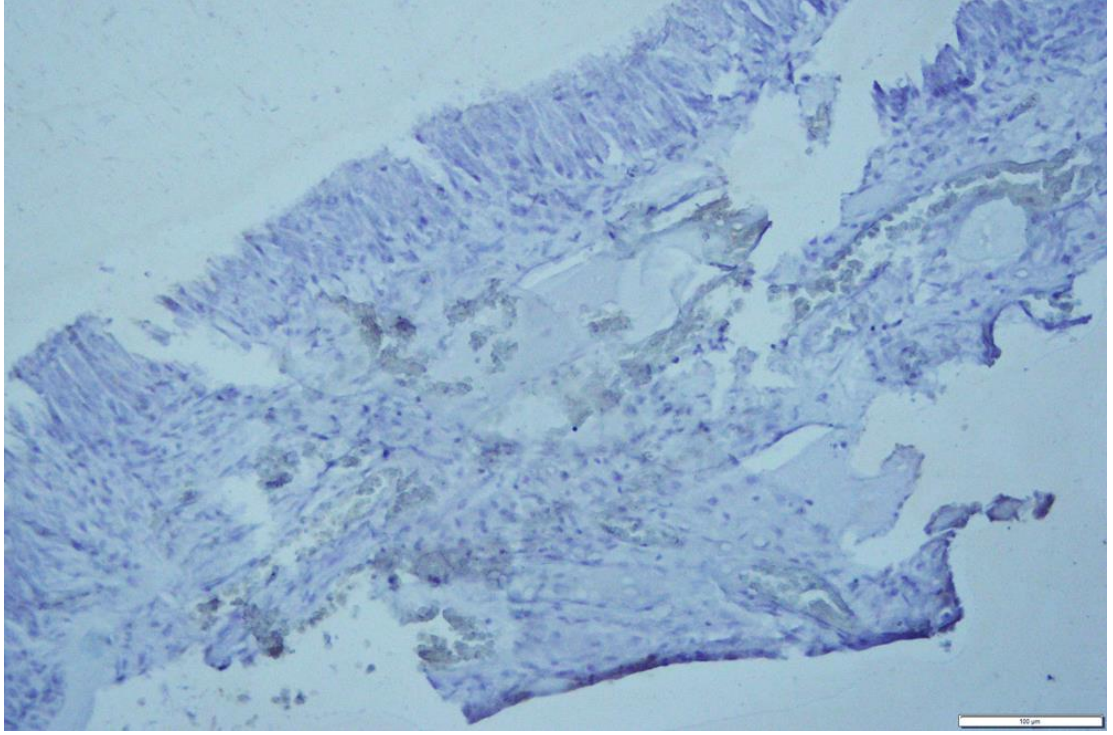
Resim 45: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde kahverengi immunopozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



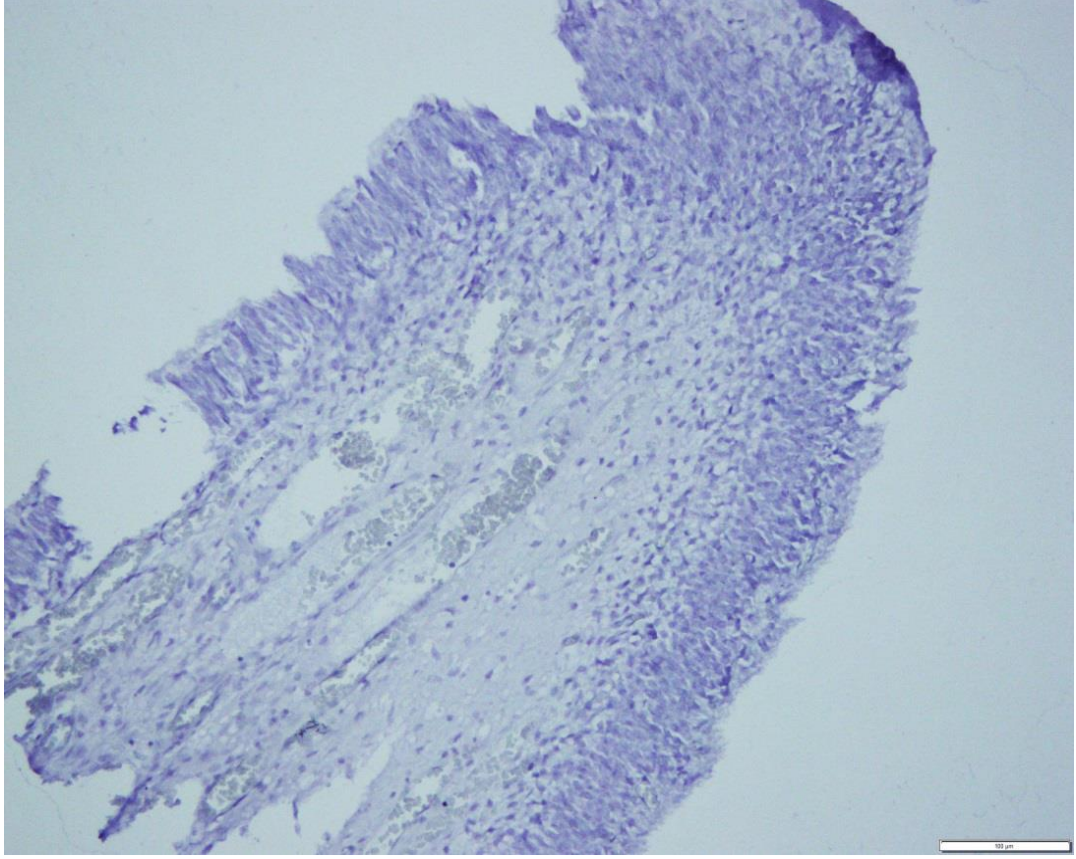
Resim 46: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, az sayıda hücrede pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



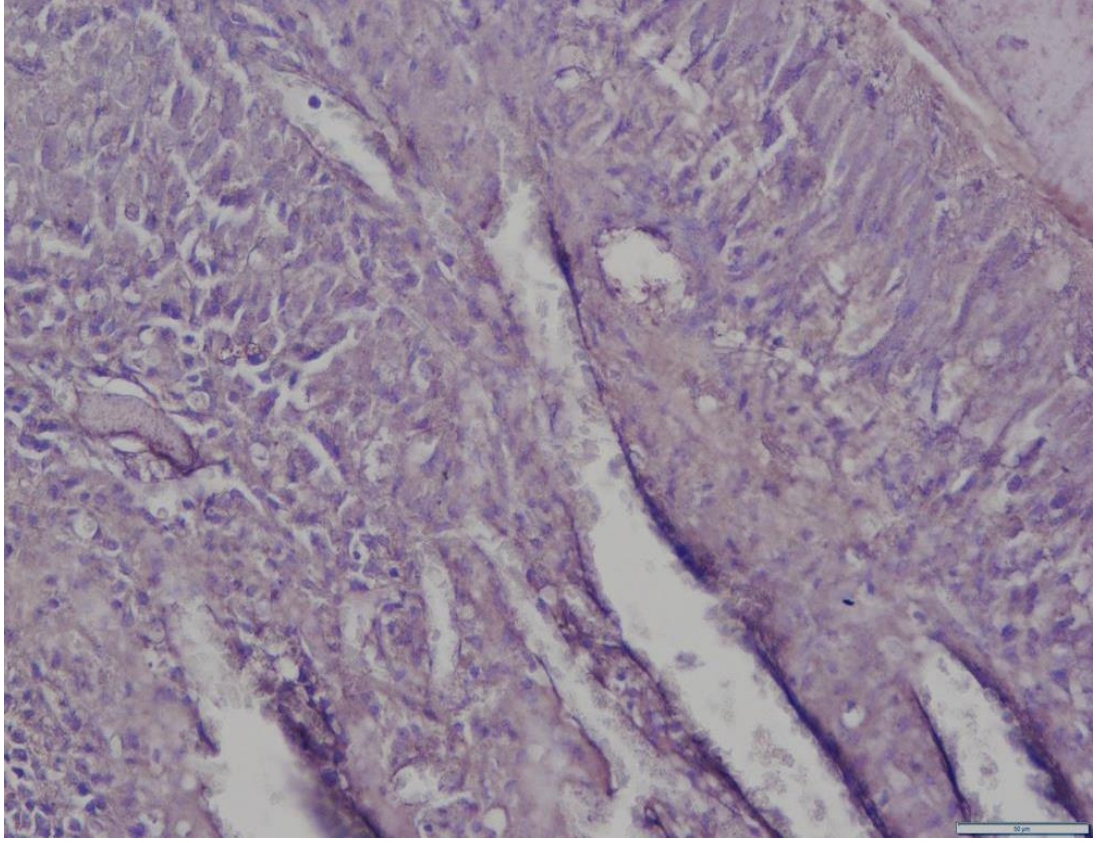
Resim 47: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



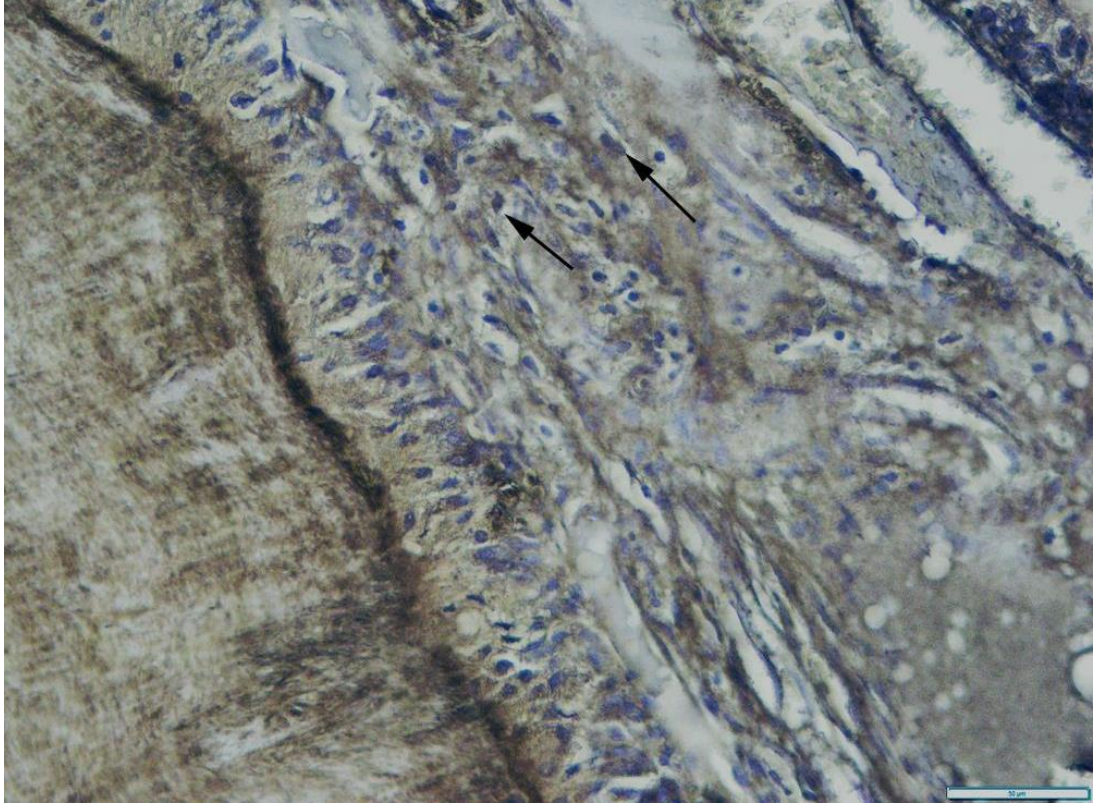
Resim 48: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



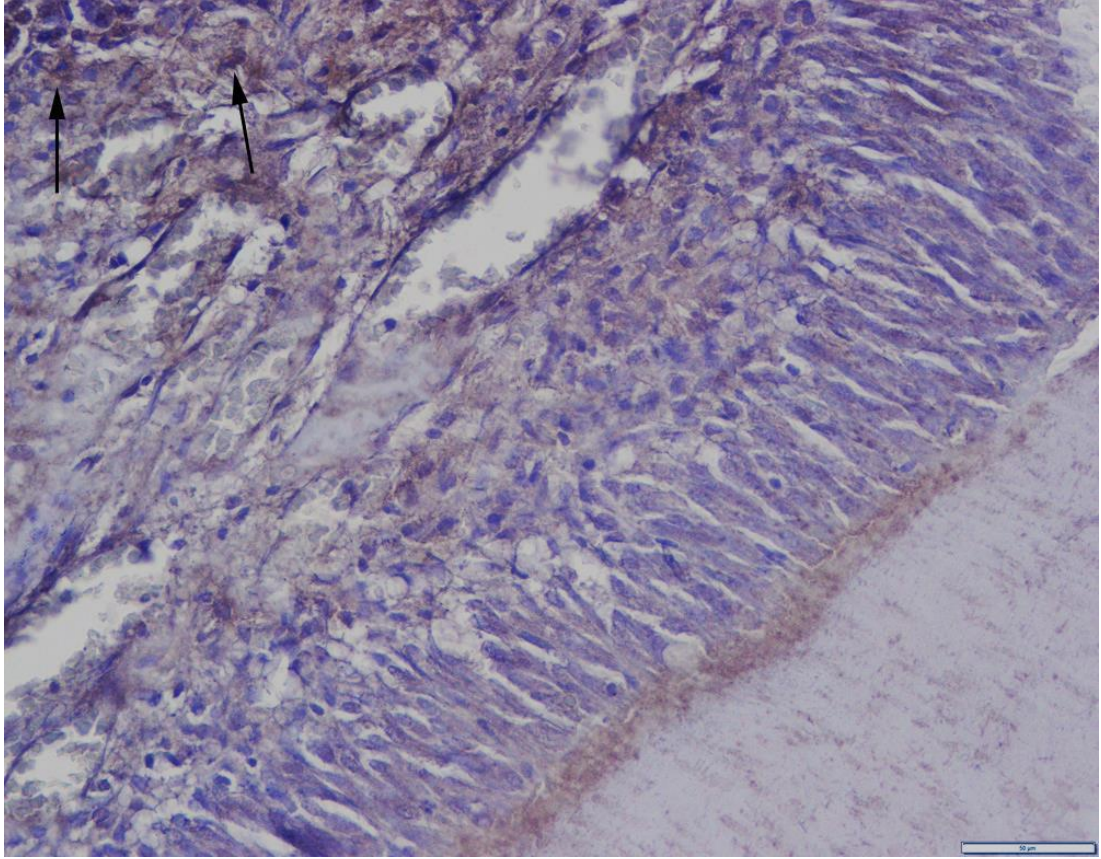
Resim 49: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat MDA ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



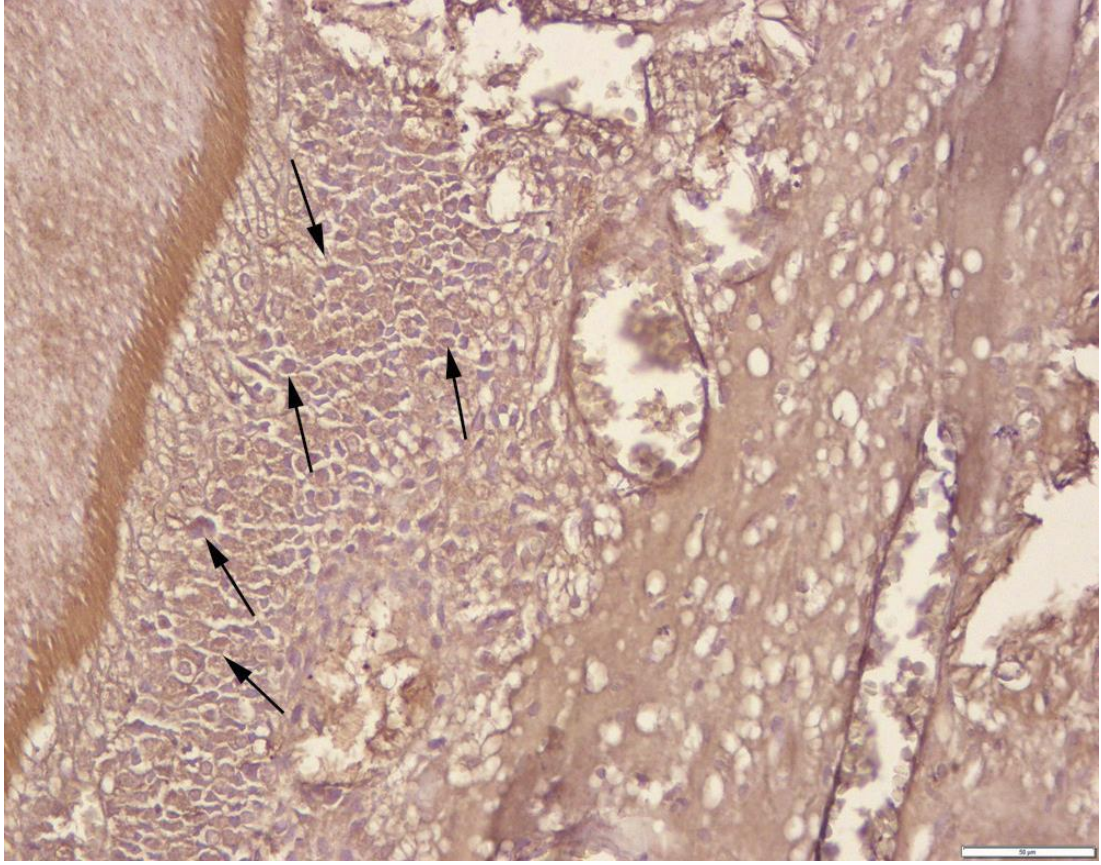
Resim 50: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



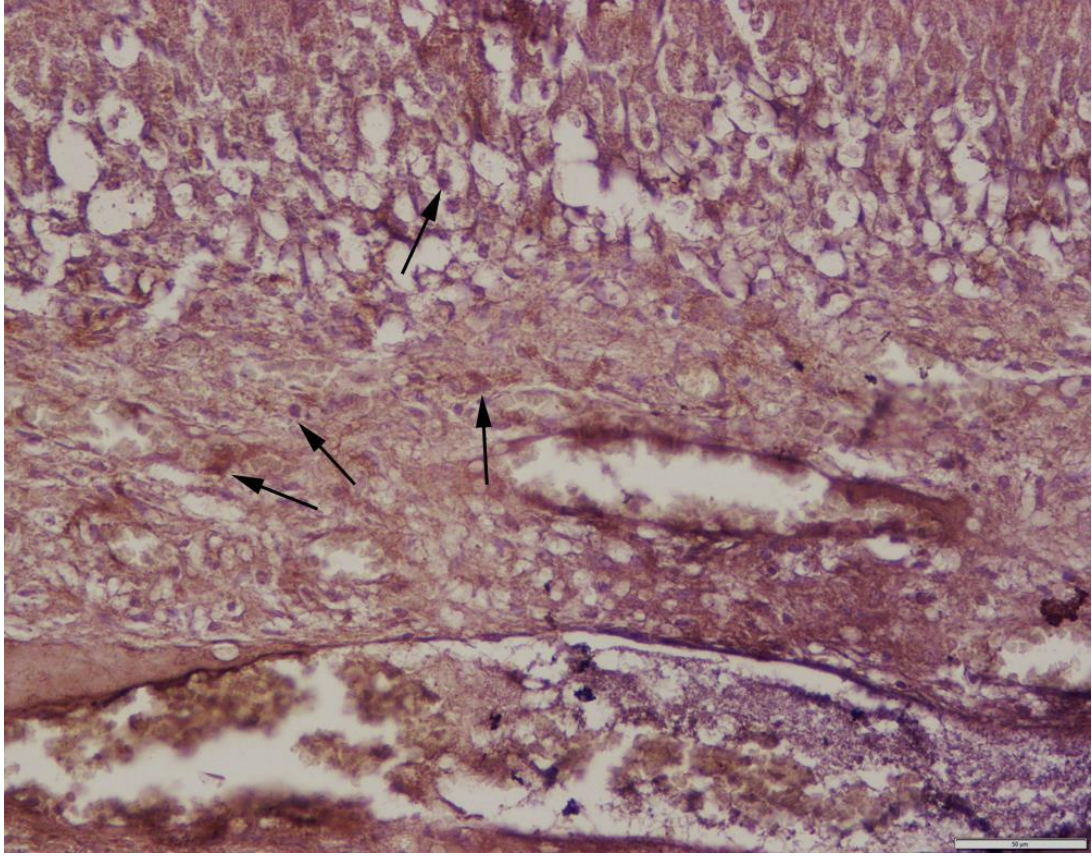
Resim 51: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, tek tük hücrede pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



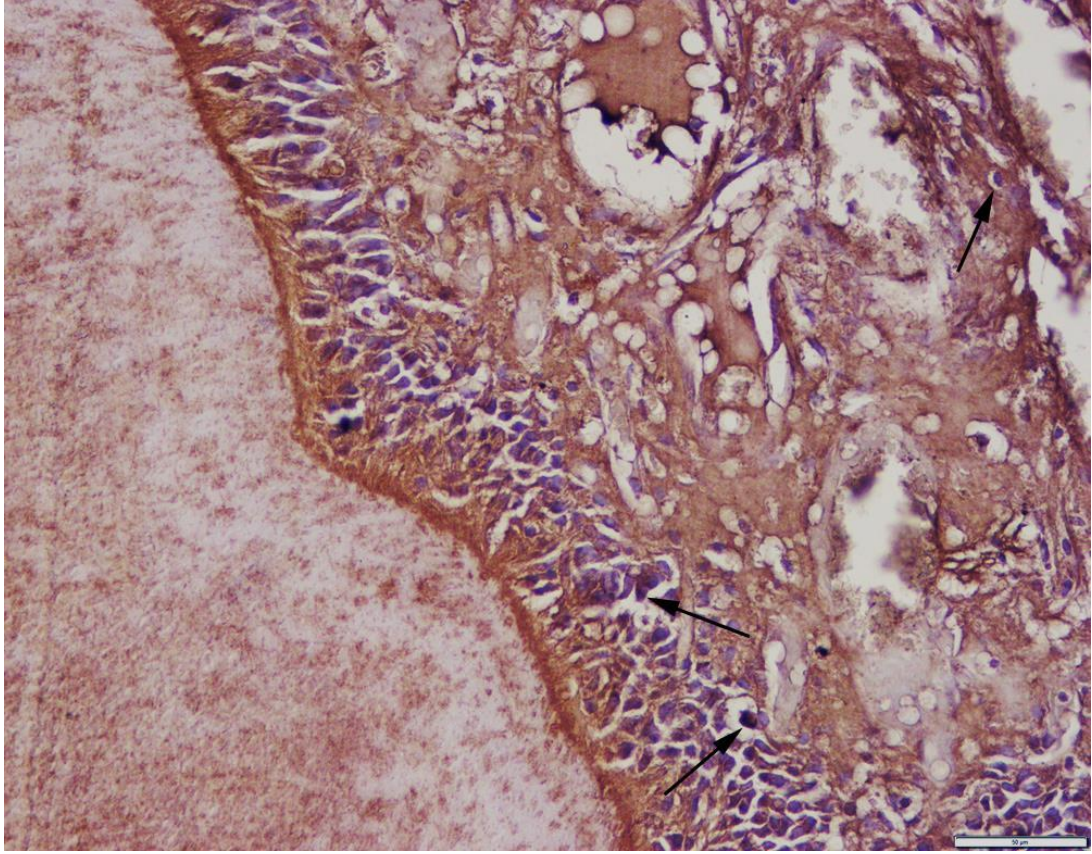
Resim 52: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, çok hafif pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



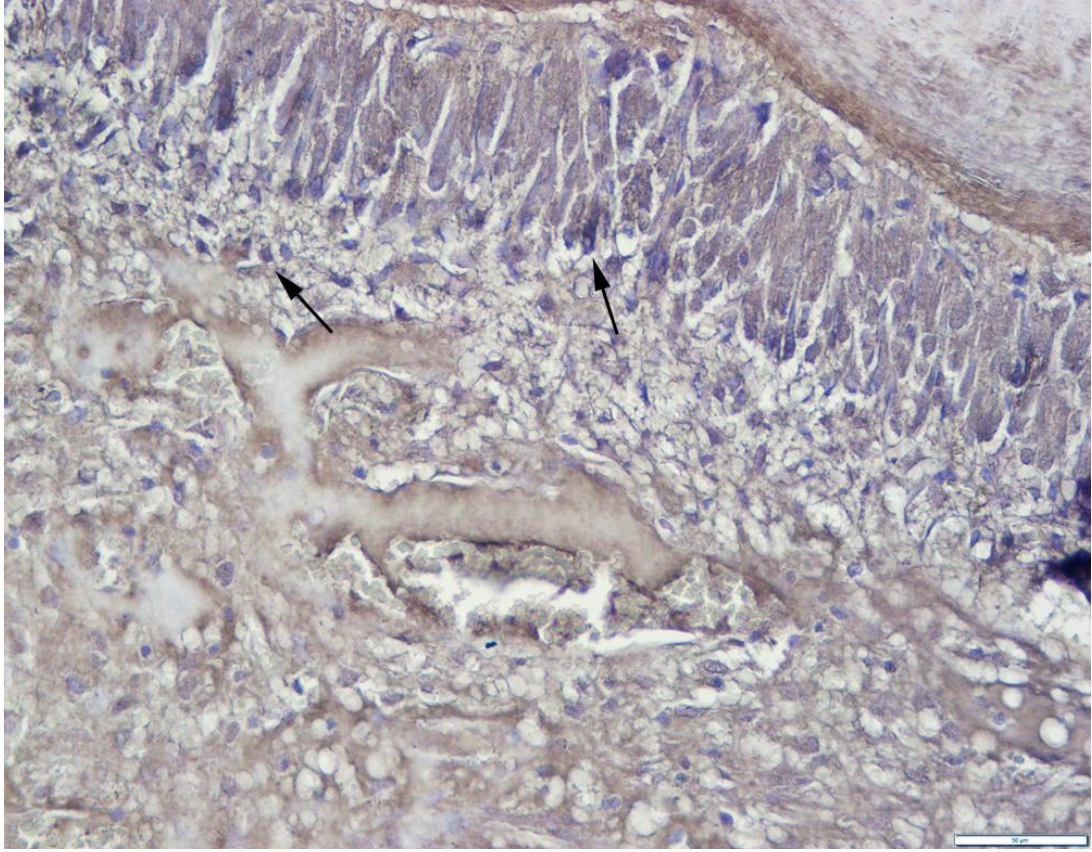
Resim 53: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, birçok hücrede pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



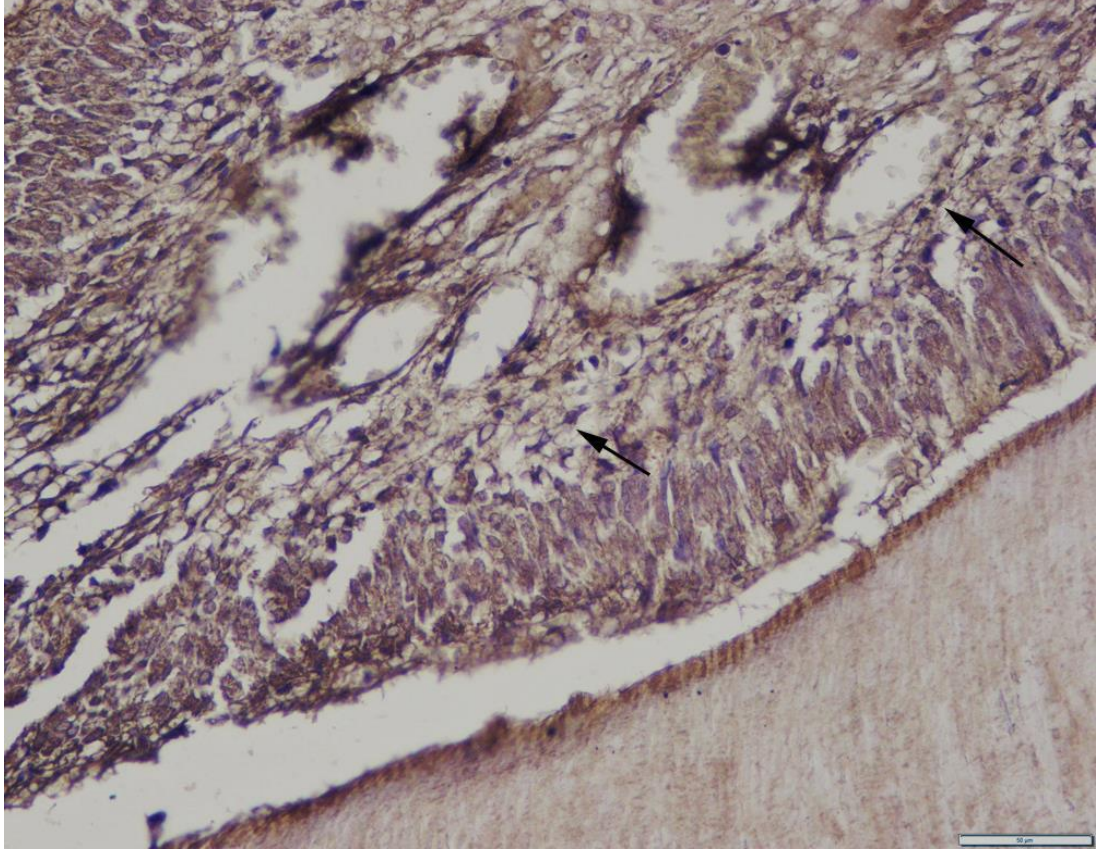
Resim 54: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, birçok hücrede pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



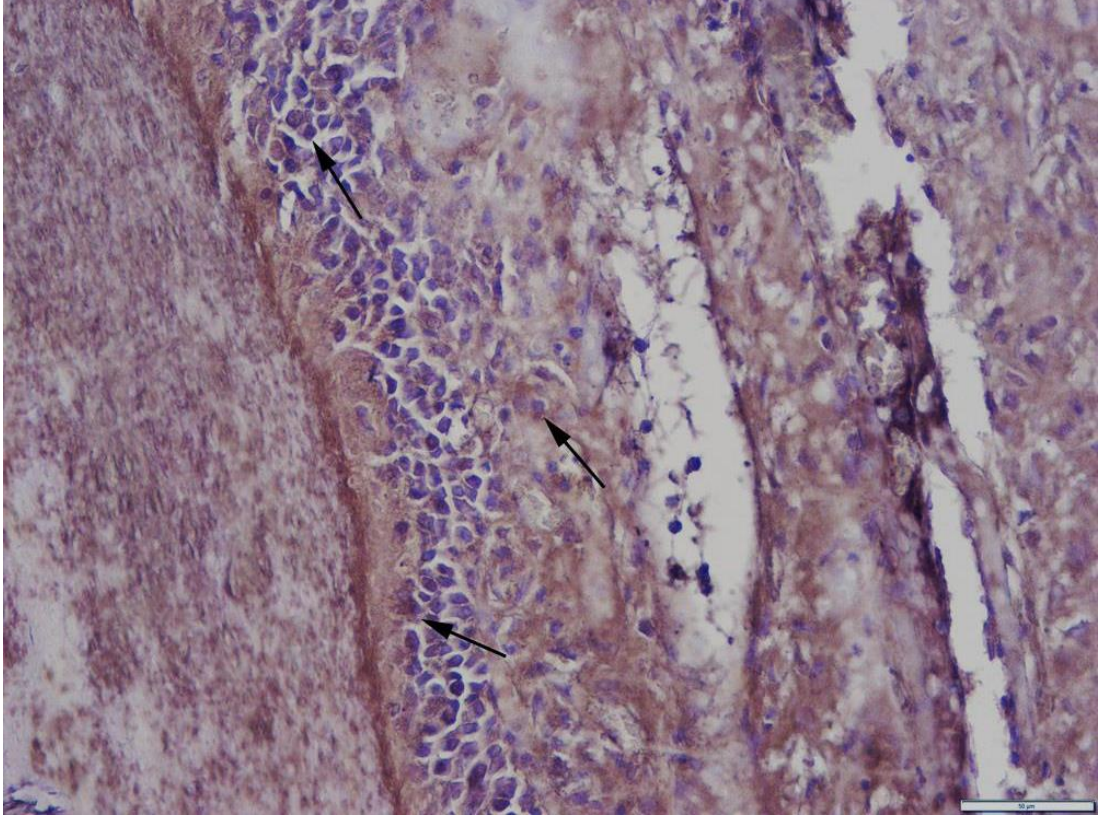
Resim 55: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, birçok hücrede pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



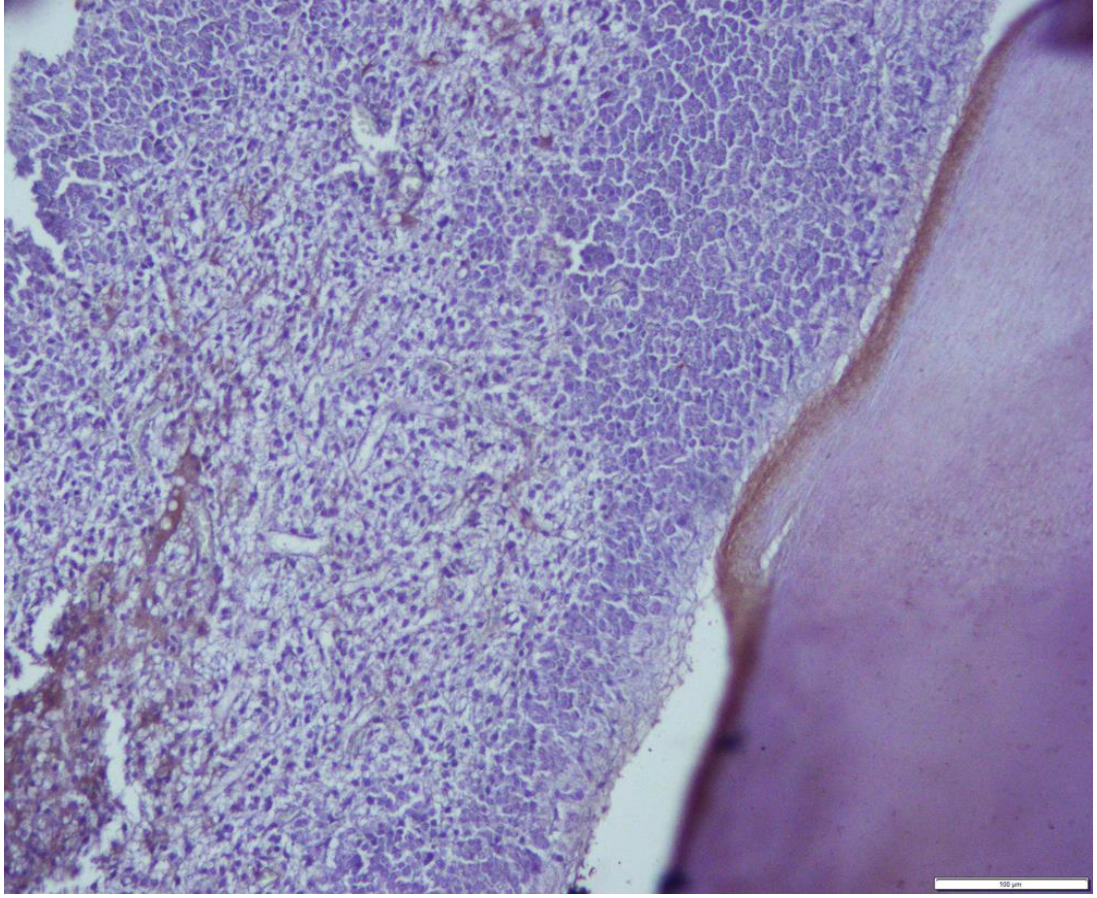
Resim 56: Benfotiamim grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, azalmış pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



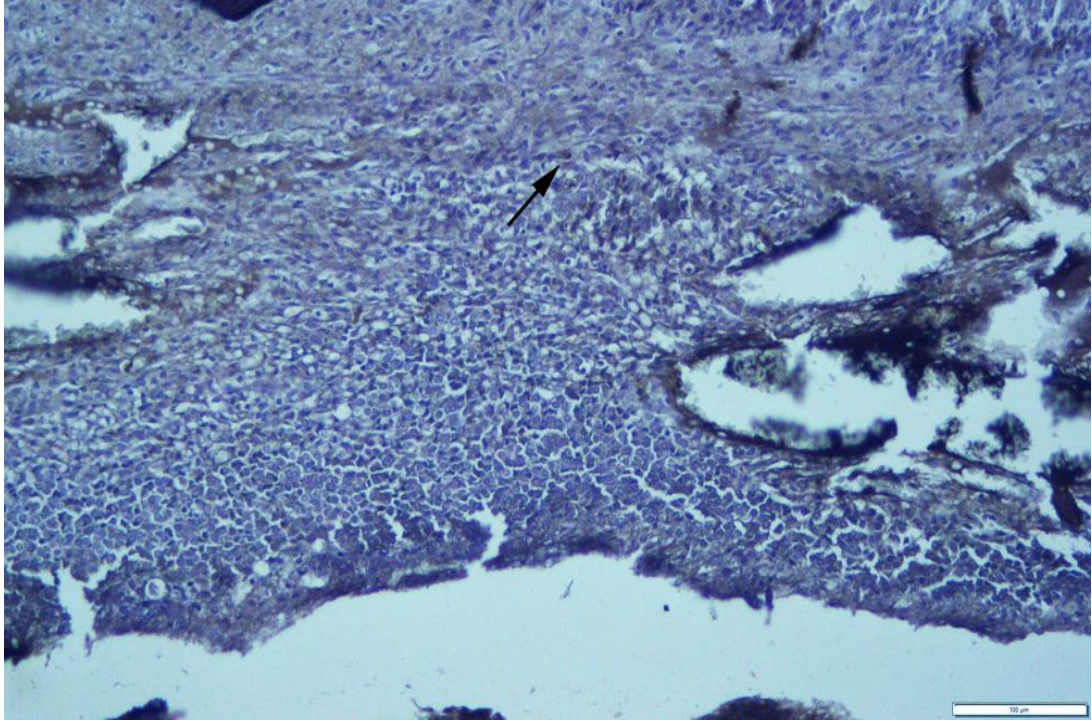
Resim 57: Benfotiamim grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, belirgin şekilde azalmış pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



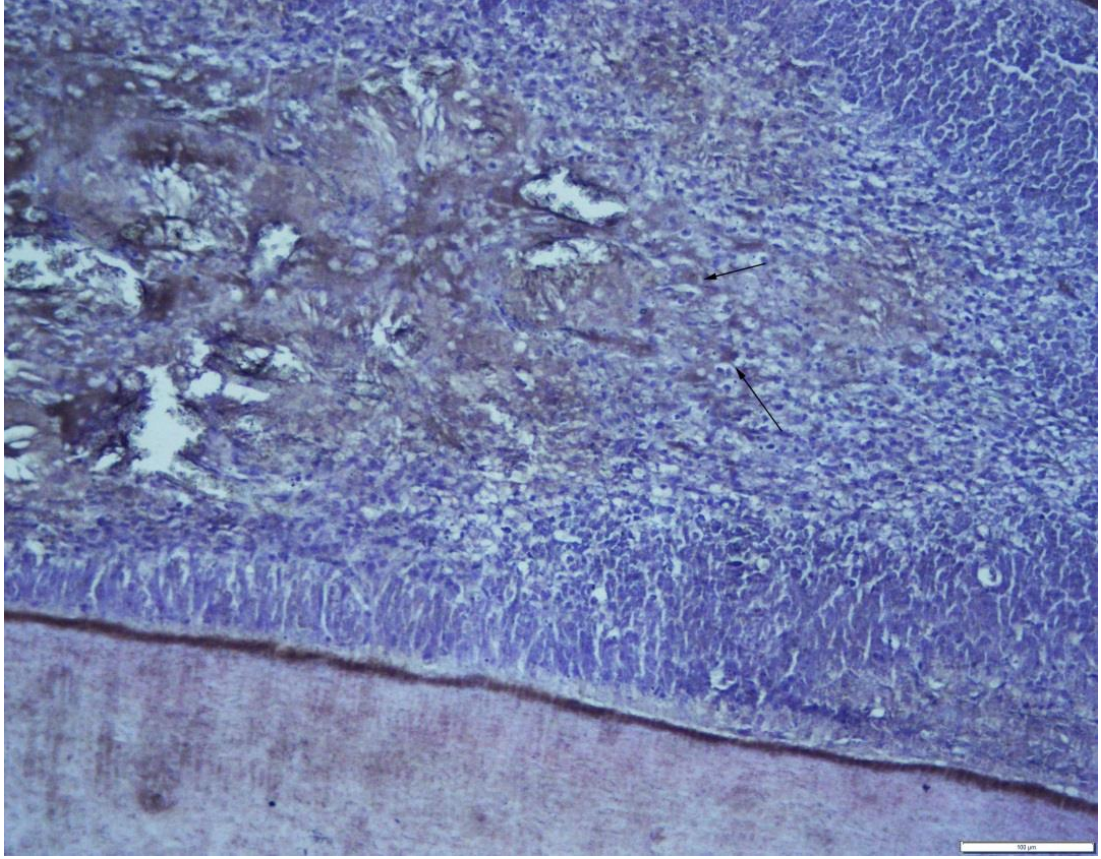
Resim 58: Benfotiamim grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat PGE2 ile immunohistokimyasal boyaması, azalmış pozitif immunoreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



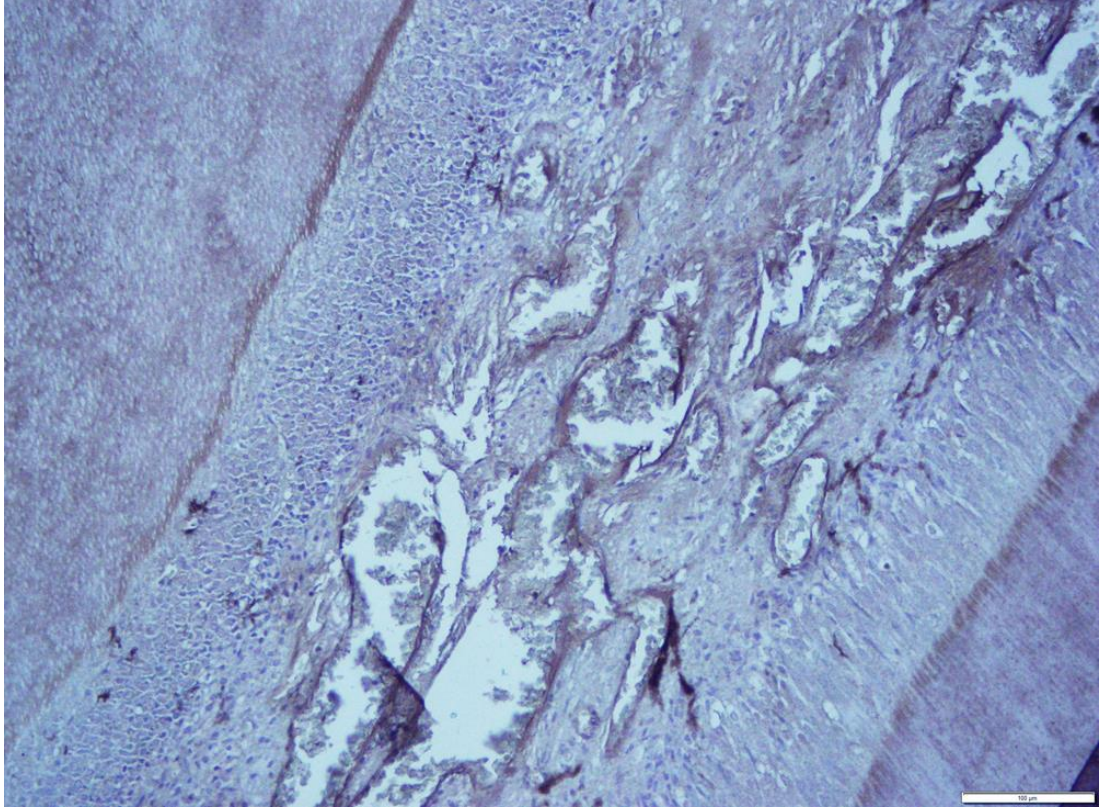
Resim 59: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



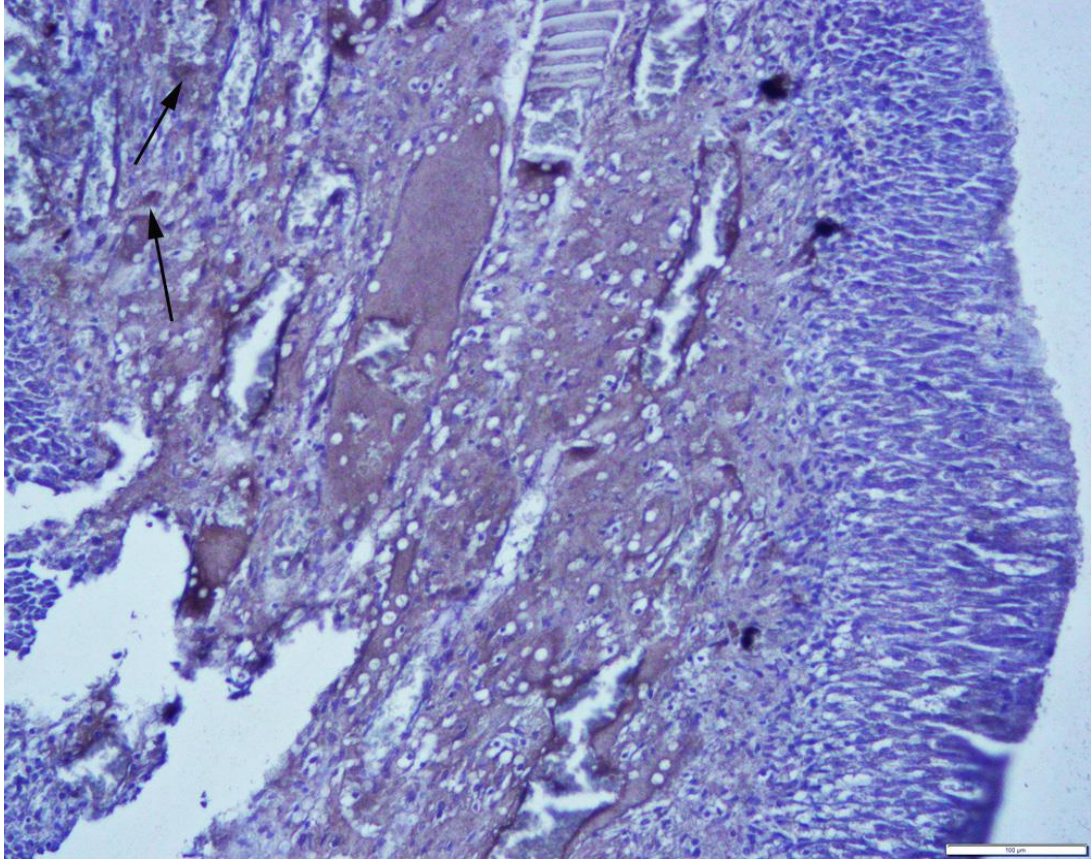
Resim 60: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, hafif pozitif reaksiyon (ok), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



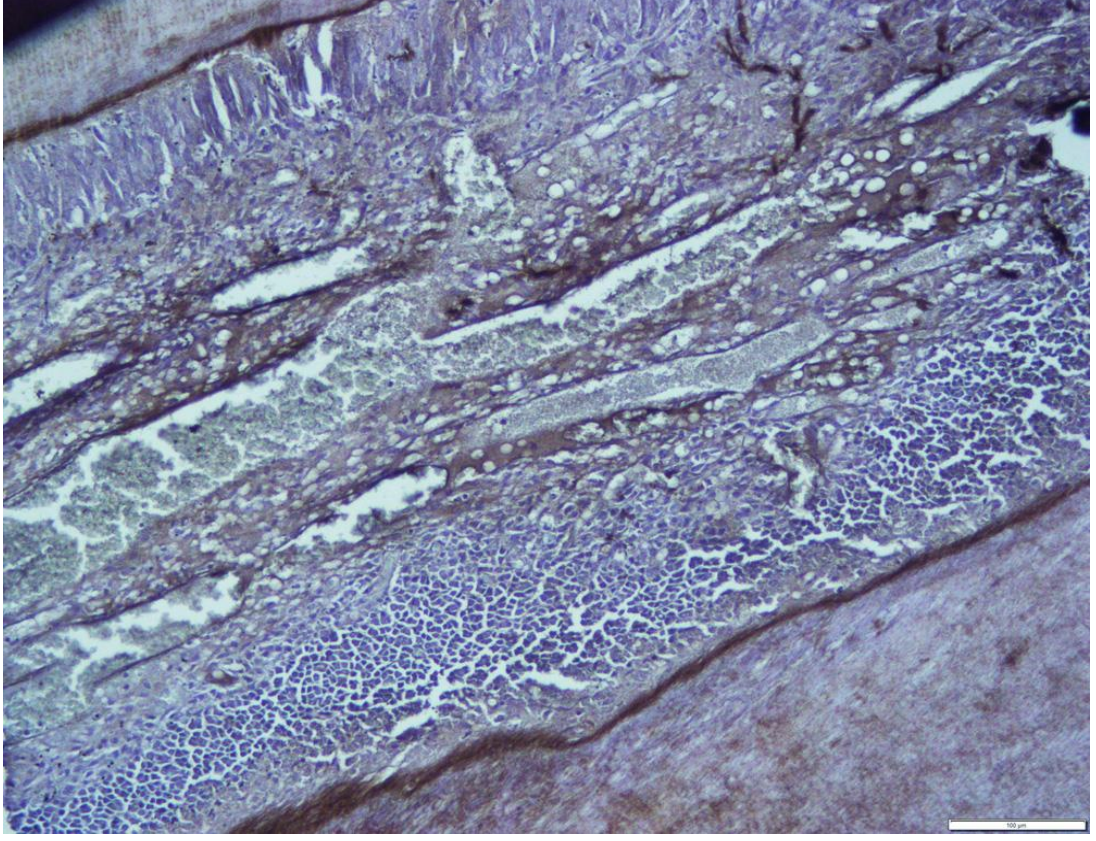
Resim 61: Negatif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, tek tük pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



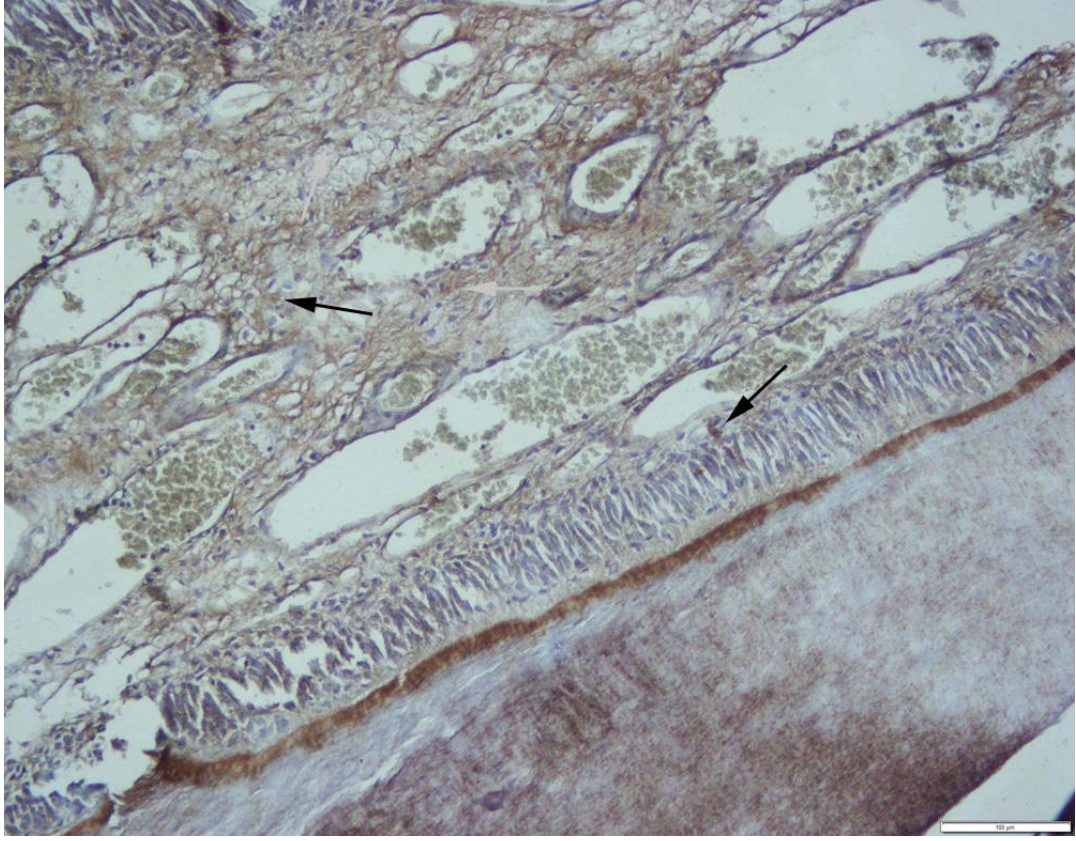
Resim 62: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100μm



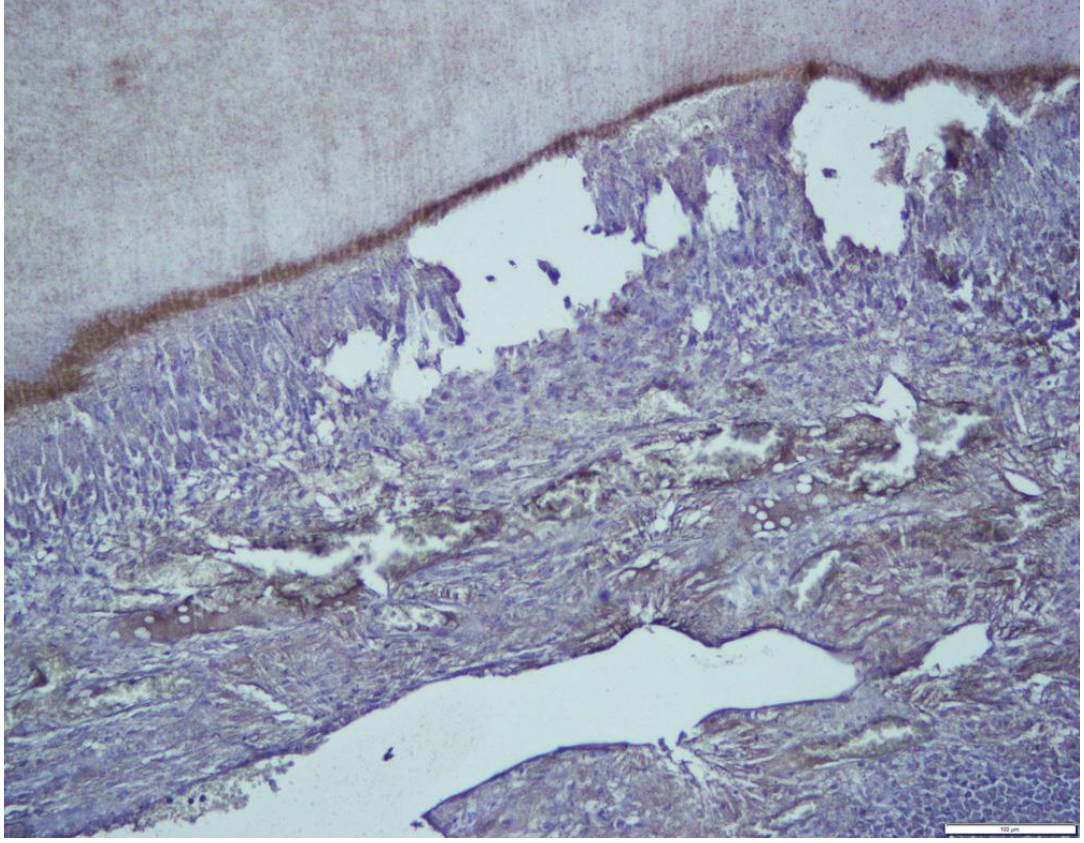
Resim 63: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, hafif pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



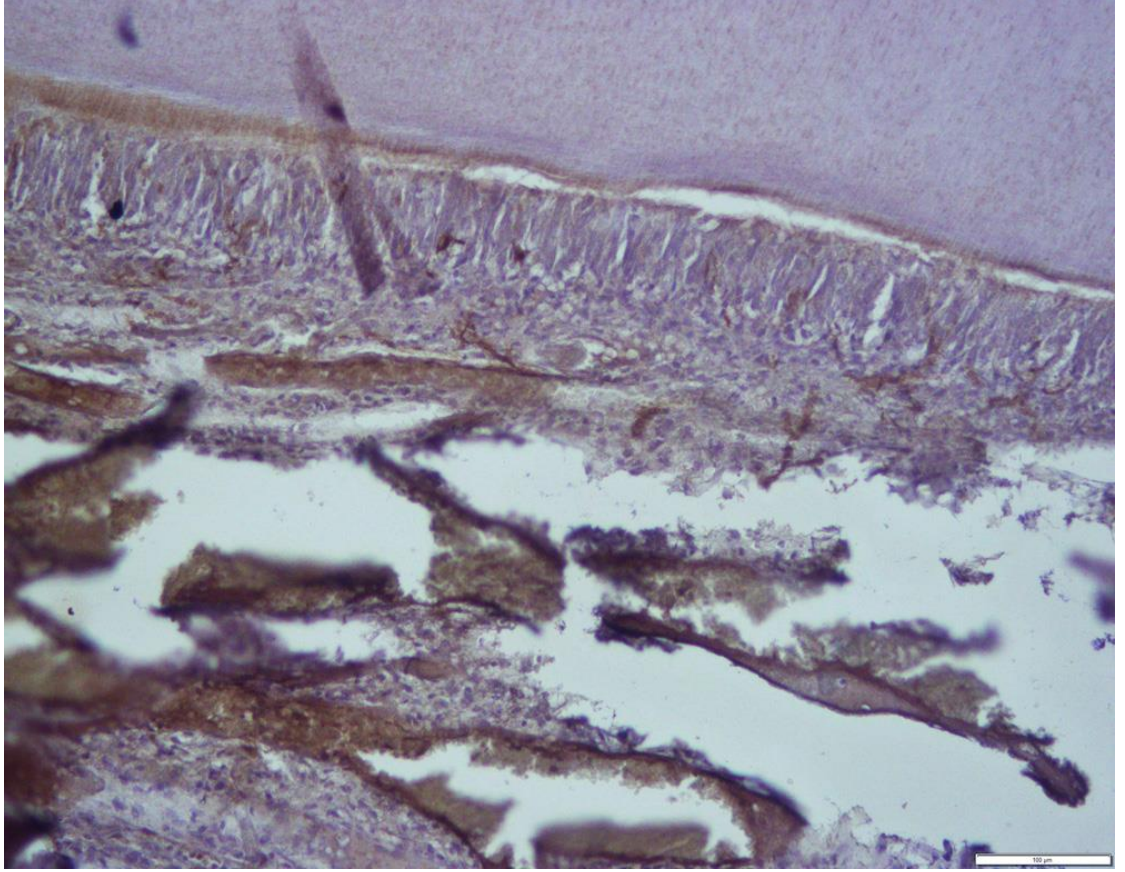
Resim 64: Pozitif kontrol grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, bazı hücrelerde pozitif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100µm



Resim 65: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 6. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, hafif pozitif reaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



Resim 66: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 12. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m



Resim 67: Benfotiamin grubundaki bir ratın pulpasının 24. saat SOD ile immunohistokimyasal boyaması, negatif reaksiyon, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=100 μ m

4. TARTIŞMA

Mikrobiyal, fiziksel, kimyasal veya iyatrojenik faktörlerle gelişen pulpa enflamasyonu, pulpanın kendine özel morfolojik yapısından dolayı (etrafının sert doku ile çevrili olması) hızla ilerlemektedir. Pulpal kan damarlarında vazodilatasyon, seröz sıvının damar dışına sızması ve medyatörlerin birikimi gibi sebeplerle pulpa iç basıncı artmaktadır. Duysal fibrillerden salınan nöropeptidlerin, immün hücreler tarafından üretilen sitokinlerin, kan damarlarının yırtılması ile ortamda bulunan bradikinin, yine immün hücrelerden ve yaralı konak dokudan salınan araziidonik asit metabolitlerinin varlığı enflamasyonun şiddetini artırmakta ve şiddetli ağrıya neden olmaktadır (1-3, 5). Enflamasyonun başlamasını takiben kullanılacak antienflamatuvar bir ajanın enflamasyon şiddetini baskılayarak pulpada meydana gelebilecek hasarı ve beraberinde ağrı medyatörlerinin salımını azaltabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada yağda çözünebilen bir B vitamini türevi olan benfotiaminin deneysel pulpitisli rat keser dişlerinde enflamasyon ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

5.1. Çalışmada kullanılan antienflamatuvar ve antioksidan ajanın seçimi

Diş hekimliğinde; sodyum diklofenak, rofekoksib, ibuprofen gibi NSAİİ'ler ile ağrı ve enflamasyonun kontrolünün değerlendirildiği çok sayıda insan ve hayvan çalışmaları mevcuttur (159, 275, 276). Bu ilaçların etkinlikleri kanıtlanmış olmasına karşın gastrointestinal yakınmalar (277, 278), renal bozukluklar (279), ve kardiyovasküler problemler (280, 281) gibi bir çok yan etkilere sahiptirler. Son zamanlarda doğal antienflamatuvar ürünlerin kullanımı güvenli olmaları ve enflamatuvar hastalıkların tedavisindeki olası etkilerinden dolayı dikkat çekmektedir (282, 283). Tiamin (B1 vitamini) nörolojik, diyabetik ve kardiyovasküler komplikasyonların tedavisinde onlarca yıldır kullanılmaktadır (236, 238). 1954 yılında keşfedilen yağda çözünen tiamin türevleri suda çözünen formlarına göre çok daha yüksek emilim ve biyoyararlanım özelliklerine sahiptir (20, 241). B1 vitamininin yağda çözünen formlarından biri olan benfotiaminin antienflamatuvar

(23, 24, 205) ve aynı zamanda etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (20, 22). Benfotiaminin protein kinaz C ve NF-κB aktivasyonunu engelleyerek antioksidan ve antienflamatuvar özellikler gösterdiği bilinmektedir (24, 88). Benfotiamin farmakolojik uygulamalar için biyoyararlanımları geliştirilmiş (242), suda çözünen formlarına göre sindirim sisteminden daha iyi absorbe edildiği, maksimum plazma seviyesinin tiaminin 5 katına kadar çıktığı, biyoyararlanımları tiaminden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (251). Bir klinik çalışmada benfotiaminin 600 mg/gün kullanımının yan etki oluşturmadığı rapor edilmiştir (284). Benfotiamin, LPS ile makrofajların uyarıldığı bir çalışmada COX-2 enzimi ile lipoksijenaz-5 enzimini ve bu yolla oluşan medyatörlerin (PGE2, tromboksan, lökotrien B4 vb gibi) oluşumunu engellemiştir (23).

Farklı dokularda antienflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği benfotiaminin diş hekimliği alanındaki olası etkileri ilk olarak bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Ramirez ve ark (2006) benfotiaminin antinosiseptif etkinliğinin oral uygulamadan 2,5 saat sonra en yüksek noktaya ulaştığını göstermiştir (245). Bu nedenle çalışmamızda pulpa enflamasyonunun 6. saatinde maksimum etkinin değerlendirilebilmesi amacı ile benfotiamin ratlara LPS uygulamasından 3 saat sonra oral yoldan verildi. Bu çalışmanın sonuçları gerçekten de benfotiaminin 6. saatten itibaren pulpada nötrofil kemotaksisini, hiperemiyi ve ödem oluşumunu azaltarak enflamasyonu baskıladığını, CGRP ve PGE2 gibi enflamatuvar medyatörlerin salınımını azalttığını histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak göstermiştir.

5.2. Antienflamatuvar ve antioksidan etkinliğin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin seçimi

Hayvan deneyleri insan ve hayvan hastalıkları hakkında bilgi edinmek, yeni bir maddeyi test etmek veya yeni cerrahi teknikleri denemek amacıyla bilime ve bilim insanlarına yardımcı olmaktadır (258). Endodontide pulpa ve pulpa hastalıkları hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla çeşitli hayvanların pulpaları incelenmiş ve pulpa hastalıklarının modelleri oluşturulmuştur. Maymun (285), köpek (155), kedi (160), gelincik (286), rat (153) ve fare (287) gibi deney hayvanları endodonti alanında çeşitli çalışmalarda tercih edilmiştir. Rat oral mikroflorası, pulpa ve

periodondal dokuları, insan oral mikroflorası, pulpa ve periodontal dokuları ile benzerlik göstermektedir (258-261). Rat pulpa dokusunda insaninkine benzer enflamatuvar cevap ve enflamatuvar hücreler görülmektedir (159, 288, 289). Ayrıca kolay üreyebilmeleri, deney uygulamalarında kullanım ve bakım kolaylığı, ekonomik olması, evrim düzeyi yüksek diğer memelilerin kullanımını azaltması, kısa sürede genetik açıdan benzer grupların oluşturulabilmesi gibi pek çok yönden avantajlıdır (256, 257, 290). Bu gibi sebeplerle çalışmamızda pulpitis modelinin oluşturulmasında ratlar tercih edilmiştir.

Domuz veya maymun gibi evrim düzeyi yüksek memelilerin diş boyutları insan diş boyutları ile benzerdir. Ratların diş boyutları ise diğer deney hayvanlarına oranla oldukça küçüktür. Literatürde rat dişlerinde yapılacak çalışmalar öncesinde pratik örnek uygulamaların çalışmanın başarısını arttıracak bildirilmiştir (257). Bu sebeple çalışmamızın pratik uygulamalarına başlamadan önce el yeteneğinin geliştirilmesi amacı ile rat kadavrasında pratik uygulamalar yapıldı. Daha sonra ise canlı hayvan üzerinde el yeteneğinin geliştirilmesi ve olası manipulasyon problemlerinin izlenebilmesi için 4 adet rat üzerinde ön çalışma gerçekleştirildi.

Ratlarda her yarım çenede 1 adet kesici diş ile 3 adet molar diş ve bu dişler arasında uzun bir diestama bulunmaktadır. Keser dişler açık apeksli ve sürekli uzayan dişlerdir. Literatürde rat pulpitis modelinin oluşturulmasında seçilen dişler farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda molar dişler kullanılmışken (159, 288, 289, 291, 292) bazılarında keser dişler tercih edilmiştir (89, 293). Ratların ağız açıklığının yetersiz olması, molar dişlerin ve pulparlarının çok küçük olması (LPS yerleştirmek için yeterli boşluk sağlanamamaktadır), molar dişlere ulaşma zorluğu gibi sebepler rat molar dişlerinde çalışmayı zorlaştırmaktadır (294). Ancak periapikal dokuların inceleneceği, daha uzun süreli çalışmalarda periapikal dokuların histolojik kesitlerde incelenme kolaylığından dolayı tercih edilebilir. Bu çalışmada uygulama kolaylığı, rahat görüş imkanı, molar dişlere göre kesici boyutlarının daha büyük olması, LPS' nin yerleştirileceği boşluğun oluşturulabilmesi ve deney süresinin dişin uzamasına imkan vermeyecek kadar kısa olması gibi sebeplerden dolayı literatürdeki çalışmaları da göz önünde bulundurarak keser dişler tercih edilmiştir (89, 293, 294).

Literatürde deneysel pulpitis modelinin hazırlanmasında farklı yöntemlere rastlanmaktadır. Bazı çalışmalarda rat dişlerinde frezlerle kaviteleler açılmış, pulpa dokusu ekspozede edilmiş ancak herhangi bir indükleyici ajan kullanılmamıştır (272, 289, 292). Bir başka çalışmada rat molar dişlerin mesial yarısında frez boyutunda kaviteleler açılmış fakat pulpa ekspozede edilmemiştir (288). Kim ve Lim pulpa enflamasyonunu indüklemek için *Streptococcus mutans* ve *Phyromonas endodontalis* bakterilerini rat keser dişlerinde açtıkları kavitelelere pulpayla temas edecek şekilde yerleştirmişlerdir (295).

Enfekte kök kanallarında gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler tespit edilmiştir ve pulpa hastalığı bu bakterilere karşı pulpanın vermiş olduğu immün cevapla ilişkilidir (296, 297). Gram negatif bakteri hücre duvarının bir parçası olan LPS konak dokunun harabiyetine sebep olan mekanizmaların harekete geçirilmesinde biyolojik etkilere sahiptir (296, 297). Konak hücrelerini özellikle de TNF- α , IL-6, IL-8, lökotrienler, nitrik oksit ve prostaglandinler gibi medyatörlerin üretimini tetikleyen mononükleer fagositleri doğrudan aktive edebilir (85). Bu enflamatuvar medyatörlerin aşırı miktarlarda salgılanması konak doku cevabını şiddetlendirerek kompleman aktivasyonu, pulpa kaynaklı ağrı, periapikal enflamasyon ve periapikal kemik yıkımı gibi enflamatuvar komplikasyonlara neden olabilir (81-83). Dental pulpada LPS uyarımı ile oluşturulan enflamasyon modeli farmakolojik bir ajanın değerlendirilebilmesine olanak tanıyan en geçerli yöntemdir (23). Çalışmalarda fare keser dişlerine LPS uygulanmasından 6 saat sonra koronal pulpada en yüksek seviyede enflamatuvar yanıtın olduğu gösterilmiştir (89, 293).

Bu çalışmada amaç benfotiaminin olası antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin 24 saat içinde değerlendirilmesi olduğundan pulpa enflamasyonunun kısa sürede maksimum düzeyde oluşturulması amacı ile indükleyici ajan olarak LPS tercih edilmiştir. Bu çalışmada, pulpanın LPS ile teması sonucunda monositlerin ve fibroblastların proenflamatuvar sitokinleri salgıladığı aynı zamanda odontoblastların da konak doku cevabında rol aldığı, proenflamatuvar sitokinleri ürettiği açık bir şekilde görülmüştür.

Yaptığımız ön çalışmada LPS ile pulpitis indüklendikten sonra 3. Saate sakrifiye edilen ratlardan elde edilen örnekler histopatolojik olarak değerlendirildiğinde hafif nötrofil lökosit infiltrasyonu ve hiperemi gözlemlendi ancak pulpa enflamasyonunun daha önceki çalışmaları destekler şekilde net olarak 6. saatte izlenebildiği görüldü (89, 293). Benfotiaminin maksimum antinötrofilik etki süresi ve ön çalışma sonuçları değerlendirildiğinde 3. saate sakrifiye edilmesi planlanan grupların kaldırılmasına ilk değerlendirmenin 6. saatte yapılmasına karar verilmiştir. Bu sayede sakrifiye edilecek rat sayısı 72'den 54'e düşürülmüştür.

5.3. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Pulpada meydana gelen enflamasyon ve enflamatuvar cevaplara ilişkili medyatörler çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilmektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve türevleri gibi moleküler teknikler (159), HE boyama ile histolojik inceleme (289), immünohistokimya (229), radyoimmün analiz (298) yöntemleri. PCR ile kantitatif sonuçlar elde etmek mümkün olmasına karşın incelenecek değerlerin konumunu ve hangi hücrelerle ilişkide olduğunu görmek mümkün olmamaktadır. Histopatolojik değerlendirmede ise kantitatif sonuçlar elde etmek zordur ve değerlendirme yapmak için skorlama yöntemi kullanılmakta ve sonuçlar semi-kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca hücreler, vasküler yapılar, bağ dokusu, enflamasyondaki nekroz alanları, hiperemi ve ödem yerinde incelenebilmektedir. İmmünohistokimya ile incelenmek istenen pek çok enflamatuvar medyatör ve oksidatif stres değerleri de semikantitatif olarak yerinde tespit edilerek hangi hücrelerle ilişkili olduğu incelenebilir. Histopatoloji ve immünohistokimyanın bu avantajları göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada enflamatuvar medyatörlerin ve oksidatif stres markerlarının hangi hücrelerden salındığını görmek istememiz, enflamasyon sırasındaki nötrofil infiltrasyonunu ile vasküler değişiklikleri değerlendirebilmek amacıyla histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler tercih edilmiştir.

Literatürde ratlarda pulpitis modellerinde histopatolojik değerlendirmenin yapıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (159, 288, 289). Souza ve ark. (2007) anjiyotensin-I ve anjiyotensin-II reseptörlerinin pulpal enflamasyondaki rolünü

değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında ratları 3., 6., 9., 12. ve 24. saatlerde sakrifiye etmişler, elde ettikleri örnekleri histopatolojik olarak değerlendirmişlerdir (289). İltihabi reaksiyon, ekspozite edilen alana bitişik pulpa dokusundaki kan damarları ve enflamatuvar hücrelerin sayısı ve karakteristiğine göre tanımlanmıştır. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu 3 saatlik periyotta başlamış 24 saatlik periyotta en fazla seviyeye ulaşmıştır. Çalışmamızda da nötrofil infiltrasyonunun 6. saatte başladığı, 24. saate kadar arttığı görülmüş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada bitki ekstraktlarının (*Serjania erecta* ve *Zeyheria montana*) etkileri ratlarda pulpitis modelinde histolojik olarak değerlendirilmiştir (288). Histolojik değerlendirmede çalışmamızda kullanılan semikantitatif skorlamaya benzer bir yöntem kullanılmıştır. *Zeyheria montana* ekstraktı 6., 12. ve 24. saatlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Pulpitis grubunda enflamasyon derecesi zamanla artmıştır. Histolojik değerlendirmenin dışında pulpa enflamasyonu başka yöntemlerle ortaya konulmamıştır. Ayrıca incelenen bitki ekstraktları pek çok etken maddeyi ihtiva etmektedir ve anti-enflamatuvar etkisi olabileceği tahmin edilen etken maddeler net olarak bildirilmemiştir. Bu çalışmada ise histopatolojik değerlendirmenin yanı sıra; sitokin (IL-6) ve enflamatuvar medyatörler (CGRP, PGE-2) ile oksidatif stres parametreleri (MDA, SOD) de immünohistokimyasal olarak tespit edildi. Çalışmada anti-enflamatuvar ve antioksidan özellikleri olduğu bilinen kimyasal adıyla S-benzoylthiamine-O-monophosphate (benfotiamin) kullanıldı.

Holt ve ark (159) üç farklı NSAİİ'nin (ibuprofen, vioxx ve celebrex) rat molarlarında oluşturdukları pulpitis modelinde COX-1 ve COX-2 gen salımını PCR yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmalarında pulpa enflamasyonunu aynı zamanda histopatolojik olarak da değerlendirilmiş ve bu çalışmada da kullanılmış olan McClanahan kriterlerini esas alacak şekilde bir derecelendirme yapılmıştır. Kesitler histoloji alanında uzman araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Gözlemciler arasındaki ilişki istatistiksel olarak güçlü bulunmuştur ($R \geq 0.70$). Bu çalışmada da histopatolojik değerlendirme patoloji alanında uzman tek bir araştırmacı tarafından yapılmıştır.

Literatürde, benfotiaminin dental dokulardaki etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmasa da farklı dokulardaki etkileri araştırılmıştır. Son yıllarda benfotiaminin özellikle diyabet ve komplikasyonlarında (236-238), göz (88), böbrek (299) ve kalp dokusundaki çalışmaları (300) dikkat çekmektedir. Hücre kültürü çalışmaları yapılmakta (23, 24) ancak deney hayvanlarında günümüze kadar sadece tek bir çalışmada (88) kullanıldığı görülmüştür. Yadav ve ark (2009) ratlarda endotoksin ile uyarılmış üveitis modelinde benfotiamin kullanarak oküler enflamasyondaki iyileşmeyi araştırmışlardır (88). Benfotiaminin lökosit hücre infiltrasyonunu anlamlı oranda azalttığını histolojik kesitlerde göstermişlerdir (88). Bunu NF-κB aktivasyonunun engellenmesi ile açıklamışlardır. De Kozak ve ark. (2007) protein kinaz C'nin inhibisyonun NF-κB aktivasyonunu engellediğini ve bu şekilde enflamatuvar hücre gn azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada da benfotiamin vetitis modelinde olduğu gibi pulpitis modelinde de belirgin bir şekilde nötrofil lökositlerin infiltrasyonunu azaltmıştır (301).

5.4. CGRP için İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

CGRP nörojenik pulpa enflamasyonunda doğrudan rol alan bir nropeptiddir. Myelinsiz C fibrillerinin terminal sonlanmalarından ve diğer pulpa hücrelerinden salınırlar. CGRP enflamasyonun hem akut hem de kronik fazında; kan akımının düzenlenmesi (302, 303), immune hücre fonksiyonlarının modülasyonu (304), endotelial hücrelerin proliferasyonu (305), kemik rezorbsiyonunun engellenmesi (306) ve osteojenik etkinin uyarılması (307) gibi önemli rollere sahiptir. Dentinde yaralanma sonrası bu bölgeye komşu CGRP immunreaktif sinir fibrillerinin sayısında hızlı bir artış meydana geldiği ve yaralanmayı takiben 4. günde sinir fibrillerinin en yüksek sayıya ulaştığı rapor edilmiştir (308). CGRP nin aynı zamanda pulpa dokusunda tamir faaliyetlerine katıldığı da gösterilmiştir (308). Taylor ve Byers (1990) CGRP immunreaktif sinir fibrilleri ile tamir dentini arasında morfolojik bir ilişki varlığını kanıtlamıştır (308).

CGRP klinik olarak sağlıklı diş pulpalarında düşük seviyelerde tespit edilmiştir (309). Sağlıklı pulpada bulunan CGRP'nin pulpal hücrelerin büyümesini uyarmak ve interstisyel pulpa basıncını dengelemek gibi fonksiyonları vardır (310,

311). Çalışmamızda da negatif kontrol grubunda en fazla pulpa hücrelerinde düşük seviyelerde immün pozitif reaksiyon görülmüştür. Bu durum pulpa kan akımı veya diğer hemostatik fonksiyonların düzenlenmesi gibi bazal fizyolojik aktiviteyle ilişkili olabilir (312).

Enflamasyonlu pulpa dokusunda CGRP miktarlarındaki değişimler insan ve hayvan çalışmalarında uzun yıllardan beri araştırılmaktadır (141, 169, 312, 313). Bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak, bir çok araştırma enflamasyonlu pulpada sağlıklı pulpaya oranla daha fazla miktarda CGRP ve SP nin salındığını rapor etmişlerdir (161, 168, 298). Ayrıca sigara içen hastalardan alınan örneklerde pulpa CGRP seviyelerinde artış olduğu da gösterilmiştir (161). Bu nedenle çalışmalarda sigara faktörünün göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Caviedes-Bucheli J ve ark (2004) sağlıklı pulpalı, akut geri dönüşümsüz pulpitisli ve indüklenmiş pulpitisli dişlerin pulpa dokularındaki CGRP seviyelerini insandan alınan örneklerde flow sitometri analizi ile incelemişlerdir. Akut geri dönüşümsüz pulpitisli ve indüklenmiş pulpitisli dişlerde CGRP seviyelerinin sağlıklı pulpadan elde edilen değerlere oranla istatistiksel olarak artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Akut geri dönüşümsüz pulpitisli ve indüklenmiş pulpitisli dişlerin CGRP seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark bulamamışlardır (309).

Caviedes-Bucheli J ve ark (2006) sağlıklı pulpalı, akut geri dönüşümsüz pulpitisli ve indüklenmiş pulpitisli dişlerin pulpa dokularındaki çeşitli nöropeptidlerin (CGRP, SP, NKA, NPY, VIP) seviyelerini radyoimmün test yöntemi ile tespit etmişlerdir. İnsan diş pulpalarında CGRP, SP, NKA, NPY seviyelerinin sağlıklı pulpayla karşılaştırıldığında akut pulpitisli ve indüklenmiş pulpitisli dişlerde istatistiksel olarak artmış olduğu, VIP seviyelerinin ise enflamasyon boyunca sabit kaldığı gösterilmiştir (298). Başka bir çalışmada ise Sattari ve ark insan pulpalarındaki SP ve CGRP seviyelerini pulpitisli dişlerde sağlıklı dişlere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulmuşlardır. CGRP seviyelerini semptomatik pulpitisli dişlerde asemptomatik pulpitisli dişlere göre daha yüksek olduğunu; SP seviyerinde ise semptomatik ve asemptomatik pulpitisli dişlerde anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir (168).

Buck ve ark (1999) pulpalarını ekspoz e ettikleri rat molar dişlerinde CGRP ve SP miktarlarını sağlıklı pulpadaki değerlerden daha yüksek bulmuşlardır. Bu artış sadece ekspoz e edilen dişte görülmüş, aynı hayvanın kontralateral molarlarında veya ipsilateral mandibular molarlarında herhangi bir artış tespit edilmemiştir (141).

Tüm bu çalışmalarla uyumlu olarak bu çalışmada da enflamasyonun indüklendiği grupta CGRP pozitif hücre miktarının sağlıklı pulpa örneklerine göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular CGRP' nin pulpal enflamasyonda rolü olduğunu ve enflamatuvar cevapta etkin olduğunu desteklemektedir. Periferal sinir sisteminin CGRP gibi nöropeptidlerin salınması yoluyla enflamatuvar süreci aktive ettiği ve immün sistemi düzenlediği düşünülmektedir (141, 302, 309). Çalışmamızda benfotiamin verilen örneklerde ise 12. saatten itibaren CGRP seviyelerinin sağlıklı pulpa dokusuna sahip örneklerle aynı düzeye indiği tespit edilmiştir. Literatürde benfotiaminin nöropeptidler ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamız benfotiaminin bir nöropeptid olan CGRP üzerine etkilerini araştırması yönüyle özgün değere sahiptir.

İmmunohistokimyasal incelemelerde CGRP araştırılırken rat pulpalarında en yoğun boyanmanın sinir fibrilleri boyunca olduğu gösterilmiştir. CGRP pozitif sinir fibrilleri periodontal ligamente oranla en yoğun pulpa ve diş eti dokularında izlenmiştir. Bu sinir fibrillerinin çoğunluğunun dişin uzun aksına paralel olacak şekilde neredeyse hiç dallanma vermeden kan damarlarını izleyerek koronal pulpaya girdiği, dallanarak subodontoblastik pleksusu oluşturduğu ve bazılarının dentin tübüllerine kadar uzanarak sonlandığı fotoğraflanmıştır (314). Trantor ve ark (1995) CGRP nin sadece sinir fibrillerinden değil lenfositler gibi enflamatuvar hücreler ile de ilişkisini ortaya koymuştur (310). Bu çalışmada da CGRP' nin odontoblastlar, pulpa bağ dokusu hücreleri ve nötrofil gibi enflamatuvar hücrelerle olan ilişkisi immünohistokimyasal olarak gösterildi ve bu üç hücre grubunda gözlenen pozitif reaksiyonlar yüzde olarak hesaplandı.

Pozitif kontrol grubunda 6. ve 12. saatlik periyotlarda CGRP (+) hücreler yaygın olarak pulpa hücreleri iken enflamasyonun ilerlemesiyle birlikte 24. saatte CGRP (+) hücreler daha çok enflamatuvar hücrelerdi. Benfotiamin grubunda ise tüm

periyotlarda pulpa hücreleri daha fazla aktivite gösterdi. Bu durum benfotiaminin enflamasyonu baskılaması ile pulpa hücrelerinin enflamatuvar hücelere göre daha fazla immunpozitif reaksiyon vermesi ile açıklanabilir.

5.5. IL-6 için İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

IL-6 sitokini; enflamatuvar reaksiyonu takiben antijene özgül immün cevapta en önemli rolü oynayan medyatördür. Adezyon kuvvet moleküllerini arttırarak ve anjiogenezi uyararak pulpal enflamasyona katılır. Bunun sonucu olarak nötrofil kemotaksisi uyarılır, pulpa odasında vasküler geçirgenlik ve enflamatuvar ödem artar. Akut faz proteinleri, C-reaktif protein, serum ameloid A ve fibrinojen seviyelerinde artışa sebep olduğu, osteoklastların farklılaşması ve kemik yıkımında rol aldığı bilinmektedir (195).

IL-6'nın immün cevaptaki rolü ve insan diş pulpa hücrelerindeki plazminojen aktivatör aktivitesini düzenlemesi gibi özellikleriyle enflamasyonlu alanlarda doku harabiyetine öncülük ettiği rapor edilmiştir (315). IL-6 aynı zamanda nötrofillerden süperoksit salınmasını ve fagositik aktiviteyi tetikler (316). Bu gibi sebeplerle IL-6'nın fazla sentezlenmesi periodontitis ve romatoid artrit gibi ciddi enflamatuvar hastalıkların patogeneziyle de ilişkilendirilmiştir (200, 201).

Çeşitli çalışmalar pulpitisli ve periapikal lezyonlu hastaların pulpalarında IL-6'nın artmış miktarlarını rapor etmektedir (192, 193). Zehnder ve ark (2003) bu sitokinin mRNA seviyelerini moleküler teknikler ile değerlendirmiş ve geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerde sağlıklı dişlere göre artmış IL-6 mRNA tespit etmişlerdir (193). Ancak pulpa kanında IL-6 seviyesi enzim bağlantılı immuno sorbent ölçümü (ELISA) ile değerlendirildiğinde sağlıklı ve pulpitisli örnekler arasında fark gösterilememiştir (156). Bu sonuç IL-6 değişimlerinin damar içinde değil çoğunlukla damar dışındaki pulpa bağ dokusunda gerçekleştiğini göstermektedir.

Lactobacillus casei peptidoglikanlarıyla (297) ve *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* bakterilerinin süpernatantlarıyla (santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı) uyarıldıklarında insan diş pulpa hücrelerinin önemli miktarlarda IL-6

ürettikleri rapor edilmiştir (317). Son yıllarda Elsalhy M ve ark. IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ve IFN- γ seviyelerini geri dönüşümsüz pulpitisli, çürükle ekspoz olmuş ve sağlıklı diş pulpalarında karşılaştırmışlar, bu medyatörlerin seviyelerinin enflamasyon olan gruplarda sağlıklı gruba göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Çürükle ekspoz olmuş dişlerle, geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerin pulpalarında IL-6 seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (318).

Tokuda ve ark. (2001) hücre kültür çalışmasında insan diş pulpası hücrelerini *Prevotella intermedia* LPS'si ile uyarılmışlar ve IL-6 seviyelerini farklı zamanlarda (başlangıç, 1., 2., 4., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde) ölçmüşler (86). ELISA testi ile yapılan ölçümler sonucunda IL-6 seviyelerinin 4. saatte artmaya başladığı ve 48. saate kadar sürekli arttığı görülmüştür. Sunulan bu çalışmanın sonuçları IL-6 seviyesinin sağlıklı ve hastalıklı örneklerde karşılaştırılan tüm çalışmalar ile uyum göstermektedir. Pulpitisin indüklendiği pozitif kontrol grubu örneklerinde IL-6 seviyesi test edilen tüm zamanlarda sağlıklı gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak çalışmamızda pozitif kontrol grubunda en yüksek IL-6 değerleri 24. saatte tespit edilmesine rağmen 6., 12. ve 24. saatler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Takimoto ve ark. (2014) güncel bir çalışmada matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3)' ün antienflamatuvar etkilerini hücre kültüründe araştırmışlardır (319). LPS ile indükledikleri makrofajlarda kontrol grubuna göre IL-6 seviyelerini daha yüksek bulmuşlardır. MMP-3 ile birlikte LPS uyguladıkları grupta ise LPS uygulanan gruba göre IL-6 seviyelerinin istatistiksel olarak azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Yadav ve ark. (2010) hücre kültürü çalışmasında LPS ile uyarılan makrofajlarda sağlıklı makrofajlara göre daha fazla IL-6 tespit etmişler ve benfotiamin uygulamasının LPS ile uyarılan hücrelerde IL-6 artışında belirgin bir azalma meydana getirdiğini göstermişlerdir (24). Bu çalışmalarda enflamasyonla birlikte artış gösteren IL-6 miktarının çeşitli antienflamatuvar maddelerle baskılanabileceği görülmektedir. Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara uyumlu olarak benfotiamin uygulanan ratlarda IL-6 seviyelerinde 12. saatten itibaren azalmanın meydana geldiği, sağlıklı pulpa örnekleri ile eşit düzeye indiği gösterilmiştir.

IL-6'nın monosit, makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreler, B ve T lenfositler, osteoblastlar, keratinositler gibi çeşitli hücrelerden salgılandığı bilinmektedir (86, 187, 297). Yadav ve ark. (2010) IL-6'nın LPS ile uyarılan makrofajlar tarafından üretildiğini hücre kültürü çalışmasıyla göstermişlerdir (24). Çalışmamızda IL-6'nın odontoblastlar, pulpa bağ dokusu hücreleri ve enflamatuvar hücrelerden salgılandığı gösterilmiş ve gruplara göre yüzde dağılımları tablo 6'te sunulmuştur. Hem pozitif kontrol hem de benfotiamin gruplarında tüm periyotlarda, enflamatuvar hücreler en fazla immünreaksiyon gösteren hücre tipleriydi.

5.6. PGE2 için İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

PG'ler siklooksijenaz enzimi aracılığıyla araşidonik asitlerden sentezlenen bioaktif moleküllerdir, geniş bir yelpazede fizyolojik ve patofizyolojik etki gösterirler (146). Enflamasyonlu diş pulpasında artmış PGE2 seviyeleri gösterilmiş (154,155, 293) ve vasküler permeabilitede artış ve ağrı ile ilişkilendirilmiştir (146, 153). Chang ve ark. (320) tarafından vasküler endotel hücrelerinin PGE2 sentezlediği ve PGE2'nin vasküler hücre adezyon molekülü-1'i inhibe ederek pulpa dokusundaki iltihabi süreçte rol aldığı gösterilmiştir. Pulpada PGE2 merkezli endotelial hücre ilişkili enflamatuvar değişiklikler daha sonra da rapor edilmiştir (90).

Ratlarda ve köpeklerde oluşturulan pulpitis modellerinde artmış PGE2 miktarları tespit edilmiştir (153-155). Enflamasyonlu insan dişlerinin pulpalarındaki PGE2 miktarının klinik olarak sağlıklı dişlerin pulpalarına göre daha fazla olduğu bulunmuştur (156). Ayrıca PGE2 düzeyinin pulpa enflamasyonunun histolojik derecesiyle ilişkilendirilebileceği, PGE2 seviyesinin tespiti ile pulpadaki enflamasyonun geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olduğuna karar verilebileceği bildirilmiştir (157). Bu çalışmada da tüm bu çalışmalarla uyumlu olarak 12. saatten itibaren, pulpa enflamasyonunun indüklendiği pozitif kontrol grubunda sağlıklı gruba göre PGE2 seviyeleri daha fazla bulunmuştur.

PGE2 iki farklı yol ile ağrı hipersensitivitesine yol açmaktadır. İlk olarak, nosiseptif sinir sonlanmalarını duyarlaştırarak hiperaljezik etki gösterir. İkinci olarak, bradikinin gibi diğer ağrı medyatörlerine verilen ağrı cevabını artırır (151, 152).

Pulpal ve endodontik ağrının kontrolü ve bunlardan sorumlu tutulan PGE2' yi baskılamak için NSAİİ'ler diş hekimliğinde sıklıkla kullanılmaktadır (158, 321, 322). Siklooksijenaz enziminin inhibisyonu yolu ile PG sentezinin azaltılması, NSAİİ'lerin ana mekanizmasını oluşturur (146, 153, 158, 323).

Ratlarda LPS ile indüklenmiş pulpitis modelinde NSAİİ'lerin PGE2 ve vasküler permeabilite artışını azalttığı gösterilmiştir (153). PGE2 ağırlı dişlerin pulparlarında klinik olarak asemptomatik dişlerin pulparına göre daha yüksek seviyelerde bulunmuş ve dental ağrıyla ilişkilendirilmiştir (323). Sistemik NSAİİ kullanımının uyarılmış intradental sinir aktivitesini inhibe ettiği (160), PGE2 miktarındaki artışı azalttığı histolojik olarak gösterilmiştir (157). Holt ve ark. (2005) üç farklı NSAİİ'nin (İbuprofen, vioxx ve celebex) PG sentezinden sorumlu siklooksijenaz enzimi üzerine etkilerini araştırmışlar ve COX-2' nin NSAİİ'ler aracılığıyla baskılanabildiğini göstermişlerdir (159). Bu çalışmada da benfotiamin PGE2 artışını baskılamıştır ve bu yönüyle benfotiaminin çeşitli yan etkilere sahip NSAİİ'lere bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Diyabetik ratlarda benfotiaminin enflamasyonla birlikte nöropatik ağrıyı da azalttığı gösterilmesi benfotiaminin antinosiseptif etkileri açısından umut vaad etmektedir (245). Özellikle PGE2, COX-2 üzerindeki baskılayıcı etkileri ve antienflamatuvar özellikleri göz önünde bulundurulduğunda pulpa ağrısı üzerinde de etkili olabileceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır. Ancak benfotiaminin diğer NSAİİ'lerle karşılaştırıldığı ve pulpada benfotiaminin ağrı ile ilişkilendirilmiş çalışmaların olmaması, bu konuda ilave çalışmalara ihtiyacı doğurmaktadır.

Hücre kültürü çalışmalarında LPS ile uyarılan makrofajlarda COX-2 (23) ve PGE2 (24) miktarının uyarılmamış makrofajlarda sentezlenene oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir, ancak makrofaj hücrelerine benfotiaminin direkt olarak uygulanması COX-2 ve PGE2 miktarlarındaki artışı engellemiştir (23, 24). Yadav ve ark. (2009) ratlarda endotoksin ile uyarılmış üveitis modelinde benfotiaminin etkilerini araştırmışlar ve COX-2 miktarındaki artışın baskılanmasına dikkat çekmişlerdir (88). Ratlarda yapmış olduğumuz bu çalışmamız da yukarıda bahsedilen araştırma sonuçları ile benzer olarak enflamasyon varlığında PGE2 miktarındaki artış benfotiaminin alınması ile kontrol altına alınmıştır (23, 24, 88).

PGE2 arasıdonik asit metabolizmasının temel üreticileri olan makrofajlardan, fibroblastlardan ve dentritik hücrelerden sentezlenir (147). Miyauchi ve ark. (1996) pulpa enflamasyonu esnasında endotelial hücrelere ve makrofajlara ilaveten pek çok pulpa bağ dokusu hücresinde ve odontoblastlarda kuvvetli PG (+) immun reaksiyon tespit etmişlerdir (148). Çalışmamızda PGE2' nin odontoblastlar, pulpa bağ dokusu hücreleri ve enflamatuvar hücrelerden salındığı gösterilmiş ve gruplara göre yüzde dağılımları tablo 6'te sunulmuştur. Hem pozitif kontrol grubunda hem de benfotiamin grubunda tüm periyodlarda PGE2 (+) hücrelerin yoğun olarak enflamatuvar hücreler olduğu görüldü.

5.7. SOD ve MDA için İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

SOD en etkin hücre içi enzimatik antioksidanlardan biridir. Hücre hasarına yol açan reaktif oksijen türlerinden olan süperoksite bir elektron vererek hidrojen peroksite ve oksijene çevirir. Böylece hücre içindeki serbest radikal düzeylerini azaltır (8, 9). SOD metalloenzimlerin bir grubudur ve beş farklı formdadır. Vücutta en bol olarak CuZn-SOD bulunur ve hücre içinde sitoplazmada yer alır. Mn- SOD ise mitokondride yer almaktadır (227).

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır ve oksidatif stres esnasında bazı makromoleküllerin yıkılması ile oluşur. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (10-13, 234).

Araştırmalar CuZn-SOD enzim aktivitesini hayvan ve insan diş pulpalarında gösterilmişler ve enflamasyon birlikte arttığını bildirmişlerdir (14, 17, 228). Normal ve enflamasyonlu diş pulpalarındaki dağılımı ve enflamasyonla birlikte etkilenmiş pulpa hücrelerindeki artışı immünohistokimyasal olarak da değerlendirilmiştir (229). Varvara ve ark. (2012) dental preperasyon sonrası pulpa CuZn-SOD miktarının sağlıklı diş pulpalarına göre artmış olduğunu rapor etmiştir (324). Bödör ve ark (2007) ise pulpitisli insan diş pulpalarında SOD' un farklı iki formu olan CuZn-SOD ve Mn-SOD miktarının sağlıklı diş pulpalarına göre artmış olduğunu, Mn-SOD'un

ise CuZn-SOD'a göre daha fazla miktarlarda salındığını tespit etmiştir (16). Geri dönüşümsüz pulpitisli, geri dönüşümlü pulpitisli ve sağlıklı diş pulpalarında SOD miktarları farklılık göstermektedir. En yüksek SOD miktarı geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerde iken bunu sırasıyla sağlıklı pulpa ve geri dönüşümlü pulpitisli dişler takip etmektedir. Enflamasyonun başlangıcında SOD miktarının az, ilerleyen enflamasyonla birlikte artış gösterdiği bilinmektedir (325). Bu çalışmada da literatürü destekler şekilde pulpa enflamasyonunun indüklendiği pozitif kontrol grubunda sağlıklı gruba göre SOD miktarının istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha fazla olduğu görüldü.

Çalışmalar SOD ile birlikte MDA miktarının da enflamasyonla birlikte arttığını göstermektedir (14-17). Ancak literatürde diş pulpasında MDA seviyelerini araştıran çok az sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada normal ve enflamasyonlu insan diş pulpalarında MDA miktarı ve SOD aktivitesi araştırılmıştır. Sonuç olarak enflamasyonlu pulpalarda superoksit radikal ve lipid peroksit reaktivitesinde artış tespit edilmiştir (15).

Bu çalışmada pulpa enflamasyonunun indüklendiği örnekler ile sağlıklı pulpa örnekleri arasında SOD ve MDA aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar yoktur. Araştırmamız pulpitisin ilk 24 saatini değerlendirmektedir. Yapılan diğer çalışmaları da göz önünde bulundurursak pulpa enflamasyonunu daha uzun süreçlerde değerlendiren çalışmalarda SOD ve MDA miktarında farklılıklar olabileceği öngörülmektedir (15-17, 325). Araştırmalar benfotiaminin diyabetik ratlarda DAG, PKC ve NF- κ B'nin aktivasyonunu engelleyerek antioksidan etki gösterdiğini bildirmiştir (243, 326) Benfotiaminin bu sinyal moleküllerinin aktivasyonunu nasıl bloke ettiği tam olarak bilinmese de uzun süreçte pulpa enflamasyonunda da antioksidan görevi alacağını düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur.

1. Bu çalışmada, pulpa enflamasyonunun oluşturulması amacı ile rat keser dişlerinde bukkal yüzde servikal seviyede açılan pulpa kavitelerine 10mg/mL konsantrasyonunda LPS uygulanmıştır. Altıncı saatte kurban edilene ratlardan elde edilen örnekler değerlendirildiğinde histopatolojik olarak pulpa enflamasyonunun oluştuğu tespit edilmiştir. Tüm örneklerde pulpa enflamasyonunun histolojik olarak izlenmesi bu modelin standardizasyonunun ve deneyin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. LPS pulpa enflamasyonunun başlatılmasında etkin bir ajandır.

2. Rat keser dişleri pulpa enflamasyonu modelinde kısa süreli çalışmalarda uygulama kolaylığı, rahat görüş imkanı, molar dişlere göre kesici boyutlarının daha büyük olması, LPS' nin yerleştirileceği boşluğun oluşturulabilmesi gibi sebeplerden dolayı tercih edilebilir.

3. Farklı dokularda anti-enflamatuar özellikleri gösterilmiş benfotiaminin pulpa enflamasyonunun şiddetini baskıladığı histopatolojik olarak ilk defa bu çalışma ile gösterildi. Pulpa enflamasyonunun indüklendiği ve benfotiaminin oral uygulandığı ratlarda histopatolojik incelemelerde 6.,12., ve 24. saatlerde benfotiaminin uygulanmadığı örneklere göre daha az sayıda nötrofil kemotaksisi ve infiltrasyonu, hiperemi ve ödemin daha az olduğu izlendi. Örnekler semikantitatif olarak değerlendirildiğinde benfotiamin grubunda enflamasyon skorlarının, pozitif kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,001$).

4. Bu çalışmada oral kullanımından 2,5-3 saat sonra maksimum antinörojenik etkilerinin bulunduğu benfotiamin ratlarda pulpa enflamasyonunun tetiklenmesinden 3 saat sonra oral olarak uygulandı. Bu örnekler pulpa enflamasyonunun 6. saatinde histolojik olarak incelendiğinde pulpa enflamasyonunun şiddetinin kontrol altına alındığı izlendi. Bu sonuç benfotiaminin oral uygulamasını takiben 3. saatte anti-enflamatuar etkilerini göstermektedir.

5. LPS ile pulpa enflamasyonunun indüklenmesi 12. saatten itibaren pulpada CGRP (+) hücre yoğunluğunda artışa neden oldu ($p < 0,001$). Benfotiamin uygulanan örneklerde ise CGRP immunpozitif hücre yoğunluğu sağlıklı pulpa ile aynı seviyededir ($P > 0,05$). Nörojenik enflamasyonda etkin nöropeptidlerden birisi olan CGRP' nin benfotiamin ile baskılanması sağlanmış ve bu ajanın antienflamatuvar etkisi gösterilmiştir.

6. LPS ile pulpa enflamasyonunun indüklenmesi 6. saatten itibaren pulpada IL-6 (+) hücre yoğunluğunda artışa neden oldu ($p < 0,001$). Benfotiamin uygulanan örneklerde ise IL-6 (+) hücre yoğunluğu 12. saatten itibaren sağlıklı pulpa ile aynı seviyede idi. Pulpa enflamasyonu ve konak immün cevabında etkili olduğu bilinen IL-6'nın benfotiamin uygulaması ile baskılanması, benfotiaminin antienflamatuvar etkilerini göstermektedir.

7. LPS ile pulpa enflamasyonunun indüklenmesi 12. saatten itibaren pulpada PGE2 (+) hücre yoğunluğunda artışa neden oldu ($p < 0,001$). Benfotiamin uygulanan örneklerde ise PGE2 (+) hücre yoğunluğu 6., 12. ve 24. saatlerde sağlıklı pulpa ile aynı seviyelerde tespit edildi. Benfotiamin, sıklıkla dental ağrıyla ilişkilendirilen, antienflamatuvar ve analjezik etkilerinden dolayı kullanılan NSAİİ'lerin (COX-2 inhibisyonundan dolayı) hedefi olan PGE2' nin üretimini azaltmıştır.

8. Pozitif kontrol grubu SOD ve MDA immunpozitif hücre yoğunluğu tüm saatlerde sağlıklı pulpa ile aynı değerlerdeydi. Tüm saatlerdeki incelemelerde benfotiaminin SOD ve MDA seviyeleri üzerine bir etkisi görülmemiştir. Benfotiaminin diş pulpasındaki antioksidan etkilerini daha uzun periyotta inceleyen araştırmalara ihtiyaç vardır.

9. IL-6, CGRP, PGE2 pulpa patolojisinde rol oynayan önemli medyatörlerdir. Bu medyatörlerin fazla miktarlarda salgılanması sürekli bir döngü oluşturmakta, tekrar ve yeni medyatörlerin salgılanmasını tetiklemektedir. Pulpa; sert dentin dokusu ile çevrili olduğundan, pulpa nekrozundan kaçınmak için fazlaca üretilen bu kimyasal medyatörleri kontrol altına almak önemlidir. Bu çalışmada benfotiamin pulpa enflamasyonunu takiben uygulandığında IL-6, CGRP ve PGE2 medyatörlerin fazla miktarlarda salgılanmasını engellemiştir.

10. Bu çalışmada benfotiaminin pulpa enflamasyonun akut fazındaki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Benfotiaminin LPS ile indüklenmiş rat pulpalarında enflamatuvar medyatör sentezini azalttığı ilk olarak bu çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları benfotiaminin antienflamatuvar özellikleri olduğunu desteklemekte ve pulpa enflamasyonunun tedavi edilmesinde potansiyel terapötik bir ajan olduğu düşünülmektedir. Ancak pulpa enflamasyonunun kronik fazını inceleyen ilave araştırmalara ihtiyaç vardır.

11. Bu çalışma ile sistemik benfotiamin uygulamasının pulpa dokusunda antienflamatuvar etkileri ortaya konulmuştur. İleriki dönemde benfotiaminin vital pulpa tedavilerinde lokal olarak uygulaması ve pulpa hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Ratlarda Deneysel Pulpitis Modelinde Benfotiaminin Antiinflamatuvar ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı LPS ile indüklenen rat pulpitis modelinde benfotiaminin enflamasyon ve oksidatif stres parametreleri üzerine olası etkilerinin araştırılmasıdır

Gereç ve Yöntem: Wistar ratlar ($N = 54$) üç gruba ayrıldı (Grup 1: negatif kontrol, grup 2: pozitif kontrol, grup 3: benfotiamin). Deneysel pulpa enflamasyonu (pozitif kontrol ve benfotiamin gruplarında) LPS ile oluşturuldu. Grup 3'teki hayvanlara oral yoldan tek doz benfotiamin verildi. Her gruptan 6 hayvan LPS uygulandıktan sonra 6., 12. ve 24. saatlerde sakrifiye edildi. Pulpa enflamasyonu histopatolojik olarak değerlendirildi ve IL-6, PGE2, CGRP, MDA ve SOD' un immünohistokimyasal lokalizasyonları incelendi. Veriler tek yönlü ANOVA ve Bonferroni–Dunn testi ile analiz edildi.

Bulgular: Grup 3' ün histopatolojik skorları grup 2'nin skorlarına göre tüm zamanlarda daha düşüktü ($p < 0,001$). IL-6 skorları grup 1 ile karşılaştırıldığında tüm zamanlarda grup 2'de artmış olduğu tespit edildi. Grup 2'de 12. ve 24. saatlerde IL-6, PGE2 ve CGRP seviyelerindeki artış ($p < 0,001$) grup 3' te benfotiaminle azaltılmıştır ($p < 0,001$). PGE2 ve CGRP skorlarında 6. saatte gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Ayrıca SOD ve MDA skorlarında hiçbir saatte gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Sonuç: Bulgularımız rat pulpasında benfotiaminin antiinflamatuvar etkilerini desteklemekte ve pulpa enflamasyonu için yeni bir antiinflamatuvar ajan olarak potansiyel faydalarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Benfotiamin, Enflamasyon, Interlökin-6, Kalsitonin gen ilişkili peptid, Prostaglandin E2.

ABSTRACT

Examination of Benfotiamine's Antiinflammatory and Antioxidant Effects in Experimental Pulpitis in Rats.

Aim: To evaluate the possible effects of benfotiamine on the inflammation and oxidative stress parameters in the lipopolysaccharide (LPS)-induced rat pulpitis model.

Methodology: Wistar rats ($N = 54$) divided into three groups (Group 1: negative control, Group 2: positive control, Group 3: benfotiamine). Experimental pulp inflammation (in the positive control and benfotiamine groups) was induced by LPS. Single oral dose benfotiamine was given to the animals in Group 3. Six animals from each group were sacrificed at 6, 12, and 24 h. Pulpal inflammation was histologically evaluated, and the immunohistochemical localization of IL-6, PGE2, CGRP, MDA, and SOD was examined. The data were analyzed by ANOVA with Bonferroni–Dunn test ($p < .05$).

Results: The histopathological scores of Group 3 were lower than those of Group 2 at all the times ($p < 0.001$). The synthesis of IL-6 was up-regulated in Group 2 in comparison to that of Group 1 at all times ($p < 0.01$). An observed increase in the levels of IL-6, PGE2, and CGRP in Group 2 at 12 and 24 h ($p < 0.001$) was down-regulated by benfotiamine in Group 3 ($p < 0.001$). There was no between-group difference in the synthesis of PGE2 and CGRP at 6 h ($p > 0.05$). There were also no significant between-group differences in the expression of MDA and SOD at any of the times ($p > 0.05$).

Conclusion: Our findings support the anti-inflammatory functions of benfotiamine in rat pulp, suggesting its potential usefulness as a novel anti-inflammatory agent for pulpal inflammation.

Keywords: Benfotiamine, Calcitonin gene related peptide, Inflammation, Interleukin-6, Prostaglandin E2.

KAYNAKLAR

1. Goodies HE, Pashley D, Stabholtz A. Pulpal effects of thermal and mechanical irritants. In: Hargraves KM, Goodies HE. Seltzer and Bender's dental pulp. Chicago: Quintessence. 2002; 371-88.
2. Ataman B. Pulpites iatrogenes. Traitments etiologiques preventives et curatifs. Encycl Med Chir, Stomatol-Odontol II 23-008-A-20, 1994 p: 1-12.
3. Fouad AF ve Levin L. Pulpal Reactions to Caries and Dental Procedures. In Hargreaves KM, Cohen Stephen, eds. Pathways of the pulp. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2011; 504-28.
4. Keiser K ve Byrne BE. Endodontic pharmacology. In: Hargreaves KM, Cohen Stephen Eds. Pathways of the pulp. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2011; 671-90.
5. Aydın M. Endodontik immünoloji, in: Alaçam T ed. Endodonti. Özyurt matbacılık, 1. Baskı, Ankara, 2012; 625-72.
6. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, 12. Baskı. Ankara, Pelikan Yayınları, 2009; 837-70.
7. Cochran CG. Cellular injury by oxidants. Am. J. Med, 1991; 92: 235-305.
8. Helmut S. Oxidative stress: From basic research to clinical application. Am J Med 1991;91(Suppl): 31-4.
9. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. Am J. Respir. Crit Care Med 1997; 156: 341-357.
10. Kalender S, Kalender Y, Öğütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. Toxicology, 2002; 202: 227-235.
11. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chem. Phy. Lipids, 1987; 44: 227-253.
12. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC: Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem.1990; 16: 259-264.
13. Porter NA: Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol.1984; 105: 273-283.
14. Davis WL, Jacoby BH, Craig KR, Wagner G, Harrison JW. Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue. J Endod 1991;17:316-8.

15. Ge J, Ji J, Wang T. Superoxide dismutase and malonyl dialdehyde in human pulp tissue. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1996 Jul;31(4):201-3.
16. Bödör C, Matolcsy A, Bernáth M. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *Int Endod J*. 2007; 40(2):128-32.
17. Varvara G, Traini T, Esposito P, Caputi S, Perinetti G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2005;38(3):195-9.
18. Greb A, Bitsch R. Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1998; 36: 216–221.
19. Baker H, Frank O. Absorption, utilization and clinical effectiveness of allithiamines compared to water-soluble thiamines. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1976; 22:63–68.
20. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res*. 2010; 61: 482–8.
21. Bakker SJ, Heine RJ, Gans Ro Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741–2.
22. Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 371–7
23. Shoeb M ve Ramana KV. Anti-Inflammatory Effects of Benfotiamine are Mediated Through the Regulation of Arachidonic Acid Pathway in Macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2012 ; 52(1): 182–190.
24. Yadav UC, Kalariya NM, Srivastava SK, Ramana KV. Protective role of benfotiamine, a fat-soluble vitamin B1 analogue, in lipopolysaccharide-induced cytotoxic signals in murine macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48(10): 1423–34.
25. C Yu, PV Abbott. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal Supplement* 2007;52:(1 Suppl):4-16.
26. Trowbridge HO, Kim S. Pulp development, structure and function. In: Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the Pulp*. St. Louis: Mosby, 1998:386-424.
27. Alaçam T. pulpa ve periapikal dokuların biyolojisi, in: Endodonti, Alaçam T ed. *Özyurt Matbaacılık 1. Baskı, Ankara 2012: s.41-71.*
28. Holland GR ve Torabinejad M. Diş pulpası ve periradiküler dokular (Çev: Gürbüz H, Erişen R). *Endodonti Temel İlkeler ve Uygulamalar*, ed: Torabinejad M, Walton RE (Çev ed. Erişen R) . İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2011: 1-20.

29. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995;21:70-73.
30. Frank RM. Etude autoradiographique de la dentinogenèse en microscopie électronique à l'aide de la proline tritiée chez le chat. *Arch Oral Biol* 1970;15: 583.
31. Baume LJ. The biology of pulp and dentin. A historic, terminologicotaxonomic, histologicbiochemical, embryonic and clinical survey. *Monographs in oral science*. Myers HM, Karger S, editors. New York, 1980; 8:69–123.
32. Pashley DH, Walton RE, Slavkin HC. Histology and physiology of the dental pulp. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. *Endodontics*. 5th ed. Hamilton, Ont: BC Decker Inc, 2002: 25-61.
33. Luukko K, Kettunen P, Fristat I, Berggreen E. Structure and functions of the dentin pulp complex. In: Hargreaves KM ve Cohen S Ed. *Pathways of the pulp* (tenth edition). St Louis, Mosby Elsevier, 2011; 452-503.
34. Weinstock M, Leblond CP. Synthesis, migration and release of precursor collagen odontoblasts as visualized by radioautography after 3H-proline administration. *J Cell Biol* 1974;60:92-127.
35. Torneck CD. Intracellular destruction of collagen in the human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1978;23:745-47
36. Avery JK, Han, SS, Lee, Y: Modifications of the fine structure of the incisor pulp of the guinea pig during experimental scurvy. *J Dent Res*, 1966;45: 440-8.
37. Griffin, C. J. ve Harris, R. Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp. *Oral Surg*, 1962;15:1396-1404.
38. Woodnutt DA, Wager-Miller J, O'Neill PC, Bothwell M, Byers MR: Neurotrophin receptors and nerve growth factor are differentially expressed in adjacent nonneuronal cells of normal and injured tooth pulp. *Cell Tissue Res* 2000; 299:225–236.
39. Watts A, Paterson RC. Migration of materials and microorganisms in the dental pulp of dogs and rats. *J Endod* 1982;8:53–8.
40. Lin LM ve Huang G T-J. Pathobiology of the Periapex. *Pathways of the pulp* (tenth edition). Ed. Hargreaves KM ve Cohen S. St Louis, Mosby Elsevier, 2011; 529- 558.
41. Kogushi M, Nakamura S, Kishi Y, et al. A study of leukocyte extravasation in early inflammatory changes in the pulp. *J endod* 1988;14:475-81.
42. Haanen C, Vermes IV: Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm* 1995;4:5-15.

43. Chinen J, Finkelman F, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:489-95.
44. Remington JS, Klein JO, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995. 140-267.
45. Hahn CL, Falkler Jr WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod.* 1989;15:20-6.
46. Langeland, K, Langeland, LK. Histologic study of 155 impacted teeth. *Odontol Tidskr.* 1965;73:527–550.
47. Phillips JH, Hori T, Nagler A, et al. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon, delta proteins. *J Exp Med* 1992; 175:1055-66.
48. Miller GS, Sternberg RN, Pilrero SJ, Rosenberg PA. Histologic identification of mast cells in human dental pulp. *Oral Surg* 1978;46:559-66.
49. Zachrisson BU. Mast cells in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1971;16:555–6.
50. Farnoush A. Mast cells in human dental pulp. *J Endod* 1984;10:250-2.
51. Gartner LP, Siebel W, Hiatt JL, Provenza DV. A fine structural analysis of mouse molar odontoblast maturation. *Acta Anat* 1979;103:16-33.
52. Garant PR. Microanatomy of the oral mineralized tissues. In: Shaw JH, Sweeney EA, Cappuccino CC, Meller SM, editors. *Textbook of oral biology*. Philadelphia:WB Saunders;1968. p. 181-225.
53. Couvre E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 1986;31:643–651.
54. Marion D, Jean A, Hamel H, Kerebel LM, Kerebel B: Scanning electron microscopic study of odontoblasts and circumferential dentin in a human tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991 72:473-8.
55. Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. (1981) *Dev Biol.* 1981: 82: 371–381.
56. Butler WT, D'Souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Somerman MJ. Recent investigations on dentin specific proteins. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88(suppl 1):369-76.
57. D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res.* 1995;74:702–9.

58. Engström C, Linde A, Persliden B. Acid hydrolases in the odontoblast-predentin region of dentinogenically active teeth. *Scand J Dent Res.* 1976;84:76.
59. Embery G. Glycosaminoglycans of human dental pulp. *J Biol Buccale* 1976;4:229-236.
60. Torneck CD. In: Ten Cate AR, editor. Dentin-pulp complex. Oral histology. Toronto: CV Mosby Co., 1980 s.169-213.
61. Hamilton AI. and Kramer IR: Cavity Preparation With and Without Water Spray: effects on the human Dental pulp and additional effects of further dehydration of the dentine. *Br. Dent. J.* 1967; 123: 281–5.
61. Stanley HR. Dental iatrogenesis. *Int Dent J* 1994;44:3-18.
62. Stanley HR. Dental iatrogenesis, Part 2. *Dent Today* 1995;14:76-81.
63. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S4-16.
64. Langeland K. Management of the inflamed pulp associated with deep carious lesion. *J Endod* 1981;7:169-81.
65. Baumgartner JC. Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Curr Opin Dent* 1991;1:737-743.
66. Sundqvist G. Associations between microbial species in Dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-262.
67. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodont* 1988;59:222-230.
68. Love RM. Effects of dental trauma on the pulp. *Pract Perio Aesthet Dent* 1997;9:427-436.
69. Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:467-480.
70. Baume LJ. Dental pulp conditions in relation to carious lesions. *Int Dent J.* 1970; 20: 309–337.
71. Torabinejad M ve Shabahang S. Pulpa ve periapikal patoloji (Çev: Gürbüz H, Pehlivanoglu E, Erişen R). *Endodonti Temel İlkeler ve Uygulamalar*, ed: Torabinejad M, Walton RE (Çev ed. Erişen R) . İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2011: 49-147.
72. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:341-349.

73. Sundqvist G. Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulps. Thesis, Umea University, 1976.
74. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 2010;13:233-9.
75. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975;1:19-21.
76. Wilkinson SG. Bacterial lipopolysaccharides—Themes and variations. *Prog. Lipid Res.* 1996;35:283–343.
77. Anwar MA, Choi S. Gram-negative marine bacteria: Structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. *Mar. Drugs.* 2014;12:2485–2514.
78. Leone S, Silipo A, Nazarenko EL, Lanzetta, Parrilli M, Molinaro A. Molecular structure of endotoxins from Gram-negative marine bacteria: An update. *Mar. Drugs.* 2007;5:85–112.
79. Raetz CRH ve Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rew Biochem.* 2002; 71:635-700.
80. Silva LAB, Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Filho NP. Quantitative Radiographic Evaluation of Periapical Bone Resorption in Dog's Teeth Contaminated with Bacterial Endotoxin (LPS) Associated or not with Calcium Hydroxide. *Braz Dent J* 2008; 19: 296-300.
81. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74: 648-51.
82. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: Association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:587-93.
83. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005;54:777-83.
84. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit. *Endodontic Topics* 2002; 1: 40-53.
85. Morrisonand DC, Ryan JL,“Endotoxinsanddisease mechanisms,,” *Annual Review of Medicine*1987; 38 :417–432.
86. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod.* 2001;27(4):273-7.

87. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T ve ark "Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide," *Journal of Endodontics*, 1996; 22 (1):9–12.
88. Yadav UC, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50(5): 2276–82.
89. Pita AC, Borda E, Ganzinelli S, Passafaro D, and Sterin-Borda L. Cholinceptor Modulation on Nitric Oxide Regulates Prostaglandin E2 and Metalloproteinase-3 Production in Experimentally Induced Inflammation of Rat Dental Pulp. *J Endod* 2009;35(4):529-36.
90. Ohkura N, Shigetani Y, Yoshida N, Yoshida K, Okiji T. Prostaglandin Transporting Protein-mediated Prostaglandin E2 Transport in Lipopolysaccharide-inflamed Rat Dental Pulp. *J Endod* 2014; 40 (8):1112-7.
91. Wang JE, Jørgensen PF, Almløf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, *et al.* Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6) and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* 2000;68: 3965-70.
92. Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almløf M, Thiemermann C, Foster SJ, *et al.* Peptidoglycan primes for LPS - induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 2001;16:178-82.
93. Hogg SD, Whaley RA, De Soet JJ. Occurrence of Lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:62-6.
94. Cohen J. Mechanisms of tissue injury in sepsis: Contrasts between gram positive and gram negative infection. *J Chemother* 2001;13:153-8.
95. Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Chan KY, Luo G, Fang HH. Direct detection of cell surface interactive forces of sessile, fimbriated and non-fimbriated *Actinomyces* spp. using atomic force microscopy. *Arch Oral Biol* 2004;49:727-38.
96. Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun* 1989;57:3425-33.
97. Llewellyn M, Cohen J. Superantigens: Microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2002;2:156-62.
98. Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K, Ike Y. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone - responsive conjugative plasmid pPDI. *J Bacteriol* 1997;179:7843-55.
99. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented bacteroides. *J Med Microbiol* 1985;19:85-94.

100. Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short chain carboxylic acid Stimulated, PMN - mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:269-90.
101. Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Yonezawa H, Ochiai K, Yamamoto M. Characterization of the effects of butyric acid on cell proliferation, cell cycle distribution and apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47:67-74 .
102. Maita E, Horiuchi H. Polyamine analysis of infected root canal contents related to clinical symptoms. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:213-7.
103. Falcioni GC, Coderoni S, Tedeschi GG, Brunori M, Rotilio G. Red cell lysis induced by microorganisms as a case of superoxide and hydrogen peroxide dependent hemolysis mediated by oxyhemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 1981;678:437-41.
104. Bammann LL, Estrela C. Microbiological aspects in endodontics: *Endodontic Science*. (edition 2) 2009;Vol 1:258–81.
105. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1975;83:153.
106. Warfvinge J, Bergenholtz G. Healing capacity of human and monkey dental pulps following experimentally-induced pulpitis. *Endo Dent Traumatol* 1986;2(6):256-62.
107. Dahlen G, Moller A., Jr . Microbiology of endodontic infection. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary Oral Microbiology and immunology*. St. Louis: Mosby year Book Inc; 1991. pp. 444–55.
108. Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endodontic Topics* 2003; 6: 57-77.
109. Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *J Dent Res* 1967; 46: 551-3.
110. Torabinejad M, Ung B, Kettering J. Invitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990;16:566-9.
111. Michaelson PL, Holland GR. Is pulpitis painful? *Int Endod J* 2002;35:829-832.
112. Torabinejad M. Pulp and Periradicular Pathosis. *Principles and Practice of Endodontics* in ed: Walton RE and Torabinejad M. WB Saunders Company Philedelphia 2002: 27-48.
113. Brannstrom M, Lind PO. Pulpal reponse to early dental caries. *Journal of Dental Research* 1965;44:1045-50.
114. Holland GR, Davis SB. Pulpal Pathosis; *Ingle's Endodontics* In edit. 6th ed. Ontario: BC Decker Inc.; 2008. pp. 468–493.

115. Buczko W, et al. Biological effects of degradation products of collagen by bacterial collagenase. *Br J Pharmacol* 1980;69:551-4.
116. Wisniewski K, et al. The effects of products of fibrinogen digestion by plasmin (P-FDP) on the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp* 1975;35:275-83.
117. Zachrisson BU. Mast cells in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1971;16:555-6.
118. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1998;9:179-200.
119. Pimenta FJ, Sá AR, Gomez RS. Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J* 2003; 36 (12): 853-856.
120. Sakurai K, Okiji T, Suda H. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. *J Dent Res* 1999;78:1596-608.
121. Kim S, Liu M, Simchon S, Dörscher-Kim JE. Effects of selected inflammatory mediators on blood flow and vascular permeability in the dental pulp. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:387-92.
122. Maltos KL ve ark: Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol* 2004 ; 49:443-450.
123. Telles PD, Hanks CT, Machado MAAM, Nör JE. Lipoteichoic acid upregulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res.* 2003;82:466-470.
124. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nör JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *J Endod* 2006; 32: 951-955.
125. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2413-2422.
126. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:661-666.
127. Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF ve ark. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod* 2004;30: 704-707.
128. Bletsa A, Berggreen E, Fristad I, Tenstad O, Wiig H: "Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during LPS-induced acute inflammation", *Journal of Physiology* 2006; 573: 225-. 236.
129. Heyeraas KJ, Kvinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 (Suppl) 1:393-401.

130. Tonder KJ, Kvinnsland I. Micropuncture measurements of interstitial fluid pressure in normal and inflamed dental pulp in cats. *J. Endod* 1983;9:105-9.
131. Tonder KJ. Vascular reactions in the dental pulp during inflammation. *Acta Odontol Scand* 1983;41:247-56.
132. Van Hassel HJ. Physiology of the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1971;32: 126-34.
133. Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10: 328-36.
134. Marchetti C, Poggi P. Lymphatic vessels in the oral cavity: different structures for the same function. *Microscopy Res Tech* 2002;56:42-9.
135. Matsumoto Y, Zhang B, Kato S. Lymphatic networks in the periodontal tissue and dental pulp as revealed by histochemical study. *Microsc Res Tech* 2002;56:50-9.
136. Tonder KH ve G NAS. Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs. *Acta physiol. scand.* 1978. 104. 13-23.
137. Bletsa A, Heyeraas KJ, Haug SR, Berggreen E. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in rat periapical lesions and dental pulp after unilateral sympathectomy 2004;11(6):376-84.
138. Haug SR, Heyeraas KJ. Immunoglobulin producing cells in the rat dental pulp after unilateral sympathectomy. *Neuroscience* 2005;136:571-7.
139. Byers M, Wheeler EF, Bothwell M. Altered expression of NGF and P75 NGF-receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nevre sprouting Growth Factors 1992; 6: 41-52.
140. El Karim IA, Lamey P-J, Linden GJ, ve ark. Caries-induced changes in the expression of pulpal neuropeptide Y. *Eur J Oral Sci* 2006;114:133-7.
141. Buck S, Reese K, Hargreaves KM. Pulpal exposure alters neuropeptide levels in inflamed dental pulp and trigeminal ganglia: evaluation of axonal transport. *J Endod* 1999;25:718-21.
142. Behnia A, Zhang L, Charles M, Gold MS. Changes in TrkBlike immunoreactivity in rat trigeminal ganglion after tooth injury. *J Endod* 2003;29:135-40.
143. Cao Y, Deng Y. Histochemical observation of nitric oxide synthase in trigeminal ganglion of rats with experimental pulpitis. *J Tongji Med Univ* 1999;19:77-80.
144. Henry MA, Westrum LE, Johnson LR, Canfield RC. Ultrastructure of degenerative changes following ricin application to feline dental pulps. *J Neurocytol* 1987; 16:601-11.

145. Holland GR ve Torabinejad M. Endodonti Temel İlkeler ve Uygulamalar, ed. Raif Erişen, çev: Hande Gürbüz, Raif Erişen, Nobel Tıp Kitapları 1. Baskı , İstanbul, 2011: 1-21.
146. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315–24.
147. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol.* 1993 ;64(5 Suppl):432-44.
148. Miyauchi M, Takata T, Ito H, Ogawa I, Kobayashi J, Nikai H, Ijuhin N. Immunohistochemical demonstration of prostaglandins E2, F2 alpha, and 6-keto-prostaglandin F1 alpha in rat dental pulp with experimentally induced inflammation. *J Endod.* 1996 Nov;22(11):600-2.
149. Jakson DL, Moore PA, Hargreaves KM. Preoperative nonsteroidal antiinflammatory medication for the prevention of postoperative dental pain . *J Am Dent Assoc.* 1989; 119: 641-647.
150. Hotz G. Medikamantöse behandlung postoperativer und posttraumatischer schwellungszustände . *ZWR* 1986; 95;3: 256-61.
151. Moriyama T, Higashi T, Togashi K ve ark. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 2005; 1: 3-12.
152. Cui M, Nicol GD. Cyclic AMP mediates the prostaglandin E2-induced potentiation of bradykinin excitation in rat sensory neurons. *Neuroscience* 1995; 66: 459–66.
153. Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Arch Oral Biol* 1989; 34: 523–8.
154. Hashimoto S, Uchiyama K, Maeda M, Ishitsuka K, Furumoto K, Nakamura Y. In vivo and in vitro effects of zinc oxide-eugenol (ZOE) on biosynthesis of cyclooxygenase products in rat dental pulp. *J Dent Res* 1988; 67:1092–6.
155. Lessard GM, Torabinejad M, Swope D. Arachidonic acid metabolism in canine tooth pulps and the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Endod* 1986; 12:146–9.
156. Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod* 1995;21:131–6.
157. Petrini M, Ferrante M, Ciavarelli L, Brunetti L, Vacca M, Spoto G. Prostaglandin E2 to diagnose between reversible and irreversible pulpitis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012 Jan-Mar;25(1):157-63.

158. Pairokh M, Ashouri R, Rekabi AR, et al. The effect of premedication with Ibuprofen and indomethacin on the success of inferior alveolar nerve block for teeth with irreversible pulpitis. *J Endod* 2010;36:1450–4.
159. Holt CI, Hutchins MO, Pileggi R. A Real Time Quantitative PCR Analysis and Correlation of COX-1 and COX-2 Enzymes in Inflamed Dental Pulp Following Administration of Three Different NSAIDs. *J Endod* 2005; 31(11): 799-804.
160. Ahlberg KF. Dose-dependent inhibition of sensory nerve activity in the feline Dental pulp by anti-inflammatory drugs. *Acta Physiol Scand* 1978;102:434–40.
161. Awawden L, Lundy FT, Shaw C, Kennedy JG, Lamey PJ: Quantitative analysis of substance P, neurokinin A, and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J* 2002; 36:30.
162. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C, Suda H: An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-presenting cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *J Dent Res* 1992; 71:1196-202.
163. Hargreaves KM, Swift JQ, Roszkowski MT, Bowles W, Garry MG, Jackson DL: Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1994; 78: 503-10.
164. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man and eight other species. *J Neurosci* 1984; 4: 3101–11.
165. Alvarez FJ, Kavookjian AM, Light AR. Ultrastructural morphology, synaptic relationships, and CGRP immunoreactivity of physiologically identified C-fiber terminals in the monkey spinal cord. *J Comp Neurol* 1993; 329:472–90.
166. Uddman R, Grunditz T, Sundler F. Calcitonin gene-related peptide: a sensory transmitter in dental pulps?. *Scand J Dent Res* 1986; 94:219 –24.
167. Uddman R, Kato J, Lindgren P, Sundler F, Edvinsson L. Expression of calcitonin gene-related peptide 1 receptor mRNA in human tooth pulp and trigeminal ganglion. *Arch Oral Biol* 1999; 4:1– 6.
168. Sattari M, Mozayeni MA, Matloob A, Mozayeni M, Javaheri HH. Substance P and CGRP expression in dental pulps with irreversible pulpitis. *Aust Endod J*. 2010;36(2):59-63.
169. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endod* 1990;16:78-84.
170. Lundy FT, Lamey PJ, McKinnell J, Shaw C, Linden GJ. Calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 1999;26:212– 6.

171. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;24:739-68.
172. Dennis T, Fournier A, Cadieux A, et al. hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;254:123– 8.
173. Nakamuta H, Fukuda Y, Koida M, et al. Binding sites of calcitonin gene-related peptide (CGRP): abundant occurrence in visceral organs. *Jpn J Pharmacol* 1986;42:175– 80.
174. Caviedes-Bucheli J, Arenas N, Guiza O, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *Int Endod J* 2005;38:712–7.
175. Fristad I, Vandevska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa SJ, Kvinnsland IH. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res* 2003;311:383–91.
176. Edvinsson L, Cantera L, Jansen-Olesen I, Uddman R. Expression of calcitonin gene-related peptide 1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries. *Neurosci Lett* 1997;229:209 –11.
177. Togari A, Arai M, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett* 1997;233:125– 8.
178. Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M, Lerner UH. Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res* 1992;7:1011–9.
179. D'Souza SM, MacIntyre I, Girgis SI, Mundy GR. Human synthetic calcitonin gene-related peptide inhibits bone resorption in vitro. *Endocrinology* 1986;119:58 – 61.
180. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *The Journal of Cell Biology* 2011; 195: 931–42.
181. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg* 2006;16(3):143-152.
182. Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M. Endurance run increased circulating IL-6 and IL-1 α but down-regulates ex vivo TNF- α and IL-1 β production. *J Appl Physiol* 1995;79:1497-503.

183. Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 regulation of TNF- α from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-9.
184. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:1S-13S.
185. Gardner RV, McKinnon E, Poretta C, Leiva L. Hemopoietic function after use of IL-1 with chemotherapy or irradiation. *J Immunol* 2003;171:1202-6.
186. Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology Philadelphia: WB Saunders Company. 1994: 240-261.
187. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:16-20.
188. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M. Involvement of IL -1 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 1989;143: 3949-3955.
189. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001; 89:763-71.
190. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-43.
191. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148:209-14.
192. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human Dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:26-7.
193. Zehnder M, Delaleu N, Du Y, Bickel M. Cytokine gene expression-part of host defense in pulpitis. *Cytokine* 2003; 22:84-8.
194. Lin SK, Kuo MY, Wang JS, Lee JJ, Wang CC, Huang S, Shun CT, Hong CY. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002; 28(3):197-201.
195. Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2010; 87: 483-7.
196. Formigli L, Orlandini S, Toricelli P, Gimnelli HL, Iliortini HL, Bradi AIL, et al. Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. *Oral Path Med* 1993; 24(2): 16-20.
197. Takeichi O, Saito I, Tsurumuachi T, Moro I, Sato T. Expression of inflammatory cytokine genes *in vivo* by human alveolar bone-derived

polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. *Calcif Tiss Res* 1996;58:244-8.

198. Bauman H, Onarato V, Gauldie J, Jahreis GP. Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 1987;262: 9756-68.

199. Gervasio AM, Silva DA, Taketomi EA, Souza CJ, Sung SS, Loyola AM. Levels of GM-CSF, IL-3, and IL-6 in fluid and tissue from human radicular cysts. *Journal of Dental Research* 2002;81:64-8.

200. Houssiau FA, Devogelaer J, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784-8.

201. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:225-31.

202. Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM:NGF upregulates TRPA1:implications for orofacial pain.*J Dent Res* 2007;86:550-555.

203.f Jeske NA,Diogenes A,Ruparel NB,et al:A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1.*Pain* 2008;138(3):604-616.

204. Üreyen Kaya B, Çiçek E, Aşçı H. Endodontide Ağrı ve Analjezik Kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2013; 4 (1): 39-45.

205. Fehrenbacher J, Sun XX, Locke E, Henry M, Hargreaves KM. Capsaicin-evoked ICRP release from human dental pulp: a model system for the study of peripheral neuropeptide secretion in normal healthy tissue. *Pain* 2009; 144: 253-261.

206. Nicholson B. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand* 2000; 101: 359-71.

207. Hargreaves KM, Milam SB. Mechanisms of pain and analgesia. In: Dionne R, Phero J. *Management of pain and anxiety in dental practice*, New York: Elsevier, 2001; 18-40.

208. Keiser K, Hargreaves K. Building effective strategies for the management of endodontic pain. *Endod Topics* 2002; 3: 93-105.

209. Sessle B. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endodon* 1986; 12: 435-444.

210. Dallel R, Clavelou P, Woda A. Effects of tractotomy on nociceptive reactions induced by tooth pulp stimulation in the rat. *Exp Neurol* 1989; 106: 78-84.

211. Marriott D, Wilkin GP, Coote PR, Wood JN. Eicosanoid synthesis by spinal cord astrocytes is evoked by substance P; possible implications for nociception and pain. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1991; 21B: 739-741.
212. Podda M, Grundmann- Kollmann M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology* 2001; 26: 578-582.
213. Derviş E. Oral Antioksidanlar. *Dermatoz* 2011; 2(1) : 263-267.
214. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Intern J Neuroscience* 1991; 57:1-17.
215. Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *Erciyes üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2000;9(1): 49-53.
216. Bast A, Haenen G, Goelmen JA. Oxidants and antioxydants. State of the Art *The Am J Of Med.* 1991,91 (Suppl 3C):2-13.
217. Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* 1998; 10: 1-4.
218. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2007; 61: 412-22.
219. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, Fitz GG. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94: 19–25.
220. Jacobson JM, Micheal JR, Jafri M, Gurtner GT. Antioxidants and antioxidant enzymes protects against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *Am physiological society.* 1993;90:1252-59
221. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1991; 9; 281(1-2):9–19.
222. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer. *Chemico Biological Interactions* 2006; 160: 1-40.
223. Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, et al. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr* 2009; 60 (Suppl 2): 12–22.
224. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 2006; 113: 189–207.
225. Cemeli E, Baumgartner A and Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 2009; 681: 51–67.

226. Yılmaz İ. Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif Stres. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2010;17 (2) 143-53.
227. Baskin SI ve Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington DC: Taylor and Francis, 1997; 79-120.
228. Grossi GB, Borello S, Giuliani M, Galeotti T, Miani C. Copper-zinc superoxide dismutase in human and animal dental pulp. J Dent 1991;19:319–21.
229. Baumgardner KR, Law AS, Gebhart GF. Localization and changes in superoxide dismutase immunoreactivity in rat pulp following tooth preparation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1999;88:488–95.
230. Baumgardner KR1, Sulfaro MA. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. J Endod. 2001 Mar;27(3):190-5.
231. Garewal HS. Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, 1997, pp 3-19.
232. Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi: 2011: 9 (1) : 73-83.
233. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clinical Interventions in Aging 2007; 2(3): 377-87
234. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg. 2004, 15 (1-2):91-96.
235. Ang CD, Alviar MJ, Dans AL, Bautista-Velez GG, Villaruz-Sulit MV, Tan JJ, Co HU, Bautista MR, Roxas AA. Vitamin B for treating peripheral neuropathy. Cochrane Database Syst Rev.2008; 16:CD004573.
236. Beltramo E, Nizheradze K, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes. Diabetes Metab Res Rev. 2009; 25:647–56.
237. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. Diab Metab Res Rev. 2004;20:330–336.
238. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinatti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. Acta Diabetol. 2001; 38:135–138.
239. Fujimara M. Allithiamine and its properties. J Nutr Sci Vitaminol. 1976; 22:57–62.

240. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) on a request from the Commission on benfotiamine, thiamine monophosphate chloride and thiamine pyrophosphate chloride, as sources of vitamin B1. *The EFSA Journal* 2008; 864: 1-31.
241. Fujimara M, Sasakawa S, Itokawa Y, Ikeda K. Affinity of thiamine propyl disulfide-S35 to organs. *J Vitaminol.* 1964; 10: 79–87.
242. Schreeb KH, Freudenthaler S, Vormfelde SV, Gundert-Remy U, Gleiter CH. Comparative bioavailability of two vitamin B1 preparations: benfotiamine and thiamine mononitrate. *Eur J Pharmacol.* 1997; 52:319–320.
243. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003;9:294–299.
244. Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, Mavrakis K, Bitsch I, Netzel M, Geyer J, Köpcke W, Sauerland C, Bretzel RG, Federlin KF. Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:330–336.
245. Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, Vidal-Cantú GC, Medina-Santillán R, Reyes-García G, Granados-Soto V. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006 ; 530(1-2):48-53.
246. Winkler G, Pal B, Nagybeganyi E, Ory I, Porochnavec M, Kempler P. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Arzneimittel-Forschung* 1999; 49: 220-4.
247. Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W . Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study). *Alcohol Alcohol* 1998; 33: 631-8.
248. Haupt E, Ledermann H, Kopcke W. [Diabetic polyneuropathy: the effectiveness of Benfotiamin in Pain]. In Gries, F.A., Federlin, K. *Benfotiamin in der Therapie von Polyneuropathien.* New York: Georg Thieme Verlag, German, 1998; 61-4.
249. Simeonov S, Pavlova M, Mitkov M, Mincheva L, Troev D. Therapeutic efficacy of "Milgamma" in patients with painful diabetic neuropathy. *Folia Med (Plovdiv)* 1997;39: 5-10.
250. Jermendy G. Diabetic polyneuropathy: results of an open multicenter study. In Gries FA, Federlin K. *Benfotiamin in the Therapy of Polyneuropathy.* New York: Georg Thieme Verlag, 1998;71-6.
251. Loew D, Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine. *Int. J. Clin. Pharmacol Ther* 1996;34, 47-50.

252. Rote Liste. Fachinfo-Service, Fachinformationsverzeichnis Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen), Verlag Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main 2008.
253. Frank T, Bitsch R, Maiwald J, Stein G. High thiamine diphosphate concentrations in erythrocytes can be achieved in dialysis patients by oral administration of benfotiamine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2000; 56: 251-257.
254. Geyer J, Netzel M, Bitsch I, Frank T, Bitsch R, Kramer K, Hoppe PP., Bioavailability of water- and lipid-soluble thiamin compounds in broiler chickens. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2000;70: 311-316.
255. Soylu MS. Rat Fizyolojisi. In:Yücel O, ed. Küçük deney hayvanlarından rat. *Matris Tanıtım Baskı Hizmetleri*, Ankara, 2012; s. 22-25.
256. Gibbs ve ark. (Rat Genome Sequencing Consortium) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004; 428(6982):493-521.
257. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010; 44 (1): 1-6.
258. Ertuğrul İF, Maden M, Orhan EO. Endodontik çalışmalarda deney hayvanlarının kullanımı ve seçim kriterleri. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2013;4 (2): 114-123
259. Huxley HG. The histology of rat molar tooth fissure plaque. *Arch Oral Biol* 1971; 16 (11): 1311-28.
260. Muruzabal M, Eurasquin J. Discussion of methods and criteria in evaluation of periapical response. *Int Dent J* 1970; 20 (3): 539-554.
261. Stashenko P, Wang CY, Tani-ishi N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994, 78 (4): 494-502.
262. Oikawa T, Nomura Y, Arai C, Noda K, Hanada N, Nakamura Y. Mechanism of active eruption of molars in adolescent rats. *Eur J Orthod* 2011; 33 (3): 221-227.
263. Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo MF, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010; 55 (2): 142-147.
264. Nakasone N, Yoshie H, Ohshima H. An immunohistochemical study of the expression of heat-shock protein-25 and cell proliferation in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol* 2006; 51 (5): 378-386.
265. Sharp PE, La Regina MC, Suckow MA. *The laboratory rat.* CRC Pres; 1998.p.16.

266. Poyraz Ö. Laboratuvar hayvanları bilimi. Ankara: Kardelen Ofset; 2000.p.210-11.
267. Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav Brain Res* 2002;136(2);339-48
268. Hofstetter J, Suckow MA, Hickman DL. Morphophysiology. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The laboratory rat*. Academic Press; 2006.p.101-107.
269. Seifi M, Ezzati B, Saedi S, Hedayati M. The Effect of Ovariectomy and Orchiectomy on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Wistar Rats. *J Dent (Shiraz)*. 2015 Dec;16(4):302-309.
270. Çalışır M, Akpınar A, Poyraz Ö, Göze F, Çınar Z. The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2015 doi: 10.1111/jre.12329.
271. Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S. Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(13): 3804-10.
272. Haug SR, Heyeraas KJ. Effects of sympathectomy on experimentally induced pulpal inflammation and periapical lesions in rats. *Neuroscience* 2003; 120: 827–36.
273. Kaya M, Çenesiz M. Deney hayvanlarının fizyolojisi. In: Aksoy, A, Kolbaktır F, Hökelek M, editors. *Laboratuvar hayvanları*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları; 2010.p.42.
274. McClanahan SB, Turner DW, Kaminski EJ, Osetek EM, Heuer MA. Natural modifiers of the inflammatory process in the human dental pulp. *J Endod* 1991;17; 589–93.
275. Chidiac JJ, Rifai K, Hawwa NN, Massaad CA, Jurjus AR, Jabbur SJ. Nociceptive behavior induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2002;6:55-67.
276. Nekoofar MH, Sadeghipanah M, Dehpour AR. Evaluation of meloxicam (A Cox-2 Inhibitor) for management of postoperative endodontic pain: a double-blind placebo-controlled study. *J Endod*. 2003;29:634-7.
277. Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology* 2001;120(3): 594–606.
278. Larkai EN, Smith JL, Lidsky MD, Sessoms SL, Graham DY. Dyspepsia in NSAID users: the size of the problem. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11(2):158–162.

279. Winkelmayr WC, Waikar SS, Mogun H, Solomon DH. Nonselective and cyclooxygenase-2-selective NSAIDs and acute kidney injury. *Am J Med* 2008; 121(12), 1092–8.
280. Chan CC, Reid CM, Aw TJ, Liew D, Haas SJ, Krum H () Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An updated meta-analysis. *J Hypertens* 2009; 27(12): 2332–2341.
281. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H ve ark. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352(11):1092–1102.
282. Gossiau A, Li S, Ho CT, Chen KY, Rawson NE. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55:74–82.
283. Choi DK, Koppula S, Suk K. Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products. *Molecules*. 2011; 16:1021–43.
284. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel RG. Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomised, double blind, placebo-controlled clinical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008; 116:600–605.
285. Krell KV, McMurtrey LG, Walton RE. Vasculature of the dental pulp of atherosclerotic monkeys: light and electron microscopic findings. *J Endod* 1994; 20 (10): 469–473.
286. Kline LW, Yu DC. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod* 2009; 35 (6): 866–869.
287. Rezende TM, Vieira LQ, Sobrinho AP, Oliveira RR, Taubman MA, Kawai T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. *J Endod* 2008; 34 (9): 1066–1071.
288. Nossa PM, Guenka LM, Couto LB, da-cruz-Perez DE. Effects of the serjania erecta and zeyheria montana ethanol extracts in experimental pulpitis in rats: A histological study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18 (2):337-42.
289. Souza PPC, Fukada SY, Cunha FQ, Costa CAS, Costa-Neto CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regulatory Peptides* 2007;140: 27–31.
290. Costa CA, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* 2003;36:831-839.
291. Hutchins M, Housholder G, Suchina J, Rittman B, Rittman G, Montgomery E. Comparison of Acetaminophen, ibuprofen, and Nabumetone Therapy in Rats with Pulpal Pathosis. *J Endod*. 1999; 25(12):804-6.

292. Rethnam S, Raju B, Fristad I, Berggreen E & Heyeraas KJ. Differential expression of neuropeptide Y Y1 receptors during pulpal inflammation. *International Endodontic Journal* 2010; 43:492–498.
293. Kawashima N, Nakano-Kawanishi H, Suzuki N, et al. Effect of NOS inhibitor on cytokine and COX2 expression in rat pulpitis. *J Dent Res* 2005;84:762–7.
294. Orhan EO. Direkt pulpa kaplama çalışmasında rat modeli/Rat as a model for direct pulp capping research. *S.D.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2012; 3 (3):142-9.
295. Kim SA, Lim SS. T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. *J Endod* 2002; 28(3):202-5.
296. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997;23:39–42.
297. Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from *Lactobacillus casei*. *J Endod* 1998;24:252–5.
298. Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguín MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2006; 39(5): 394-400.
299. Raval AD, Thakker D, Rangoonwala AN, Gor D, Walia R. Vitamin B and its derivatives for diabetic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;12;1-18.
300. Mapanga RF1, Joseph D, Symington B, Garson KL, Kimar C, Kelly-Laubscher R, Essop MF. Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014; 210(3):546-64.
301. De Kozak Y, Omri B, Smith JR, Naud MC, Thillaye-Goldenberg B, Crisanti P. Protein kinase C ζ (PKC ζ) regulates ocular inflammation and apoptosis in endotoxin-induced uveitis (EIU): signaling molecules involved in EIU resolution by PKC ζ inhibitor and interleukin-13. *Am J Pathol*. 2007;170:1241–1257.
302. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313; 54–56.
303. Gazelius B, Edwall B, Olgart L, Lundberg JM, Hökfelt T, Fischer JA. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. *Acta Physiol Scand*. 1987;130(1):33-40.
304. Foreman JC. Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin. *Intl Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82, 366–71.

305. Haegerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O, Nilsson J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3299–3303.
306. Zaidi M, Fuller K, Bevis PJ, GainesDas RE, Chambers TJ, and MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide inhibits osteoclastic bone resorption: a comparative study. *Calcif Tiss Intl* 1987; 40: 149–154.
307. Bernard GW ve Shih C. The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene-related peptide. *Peptides* 1990;11: 625–32.
308. Taylor PE ve Byers MR. An immunocytochemical study of the morphological reaction of nerves containing calcitonin gene-related peptide to microabscess formation and healing in rat molars. *Arch Oral Biol* 1990;35: 629-38.
309. Caviedes-Bucheli J, Camargo-Beltrán C, Gómez-la-Rotta AM, Moreno SC, Abello GC, González-Escobar JM. Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. *J Endod.* 2004;30(4):201-4.
310. Trantor IR, Messer HH, Birner R. The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on cultured human pulp cells. *J Dent Res.* 1995 Apr;74(4):1066-71.
311. Calland JW1, Harris SE, Carnes DL Jr. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *J Endod.* 1997; 23(8): 485-9.
312. Grutzner E, Garry M, Hargreaves KM: Effect of injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and CGRP. *J Endodon* 1992;18:553-7.
313. Kanning H, Carnes D. Concentration of CGRP in symptomatic and asymptomatic human pulp tissue. *J Endodon* 1993;19:191.
314. Sun Y, Tao R, Zhang M, Cao X, Wang H, Xue L, Wu M. Expression of calcitonin gene-related peptide in rat pulp and periodontal tissues by indirect immunofluorescence method. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2013; 32(6):404-8.
315. Hosoya S, Ohbayashi E, Matsushima K, et al. Stimulatory effect of interleukin-6 on plasminogen activator activity from human dental pulp cells. *J Endodon* 1998; 24:331–4.
316. Euler GJ, Miller GA, Hutter JW, D'Alesandro MM. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. *J Endodon* 1998; 24:480–4.
317. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented Bacteroides in human pulp cell cultures. *Int Endod J* 2003; 36: 352–7.

318. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R: Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J* 2013; 46(6):573-80.
319. Takimoto K, Kawashima N, Suzuki N, Koizumi Y, Yamamoto M, Nakashima M, Suda H. Down-regulation of inflammatory mediator synthesis and infiltration of inflammatory cells by MMP-3 in experimentally induced rat pulpitis. *J Endod* 2014; 21;40(9):1404-9.
320. Chang MC, Lin LD, Zwei-Ching Chang J, Huang CF, Chuang FH, Lee JJ, Jeng PY, Wang TM, Jeng JH. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 in dental pulp cells by interleukin-1 β : the role of prostanoids. *J Endod.* 2012; 38(6):774-9.
321. Doroschak AM, Bowles WR, Hargreaves KM. Evaluation of the combination of flurbiprofen and tramadol for management of endodontic pain. *J Endod* 1999;25:660–3.
322. Menhinick KA, Gutmann JL, Regan JD, Taylor SE, Buschang PH. The efficacy of pain control following nonsurgical root canal treatment using ibuprofen or a combination of ibuprofen and acetaminophen in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int Endod J* 2004; 37: 531–41.
323. Cohen JS, Reader A, Fertel R, Beck M, Meyers WJ. A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2a in painful and asymptomatic human dental pulps. *J Endod* 1985; 11: 330–5.
324. Varvara G, Pinchi V, Caputi S, D'Arcangelo C, Scarano A, Sinjari B, Murmura G. Copper zinc superoxide dismutase activity in dental pulp after dental preparation. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26(4): 769-73.
325. Tulunoglu O, Alacam A, Bastug M, Yavuzer S. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *J Clin Pediatr Dent.* 1998 Summer; 22(4):341-5.
326. Hargrove DM, Bagby GJ, Lang CH, Spitzer JJ. Adrenergic blockade does not abolish elevated glucose turnover during bacterial infection. *Am J Physiol.* 1988;254: 16–22.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Arş. Gör. Dt. Emre ÇİÇEK

İmza

Danışman I

Doç.Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

İmza

Danışman II

Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI

İmza

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emre	Soyadı: ÇİÇEK
Doğum Yeri	Antalya	Doğum Tarihi: 17.04.1987
Uyruğu	T.C.	Tel: 05071498161
E-mail	dt.emrecicek@hotmail.com	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti	2010-Devam Ediyor
Lisans	Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2005-2010
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2001-2005
İlköğretim	Barbaros İlköğretim Okulu	1993-2001

İş Deneyimi

SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2011- Devam Ediyor
-----------------------------	--------------------

Yabancı Dilleri	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	80.00	

EKLER



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 21438139 - 61
KONU: Etik Kurul Kararı

20/03/2014

SAYIN
Doç. Dr. Bülent ÜREYEN KAYA
(SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti A.D.)

“Ratlarda deneysel pulpitis modelinde benfotiaminin antiinflamatuar etkilerinin araştırılması” konulu projeniz Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından **20 MART 2014** tarih ve **05** sayılı kararı ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. İlkan UZ
SDÜ-HADYEK Başkanı

Ek: 1 Adet HADYEK Kararı

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

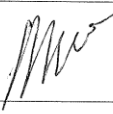
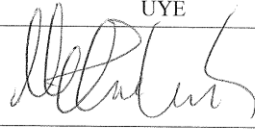


TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
20.03.2014	10	05

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 20 MART 2014 tarihinde Saat 14:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent Üreyen KAYA'nın yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Özlem ÖZMEN, Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI, Yrd. Doç. Dr. Mustafa SAYGIN, Arş. Gör. Emre ÇİÇEK'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Ratlarda deneysel pulpitis modelinde benfotiaminin antiinflamatuar etkilerinin araştırılması" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Wistar Albino)	Erkek	72+4	12 haftalık / 250-300gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Doç. Dr. Efkân UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Münire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İ. Metin ÇİRİŞ ÜYE
		
Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülnur ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
		
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE
	KATILMADI	KATILMADI