

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**PERİAPİKAL LEZYONLARDA NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 VE HSP70
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Ertan YALÇIN

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ertunç DAYI**

Doktora Tezi

ERZURUM 2009

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI DOKTORA
PROGRAMI

PERİAPİKAL LEZYONLARDA NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 VE
HSP70 EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Ertan YALÇIN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.09.2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 13.10.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ertunç DAYI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ömer KAYA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cengizhan KESKİN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ümit ERTAŞ

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Ekim 2009
ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1. TEŞEKKÜR	III
2. ÖZET	IV
3. SUMMARY	VII
4. GİRİŞ VE AMAÇ	1
5. GENEL BİLGİLER	3
5.1 Periapikal Lezyonlar	4
5.1.1. Apikal Periodontitis	5
5.1.2. Kronik Apikal Periodontitis (Periapikal Granuloma)	6
5.1.3. Radiküler Kist (Periapikal Kist)	9
5.2. Periapikal Lezyonların Patobiyolojisi	11
5.2.1. Konak Doku Hücreleri	12
5.2.2. Proinflamatuvar Sitokinler	16
5.2.3. Nitrik Oksit (NO)	19
5.2.4. Isı Şoku Proteinleri	23
6. MATERYAL VE METOD	26
6.1. Grupların oluşturulması	27
6.2. Örneklerin toplanması	27
6.3. İmmunohistokimyasal İnceleme	29
6.3.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan	
Cihaz, Kimyasal Kit ve Malzemeler	29
6.4. İstatistiksel inceleme	33

7. BULGULAR	34
8. TARTIŞMA	46
9. SONUÇLAR	54
10. KAYNAKLAR	56

1. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli fikirlerinden istifade ettiğim başta sayın hocam Prof. Dr. Ertunç Dayı olmak üzere Prof. Dr. Ömer KAYA, Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU, Doç. Dr. Ümit ERTAŞ ve yardımını geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmam süresince kıymetli tecrübelerinden istifade ettiğim Yrd. Doç. Dr. Cenk Fatih ÇANAKCI'ya teşekkür ederim.

Bu süre zarfında sabırla beni destekleyen eşim ve tüm aile fertlerime de şükranlarımı sunarım.

2. ÖZET

Periapikal Lezyonlarda NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 Ekspresyonlarının İncelenmesi ve Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı; periapikal lezyonlarda nitrik oksit (NO), interlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), ısı şoku protein 60 (HSP60) ve ısı şoku protein 70 (HSP70)'in salınımlarının incelenmesi ve değerlendirilmesidir, ayrıca bu moleküllerin salınım miktarlarının birbirleri ile ilişkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne farklı nedenlerden dolayı müracaat eden sistemik olarak sağlıklı toplam 59 birey dâhil edildi. Çalışma protokolüne göre bireyler üç gruba ayrıldı. Periapikal ve periodontal olarak sağlıklı 10 birey kontrol grubunu, radyografik ve histolojik olarak tanısı konmuş kronik apikal periodontitisli 33 hasta ile radiküler kistli 16 hasta periapikal lezyonlu grupları oluşturdu. Çalışmamıza dâhil edilen tüm bireylere çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verildi ve imzalı onayları alındı.

Bu çalışmada kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde iNOS antikoruna ile boyanma skorlarının istatistiksel incelemesinde her grup arasında ileri derecede anlamlılık tespit edildi. ($p<0.001$) Kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde IL-1 β antikoruna ile boyanma skorlarının istatistiksel incelemesinde; kronik apikal periodontitis grubu ile radiküler kist grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken, bu gruplarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. ($p<0.01$) Yine bu üç gruptan elde edilen doku örneklerinde TNF- α

antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel incelemesinde; kronik apikal periodontitis grubu ile radiküler kist grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken, bu gruplarla kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi. ($p < 0.01$) HSP60 antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel incelemesinde her grup arasında ileri derecede anlamlılık görüldü. ($p < 0.001$) HSP70 antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel incelemesinde her grup arasında ileri derecede anlamlılık bulundu. ($p < 0.001$) Kronik apikal periodontitis grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisini gösteren istatistiksel değerlendirmelere göre; iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında ($R = 0.625$, $P = 0.000$), iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında ($R = 0.481$, $P = 0.005$), IL-1 β boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında ($R = 0.797$, $P = 0.000$) ve HSP70 boyanma skorları ile HSP60 boyanma skorları arasında ($R = 0.436$, $P = 0.011$) istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi. Diğer yandan, kist grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisini gösteren istatistiksel değerlendirmelere göre; iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında ($R = 0.593$, $P = 0.016$), iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında ($R = 0.595$, $P = 0.015$) ve HSP70 boyanma skorları ile HSP60 boyanma skorları arasında ($R = 0.787$, $P = 0.000$) istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi.

Sonuç olarak; periapikal lezyonlu gruplarda NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70'in salınımları sağlıklı dokulara oranla daha yüksek bulundu. Ayrıca radiküler kist grubunda NO, HSP60 ve HSP70'in salınımları kronik apikal periodontitis grubuna oranla daha yüksek bulundu. Periapikal lezyonların oluşumunda bu moleküllerin

aktivasyonunun önemli olduğu ve kronik apikal periodontitis formasyonundan kist formasyonuna geçişte bu moleküllerden bazılarının rol alabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Periapikal lezyonlar, nitrik oksit, sitokinler, ısı şoku proteinleri, ekspresyon, immünohistokimyasal

3. SUMMARY

Determination and Evaluation of the Expression of NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 and HSP70 in Periapical Lesions

The aim of this study was to determine and to evaluate the expression of nitric oxide (NO), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), heat shock protein 60 (HSP60) and heat shock protein 70 (HSP70) in periapical lesions, it also aims to study the relationships between the expression amounts of these molecules.

Fifty-nine systemically healthy patients were included the study which they attend Dentistry Faculty of Ataturk University for different causes. According to the study protocol all individuals were divided into three groups. The control group consisted of 10 periodontally and periapically healthy individuals, the groups with periapical lesions had 33 patients who were radiographically and histologically diagnosed with chronic apical periodontitis and 16 patients with radicular cyst. The protocol of investigation was explained to each individual and received his or her signed consent.

In the study, in statistical analysis of scores of staining with iNOS antibody of tissue samples, obtained from control, chronic apical periodontitis and radicular cyst groups, statistically highly significant differences were found among all groups. ($p < 0.001$) In statistical analysis of scores of staining with IL-1 β antibody of tissue samples, obtained from chronic apical periodontitis and radicular cyst groups, statistically no significant differences were found between chronic apical periodontitis and radicular cyst groups, but statistically significant differences were found among

VIII

control and periapical lesion groups. ($p < 0.01$) Although in statistical analysis of scores of staining with TNF- α antibody of tissue samples, obtained from chronic apical periodontitis and radicular cyst groups, statistically no significant differences were found between chronic apical periodontitis and radicular cyst groups, significant differences were found among control group and periapical lesion groups. ($p < 0.01$) In statistical analysis of scores of staining with HSP60 antibody of tissue samples, statistically highly significant differences were found among all groups. ($p < 0.001$) In statistical analysis of scores of staining with HSP70 antibody of tissue samples, statistically highly significant differences were found among all groups. ($p < 0.001$) In chronic apical periodontitis group, according to statistical analysis indicating relations with scores of staining with iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 and HSP70 antibodies with each other; statistically significant positive correlations were found between scores of staining with iNOS antibody and scores of staining with IL-1 β antibody ($R = 0.625$, $P = 0.000$), between scores of staining with iNOS antibody and scores of staining with TNF- α antibody ($R = 0.481$, $P = 0.005$), between scores of staining with IL-1 β antibody and scores of staining with TNF- α antibody ($R = 0.797$, $P = 0.000$) and between scores of staining with HSP70 antibody and scores of staining with HSP60 antibody ($R = 0.436$, $P = 0.011$). On the other hand, in radicular cyst group, according to statistical analysis indicating relations with scores of staining with iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 and HSP70 antibodies with each other; statistically significant positive correlations were found between scores of staining with iNOS antibody and scores of staining with IL-1 β antibody ($R = 0.593$, $P = 0.016$), between scores of staining with iNOS antibody and scores of staining with TNF- α antibody ($R = 0.595$, $P = 0.015$) and between scores of

staining with HSP70 antibody and scores of staining with HSP60 antibody ($R= 0.787$, $P= 0.000$).

In conclusion, expressions of NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 and HSP70 were found higher in periapical lesion groups in comparison to healthy tissues. Furthermore, expressions of NO, HSP60 and HSP70 were found higher in radicular cyst group in comparison to chronic apical periodontitis group. It was concluded that the activation of these molecules are of importance in formation of periapical lesions and some of these molecules might take place in transition from chronic apical periodontitis formation into cyst formation.

Keywords: Periapical lesions, nitric oxide, cytokines, heat shock proteins, expression, immunohistochemical

4. GİRİŞ VE AMAÇ

Periapikal lezyonlar diş ve alveol kemiğini kapsayan en yaygın enflamatuvar hastalıklar arasında yer almaktadır. Lezyonların etyolojisinde genellikle bakteriler ile enfekte diş kökü kanallarının apikal bölgeyi irritasyonu vardır.¹⁻³ Bu nedenle periapikal lezyon patolojisi periapikal bölgede akut immün-enflamatuvar doku cevabı ile başlar. Bu safhada klinik olarak ağrı, perküsyonda hassasiyet ve şişlik ile karakterize olan lezyonun periodontal ligamentten komşu alveol kemiği dokusuna yayıldığı gözlenir.^{2,4} Lezyonun patolojisinin sonraki seyri enfekte kök-kanal sisteminin mikrobiyolojik kompozisyonu ve konak doku cevabı arasında ki dinamik denge ile belirlenir.² Akut konak cevabını takiben periapikal bölgede makrofajlar görülmeye başlar. Periapikal enflamasyon bölgesinde aktive olmuş makrofajlar birçok çeşit proenflamatuvar sitokin üretip salgıladıkları gibi fibroblast, keratinosit, osteoblast ve osteoklast benzeri lokal doku hücrelerini de aktive ederek sitokin salınımına neden olurlar.⁴ Proenflamatuvar sitokinlerden tümör nekrozis faktör - α (TNF- α) ve interlökin-1(IL-1) araşidonik asit metabolizması ve proteinaz üretimini aktive ederek periapikal doku yıkımı ve yeni kemik oluşumunun inhibe edilmesinde rol oynarlar.⁴ Periapikal lezyon patolojisinde bu sitokinlerin diğer mediatörler vasıtasıyla kontrol edilmesi lezyonun seyri açısından önemlidir.

Enflamatuvar patolojilerde proenflamatuvar sitokinlerin (özellikle de IL-1 ve TNF- α) uzun süre üretilmesi Nitrik Oksit (NO) üretiminde artışa neden olur.^{5,6} Reaktif bir radikal aynı zamanda toksik ve kirlenici bir gaz olan nitrik oksit (NO), pek çok fizyolojik ve patolojik aşamalarda anahtar rol oynayan bir moleküldür. NO, direkt veya indirek yoldan bazı iltihabi sitokinlerin üretimini etkileyerek periapikal lezyonların patogenezinde rol oynayabilir. Organizmada TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin

stimülasyonu ile NO üretiminin arttığı bildirilmiştir.^{5,7} Lipopolisakkaritler ve endotoksinler gibi bakteriyel ürünlere cevap olarak konak dokudan salgılanan iltihabi sitokinlerin periodonsiyumun yıkımından sorumlu olduğunu gösteren deliller vardır.^{5,7-9} Diğer yandan sınırlı sayıdaki çalışmalar inflamatuvar periapikal lezyonların patobiyolojisinde proinflamatuvar sitokinler ve NO ile birlikte ısı şoku proteinlerinde (HSP) önem arzedebileceğini vurgulamaktadır.^{10,11} HSP ler sağlıklı dokularda pekçok çeşit fizyolojik fonksiyonlara sahip önemli moleküllerdir. Kronik enflamasyon gibi stres durumlarında gen ekspresyonu yoluyla aşırı üretimi gerçekleşir. HSP60 ve HSP70 enflamasyonlu dokularda patolojik olaylara direk etki eden isoformlardır. HSP60 otoantijen özelliği göstererek T hücre aktivasyonu yolu ile TNF-a ve IL-1 gibi sitokinlerin üretimine katkıda bulunurken HSP70 başta hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması olmak üzere hücresel aktivitenin düzenlenmesinde rol oynar.¹²⁻¹⁸

Bu çalışmadaki öncelikli amacımız; periapikal lezyonlardan elde edilen histolojik kesitlerde NO, IL-1 β , TNF- α , HSP 60 ve HSP 70'in immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak incelenmesi ve periapikal lezyon histolojik formasyonları arasında karşılaştırmaların yapılmasıdır. Buna ilaveten çalışmamızın diğer amacı; kronik apikal periodontitisli ve radiküler kistli dokuların histolojik kesitlerinde bu moleküllerin salınımını gösteren boyanma skorlarının birbirleriyle olası ilişkilerinin incelenmesidir.

5. GENEL BİLGİLER

Ağız ve çene hastalıkları ve cerrahisinin önemli konularından birini oluşturan periapikal lezyonlar alveolar kemik içerisinde en sık görülen ve dental pulpadaki birçok fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve immünolojik iritanın periapikal bölgeyi uyarması sonucu meydana gelen patolojik oluşumlardır.¹ Periapikal lezyonlara neden olan dental pulpadaki patolojik değişiklikler ve patolojik kök kanal sistemi sayısız irritanı barındırabilir.² Genel olarak iritanlar bakteriler ve bakterilerden kaynaklanan bakteriyel toksinler, bakteriyel fragmanlar ve viruslerdir.² Bu mikrobiyal etkenler enfekte kök kanalından periapikal dokulara çıkmasıyla lezyon formasyonu başlayıp kalıcı hale gelebilir.² Periapikal patolojinin oluşumu etkenlerin nitelik ve miktarına ayrıca apikal dokuların bu etkenlere maruz kalma süresine bağlı olabilir.² Periapikal dokuların patojenlere sürekli maruz kalması durumunda nonspesifik ve spesifik immünolojik reaksiyonlar bölge dokularının destrüksiyonuna sebep olabilir.²

Histolojik olarak incelendiğinde, lezyonun gelişim evresine bağlı olarak periapikal lezyonlar polimorf nüveli lökositler, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, bazofiller ve eozinofiller gibi sayısız inflamasyon hücreleri içerirler. Patolojik etkenler ve konak doku savunması arasındaki karmaşık etkileşim sonucu olarak şiddetli lokal enfeksiyon (osteomyelit) ve septisemi gibi sistemik komplikasyonların görülme riski vardır. Bu riskleri azaltmak için konak dokunun çeşitli immünolojik mekanizmalar vasıtasıyla birçok değişik tür medyatörleri ortama salıverdiği tahmin edilmektedir. Ancak patojenler ve konak savunma sistemi arasındaki karmaşık etkileşimin hangi mekanizmaları içerdiği halen tam olarak aydınlatılamamıştır.²

5.1. Periapikal Lezyonlar

Periapikal dokular; apikal sementum, periodontal ligament ve alveol kemiğinden ibarettir. Apikal periodonsiyum sellüler komponentler, kan ve lenfatikleri içeren ekstrasellüler komponentler bunlara ek olarak pulpa ve periodonsiyumda bulunan sensitif ve motor sinirlerin lifleriyle donanmıştır. Periodontal ligamentin diğer yapısal elementleri, esas madde, çeşitli lifler, fibroblastlar, sementoblastlar, osteoblastlar, osteoklastlar, histiyositler, andiferensiye mezenkimal hücreler ve malassez epitelyal hücre artıklarıdır.² Kök apeksini çevreleyen sement, periodontal ligament ve alveol kemiğinden oluşan periapikal bölgenin herhangi bir etkene bağlı olarak normal yapısını kaybetmesi sonucu periapikal lezyon meydana gelir.^{3,19,20} Pulpal ve periapikal bölgelerin yakın anatomik ilişkilerinden dolayı, pulpal inflamasyon periapikal bölgede periodontal değişikliklere neden olabilir.²⁰

Periapikal doku hastalıkları, kökün apeksi etrafındaki dokuların bir enflamatuvar reaksiyonudur ve akut veya kronik şekillerde görülebilir. Akut reaksiyonlarda ya apikal periodontitis ya da alveoler apse oluşur. Eğer reaksiyon kronik hale dönüşürse;

(i). Lokal vücut savunması ile etken arasında bir denge kurulur. Düşük dereceli irritasyona karşı, immün sistem hücreleri olayın daha fazla ilerlemesini önleyecek şekilde karşı koyarlar. Bu şekilde kronik apikal periodontitis yani granulom oluşur.

(ii). Mikroorganizmaların sayısının veya virülansının arttığı, vücut direncinin azaldığı durumlarda görülen kronik apikal periodontitis, iltihaplı apikal periodontitise dönüşüp, oluşan koleksiyon(iltihap) kök kanalıyla ya da fistül yoluyla dışarıya drene olur.

(iii). İlk iki lezyondan herhangi birinde ortamda hertwig epitel kını kalıntıları mevcut ise ve lezyonun etkisiyle olaya karışıp proliferasyon başlamışsa apikal kist oluşur.^{20,21}

Nobuhara ve del Rio²² tarafından periradiküler lezyonların % 59,3'ünün kronik apikal

periodontitis (granuloma), %22'sinin kist, %12'sinin apikal skar ve % 6,7'sinin diğer patolojilerden ibaret olduğu ifade edilmiştir.

5.1.1. Apikal Periodontitis

Apikal periodontitis periodonsiyumun endodontik orijinli iritandan kaynaklanan enfeksiyonudur. Apikal periodontitisin patobiyolojik niteliği hakkında önemli bilgiler açığa kavuşmuş olmasına rağmen, apikal periodontitisin patogenezisinde mikroorganizmaların rolü uzun yıllar belirsiz olarak kaldı. Bakteriler lezyonun yalnızca küçük bir kısmında tespit edildiği için apikal periodontitisin sadece mikrobiyal enfeksiyondan kaynaklanmadığı düşünüldü.⁴ Buna karşın bu duruma nekrotik pulpa²³, hareketsiz doku sıvısı, kanal dolgusu gibi primer ve bağımsız kofaktörlerin sebep olabileceği fikri öne çıktı.⁴ Kakehashi ve arkadaşları²⁴ molar pulpaları ağız ortamına açılan germ-free ratlarda apikal periodontitis gelişmediğini rapor ettiler. Normal oral mikrofloraya sahip kontrol grubu ratlarla karşılaştırıldığında kontrol grubunda geniş periapikal radyolusenslerin meydana geldiği görüldü. Bugün mikroorganizmaların apikal periodontisteki primer rolü konusunda bir konsensüs mevcuttur.⁴ Araştırmacılar periapekte gelişen kemik destrüksiyonunu ve bölgede enflamatuar hücre akümülyasyonundaki radyografik ve histopatolojik değişiklikleri kayıt ettiler.⁴ Nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajların varlığının sadece zayıf bir savunma manevrası olduğu düşünüldü. Ama bu hücrelerin periapikal doku destrüksiyonundaki rolü tahmin edilemedi. Marjinal periodontitisle alakalı doku destrüksiyonundaki savunma hücrelerinin majör rolü ve immün reaksiyonlar hakkında daha fazla kanıt toplandığında, immün sistem hastalık gelişiminde etken olarak kabul edildi.⁴

Enflamatuvar bir hastalık olan apikal periodontitis semptomları, sebebi, histopatolojisi ve benzeri özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) apikal periodontitisi klinik bulguları temel alarak sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma kullanışlıdır fakat hastalıklı dokuların yapısal durumlarını göz önünde bulundurmamaktadır. Hastalık sürecini anlamada yapısal özelliklerin temel olması sebebiyle burada histopatolojik sınıflandırma kullanılmıştır. Bu sınıflandırma lezyon içerisine enflamatuvar hücrelerin yayılımı, epitel hücrelerin varlığı veya yokluğu, lezyonun kistik formasyon gösterip göstermemesi ve etkilenmiş dişin kök kanalının kist kavitesiyle ilişkisi temel alınarak yapılmıştır.⁴ Ancak WHO nun sınıflamasıda dahil olduğu günümüze kadar yapılan sınıflamalar birçok eksiklik ve çelişkiler barındırmaktadır.

Apikal periodontitisin akut formu, endodontik orijinli olup, lezyon belirgin nötrofil odaklarının varolmasıyla karakterize özellik gösterir. İnflamasyon irritanlara cevap olarak sağlıklı periodonsiyumda başlar ve kısa süreli olursa primer, akut durum daha önceden mevcut olan bir kronik apikal periodontitis lezyonunda oluşmuşsa sekonder olarak adlandırılır. Son form olarak da periapikal flare-up, eksaserebasyon, ya da phoenix abseden söz edilir. Kronik apikal periodontitis ise granulomatöz içerikli bir dokudur, histolojik olarak plazma hücreleri, makrofajlar varlığıyla ve çoğunlukla lenfositlerle infiltre olmasıyla karakterizedir. Apikal periodontitisin her iki formunda da lezyonlar epitelize veya non-epitelize olabilir.⁴

5.1.2. Kronik Apikal Periodontitis (Periapikal Granuloma)

Periapikal granuloma, nonvital bir dişin apikalinde görülen kronik enflame granülasyon doku oluşumudur. Sıklıkla kullanılan bu isim lezyonda mikroskopik olarak gerçek granulomatöz inflamasyon görülmemesi sebebiyle tam olarak doğru değildir. Bu

nedence kronik apikal periodontitis daha kabul edilebilir bir terimdir.²⁵ Lezyonun oluşumunun sebebi pulpa nekrozunu takiben prodüktif hücresele reaksiyonların meydana gelişini periapikal dokuların hafif bir enfeksiyon veya irritasyonunun stimüle etmesidir.²⁶ Deneysel bulgular lezyonun pulpal bakteriyel ürünlere hücresele bir yanıt olduğunu göstermiştir.²⁷

Kronik apikal periodontitislerin çoğu asemptomatik olmakla birlikte akut alevlenme meydana gelirse ağrı ve hassasiyet olabilir. Genellikle etkilenen dişte mobilizasyon veya perküsyona duyarlılık görülmez. Pulpal nekroz çok köklü bir dişin tek bir kanalında meydana gelmedikçe diş termal ve elektrik pulpa testlerine cevap vermez. Lezyonların çoğu rutin radyografik muayenelerde fark edilir. Farklı boyutlarda radyolusens görülebilir ve etkilenen dişte apikal lamina dura kaybı vardır. Lezyon iyi sınırlanmış veya belirsiz olabilir. Boyutları değişkendir; zor fark edilecek kadar küçük bir radyolusensten, 2 cm genişliğe kadar ulaşabilir. Kök rezorpsiyonu olağandışı değildir. 200 mm² den büyük lezyonların sıklıkla periapikal kistler olmasına rağmen çok sayıda araştırmacı kronik apikal periodontitisleri periapikal kistlerden ayırt etmek için sadece boyut ve radyografik görüntünün yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Kesin ayırt edici teşhis histolojik olarak yapılabilir.²⁵

Akut faz olmadan bir kronik proğes olarak ortaya çıkan kronik apikal periodontitis, periodontal membranın kronik enflamatuar hücreler, özellikle lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltre olduğu hiperemisi ve ödemi ile başlar. Dokunun lokal olarak artmış vaskülaritesi ve inflamasyonu bölgeye komşu destek kemiğin rezorpsiyonunu indükler. Bazen kök apeksinde mikroskobik hatta makroskobik rezorpsiyon meydana gelir. Ancak bu durum genellikle erken bir bulgu değildir. Kemik rezorbe olurken fibroblastların ve endotelyal hücrelerin proliferasyonu ve zayıf konnektif doku fibrillerinin yanında çok küçük vasküler kanalların oluşumu gözlenir.

Yeni kapillerler genellikle şişkin endotelyal hücrelerle kaplanmıştır. Ayrıca çok sayıda, büyük mononükleer fagositler ile beraber lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltrasyonunda meydana gelir. Bazen bu çok sayıda fagositler lipoid materyalleri fagosite ederler ve köpük hücrelerine benzeyerek tabaka şeklinde gruplar oluştururlar. Kolesterol kristalleride doku bozulmasının bir sonucu olarak dokuya akümüle olurlar ve mikroskopik olarak dokuların histolojik incelenmesinde kullanılan ajanlar tarafından eritilmelerinden dolayı boş bir alan görüntüsü verirler. Bu durum epitelyal proliferasyonda veya kist formasyonunda da gözlenebilir.²⁸

Konnektif doku aktivitesi kronik apikal periodontitisin periferinde oldukça belirgindir ve kollajen demetlerinin buralarda yoğunlaşmasıyla yumuşak doku kitlesinin yavaş büyümesinin bir sonucu olarak kemiği granülasyon dokusundan ayıran devamlı bir kapsül oluştuğu görülür. Kronik apikal periodontitiste fark edilen bir diğer özellik epitel varlığıdır. Bu epitel nadiren periapikal lezyonun içine girdiği maksiller sinüsün solunum epitelinden, fistül bölgesi boyunca ilerleyen oral epitelinden, bir periodontal cepten veya furkasyon bölgesinde periodontal hastalık bulunan bir dişten apikale proliferen olan oral epitelinden kaynaklanabilmesine rağmen genellikle malassez epitel artıklarından kaynağını alır. Kronik apikal periodontitisin erken evresinde epitel, periodontal membranın yakın komşuluğunda tutulur. Sonuç olarak enflamatuar süreç tarafından stimüle edilerek proliferen olan bu epitel genişler ve şeritlerin anastomoz yapmasıyla oluşan stratifiye skuamoz epitel hücre tabakaları yaygınlaşır. Bu epitel apikal periodontal kiste sebep olabilir. Bazen prekistik olduğu düşünülen lezyonlar görülebilir. Bu durum birbirinden ayrı epitelyal hücrelerin dejenerasyona eğilimi sebebiyle gözlenir, kronik apikal periodontitis ve kist arasında keskin bir sınır çizilemez.²⁸

5.1.3. Radiküler Kist (Periapikal Kist)

Radiküler kistler, maksilla ve mandibulada en çok gözlenen kist tipidir. Puberta öncesi nadir olmakla beraber sıklıkla yetişkinlerde görülürler. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla yaklaşık olarak 1.5 kat fazladır. Maksillada, mandibuladan en az 3 kat daha sık görülür. Kist gelişiminden sorumlu ana etkenler; epitel ve fibröz kapsülün proliferasyonu, kist sıvısının hidrostatik basıncı ve çevre kemiğin rezorpsiyonudur. Pulpadan periapikal bölgeye ulaşan enfeksiyon, inflamasyonu ve malassez epitel artıklarının proliferasyonunu indükler. Eğer enfeksiyon kök kanalından elimine edilebilirse 2 cm'ye kadar olan küçük kistler cerrahiye gerek kalmadan küçülebilir.²⁹

Radiküler kistler çenelerde görülen diğer kistler gibi yavaş büyüyen ağrısız bir şişliğe sebep olur. Dikkat çekecek kadar büyümedikçe de herhangi bir semptom vermez, ancak büyük kronik şişliklerin de en sık sebebidir. Eğer enfekte olursa, enflamatuvar ödemden dolayı yuvarlak ve sert olan şişlik ağırlı hale gelir hızlı bir şekilde genişleyebilir. Kemik yumurta kabuğu kalınlığına düştüğünde, üzerine basınç uygulandığında krepitasyon hissedilir. Sonunda, incelmış kemik duvarı tamamen rezorbe olur ve yerini muköz membran altında mavimsi renkte, yumuşak ve fluktuan bir şişliğe bırakır.²⁹

Kiste sebep olarak ölü bir diş vardır ve bu dişin kistle olan ilişkisi radyografide görülür. Radiküler kist yuvarlak, keskin sınırlarla belirgin radyolusent bir alan olarak gözlenir. Kondanse radyopak dış çevre sadece gelişim alışılmadık şekilde yavaş ise görülür ve uzun süreden beri varolan kistlerde genellikle daha belirgindir. Kiste sebep olan ölü diş ise sıklıkla geniş bir çürük kavitesine sahiptir. Komşu dişler eğilmiş, bir miktar yer değiştirmiş veya hafifçe mobil hale gelmiş olabilir. Maksillada yer alan çok büyük kistler, gelişmeye uygun bulunduğu herhangi bir yöne doğru büyüyebilir ve şekli

intizamsız bir hal alabilir. Kistin enfekte olması ile vaskülarite ve çevre kemiğin rezorpsiyonu artar, bu sebeble de kistin ana hatları belirsiz bir hale gelebilir.²⁹

Radiküler kistler ve birçok diğer kist türü lokal anatominin izin verdiği ölçüde balon benzeri büyüyen lezyonlardır. İnternal basıncı büyümelerinde önemli bir faktördür. Kist içi hidrostatik basınç 70 cm H₂O'dur ve bu haliyle kapiller kan basıncından daha yüksektir. Kist sıvısı büyük ölçüde enflamatuar eksudadır ve yüksek konsantrasyonda protein içerir. Bazı yüksek moleküler ağırlıklı olan proteinler osmotik basıncı sağlar. Kist sıvısı plazmadaki ile benzer konsantrasyonda düşük moleküler ağırlıklı proteinler içermesine rağmen daha az miktarda yüksek moleküler ağırlıklı protein içerir. Bu durum kist duvarının tam bir basit yarı geçirgen membran gibi davranmadığını gösterir. Diğer yandan kist duvarı kapillerlerinin geçirgenliği enflamasyonun ve farklı miktarda immünglobulin ve diğer proteinlerin etkisinin bir sonucu olarak artmıştır. Bu nedenlerle kist kavitesi içersindeki osmotik gerilim sayesinde basınç meydana gelir.²⁹

Kist epiteli değişik kalınlıklarda çok katlı yassı epitelden meydana gelir. İyi sınırlanmış bir bazal hücre tabakasından mahrumdur ve bazen tamamlanmamıştır. Başlangıçta epitelyal proliferasyon aktivitesi kronik enflamasyonla ilgilidir ve kalınlaşıp düzensiz ve hiperplastik veya ağ gibi görünebilir. Epitelde hyalin cisimler görülebilir ve müköz hücreler sıklıkla metaplazinin bir sonucu olarak vardır. Uzun zamandır mevcut olan kistler tipik olarak ince yassı epitel duvar, kalın fibröz duvar ve minimal enflamatuar infiltrat içerir.²⁹

Kist kapsül ve duvarına gelince; kapsül, kollajen, fibröz konnektif dokudan meydana gelir. Kist gelişimi aktif olduğu sürece kapsül vaskülarizedir ve proliferen epitele komşu kronik enflamatuar hücrelerden infiltre olur. Kök apeksinden sızan antijenlere bir cevap olarak bulunan plazma hücrelerinin sıklıkla belirgin ve baskın

olduğu gözlenir. Kist kapsülüne komşu kemik duvarında osteoklastik aktivite ve rezorpsiyon vardır. Rezorpsiyon alanı dışında genellikle aktif kemik formasyonu vardır. Kist normal kemik kontürünün ötesine büyüye bile kemik duvarı varlığını sürdürür. Bu kemik duvarı, yeni kemik yapımının rezorpsiyondan daha yavaş olması sebebiyle yumurta kabuğu formuna hatta sonunda duvar kaybolana kadar artan bir şekilde inceler. Kist kapsülü içinde sıklıkla iğne deliği gibi görünen ve kolesterol barındıran yarıklar vardır. Bu yarıklar kolesterolün preparatın hazırlanması sırasında kullanılan ajanlar tarafından çözündürülmesiyle kalırlar. Kolesterol bozulmuş kan ürünlerinden meydana gelir. Kolesterol barındıran küçük yarıklar yabancı cisim dev hücreliler tarafından kuşatılmışlardır ve damar dışına çıkan kırmızı hücreler ve kan pigmentleriyle birliktedirler. Genellikle opal bazende sarımsı ve daha visköz olan kist sıvısı kolesterol kristallerinin varlığıyla parlak görülebilirler. Bu sıvının yayma preparatlarının mikroskopik olarak incelenmesi sırasında tipik çentikli kolesterol kristalleri görülebilir. Histolojik olarak sıvının protein içeriği genellikle amorf eozinofilik materyal olarak görülürler ve sıklıkla bozulmuş lökositler ve yağ globülleriyle şişmiş hücreler ihtiva ederler.²⁹

5.2. Periapikal Lezyonların Patobiyolojisi

Periapikal lezyonlar kronik apikal periodontitis ve radiküler kisti içerir, her ikisinde kök kanalından kaynağını alan sürekli antijenik stimülasyona karşı oluşan immünolojik konak cevabın sonucu olarak gelişir. Hem kronik apikal periodontitis hemde radiküler kist aynı inflamatuvar süreçten gelişen iki farklı aşama olarak tanımlanabilir ve apikal dokulara lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajların infiltrasyonu ile karakterizedir. Diğer yandan lezyonların oluşumu periapikal bölgede kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanır.³⁰ Periapikal lezyonların gelişimine ve periapikal

kemik rezorpsiyonuna IL-1 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerin varlığı eşlik eder.^{2,4,30-46} Ayrıca indüklenebilen izoform (iNOS) yoluyla üretilen nitrik oksit (NO) birçok mekanizma vasıtasıyla periapikal lezyonların gelişimine katkıda bulunur.^{10,33,36-39,47-49} Son yıllarda yapılan çalışmalar inflamatuvar periapikal lezyonların patobiyolojisinde proinflamatuvar sitokinler ve NO ile birlikte ısı şoku proteinlerinde (HSP) rol oynadığına dair deliller ortaya koymuştur.^{10,11}

5.2.1. Konak Doku Hücreleri

Periapikal bölgedeki savunmaya vücut hücrelerinin muhtelif sınıfları iştirak eder. Bu hücrelerin çoğunluğu savunma sisteminde görevlidir ve nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlardan müteşekkildirler. Ek olarak, fibroblastlar, osteoblastlar ve malassez epitel artıkları gibi yapı hücreleri de önemli rol oynarlar. Yüksek konsantrasyondaki nötrofiller ve bazı makrofajlar akut faz boyunca bulunurlar. Lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreleri ise hastalığın kronik fazı boyunca akümüle olurlar.⁴

Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

PNL veya nötrofiller, patojen mikroorganizmalara karşı savaşta ön safta yer alırlar. Fonksiyonları vücuda girmiş olan patojen mikroorganizmaları tespit edip yok etmektir. PNL'ler nonspesifik fagositlerdir ve mevcutlarında bulunan silahlarıyla düşmanlarına karşı iyi donanımlıdır. Bu mikroorganizmalara karşı primer, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılmış çeşitli stoplazmik granüllerle savaşır. Primer granüller lizozomlar, myeloperoksidaz, katyonik proteinler ve nötral proteinazları içerirler. Sekonder granüller laktoferrin ve vitamin B₁₂ bağlayıcı protein ile oluşurlar. Tersiyer granüller ise stimulusya bir cevap olarak dokulara salıverilirler. Enflamasyonun başlangıç fazı boyunca, dokularda çoğunlukla bol miktarda oksijen

vardır ve PNL, NADPH enziminin moleküler oksijeni serbest radikale çevirmesi için aerobik yolu izler. Serbest radikaller çiftlenmemiş elektronlar içeren atom veya moleküllerdir. Bunlar yüksek derecede kararsız ve reaktiftirler. Diğer moleküllerden elektron çalmak suretiyle onlara zarar verirler. Süperoksit (O_2^-), NADPH oksidaz stabil oksijeni etkileyince oluşur. Bir çift O_2^- reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünü oluşturabilir. O_2^- ve H_2O_2 hafifçe mikrobisittir. Ancak H_2O_2 myeloperoksidaz enzimi varlığında (Cl^-)'yi oksitleyerek yüksek derecede bakterisit etki gösteren hipoklorik asidi ($HOCl$) meydana getirir. Bu antimikrobiyal yol H_2O_2 -halidemyeloperoksidaz sistem olarak bilinir. Hipoksik koşullarda, örneğin abselerde PNL güçlü enzimler içeren primer ve sekonder granülleriyle patojen mikroorganizmaları öldürüp sindirmek için intrasellüler yok edici proçesini anaerobik yola çevirir. PNL mikroorganizmaları öncelikle öldürmek için harekete geçer, ancak bu sırada konak dokularına da zarar verir. PNL'lerin çok sayıda enzim içeren stoplazmik granülleri serbest bırakıldıklarında ekstrasellüler matriks ve doku hücrelerinin yapı elemanlarına zarar verirler. Çinko bağlı enzimleri, ekstrasellüler matriksin büyük bir kısmının bozulmasından sorumludur ve matriks metalloproteinazlar (MMP) adı verilen enzimlerin üst familyası altında sınıflandırılırlar. Bununla birlikte, atılan veya serbest bırakılan süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi bu enzimatik ve kimyasal silahlar düşman ve konak dokuları arasında bir ayırım yapmaz. PNL'ler 3 gün gibi kısa ömürlü hücrelerdir ve akut enflamasyon bölgelerinde çok yüksek sayıda öldükleri görülür.⁵⁰ Bu yüzden PNL mobilizasyonunun sebebine bakmaksızın, bu nötrofillerin akümülyasyon ve lokal ölümleri apikal periodontitisin akut fazındaki doku hasarının en büyük sebebidir.⁴

Lenfositler

Lenfositler, savunma sisteminin elit üyelerindendir ve enflamasyon ve immüitenin merkezindedirler. Apikal periodontitiste bir takım rolleri vardır. Lenfositler, T-lenfositler, B-lenfositler, doğal öldürücü hücreler (NK) olmak üzere 3 büyük sınıfta tanımlanmaktadır. NK hücrelerin primer görevi neoplastik ve virüsle enfekte olmuş hücreleri takip etmek ve yok etmektir. Bu yüzden bu hücreler apikal periodontitiste önemli olmayabilirler. Fakat T ve B lenfositler öneme sahiptir. Bu hücreler CD (clusters of differentiation) numaraları ile tanımlanırlar.

T-lenfositler timus kökenli hücreler olup kemik iliği kök hücreleri orijinlidirler. Pre T-hücreleri timusa giderler ve orada olgunlaşıp genel dolaşıma katılırlar. Etkisi ve fonksiyonlarına göre adlandırılırlar; B-lenfositler ile çalışan T-lenfositler T-helper/inducer ($T_{h/i}$) olarak, direk toksik ve yok edici etkisi olan hücrelerse T-sitotoksik/supresif ($T_{c/s}$) olarak isimlendirilir. $T_{h/i}$ hücreler $CD4^+$, $T_{c/s}$ hücreler ise $CD8^+$ olarak da bilinirler. $CD4^+$ hücreler T_{h1} ve T_{h2} hücreler olarak bilinen iki tip hücreye farklılaşırlar. T_{h1} IL-2 ve interferon- γ (IFN- γ) üretir ve hücrel immün sistemi kontrol eder. T_{h2} hücreler ise bazı IL leri üreterek hümorale immün yanıtı oluşturan plazma hücrelerinden antikor üretimini regüle ederler.⁴

B-lenfositler antikor üretiminden sorumlu olup kemik iliğinden orijin alır ve farklılaşırlar. Farklılaşan B-lenfositler kan dolaşımına girerler ve toplam lenfosit popülasyonunun %10-20'sini oluştururlar. Eksratimik lenfoid dokuların germinal merkezlerinde akümüle ve proliferer olurlar. Antijenlerden veya T_{h2} hücrelerinden gelen sinyallerle bazı B-lenfositler, plazma hücrelerine dönüşürler. Plazma hücreleri immün sistemin spesifik kimyasal silahları olan antikorları üretip sekrete edebilen yegane hücrelerdir.⁴

Makrofajlar

Makrofaj immün sistemin ve kronik enflamasyonun başrol oyuncusudur. Büyük mononükleer bir fagosit olup, retiküloendotelyal sistem olarak bilinen mononükleer fagositik sistemin⁵¹ major elemanıdır. Bu sistem kan monositleri ve doku makrofajlarından ibarettir. Makrofajlar buldukları bölgeye göre çeşitli isimler alırlar. Konnektif ve lenfoid doku makrofajları, akciğerde alveoler makrofajlar, karaciğerde Kupffer hücreleri, deride Langerhans hücreleri, beyinde mikroglial hücreler ve makrofajların birleşerek oluşturdukları osteoklastlar, dentoklastlar, yabancı cisim dev hücreleri gibi çeşitli tip multinükleer dev hücreler makrofaj kökenli hücrelerdir. Makrofajların fonksiyonları, mikroorganizmaların fagosite edilerek öldürülmesi, ölü hücre ve doku komponentlerinin temizlenmesi, küçük yabancı partiküllerin ortadan kaldırılması, antijen yakalama, antijenlerin immün kompetan hücrelere sunulması, aktif biyolojik moleküllerin sekresyonu ve regülasyonudur. Makrofajlar kemotaksis ile hareket ederler, mikroorganizmalar ve ürünleri, kimyasal medyatörler veya yabancı partiküller tarafından aktive edilirler. Apikal periodontitiste özel öneme sahip bazı sitokinler (IL-1, TNF- α), interferonlar ve growth faktörler gibi moleküler medyatörler makrofajlar tarafından sekrete edilirler. Makrofajlar aynı zamanda enflamasyonda önemli olan prostoglandinler ve lökotrienler gibi serum komponentleri ve metabolitlerin oluşumunda katkı sağlar.⁴

Osteoklastlar

Apikal lezyonların majör patolojik olaylarından biri de kemik ve dental sert doku yıkımıdır. Osteoklastlar bu süreçte etkili hücreler olup progenitör hücreleri kemik iliği kök hücrelerinden sağlar. Proosteoklastlar kanda monosit olarak hareket ederek periapikal dokulara gelirler ve kemik yüzeyine tutunurlar. Kemik yıkımı ekstrasellüler olarak gerçekleşir, organik matriksin enzimatik bozulması ve ph

düşmesinin bir sonucu olarak rezorpsiyon bölgesinde kemik demineralizasyonunu içerir. Enzimatik aşama kistinoproteinazlar ve matriksmetalloproteinazları (MMPs) içerir ki bu durum apikal lezyonlarda kemik, kök sementi ve dentinin rezorpsiyonu ile sonuçlanır. Makrofajların birleşerek osteoklastlara ve odontoklastlara⁵² farklılaşması bu rezorpsiyondan sorumludur.⁴

Epitelyal Hücreler

Tüm periapikal periodontitis lezyonlarının %30-52'si proliferen olan epitel içerir. Periapikal enflamasyon süresince Malassez epitel artıklarının enflamatuar hiperplazi süreci olarak tanımlanan bölünerek proliferen olmasını sitokinler ve growth faktörlerin stimüle ettiği düşünülmektedir. Bu hücreler radiküler kistlerin patogenezinde epitel kaynağı olarak katılır. Ancak, siliyalı epitel hücreleri de özellikle maksiller molarları etkileyen periapikal lezyonlarda bulunabilirler. Maksiller sinüs epitelinin bu hücrelere kaynak oluşturduğu düşünülmektedir.^{4,53,54}

5.2.2. Proinflatuar Sitokinler

Sitokinler, hücreden hücreye haberciler veya lokal hormonlar olarak tanımlanmaktadır.^{55,56} Çeşitli hematopoetik ve yapı hücrelerinden üretilen, immünolojik savunmanın regülasyonunda, enflamatuar cevapta, hücresel gelişim ve farklılaşmada, doku remodeling ve onarımındaki hedef hücrelere pleotropik etkisi olan hücrelerarası medyatörlerdir.⁴ Bunlar çeşitli uyarıların etkisiyle aktive edilmiş kaynak hücrelerden geçici olarak salgılanan düşük moleküler ağırlıklı (<30kDa) polipeptidler ve glikoproteinlerdir.⁵⁷ Bunlar başka bir hücre membranında yer alan spesifik reseptörlere bağlanabilirler.^{55,56} Sitokinlerin hedef hücreler üzerine çok sayıda etkisi vardır. Yapısal olarak farklı sitokinler etki spektrumu birbiriyle örtüşen etkilere sahip olabilirler. Bunların her birinin fonksiyonu diğer sitokinlerin üretimini artırmak ve azaltmaktır.

Sitokinlerin çoğu küçük bir alanda etkilidir ve üretildiği hücrenin kendisine veya komşuluklarındaki hücelere karşı birbirleri arasında sinerjik ve antagonistik etkileri vardır. Kan dolaşımıyla yayılarak uzak hücreleri etkilemesi nadir olarak gerçekleşir. Sitokinler çok düşük konsantrasyonlarda etkilidirler. Çünkü etkilerini yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak meydana getirirler.⁴ Sitokinler pek çok fizyolojik olayda önemli roller üstlenmelerine rağmen uygunsuz olarak salgılandıklarında patoloji oluşumuna da aracılık edebilirler.^{8,56} Hücre ölümüne sebebiyet verme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle sitokin aktivitesi fizyolojik ortamda çok dikkatli bir şekilde düzenlenir.⁵⁶

TNF

TNF, inflamatuvar patoloji esnasında meydana gelen olayların bir kısmına aracılık eden bir sitokindir. TNF moleküler ağırlığı yaklaşık 17,000 kDa/monomer olan trimerik bir proteindir.⁵⁸ TNF indüksiyonu, kemotaktik sitokinler olarak rol oynayan kemokinler ve prostoglandinleri üreten siklooksijenazlar gibi sekonder medyatörlerin üretimini uyarır.^{9,56,59} TNF'nin TNF- α ve lenfotoksin-alfa olarak da bilinen TNF- β olmak üzere iki farklı tipi vardır. Hücre yüzeyi yapısı açısından birbirine benzeyen iki farklı TNF reseptörü vardır: TNF reseptör-1 ve TNF reseptör-2. Bu reseptörler farklı sitoplazmik kısımlara sahiptirler ve bunun sonucu olarak farklı uyarılarla aktif hale gelirler. Deneysel kanıtlar, TNF'in mikrobiyal patojenlere karşı dirençte rol oynadığını göstermiştir.^{56,59}

TNF- α , makrofajlar ve monositler tarafından üretilen ve "cachectine" olarak da bilinen bir polipeptid sitokindir. TNF- α , çeşitli hücre populasyonları üzerinde bir grup iltihabi ve immün düzenleyici etki gösterir.^{8,56} Periodonsiyumda birçok kaynaktan üretilen TNF- α , dişeti fibroblastlarını da içerecek şekilde fibroblastları uyarak

doku yıkımından sorumlu bir enzim olan kollojenaz üretimini ve kemik rezorpsiyonunu stimüle eder.^{56,60} İmmün sistemdeki çeşitli işlevlerinden dolayı TNF- α pek çok hastalığın patogenezinde rol alabilir. TNF- α , eklemlerin ve diğer dokuların iltihabi hastalıklarının patogenezinde de önemli roller oynayabilir.^{56,61}

İmmün cevapta multipotent bir düzenleyici olarak rol oynar ve ayrıca potent bir pirojen olarak işlev görür. TNF- α , iltihabi ajanlar ve doku yaralanmaları gibi uyarılara cevap vererek, nötrofilleri aktive ederek, vasküler endotelial hücrelerin özelliklerini değiştirerek ve lokal kan pıhtılaşması oluşturarak tümörisidal aktiviteyi artırdığı gibi, diğer hücrelerin metabolik aktivitelerini de düzenleyerek tüm vücutta dolaşır. TNF- α ayrıca kaşeksi (cachexia) ile sonuçlanan lipoprotein lipaz aktivitesini de inhibe eder. TNF- α monositleri aktif hale getirir, platelet aktive edici faktörün ve IL-1 β 'nın üretimini stimüle eder.^{56,62}

İnterlökinler

Bu güne kadar tanımlanan interlökinler arasında IL-1, IL-6 ve IL-8 apikal periodontitis gelişiminde özel bir öneme sahiptir. IL-1 α , IL-1 β büyük ölçüde makrofajlardan tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinlerdir. Sistemik etkileri toksik şokta gözlemlenmiştir. Lokal olarak ise endotelial duvarlara lökosit adezyonunu artırmaları, lenfositlerin stimülasyonu, nötrofillerin tesirini artırma, prostoglandin ve proteolitik enzimlerin üretimini aktive edilmesi, kemik rezorpsiyonunun artırılması ve kemik oluşumunun inhibe edilmesi etkileri vardır.⁴

IL-1 β insan periapikal lezyon ve eksudalarında en baskın olan IL formudur.⁶³⁻⁶⁵ Osteoklast aktive edici faktörün ana komponenti pürifiye edilmiş ve IL-1 β ile aynı olduğu tespit edilmiştir.⁶⁶ IL-1 β canlı dokularda kemik rezorpsiyonunu stimüle etmede en aktif sitokin olup, IL-1 α 'dan 15 kat, TNFs'den 1000 kat daha etkilidir.⁶⁷ IL-1 α ratlardaki apikal periodontitisin patogenezisine ilk karışan IL formudur.^{68,69} IL-6 ise IL-

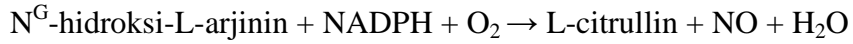
1, TNF- α ve IFN- γ 'nın etkisi altında lenfoid ve çeşitli nonlenfoid hücreler tarafından üretilirler, IL-1'in üretimini ve bazı etkilerini azaltırlar.^{4,70} Apikal periodontitiste IL-6'nın önemi antienflamatuar özellikleriyle ilgili olabilir. IL-6 henüz insan periapikal lezyonlarında gösterilmemiş olmasına rağmen, enflame gingiva ve yetişkin marjinal periodontitisinde⁷¹ var olduğu tespit edilmiştir. IL-8; IL-1 β ve TNF- α 'nın etkisiyle makrofajlardan ve fibroblastların da dahil olduğu çeşitli doku hücrelerinden üretilen kemotaktik sitokin ailesinin üyesidir.⁷⁰ Nötrofillerin masif infiltrasyonu apikal periodontitisin akut fazının karakteristik özelliğidir. Bundan dolayı IL-8 apikal periodontitiste bakteriyal peptidler, plazma kökenli kompleman split-faktör C_{5a} ve lökotrien B₄ gibi diğer kemoatraktan ajanlarla birlikte aktif olabilir.⁴

5.2.3. Nitrik Oksit (NO)

Önceleri toksik ve kirletici bir gaz olarak görülen nitrik oksit (NO), pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte anahtar rol oynayan kısa ömürlü bir moleküldür.^{5,6,72-75} 1987'de ise endotelial derived relaxing faktörün (EDRF) işlevlerinden sorumlu bir kimyasal olduğu keşfedildi.^{5,72} Bu bulguyu takiben NO ile ilgili çalışmalar arttı. Başlangıç raporları NO'nin vasküler tonusu düzenlemedeki rolü üzerine yoğunlaşmasına rağmen, çok geniş fizyolojik ve patolojik işlevleri olduğu daha sonraları açığa çıkarılmıştır. Serbest haldeki NO, eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikaldir ve ROS türlerinin pek çok özelliklerine sahiptir.^{5,75,76} Bu yüzden çeşitli hücrel reaksiyonları ve biyolojik fonksiyonları etkileyebilir.^{75,76} NO, dokuların genel patofizyolojisinde hem yararlı hem de zararlı etkilere sahiptir.⁶ NO, konak savunması ve homeostazisteki faydalarının yanında, pek çok inflammatuar ve otoimmün hastalığın patogeneğinde zararlı yönde rol almaktadır.^{5,72-76} NO serbest gaz olması sebebi ile hücreler arasında, hücre içinde ve hücre membranları boyunca hareket edebilir ve böylece hücreler arası

etkileşimde rol alır.⁶ Bununla beraber diğer hücre içi habercilerden farklı olarak NO, reseptörlere bağlanmaz, yarılanma ömrü saniyelerle sınırlıdır, etkileri lokal ve geçicidir.^{5,72,74-78} NO'nun zararlı etkilerinin kalıcı ve uzun süreli olabilmesi için diğer reaktif türlerle etkileşip yeni bir reaktif tür oluşturması gerekir.⁶

NO memeli hücrelerinde bir aminoasit olan arjininin oksidasyonu ile şekillenir.^{5,36,72-78} NO formasyonu, L-arjinin ve oksijen atomlarının terminal guanidino nitrojen atomlarından birininin bir grup enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-citrullin ve NO'ya okside edilmesi ile gerçekleşir. Gereken elektronlar flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid içeren NADPH'dan derive edilir ve bir ko-faktör olarak tetrahidrobiopterin (T₄BPT) varlığını da gerektirir:⁷⁶



Her biri farklı genlerde üretilen ve keşfedilme sıralarına göre adlandırılan 3 ayrı NOS izoformu vardır. İzofomlardan ikisi yapıcı, diğeri ise indüklenebilir bir enzimdir. İndüklenebilen izoform (iNOS) kalmoduline sıkı bir şekilde bağlanır ve protein salınımı ile düzenlenir. Yapıcı izoformlar orijinal olarak endotel hücreleri (ecNOS) ve nöronlarda (ncNOS) lokalize olurlar ve aktiviteleri kalmodulin aracılığı ile etkilenen artan hücre içi kalsiyum seviyesine bağlıdır. iNOS, sitokinlerce aktive edilen makrofajlar ve diğer pek çok hücre tarafından üretilen, kalsiyumdan bağımsız, sitosolik bir enzimdir.^{5,72-74} iNOS, üretimi için hem mRNA hem de protein sentezi gerektiren transkripsiyonal kontrol altındadır. Negatif feed-back mekanizması ile işleyen NOS aktivitesi ekzojen NO ile inhibe edilir.⁷⁹ Hücre tipine spesifiklik gerektirmeyen kompleks ve üst üste NOS izoformları salgılanması sebebi ile, hücre orjinini spesifikleştirmeyen ve farklılaşan NOS genlerinin miktarını dikkate alan sayısal bir

NOS sınıflandırması önerilmektedir.⁷⁶ Bu sayısal sınıflamada ncNOS → Tip I NOS'u, iNOS→ Tip II NOS'u ve ecNOS→ Tip III NOS'u ifade etmektedir.

NOS-II, çeşitli immünolojik sitimuluslarla uyarılan pek çok hücre tipi tarafından üretilir. Yapıcı NOS izoformlarının(NOS-I ve NOS-III) arttığı dokular hızlı, geçici ve pikomolar konsantrasyonlarda küçük miktarlarda NO üretirler.^{76,80} NOS-II, bir kez indüklendiğinde uzun zaman periyodunda daha fazla miktarda ve sitotoksik NO üretmesi ile yapıcı izoformlardan ayrılır. Yüksek NO seviyesinin sitotoksik potansiyeli bir cevap elde etmek yani NOS-II gen ekspresyonu sağlamak için primer ve uyarıcı olan INF- γ , IL-1 TNF- α ve LPS ile sıkı bir şekilde kontrol edilir.⁷⁶

NO için baskın olan hücre içi hedefler; metal ve thiol içeren proteinler, demir-sülfür kompleksleri, oksijen ve diğer serbest radikallerdir.^{5,72-74} Bazal şartlar altında düşük NO seviyeleri vasokonstriksiyona olanak veren vasküler bir tonus sağlayacak şekilde sürekli salınır. Hücre içi hedefler, plazma membran transportu ve uyarıcı proteinler, mitokondri ve hücre çekirdeğidir. DNA'da meydana gelen NO'ya bağlı hasarlar; DNA sarmalında kopmalar, aminoasit değişimi ve ribo nükleotid redüktazın inhibisyonudur. NO'ya bağlı olarak meydana gelen ciddi DNA hasarı, apoptozis ve nekroz yolu ile hücre ölümünü de tetikleyebilir. NO'nun aşırı üretimine bağlı meydana gelen apoptotik hücre ölümünün insan kondrositlerinde, β -islet hücrelerinde ve periodontal ceplerin apikalindeki keratinositlerde görüldüğü rapor edilmiştir.^{74,76}

NO reaksiyonları, pek çok biyomolekülün oksidasyonu, nitrasyonu (NO₂ ilavesi), nitrozasyonu (NO⁺ ilavesi) ve nitrosilasyonuna (NO) yol açar.^{74,76} En önemli NO etkileşimleri, moleküler oksijen, süperoksit radikal (O₂⁻) ve genel olarak proteine bağlanan demir, bakır ve magnezyum gibi metallerelemdir. NO, bu metalloproteinleri aktif hale getirebilir veya aktif alanlarda metal bağlayarak aktivasyonlarını engelleyebilir.⁷⁶ Ortamda demir (Fe) bulunmadığı durumlarda NO ve süperoksit radikal (O₂⁻) reaksiyona

girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluştururlar.^{74,76} Bununla beraber, NO ve süperoksit radikalden herhangi birinin aşırı üretimi bu reaksiyonu inhibe eder. Moleküler seviyede peroksinitrit en tehlikeli reaktif moleküldür.^{6,76} Bu nedenle araştırmacılar peroksinitritin NO'dan daha zararlı olduğunu öngörmektedirler.⁶

Periodonsiyumda yer alan doku yıkım medyatörleri, IL-1 β , TNF- α ve PGE₂'dir.⁸¹ Proinflamatuvar medyatörlerin uzun süreli üretimi NO üretiminde artmaya ve doku katabolizması için önemli olan PGE₂ senteziyle sonuçlanan COX-II stimülasyonuna yol açabilir.^{5,6} İltihabi cevap büyük oranda kendi kendini sınırlar. Bununla beraber, periodontal hastalıklarda olduğu gibi kronik iltihabın gelişimi doku yıkımına katkıda bulunan başka faktörleri devreye sokar.⁷

Fibroblastlar, bağ dokusu turn-overında ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynarlar. NO, genellikle antiproliferatif etki gösterir. Düşük NO seviyeleri kollojen sentezi için gerekli olurken daha yüksek NO seviyeleri kollojen sentezini baskılar. NO fibroblast proliferasyonunu artırırken, NOS-II indüksiyonu fibroblast proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozis oluşturabilir. Dişeti fibroblastlarında yüksek miktarda NOS-II üretimi, iyileşme cevabında azalma ile sonuçlanabilir ve periodontitis için karakteristik olacak şekilde doku yıkımı/doku tamiri oranında yıkım lehine katkıda bulunabilir.⁷⁶ Bu bulgular hücre-hücre, hücre-matriks ve biyomoleküller arasındaki karmaşık etkileşime dikkat çeker. Homeostazis, hücre ölümü ve hücre büyümesi arasındaki denge ile sağlanır ve NO, sitostazis ve apoptozis oluşturabilir.⁷⁴ Böylece yaralanma ve iltihap esnasında olduğu gibi, interselüler çevredeki değişikliklerin NO seviyesinde değişikliklere sebep olması ve kalıcı fibroblastlarda NOS üretimini artırması olasıdır. Fibroblastlarca salgılanan NOS-II'nin önemi henüz yeterince açık değildir. Bu sebeple NO'nun bir doku yıkım medyatörü olduğuna dair deliller tartışmalıdır ve sitostatik/immünosupresif etkilerinden dolayı bazı durumlarda inflamasyona cevabın

bozulmasında rol oynayabilir. Henüz direkt olarak doku katabolizmasından sorumlu tutulmamaktadır. NO'nun en net etkisi güçlü bir kemotaktik etkiye sahip olan TNF- α ile karşılıklı pozitif etkileşimidir. Son zamanlarda inflamatuvar hastalıklarda, NO'in ve pozitif etkileşimde olduğu TNF- α nın hücresele ekspresyonunun artmasında ısı şoku proteinlerinin (HSPs) etkili olduğuna dair kanıtlar ortaya konmuştur.^{82,83}

5.2.4. Isı Şoku Proteinleri

Isı Şoku Proteinleri (HSPs); hipertermi, hipoksi, iskemi, anoksi, hipoglisemi, viral enfeksiyonlar, alkol, toksik metaller gibi hücre için stres oluşturan şartlarda intrasellüler birikim yapan moleküler yapılardır.⁸⁴⁻⁹⁰ HSP'ler protein sentezi aşamalarında, hücre içi protein transportunda ve protein komplekslerinin toplanmasında ve dağılmasında önemli rol oynarlar.^{84,86,88,91-93} Bu nedenle aslında sadece stres durumlarında değil hücrenin bazal metabolik çalışmasında da yardımcı moleküllerdir.^{84,91} Ancak enfeksiyon, inflamasyon ve benzer olayların neden olduğu stres durumları ortaya çıktığı zaman bu strese cevap olarak HSP sentezi artar.^{84,91,93-95} Yukarda sayılan farklı streslerin ortak özelliği hücrelerde protein denatürasyonuna yol açmalarıdır.⁸⁸ Doğada en iyi korunmuş adaptasyon cevabı olarak ökaryotik ve prokaryotik tüm canlı hücrelerde bulunurlar.^{85,92-94,96}

HSP'ler, genel olarak yaklaşık 15-175 kDa aralığında değişen moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar.^{84,85} Memelilerde HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre 4 ana gruba ayrılırlar: HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük moleküler ağırlıklı HSP'ler (HSP27, alfa A-kristalin, alfa B-kristalin). Her grup yapısal olarak ve bulunduğu sellüler kompartmana göre alt gruplara ayrılır.^{84,97}

HSP70: En iyi korunmuş ve en iyi bilinen gruptur. İnsan hücrelerinde stres esnasında oluşan HSP70, hücrede yapısal olarak bulunan HSC70, mitokondriyal HSP75

ve endoplazmik retikulumda lokalize GRP 78 gibi farklı alt tipleri bulunmaktadır.⁹⁷ HSP70 protein grubu, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasında, multiprotein komplekslerinin oluşmasında ve hücre membranlarından proteinlerin taşınmasında ATP-bağımlı moleküler şaperonlar olarak fonksiyon görürler.^{84,94,97} Çeşitli stres durumlarında, strese bağlı ortaya çıkan HSP70 sentezi, stresli hücrelerin artmış konsantrasyonlardaki katlanmamış veya denatüre proteinlerle baş edebilme yeteneklerine katkıda bulunur. HSP70 hayvan deneylerinde tümör oluşturma potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir. Bunların yanı sıra apoptozisi engelleyebilir ve böylelikle ölümcül stimuluslara maruz kalmış hücrelerin yaşama şansını artırır.^{84,97}

HSP60: Şaperon olarak da bilinen memeli HSP60 ekstrasitoplazmik bölgede de tespit edilmiş olmasına karşın çoğunlukla mitokondriyal matriks içerisinde bulunur.^{85,97} HSP60 mitokondriyal proteinlerin katlanmasında ve ATP'ye bağımlı olarak yanlış katlanmış veya denatüre olmuş proteinlerin proteolitik yıkımlarında görev alır.^{84,97} HSP60 hem kazanılmış (adaptif, spesifik) hem de doğal (innate, nonspesifik) immün cevabı tetikleyebilir.⁸² Daha önce yapılan çalışmalarda HSP60'ın Toll-like reseptör 4 ve 2 (TLRs) ile bağlantı kurabileceği gösterilmiştir.^{98,99} TLRs bakteriyel ve viral orijinli moleküler yapıları tanımlamakla sorumlu reseptör ailesidir ve özellikle doğal savunma sistemi için çok önemlidir. HSP60'ın direk olarak TLRs ve T hücrelerine hatta dendritik hücrelere bağlanarak daha güçlü ve uzun süreli immün cevaba neden olduğu hipotez edilmiştir.⁸²

Vücuda dışarıdan giren mikrobiyal patojen mikroorganizma ısı, pH ve oksijen gibi değişiklikler ile bunların yanı sıra fagositoz gibi doğal konak savunmasıyla karşılaşır. Fagositler tarafından sindirilen patojen, reaktif oksijen ve nitrojene, lizozomal enzimlere karşı kendisini korumak amacı ile HSP sentezi yapar. İnfeksiyon esnasında patojende olduğu gibi konak hücre de HSP sentezini artırır. Bunun iki sebebi olduğu

düşünülmektedir: Birincisi makrofajların patojenlere karşı ürettikleri efektör moleküllerden (örn. reaktif radikaller) kendilerini de korumaları gerekmektedir. İkinci sebep ise fagositler içinde canlı kalan pek çok patojenin intrasellüler hücre metabolizmasına katılmasıdır. Bu patojenlerin çoğu memeli hücresinde HSP sentezinin kuvvetli uyarıcılarıdır.^{84,94} Artmış HSP sentezinin spesifik proinflamatuvar mediyatörler olan NO ve TNF- α ile bazı IL lerin ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir.^{84,86} Sonuç olarak HSP'lerin özellikle inflamatuvar hastalıklarda doğal immün sistemin aktivasyonunda rol alabileceği görüşü ağırlık kazanmaktadır.^{84,100,101} Son yıllarda HSP'ler üzerine yapılan çalışmalar cesaret verici olmakla beraber inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların gelişimindeki rolleri konusunda açıklık bekleyen pek çok konu mevcuttur.

Bütün bu genel bilgilerin ışığı altında bu tez çalışmasının amacı; kök kanal sistemindeki mikrobiyal iritanlardan kaynağını alan inflamatuvar hastalıklar olarak bilinen periapikal lezyonlardan elde edilen histolojik kesitlerde NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 ekspresyonlarının incelenmesi ve değerlendirilmesidir.

6. MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı kliniğine başvuran, radyografik ve klinik olarak periapikal lezyon tespit edilen 49 hasta ve gömük 20 yaş problemi bulunan 10 hasta dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda bazı kriterler arandı;

1. Herhangi bir sistemik hastalığı olmaması,
2. Herhangi bir madde bağımlısı olmaması ve sigara içmemesi,
3. Gebelik veya hastanın hormonal tablosunu değiştirecek herhangi bir durumun bulunmaması,
4. Sürekli kullandığı bir ilaç olmaması,
5. Akut bir durumun olmaması,
6. Yakın zamanda herhangi bir tıbbi tedavi görmemiş olması,
7. Kısa süre öncesine kadar (7-14 gün) Antibiyotik, antihistaminik, antienflamatuar türü herhangi bir ilaç kullanmış olmaması,
8. Apikal rezeksiyon endikasyonu olması ve hastanın endikasyon koyulan diş veya dişlerden daha önce herhangi bir cerrahi veya endodontik tedavi geçirmiş olmaması.

Çalışmamıza dahil edilen tüm bireylere çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında Helsinki Deklarasyonu kriterleri göz önüne alınarak yazılı ve sözlü olarak bilgi verildi ve imzalı onayları alındı.

6.1. Grupların oluşturulması

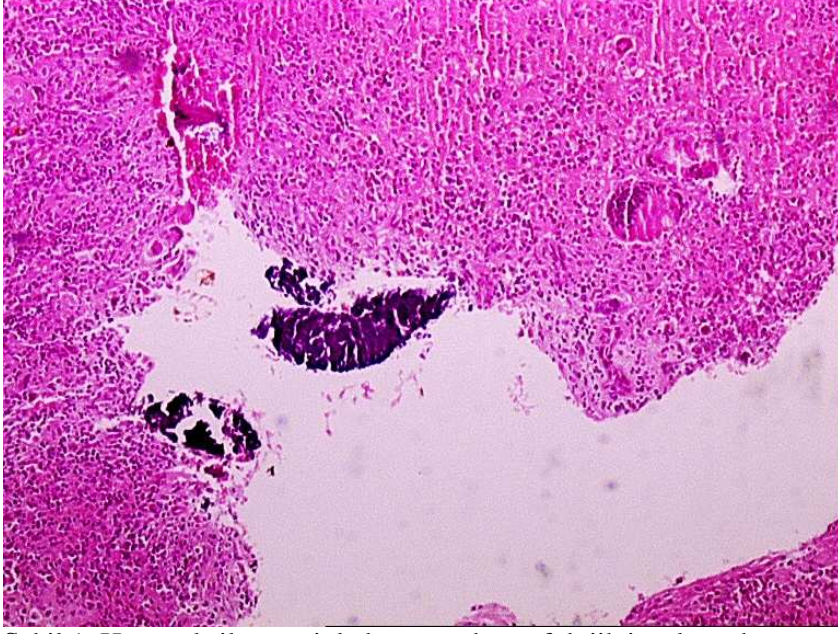
Çalışmamıza dahil edilen gömük 20 yaş problemi bulunan 10 hasta kontrol grubunu oluşturdu. Kontrol grubuna dahil edilen bireylerin doku örneklerinin toplandığı bölgede herhangi bir patolojinin olmamasına dikkat edildi. Diğer yandan 49 periapikal lezyonlu birey ise radyografik ve histolojik değerlendirmelerin sonucunda kronik apikal periodontitis grubunu ve radiküler kist grubunu oluşturdu (33 kronik apikal periodontitis, 16 radiküler kist).

6.2. Örneklerin toplanması

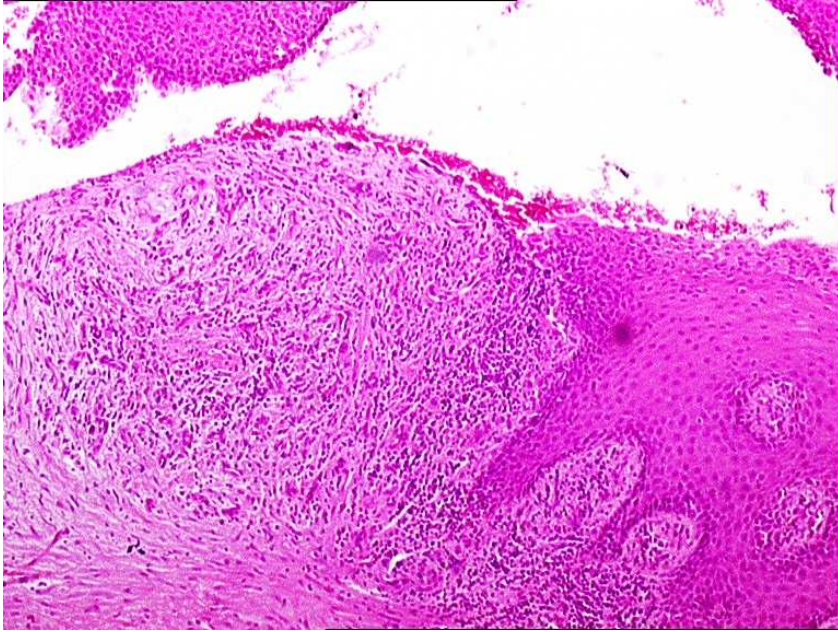
Kontrol grubuna dahil edilen hastalardan gömük 20 yaş dişlerinin cerrahi operasyonu sırasında 0,5x0,5mm boyutlarında sağlıklı dişeti dokusu alındı. Diğer gruplarda ise rutin cerrahi prosedürler uygulandı; apikal rezeksiyon operasyonu ve lezyon eksizyonu için gerekli şartlar hazırlandı. Lokal anesteziyi takiben ilgili dişlerin kök kanalları açıldı. İrrigasyon maddesi olarak serum fizyolojik kullanıldı. Mekanik preparasyonla dentin ve pulpa artıkları temizlendi. Kanal genişletme işlemi tamamlandıktan sonra mukoperiostal flep kaldırılıp lezyona ulaşıldı. Lezyon küret ve düşük devirli tur ile temizlendi. Elde edilen lezyon daha önceden hazırlanmış %10'luk formaldehit ihtiva eden tüplere konuldu. Diş apeksi yeterince rezeke edildikten sonra kök kanalı tekrar temizlenip irrigasyon yapıldı. Kanal, gutta-percha ve kanal dolgu patıyla lateral kondansasyon tekniğine göre dolduruldu. Kanama kontrolü yapıldı ve flep 3-0 ipek sütürler ile kapatıldı. Tüm gruplardan toplanan doku örnekleri bir kaç gün %10'luk formalin ile fikse edildi. Histolojik ve immünohistokimyasal inceleme için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına götürüldü.

Laboratuarda doku örnekleri otomatik doku takip cihazına (Leica TP1050, Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany) konuldu ve ayrı parafin bloklara gömüldü. Mikrotom cihazı (Leica RM2155, Leica Microsystems – Biosystems

Division, Wetzlar, Germany) ile ve 4µm'lik kesitler hazırlandı. Her dokudan en az bir kesit hematoksilin-eozinle boyanarak morfolojik incelemeye alındı (Şekil 1,2). Her dokudan en az beş kesitte immünohistokimyasal inceleme için hazırlandı.



Şekil 1. Hematoksilin-eozinle boyanarak morfolojik incelemede kronik apikal periodontitis teşhisi koyulmuş doku örneği (x20)



Şekil 2. Hematoksilin-eozinle boyanarak morfolojik incelemede radiküler kist teşhisi koyulmuş doku örneği (x20)

6.3. İmmunohistokimyasal İnceleme

6.3.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Cihaz, Kimyasal Kit ve Malzemeler

Cihazlar:

- 1- Otomatik immünohistokimyasal boyama Cihazı: Leica Bond-Max, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 2- Doku takip Cihazı: Leica TP1050, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 3- Mikrotom Cihazı: Leica RM2155, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)

Kimyasal Kit ve Malzemeler:

- 1- Görüntüleme Kiti (Bond polimer rafine detection kit) : Leica, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 2- Primer antikorlar: (Şekil 3)
 - a- Rabbit antihuman NOS2 (N-20) poliklonal antikor (Katalog no: sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
 - b- Mouse antihuman IL-1 β (11E5) monoklonal antikor (Katalog no: sc-52012, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
 - c- Mouse antihuman TNF- α (52B83) monoklonal antikor (Katalog no: sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
 - d- Goat antihuman HSP60 (N-20) poliklonal antikor (Katalog no: sc-1052, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
 - e- Mouse antihuman HSP70 (3A3) monoklonal antikor (Katalog no: sc-32239, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

- 3- Wash Buffer Solüsyon: Leica, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 4- Dewax Solüsyon: Leica, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 5- Etilalkol: Riedel De Haën, (Riedel De Haën GmbH, Seelze, Germany)
- 6- Formalin %37'lik: Merck, (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 7- Antijen retrieval solüsyon (Epitop 2): Leica, (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany)
- 8- Entellan (Lamel kapatma solüsyonu): Merck, (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 9- Pozitif şajlı lam: Menzel, (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Germany)
- 10-Lamel: Menzel, (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Germany)
- 11- Antibody Diluent Solusyon: Novocastra, (Newcastle upon Tyne, UK)



Şekil 3. Çalışmamızda kullanılan primer antikorlar; rabbit antihuman NOS2 poliklonal antikor, Mouse antihuman IL-1 β monoklonal antikor, Mouse antihuman TNF- α monoklonal antikor, goat antihuman HSP60 poliklonal antikor, Mouse antihuman HSP70 monoklonal antikor.

İmmünohistokimyasal inceleme için aşağıdaki yol izlendi:

Primer antikorlar; Rabbit antihuman NOS2 (N-20) poliklonal antikor (Katalog no: sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Mouse antihuman IL-1 β (11E5) monoklonal antikor (Katalog no: sc-52012, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Mouse antihuman TNF- α (52B83) monoklonal antikor (Katalog no: sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), goat antihuman HSP60 (N-20) poliklonal antikor (Katalog no: sc-1052, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Mouse antihuman HSP70 (3A3) monoklonal antikor (Katalog no: sc-32239, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibody diluent solüsyonu ile her biri 1:50 oranında olacak şekilde dilüe edildi.

4 μ m kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Daha sonra Leica Bond-Max (Leica Microsystems – Biosystems Division, Wetzlar, Germany) otomatik immünohistokimya cihazına yerleştirildi. (Şekil 4)



Şekil 4. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan otomatik immünohistokimya cihazı.

Cihaz tarafından aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi:

1. 30 dakika 60 derecede parafininin erimesi ve lama daha iyi tutunması sağlandı,
2. 15 dakika dewax solüsyonunda tutularak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi,
3. 15 dakika %99' luk etilalkolde tutularak rehidratasyon gerçekleştirildi,
4. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
5. Epitop 2 solüsyonunda 100 °C'de 10 dakika tutularak antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi,
6. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
7. Endojen peroksidaz aktivitesini elimine etmek için %3 lük hidrojen peroksidase da 10 dakika bekletildi,
8. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
9. Antikor damlatılıp 60 dakika beklendi,
10. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
11. Post Primer solüsyon damlatılarak 10 dakika bekletildi,
12. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
13. Polimer solüsyon damlatılarak 10 dakika bekletildi,
14. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı,
15. Saf suda 3 dakika yıkandı,
16. DAB+Choromogen damlatılır 3 dakika bekletildi,
17. Distile su ile yıkandı,
18. Hematoksilende 5 dakika boyandı,
19. Distile su ile yıkandı,

Lamlar cihazdan çıkarılarak manuel olarak aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. % 99' luk etilalkolde 5 dakika tutuldu,
2. Ksilol de 5 dakika tutuldu,
3. Daha sonra lamlara Entellan (Merck marka) kapatma solüsyonu damlatılarak lamelle kapatıldı.

Preparat bu haliyle mikroskop altında incelenmek üzere laboratuara alındı.

IL-1 β , NOS2, TNF- α , HSP60, HSP70 boyanmalarının değerlendirme yöntemi

Hücrelerin IL-1 β , iNOS, TNF- α , HSP60, HSP70 antikorları ile boyanma yoğunlukları;

0= boyanma yok,

1+ = az yoğunlukta boyanma,

2+ = orta yoğunlukta boyanma,

3+ = yoğun boyanma

olarak derecelendirilip değerlendirildi.

6.4. İstatistiksel inceleme

İstatistiksel analizlerde SPSS yazılımı (v 13 for Windows; SPSS, Chicago, IL) kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda χ^2 testi, grup içi korelasyonlar için ise Spearman's rank correlation testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ düzeyi kabul edildi.

7. BULGULAR

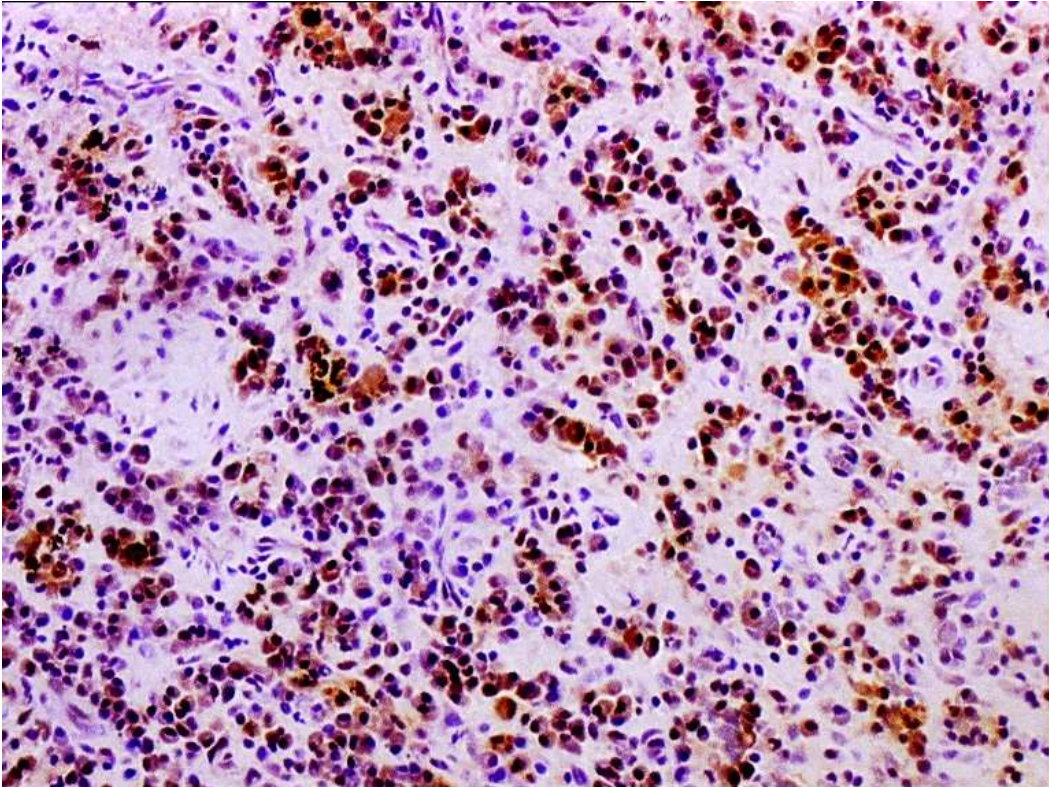
Çalışmamızın kontrol grubuna dahil edilen 10 hastanın (6 erkek, 4 bayan) yaşları 31-50 arasında olup, yaş ortalamaları $39,30 \pm 6,074$ idi. Kronik apikal periodontitis grubunu oluşturan 33 hastanın (19 erkek, 14 bayan) yaşları ise 19-55 arasında olup yaş ortalamaları $35,14 \pm 11,02$ ve radiküler kist grubunu oluşturan 16 hastanın (9 erkek, 7 bayan) yaşları 28-61 arasında değişirken yaş ortalamaları $38,25 \pm 9,93$ idi. Her üç grup ikişerli olarak birbirleri ile karşılaştırıldıklarında; yaş parametresi bakımından gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Tablo 1’de kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde iNOS antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol grubunda hiçbir örnekte boyanma gözlenmedi. Kronik apikal periodontitis grubunda 20 örnekte +1 skorunda (%60,61), 12 örnekte +2 skorunda (%36,36), 1 örnekte +3 skorunda (%3,03) boyanma gözlenirken, radiküler kist grubunda 11 örnekte +2 skorunda (%68,75), 5 örnekte +3 skorunda (%31,25) boyanma gözlendi. (Şekil 5) Her grup arasında yapılan istatistiksel incelemede ileri derecede anlamlılık tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 8).

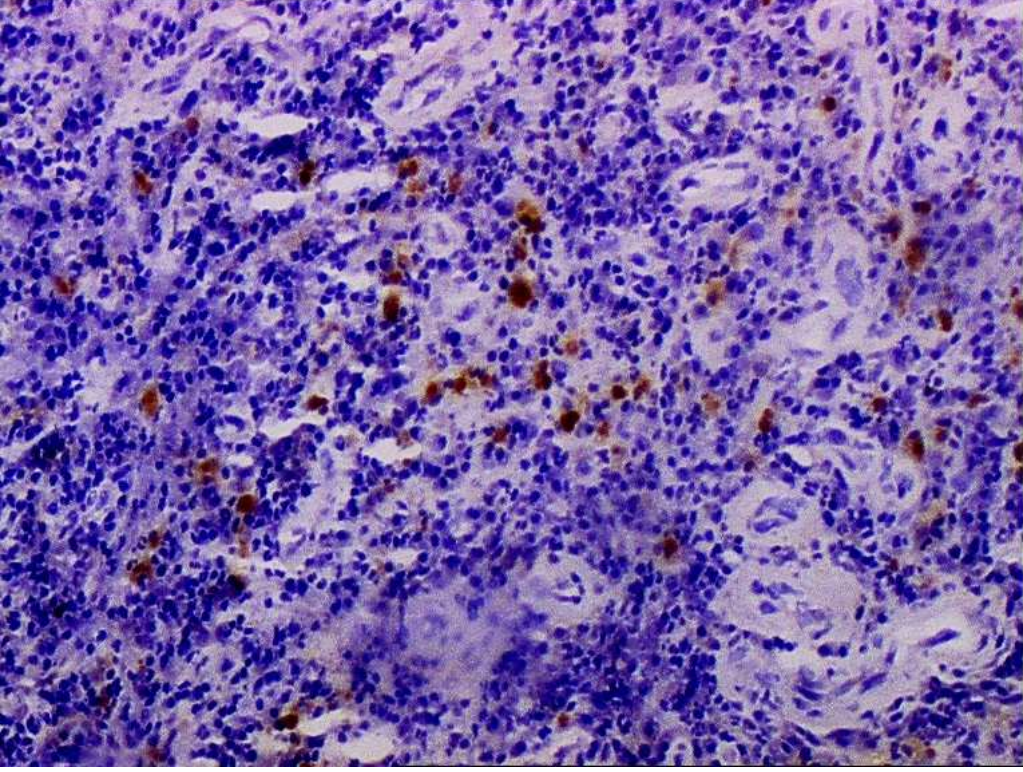
Tablo 2’de kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde IL-1 β antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol grubunda 7 örnekte boyanma gözlenmezken (%70), 3 örnekte +1 skorunda boyanma (%30) gözlendi. Kronik apikal periodontitis grubunda 18 örnekte +1 skorunda (%54,55), 11 örnekte +2 skorunda (%33,33), 4 örnekte +3 skorunda (%12,12) boyanma gözlenirken, radiküler kist grubunda 6 örnekte +1 skorunda (%37,50), 9 örnekte +2 skorunda (%56,25), 1 örnekte +3 skorunda (%6,25) boyanma gözlendi (Şekil 6). Kronik apikal periodontitis grubu ile radiküler kist

grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Bu gruplarla kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.01$) (Şekil 9).

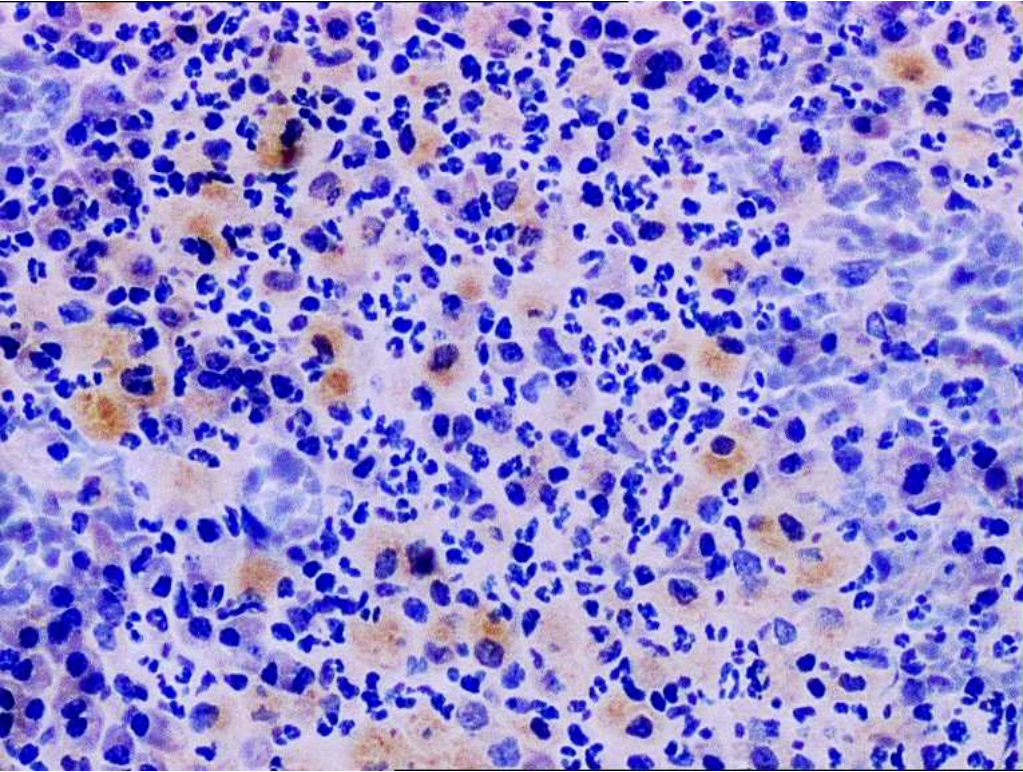
Tablo 3’de kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde TNF- α antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol grubunda 6 örnekte boyanma gözlenmezken (%60), 3 örnekte +1 skorunda (%30), 1 örnekte +2 skorunda (%10) boyanma gözlendi. Kronik apikal periodontitis grubunda 13 örnekte +1 skorunda (%39,39), 16 örnekte +2 skorunda (%48,49), 4 örnekte +3 skorunda (%12,12) boyanma gözlenirken, radiküler kist grubunda 7 örnekte +1 skorunda (%43,75), 9 örnekte +2 skorunda (%56,25) boyanma gözlendi (Şekil 7). Kronik apikal periodontitis grubu ile radiküler kist grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken, bu gruplarla kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.01$) (Şekil 10).



Şekil 5. Radiküler kiste iNOS antikoru ile pozitif boyanma skor 2 (x10)



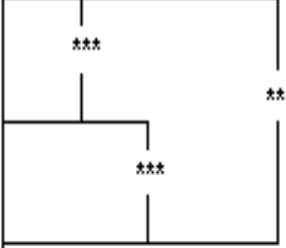
Şekil 6. Radiküler kistte IL-1 β antikoru ile pozitif boyanma skor 1 (x10)



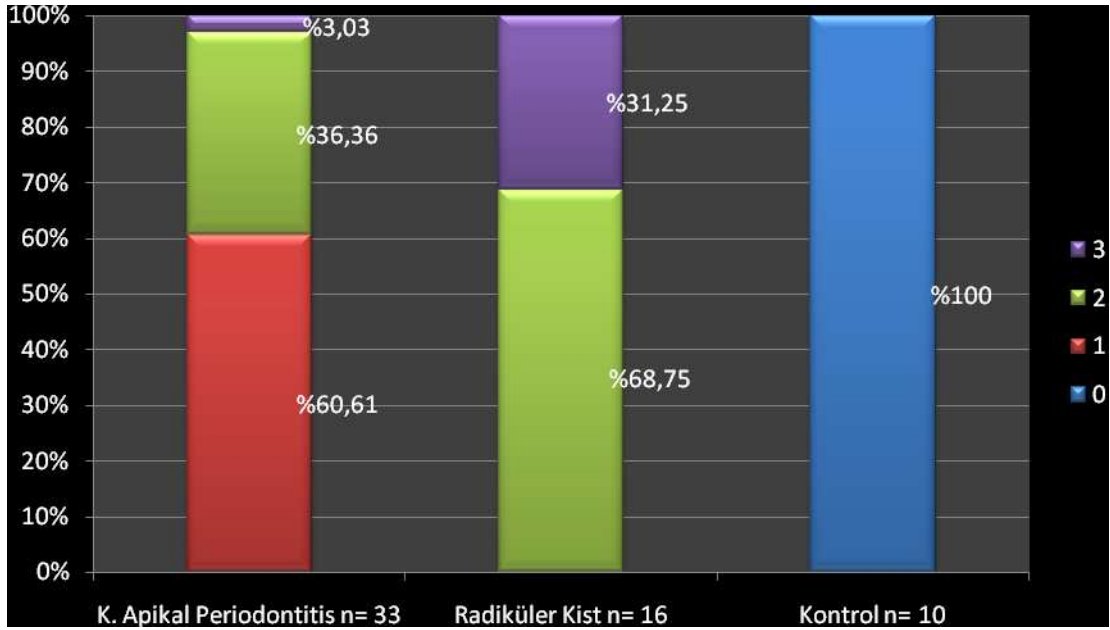
Şekil 7. Kronik apikal periodontitiste TNF- α ile boyanma skor 1 (x20)

Tablo1. Her üç grupta iNOS boyanma değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

iNOS	0	+1	+2	+3
K. Apikal Periodontitis	0	20	12	1
Radiküler Kist	0	0	11	5
Kontrol	10	0	0	0



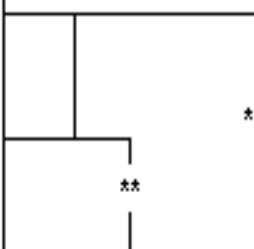
*** $p < 0.001$



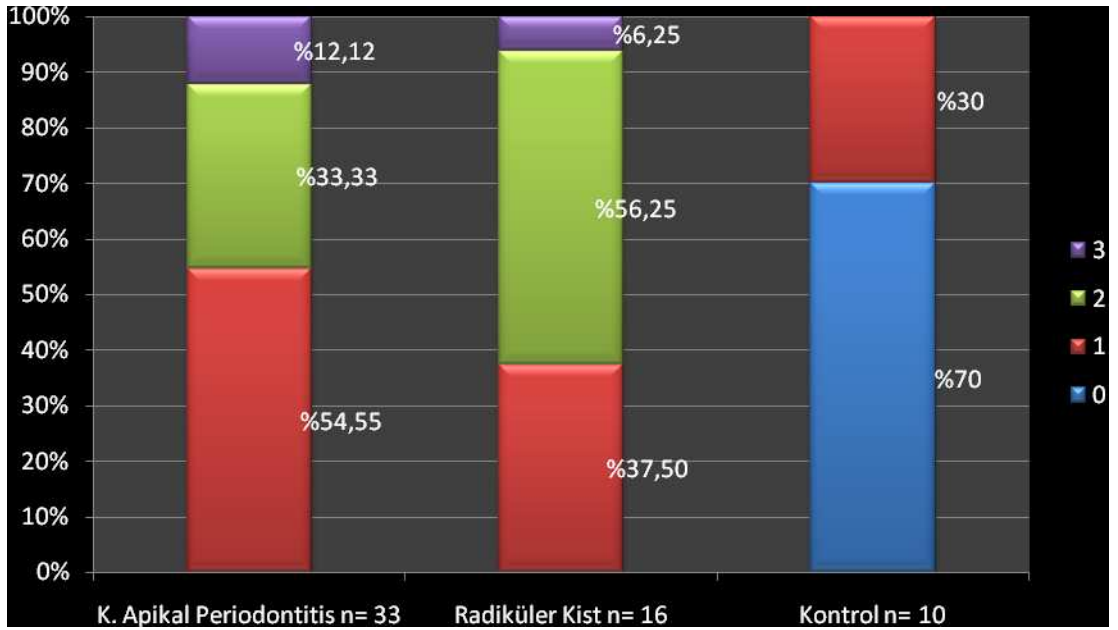
Şekil 8. Her üç grup iNOS boyanma değerleri (%)

Tablo 2. Her üç grupta IL-1 β boyanma değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

IL-1 β	0	+1	+2	+3
K. Apikal Periodontitis	0	18	11	4
Radiküler Kist	0	6	9	1
Kontrol	7	3	0	0



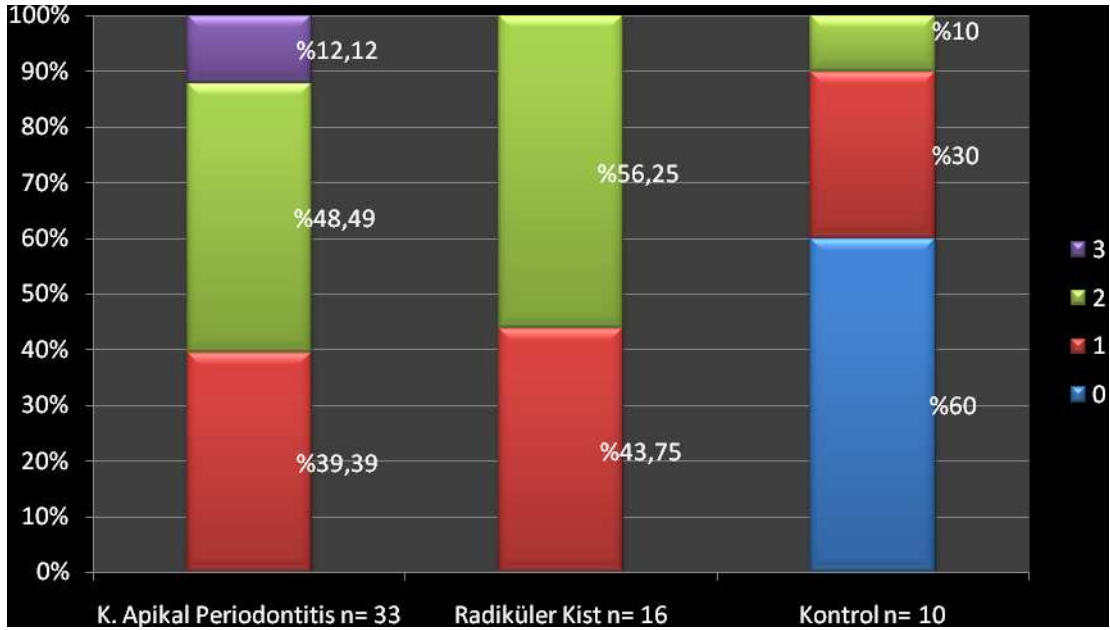
** $p < 0.01$

Şekil 9. Her üç grup IL-1 β boyanma değerleri (%)

Tablo 3. Her üç grupta TNF- α boyanma değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

TNF-α	0	+1	+2	+3
K. Apikal Periodontitis	0	13	16	4
Radiküler Kist	0	7	9	0
Kontrol	6	3	1	0

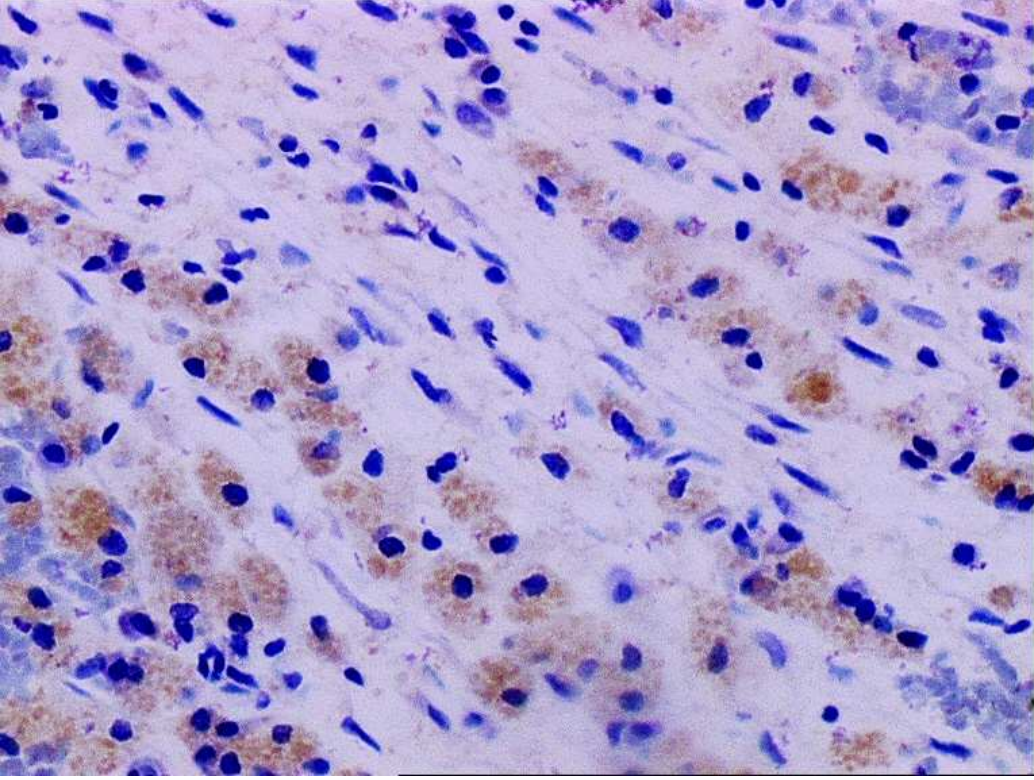
** $p < 0.01$

Şekil 10. Her üç grup TNF- α boyanma değerleri (%)

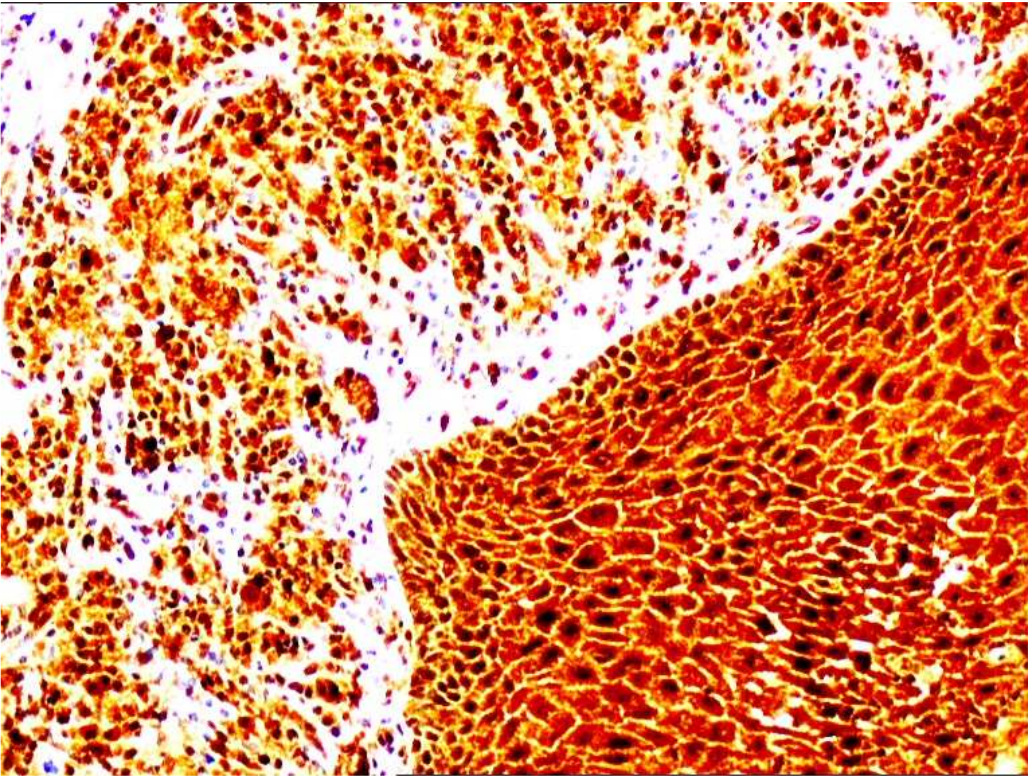
Tablo 4’de kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde HSP60 antikoru ile boyanma skorlarının istatistiksel

karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol grubunda hiçbir örnekte boyanma gözlenmedi. Kronik apikal periodontitis grubunda 18 örnekte +1 skorunda (%54,55), 14 örnekte +2 skorunda (%42,42), 1 örnekte +3 skorunda (%3,03) boyanma gözlenirken, radiküler kist grubunda 3 örnekte +2 skorunda (%18,75), 13 örnekte +3 skorunda (%81,25) boyanma gözlendi (Şekil 11). Her grup arasında yapılan istatistiksel incelemede ileri derecede anlamlılık tespit edildi ($p<0.001$) (Şekil 13).

Tablo 5’de kontrol, kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarından elde edilen doku örneklerinde HSP70 antikoruna ile boyanma skorlarının istatistiksel karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol grubunda hiçbir örnekte boyanma gözlenmedi. Kronik apikal periodontitis grubunda 27 örnekte +1 skorunda (%81,82), 6 örnekte +2 skorunda (%18,18) boyanma gözlenirken, radiküler kist grubunda 2 örnekte +2 skorunda (%12,50), 14 örnekte +3 skorunda (%87,50) boyanma gözlendi (Şekil 12). Tüm gruplar arasında yapılan istatistiksel incelemede ileri derecede anlamlılık tespit edildi ($p<0.001$) (Şekil 14).



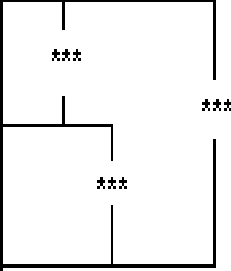
Şekil 11. Kronik apikal periodontitiste HSP60 antikoruna ile boyanma skor 1 (x20)



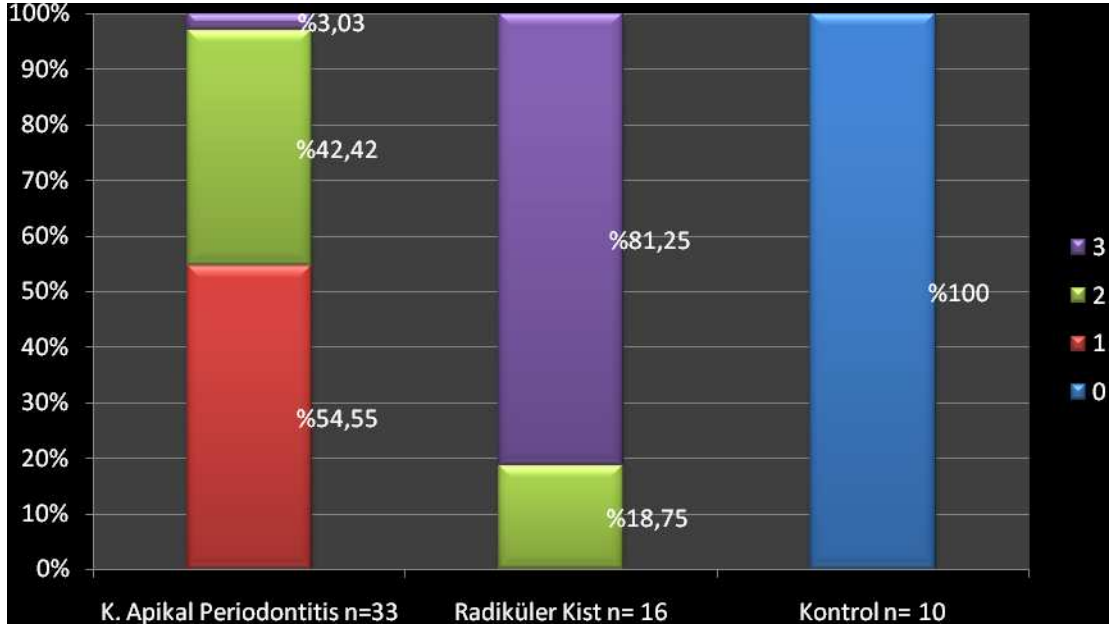
Şekil 12. Radiküler kistte HSP70 antikoruna ile boyanma skor 3 (x10)

Tablo 4. Her üç grupta HSP60 boyanma değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

HSP60	0	+1	+2	+3
K. Apikal Periodontitis	0	18	14	1
Radiküler Kist	0	0	3	13
Kontrol	10	0	0	0



*** $p < 0.001$

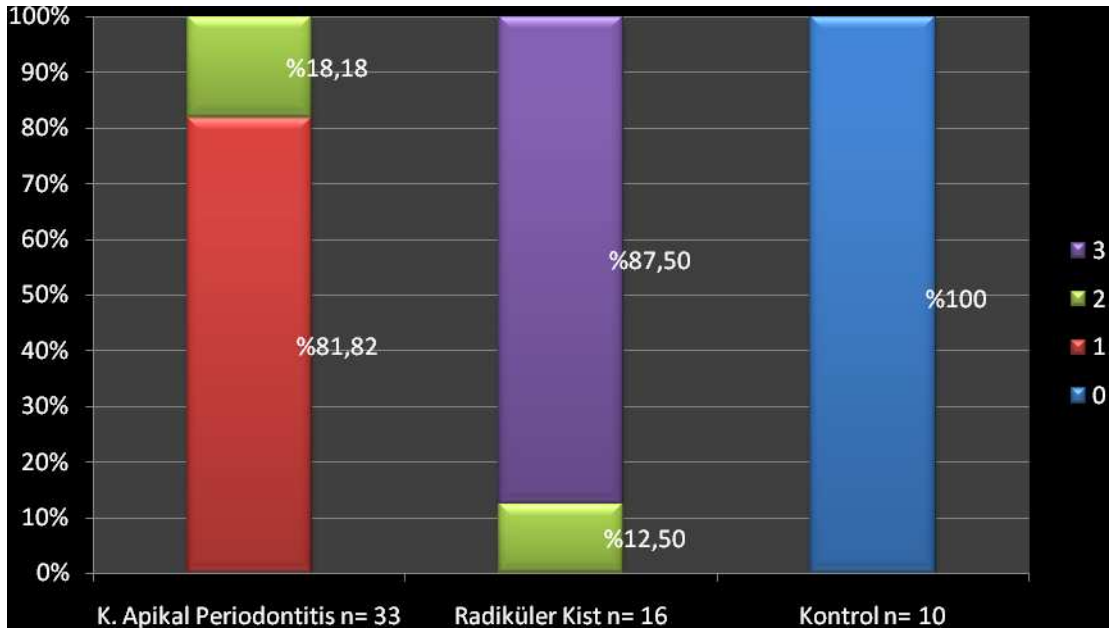


Şekil 13. Her üç grup HSP60 boyanma değerleri (%)

Tablo 5. Her üç grupta HSP70 boyanma değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

HSP70	0	+1	+2	+3
K. Apikal Periodontitis	0	27	6	0
Radiküler Kist	0	0	2	14
Kontrol	10	0	0	0

*** $p < 0.001$



Şekil 14. Her üç grup HSP70 boyanma değerleri(%)

Kronik apikal periodontitis grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 6'da verilmiştir. Bu verilere göre, iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir

pozitif korelasyon tespit edildi ($R= 0.625$, $P= 0.000$). Benzer şekilde iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir pozitif korelasyon görüldü ($R= 0.481$, $P= 0.005$). Diğer yandan IL-1 β boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($R= 0.797$, $P= 0.000$). Ayrıca HSP70 boyanma skorları ile HSP60 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon gözlemlendi ($R= 0.436$, $P= 0.011$).

Tablo 6. Kronik apikal periodontitis grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Kronik Apikal P.	iNOS		IL-1 β		TNF- α		HSP60		HSP70	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
iNOS	–		0.625**	0.000	0.481**	0.005	0.021	0.908	-0.220	0.219
IL-1 β	–		–		0.797**	0.000	-0.250	0.160	-0.051	0.777
TNF- α	–		–		–		-0.216	0.227	0.075	0.677
HSP60	–		–		–		–		0.436*	0.011
HSP70	–		–		–		–		–	

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

Kist grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiksel değerlendirmeler ise Tablo 7’de verilmiştir. Bu verilere göre, iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir pozitif korelasyon tespit edildi ($R= 0.593$, $P= 0.016$). Benzer şekilde iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir pozitif korelasyon görüldü ($R=$

0.595, $P= 0.015$). Diğer yandan HSP70 boyanma skorları ile HSP60 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($R= 0.787$, $P= 0.000$).

Tablo 7. Radiküler kist grubunda iNOS, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 boyanma skorlarının birbirleriyle ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Radiküler Kist	iNOS		IL-1 β		TNF- α		HSP60		HSP70	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
iNOS	–		0.593*	0.016	0.595*	0.015	0.324	0.221	0.255	0.341
IL-1 β	–		–		0.176	0.515	0.017	0.950	0.122	0.654
TNF- α	–		–		–		-0.101	0.760	0.048	0.861
HSP60	–		–		–		–		0.787**	0.000
HSP70	–		–		–		–		–	

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

8. TARTIŞMA

Periapikal lezyonlar genellikle kök kanal sistemindeki enfeksiyonun neden olduğu, periapikal dokuların kronik antijenik stimülasyonuna konak dokunun verdiği cevap sonucunda oluşurlar. Bu lezyonlar histolojik olarak kronik apikal periodontitis veya radiküler kist formasyonu ile karakterizedir ve bu formasyonların her ikisinde aynı enflamatuar sürecin iki farklı aşaması olarak değerlendirilir.³⁰ Periapikal bölgedeki inatçı enflamasyon periapikal kemik dokularında rezorpsiyonla sonuçlanır ve rezorbe olan kemik dokusu yerini kronik enflame granülasyon dokusuna bırakarak kronik apikal periodontitis (periapikal granuloma) oluşumu gözlenir. Granülasyon dokusunun oluşumunun bir sonucu olarak bölgeye proliferen olan malassez epitel hücre artıkları ve enflamasyon arasındaki ilişki enflamatuar radiküler kist gelişimine neden olabilir.¹⁰² Ancak neden bazı granülasyon doku formasyonlarında kistik dönüşüm olduğu ve bu dönüşüm için hangi mekanizmaların gerekli olduğu halen tartışmalıdır. Bu dönüşümde nekrotik pulpadan kaynaklanan kronik enflamatuar uyarıların devamlılığı esas olabileceği gibi konak doku savunmasında rol oynayan faktörlerinde rol aldığı düşünülebilir.

Son yıllarda, periapikal enflamatuar lezyonların oluşumu ve gelişiminde IL-1 ve TNF gibi proinflamatuar sitokinlerin,^{42,102-105} nitrik oksitinin^{10,47,66,106-108} ve ısı şoku proteinlerinin^{10,11} rollerinin araştırıldığı çalışmalar muhtemel bir ilişkinin varlığına dikkat çekmektedir. Proinflamatuar sitokinler hem spesifik hem de non-spesifik immün cevapta önemli roller oynarlar. IL-1 β ve TNF- α periapikal dokularda enflamasyona katkıda bulunduğu gibi osteoklastik aktivite yoluyla kemik rezorpsiyonuna da neden olurlar. Kültür çalışmaları periapikal lezyonlarda gen ekspresyonu seviyesinde sitokin üretiminin arttığını göstermektedir.^{109,110} Diğer yandan enflamatuar sürecin

düzenlenmesinde rol oynayan nitrik oksitin ekspresyonunda bu sitokinler tarafından kontrol edildiği ve nitrik oksit sentezinin periodontal hastalıklar gibi oral enflamatuar hastalıkların patogeneğinde önemli roller oynadığı bilinmektedir.⁶ Daha önce yapılan sınırlı sayıdaki araştırmalarda periapikal lezyonların NO'nin biyolojik aktivitesiyle dikkatli bir şekilde dengede tutulduğu ve kontrol edildiği hipotez edilmiştir.⁶⁶ Enflamatuar hastalıklarda önemli roller oynayan bir diğer konak faktörü de ısı şoku proteinleridir. HSP60 kronik enflamasyon boyunca önemli bir otoantijen olarak görev yapar ve NO ve TNF- α gibi proinflamatuar mediatörlerin salınımını indükler.⁸⁶ HSP70 ise hem inflammatuar süreçte hemde tümoral süreçte rol alan önemli bir ısı şoku protein türüdür.¹¹¹ Fizyolojik dokularda düşük seviyede sürekli üretilen HSP70'in kronik enflamasyon gibi stres durumlarında salınımı artar.¹¹² Enflamatuar cevapla olan bu yakın ilişkisi nedeniyle, enflamasyon ilişkili HSP70 geni prekanseröz lezyonların gelişimi için muhtemel risk faktörü olarak değerlendirilmiştir.¹¹¹

Tüm bu bilgilerin ve daha önce yapılan araştırmaların ışığı altında bu çalışmada, periapikal lezyonların başlamasında ve ilerlemesinde önemli roller oynadığı düşünülen NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 biyolojik moleküllerinin kronik apikal periodontitis ve radiküler kist doku örneklerinden alınan histolojik kesitlerde salınımının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Bu çalışmanın bir diğer amacı ise; kronik apikal periodontitis ve radiküler kist gruplarında bu biyolojik moleküllerin salınımlarının birbirleri ile olası ilişkilerinin araştırılması idi. Kontrol grubu olarak klinik ve histolojik sağlıklı dişeti dokusu kesitleri kullanıldı.

Bu amaç doğrultusunda, klinik ve histolojik sağlıklı 10 dişeti dokusu, histopatolojik inceleme ile kesin tanısı konmuş 33 kronik apikal periodontitis ve 16 radiküler kist dokusundan histolojik kesitler hazırlandı. Doku örneklerinin alındığı bireylerin sistemik olarak sağlıklı olmalarına ve sigara, alkol gibi zararlı maddeler

kullanmıyor olmalarına dikkat edilerek, NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 biyolojik moleküllerinin salınım miktarlarının bu faktörlerden etkileniyor olma ihtimali elimine edildi.

Litaretürde kardiovasküler, nörolojik ve immün fonksiyonlara sahip hücreler arası önemli bir molekül olan NO'in enflame dokularda salınımının incelendiği sayısız çalışma mevcuttur. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda hastalıklı periodonsiyum dokularında NO salınımının arttığı rapor edilmiştir. Hirose ve arkadaşları¹¹³ ve Batista ve arkadaşları¹¹⁴ histolojik olarak sağlıklı periodonsiyum dokularına oranla hastalıklı dokularda da NO salınımının önemli derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Diğer yandan periapikal lezyonlu dokularda NO salınımının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışmalarda da hastalıklı periapikal bölgede konak doku hücrelerinden NO salınımının arttığı gözlenmiştir. Hama ve arkadaşları¹⁰⁷ periapikal periodontitisle ilişkili doku hasarı için NO'in önemli bir molekül olduğunu önermişlerdir. Lin ve arkadaşları¹⁰⁸ NO'in makrofaj ve osteoblastlarda apoptosisi indükleyerek periapikal lezyonların ilerlemesine katkıda bulunacağını belirtmişlerdir. Suzuki ve arkadaşları¹⁰ ise periapikal lezyonlu dokuların periapikal epitel hücrelerinde NO salınımının arttığını ve bu durumun periapikal doku yıkımı ve lezyonun genişlemesiyle sonuçlanabileceğini hipotez etmişlerdir. Bizim çalışmamızda dokularda NO salınım miktarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Çalışmamızın bu bulgusu daha önce yapılan çalışmaların bulgularıyla uyumludur. NO fizyolojik miktarlarda üretildiğinde biyolojik organizmalar için vazgeçilmez bir moleküldür, ancak yüksek miktarlarda üretimi hem bir serbest radikal olması hem de hücreler arası mediatör özelliği nedeniyle patolojik sonuçlar doğurabilir. Periapikal lezyonlu dokularda NO salınımının artması bu dokularda enflamatuar sürecin varlığının ve lezyonun genişleyerek gelişimini devam ettireceğinin

bir göstergesi olabilir. Ayrıca bizim çalışmamızda radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek NO boyanma skoru gözlemlendi. Ancak literatürde periapikal lezyonların bu iki histolojik formasyonu arasında NO salınımının araştırıldığı çalışmaya rastlayamadık. Bizim çalışmamız bu yönüyle tamamlanmış ilk çalışmadır. NO'nun fizyolojik salınım miktarındaki değişimlerin apoptosis ve tümör süpresif genler üzerine etkileri⁶ ve bizim çalışmamızın bu bulgusu kronik apikal periodontitis formasyonundan radiküler kist formasyonuna geçişte NO'nun önemli bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

Enflamatuar periapikal lezyonların patobiyolojisinde sitokinlerinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir.⁴ IL-1 β ve TNF- α kemik rezorpsiyonuna sebep olmaları ve güçlü proinflamatuar özellikleri nedeniyle periodonsiyum patolojilerinde rol alan en önemli sitokinler olarak bilinmektedirler¹¹⁵. Periapikal lezyonlu dokularda sitokin salınımının araştırıldığı çalışmalar sağlıklı dokulara oranla lezyonlu dokularda sitokin aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.^{31,69,103,105,116-118} Wang ve Stashenko⁶⁹ periapikal bölgedeki kemik rezorpsiyonu safhalarını inceledikleri çalışmalarında IL-1 ve TNF formlarının salınımındaki artışın kronik fazda etkin olduğu sonucuna varmışlardır. Mei ve arkadaşları¹¹⁸ yaptıkları hayvan çalışmasında IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyonlarının periapikal lezyon oluşumunda aktif olduğunu ancak lezyonun ilerleyen devrelerinde IL-1 β salınımındaki artışın azaldığını rapor etmişlerdir. Mei ve arkadaşları'nın¹⁰⁵ daha sonra yaptıkları başka bir hayvan çalışmasında da benzer bulgulara dikkat çekmişlerdir. Kawashima ve arkadaşları¹¹⁶ ise periapikal lezyonun yerleşmesi ile hem RANKL ekspresyonunda hemde IL-1 β ve TNF- α salınımında artış olduğunu ve bu salınımların 2-3 hafta sonra en üst düzeye çıktığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar RANKL ve sitokin salınımlarındaki artışın durmasından sonraki kemik doku rezorpsiyonu ve lezyon genişlemesini bu iki faktörün

sinerjik etkisine bağlamışlardır. Bizim çalışmamızda dokularda IL-1 β ve TNF- α salınım miktarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken periapikal lezyonlu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiyordu. Çalışmamızın bu bulguları daha önce yapılan çalışmaların bulgularıyla uyumludur. Periapikal lezyonların oluşum aşamalarında artan sitokin aktivitesi kemik rezorpsiyonu ve enflamatuvar sürecin varlığının bir göstergesi olabilir. Bizim çalışmamızın ve daha önceki çalışmaların bulguları göstermektedirki; lezyonun genişlemesi için sitokin salınımdaki artışın devamlılığına ihtiyaç vardır. Diğer yandan çalışmamızda periapikal lezyonlu gruplar arasında IL-1 β ve TNF- α salınım miktarını gösteren boyanma skorları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiyordu. Bu bulguya dayanarak sitokin salınımindaki artışın lezyonların genişlemesiyle ilişkili olmasına rağmen lezyonların histolojik formasyonları ile ilişkili olmadığı sonucuna varabiliriz.

Bu çalışmanın diğer bulguları ise periapikal lezyonlu dokularda ısı şoku proteinlerinin araştırılması ile ilgilidir. Isı şoku proteinleri hem immun-modülatör rolleri hem de tümorojenik aktivitede ki rolleri nedeniyle genel patoloji için önemli moleküllerdir. Daha önce periapikal lezyonlu dokularda ısı şoku protein ailesinden HSP27, HSP60 ve HSP70 in araştırıldığı iki çalışma mevcuttur. Leonardi ve arkadaşları¹¹ HSP27 nin periapikal lezyonlarda birçok rol üstlendiğini, epitel hücre artıklarının migrasyonuna yardımcı olduğunu ve nekrotik/apoptotik hücre ölümüne direnci artırdığını iddia etmişlerdir. Suzuki ve arkadaşları¹⁰ ise periapikal lezyonlu ve sağlıklı dokularda yaptıkları incelemede HSP27 salınımlarında istatistiksel anlamlı farklılık bulamazlarken, HSP60 ve HSP70 salınımlarının lezyonlu dokularda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar periapikal lezyonlu dokularda HSP60 ve HSP70 in artmış salınımının enflamatuvar

proçesle ilgili olduğunu ve periapikal lezyonların gelişimine neden olduğunu önermişlerdir. Bizim çalışmamızda dokularda HSP60 ve HSP70 salınım miktarlarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bizim çalışmamızın bu bulguları Suzuki ve arkadaşları¹⁰,nın bulgularıyla uyumludur. Ayrıca bizim çalışmamızda radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek HSP60 ve HSP70 boyanma skorları gözlemlendi. Ancak literatürde periapikal lezyonların bu iki histolojik formasyonu arasında HSP60 ve HSP70 salınımlarının araştırıldığı çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamız bu yönüyle de tamamlanmış ilk çalışmadır.

Genel patolojide daha önce yapılan çalışmalar HSP60 ın T hücre aktivasyonu aracılığı ile görev yapan güçlü bir immün modülatör olduğunu göstermektedir.^{12,13} Özellikle enflamatuar dokularda HSP60 aşırı üretiminin T hücre aktivasyonunu artırdığı ve IL-1 β ve TNF- α sitokin ekspresyonuna neden olduğu rapor edilmiştir.¹² Ayrıca HSP60 aşırı üretiminin transkripsiyon faktörlerinden Nükleer Faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonunu etkileyerek spesifik immün cevabın yerleşmesine neden olduğu ve kronik enflamasyonun devamını sağladığı bilinmektedir.¹³ Bizim çalışmamızın bulguları ve Suzuki ve arkadaşları¹⁰,nın bulguları genel patolojiden elde edilen bilgilerin ışığı altında yorumlandığında periapikal lezyonlu dokularda spesifik immün cevabın devam ettiğini ve bu durumun lezyonun genişlemesiyle sonuçlanacağı fikrini uyandırmaktadır. Ayrıca çalışmamızda radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek HSP60 boyanma skorları gözlenmesi kist epitel dokusunda kronik enflamatuar aktivitenin şiddetlenerek devam ettiğinin ve bu lezyonun daha büyük boyutlara ulaşabileceğinin göstergesi olabilir.

HSP70 ise anti-apoptotik bir moleküldür, caspase aktivasyonunu azalttığı ve mitokondriyal hasar ve nükleer fragmantasyonu baskıladığı bilinmektedir.^{14,15} Bu özellikleri nedeniyle kronik enflamasyonun varlığında HSP70 prekanseröz lezyonların gelişimi için muhtemel risk faktörü olabilir.¹¹ HSP70 hücre döngüsü, proliferasyon ve hücreyel farklılaşma gibi birçok fizyolojik olayı kontrolü altında tutan önemli bir faktördür.¹⁶ Birçok vakada tümör hücrelerinde HSP70 aşırı salınımı tespit edilmiştir.¹⁷ Ayrıca birçok hücre tipinde aşırı salınımı hücreyel transformasyonun artmasına neden olur.¹⁸ Bizim çalışmamızın ve Suzuki ve arkadaşları¹⁰,nın HSP70 ile ilgili bulguları genel patolojiden elde edilen bilgiler ile birlikte yorumlandığında periapikal lezyonların oluşumunda HSP70 in önemli bir faktör olabileceği sonucunu vermektedir. Diğer yandan bizim çalışmamızda radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek HSP70 boyanma skorları gözlenmesi kronik apikal periodontitis formasyonundan radiküler kist formasyonuna geçişte HSP70'in rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda hem kronik apikal periodontitis grubunda hem de radiküler kist grubunda NO, IL-1 β , TNF- α , HSP60 ve HSP70 biyolojik moleküllerinin salınımlarının birbirleri ile olası ilişkileri de araştırıldı. Kronik apikal periodontitis grubunda; iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında, iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında, IL-1 β boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında ve HSP60 boyanma skorları ile HSP70 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi. Radiküler kist grubunda ise; iNOS boyanma skorları ile IL-1 β boyanma skorları arasında, iNOS boyanma skorları ile TNF- α boyanma skorları arasında ve HSP60 boyanma skorları ile HSP70 boyanma skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi. Ancak literatürde periapikal lezyonlu dokularda bu moleküllerin birbirleriyle ilişkilerinin araştırıldığı

çalışmaya rastlayamadık. Bizim çalışmamızda her iki lezyonlu gruptaki grup içi bulguları değerlendirildiğinde, iNOS aktivasyonu ile sitokin aktivasyonları arasında pozitif bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Benzer şekilde her iki lezyonlu grupta da ısı şoku protein formlarının aktivasyonları arasında pozitif bir ilişki dikkat çekmektedir. Çalışmamızın bu korelasyon bulguları periapikal lezyonların patobiyolojisi ve kronik enflamasyonun karakteristiğiyle uyumludur.

Periapikal lezyonlu dokularda histopatolojik yöntemler kullanılarak lezyonun oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olabilecek konak faktörlerinin araştırılması periapikal doku patolojisinin anlaşılması açısından önemlidir. Periapikal lezyonlar ağız, diş ve çene hastalıkları ve cerrahisinin önemli konularından birini oluşturmasına rağmen lezyonların histopatolojisi üzerine az sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamız bu konuyla ilgili yapılmış en geniş kapsamlı araştırmadır. Literatürde bulgularımızın bir kısmını tartışabileceğimiz çalışmalara rastlanmazken bulgularımızın diğer kısmı ise sınırlı sayıdaki çalışmalarla tartışıldı. Dolayısıyla bu konuya ışık tutabilecek ileriki çalışmaların yapılmasının yararlı ve gerekli olduğu kanaatindeyiz.

9. SONUÇLAR

Bu çalışmada;

1. dokularda NO salınım miktarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bu durum dokularda enflamatuar sürecin varlığının ve lezyonun genişleyerek gelişimini devam ettireceğinin bir göstergesi olabilir.

2. Radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek NO boyanma skoru gözlemlendi. Bu durum kronik apikal periodontitis formasyonundan radiküler kist formasyonuna geçişte NO'nin önemli bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

3. Dokularda IL-1 β ve TNF- α salınım miktarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek idi. Bu durum periapikal lezyonların oluşum aşamalarında artan sitokin aktivitesi kemik rezorpsiyonu ve enflamatuar sürecin varlığının bir göstergesi olabilir.

4. Periapikal lezyonlu gruplar arasında IL-1 β ve TNF- α salınım miktarını gösteren boyanma skorları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiyordu. Bu bulguya dayanarak sitokin salınımındaki artışın lezyonların genişlemesiyle ilişkili olmasına rağmen lezyonların histolojik formasyonları ile ilişkili olmadığı sonucuna varabiliriz.

5. Dokularda HSP60 salınım miktarlarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bu durum periapikal lezyonlu dokularda spesifik immün cevabın devam ettiğini ve bu durumun lezyonun genişlemesiyle sonuçlanacağı fikrini uyandırmaktadır.

6. Dokularda HSP70 salınım miktarlarını gösteren boyanma skorları her iki periapikal lezyonlu grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Bu durum periapikal lezyonlu dokuların proliferasyonunda HSP70 in önemli bir faktör olabileceği sonucunu vermektedir.

7. Radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek HSP60 boyanma skorları gözlenmesi kist epitel dokusunda kronik enflamatuar aktivitenin şiddetlenerek devam ettiğinin ve bu lezyonun daha büyük boyutlara ulaşabileceğinin göstergesi olabilir.

8. Radiküler kist grubunda kronik apikal periodontitis grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek HSP70 boyanma skorları gözlenmesi kronik apikal periodontitis formasyonundan radiküler kist formasyonuna geçişte ve lezyonlu dokularda hücresel farklılaşmada HSP70'in rolü olabileceğini düşündürmektedir.

10. KAYNAKLAR

1. Aybar B. Periapikal Lezyonlarda Prostaglandinler (PGE₂, PGF_{2α}) ve Bazı Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1997.
2. Torabinejad M, Walton RE. Periradicular lesions. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. Endodontics. Fifth Edition. Hamilton, London: BC Decker Inc, 2002: 175-201.
3. Ingle JI, Beveridge EE. Endodontics. Second Edition. Philadelphia: Lea and Febiger; 1976: 419-420.
4. Nair PNR. Pathobiology of the periapex. In Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 8th ed. St. Louis: CV Mosby, 2002: 457-500.
5. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis Rheum 1998; 41: 1141-1151.
6. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. Biochemistry (Mosc) 2005;70: 619-628.
7. Oringer RJ. Research, Science, and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Modulation of the host response in periodontal therapy. J Periodontol 2002; 73: 460-470.
8. Erdemir EO, Duran I, Haliloğlu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2004; 31: 99-104.
9. Ataoğlu H, Alptekin NO, Haliloğlu S, et al. Interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. Clin Oral Implants Res 2002; 13: 470- 476.

10. Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 488–493.
11. Leonardi R, Villari L, Caltabiano M, Travali S. Heat shock protein 27 expression in the epithelium of periapical lesions. *J Endod* 2001; 27: 89–92.
12. Elst EF, Klein M, de Jager W, et al. Hsp60 in inflamed muscle tissue is the target of regulatory autoreactive T cells in patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 547-555.
13. Zanin-Zhorov A, Tal G, Shivtiel S, et al. Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 276-285.
14. Zyllicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J* 2001; 20: 4634-4638.
15. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 17147-17153.
16. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperone in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000; 33: 341-365.
17. Jollyn C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1564-1572.
18. Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene* 1999; 18: 3648-3651.
19. Morton TH Jr. Differential diagnosis of periapical radiolucent lesions. *Dent Clin North Am* 1979; 23: 519-541.

20. Cenkaş A. Kronik Periapikal Lezyonlu Hastaların Lokal Tip 1 İmmün Reaksiyonu ile İlişkisinin Histopatolojik ve İmmünolojik Yönden Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Endodonti Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 1995.
21. Bayırlı G. Endodontik Tedavi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları, 1985: 504-505, 534.
22. Nobuhara WK, del Rio CE. Incidence of periradicular pathoses in endodontic treatment failures. J Endod 1993; 19: 315-318.
23. Guldener PHA, Langeland K. Endodontie. 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 1993.
24. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965; 20: 340-349.
25. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial Pathology. Philadelphia: Saunders, 2002: 103-109.
26. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. Endodontic Practice. 11st ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988: 78-101.
27. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. J Dent Res 1982; 61(12): 1408-1412.
28. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A Textbook of Oral Pathology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1963: 378-396.
29. Cawson RA, Odell EW, Porter S. Cawson's Essentials of Oral Pathology and Oral Medicine. 7th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002: 102-108.

30. Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 195-201.
31. Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 162-169.
32. Danin J, Linder L, Lundqvist G, Wretling B. Cytokines in Periradicular lesions: The effect of linezolid treatment. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 492-498.
33. Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J* 2003; 36: 237-245.
34. Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. *Int Endod J* 2002; 35: 807-811.
35. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998; 31: 311-325.
36. Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, et al. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon- γ -producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J* 1999; 32: 124-130.
37. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 93-100.
38. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 139-150.
39. Lin S-K, Kok S-H, Lin L-D, et al. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 24-29.

40. Colic M, Vasilijic S, Gazivoda D, Vucevic D, Marjanovic M, Lukic A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 315–320.
41. Wang C-Y, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 65-71.
42. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med* 2009; 7: [Epub ahead of print]
43. Lin SK, Kok SH, Kuo MYP, et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6 and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 246–253.
44. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 310–316.
45. Honma M, Hayakawa Y, Kosugi H, Koizumi F. Localization of mRNA for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by in situ hybridization, and induction of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to radicular cyst contents. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 399–404.
46. Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. *Int Endod J* 2002; 35: 854–858.
47. Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endod* 1998; 24: 157–160.

48. Kabashima H, Nagata K, Maeda K, Iijima T. Interferon-g-producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 95–100.
49. Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod* 2001; 12: 749–752.
50. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* 1977; 86: 183-276.
51. Papadimitriou JM, Ashman RB. Macrophages: current views on their differentiation, structure, and function. *Ultrastruct Pathol* 1989; 13: 343-372.
52. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 1994; 277: 19-26.
53. Schulz M, von Arx T, Altermatt H, Bosshardt D. Histology of Periapical Lesions Obtained During Apical Surgery. *J Endod* 2009; 35: 634-642.
54. Nair P, Pajarola G, Luder H. Ciliated epithelium-lined radicular cysts. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 485-493.
55. Eley BM, Cox SW. Advances in periodontal diagnosis 5. Potential inflammatory and immune markers. *Br Dent J* 1998; 184: 220-223.
56. Yağız H. Plağa bağlı gingivitisli kronik periodontitisli periodontal olarak sağlıklı bireylerin dişeti oluğu sıvısı ve tükürük örneklerinde nitrik oksit ve tümör nekrozis faktör alfa seviyelerinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilimdalı, Doktora Tezi, Erzurum, 2006.
57. Fabricius L. Oral bacteria and apical periodontitis. An experimental study in monkeys. University of Göteborg, Doctoral thesis, Göteborg, Sweden, 1982.

58. Rossomondo EF, White L. A novel method for the detection of TNF-alpha in gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1993; 64: 445-449.
59. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74: 391-401.
60. Baqui AA, Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falkler WA jr. Enhanced interleukin 1 β , interleukin 6 ve tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 67-73.
61. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-110.
62. Sheikhi M, Gustafson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*–activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 758-762.
63. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 334-336.
64. Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. *J Endod* 1994; 20: 432-435.
65. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1-beta in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994; 20: 225-227.
66. Tatakis DN, Schneeberger G, Dziak R. Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: synergy with parathyroid hormone. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 358-362.

67. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; 319: 516-518.
68. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 213-219.
69. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 50-56.
70. Thomson A W. *The cytokine handbook*. Second Edition. San Diego: Academic Press, 1994: 145–168, 185-208.
71. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 347-353.
72. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 93-100.
73. Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: What a gas!. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 831-838.
74. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1421-1441.
75. Aurer A, Aleksic J, Ivic-Kardum M, Aurer J, Culo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 565-568.
76. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7: 2-10.

77. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–142.
78. Lohinai Z, Szabo C. Role of nitric oxide in periodontal tissues in health and disease (review). *Med Sci Monit* 1998; 4: 1089-1095.
79. Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M, et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 1995; 270: 26731–26733.
80. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121–1131.
81. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 145-153.
82. Vercoulen Y, van Teijlingen NH, de Kleer IM, Kamphuis S, Albani S, Prakken BJ. Heat shock protein 60 reactive T cells in juvenile idiopathic arthritis: what is new? *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 231. Epub 2009 May 19.
83. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, et al. CD4+CD25(bright) regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004; 172: 6435-6443.
84. Deniz E. Behçet Hastalığında İntraoral Lezyonlardan Alınan Biyopsi Örneklerinde HSP 60'ın Etyolojik Faktör Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilimdalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2004.
85. Aquino DA, Brosnan CF. Heat-shock proteins and immunopathology. *Chem Immunol* 1992; 53: 1-16.

86. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 1999; 162: 3212-3219.
87. Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G. The role of heat shock proteins in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21: 44-48.
88. Direskeneli H. Stres proteinleri ve Behçet hastalığı. *Aktüel Tıp Derg* 1997; 2: 72-75.
89. Schultz DR, Arnold PI. Heat shock (stress) proteins and autoimmunity in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 22: 357-374.
90. Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol* 1999; 277: L1026-1033.
91. Granel B, Swiader L, Serratrice J, Disdier P, Weiller PJ. [Heat shock proteins or "stress proteins"]. *Rev Med Interne* 2000; 21: 421-427.
92. Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 2000; 48: 299-302.
93. Romano CC, Benedetto N, Catania MR, et al. Commonly used antibiotics induce expression of Hsp 27 and Hsp 60 and protect human lymphocytes from apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1067-1073.
94. Zügel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 19-39.
95. van Eden W, van der Zee R, Paul AG, et al. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today* 1998; 19: 303-307.

96. Tabeta K, Yamazaki K, Hotokezaka H, Yoshie H, Hara K. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 285-293.
97. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 433-42.
98. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164: 558-561.
99. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31332-31339.
100. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 2000; 164: 13-17.
101. Bethke K, Staib F, Distler M, et al. Different efficiency of heat shock proteins (HSP) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of HSP60. *J Immunol* 2002; 169: 6141-6148.
102. Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun AK, Williams DM, Cruchley AT. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol* 1988; 17: 84-90.
103. Colić S, Jurisić M, Jurisić V. [Pathophysiological mechanism of the developing radicular cyst of the jaw]. *Acta Chir Jugosl* 2008; 55: 87-92.

104. 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. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11: 376-384.
105. Mei LX, Jiang Y, Zhao CH, Liu Z, Zhang P. [Relationships between periapical lesion and IL-1, TNF-alpha gene expression in rat]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2003; 38: 345-347.
106. Marcato LG, Ferlini AP, Bonfim RC, et al. The role of Toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 353-359.
107. Hama S, Takeichi O, Saito I, Ito K. Involvement of inducible nitric oxide synthase and receptor for advanced glycation end products in periapical granulomas. *J Endod* 2007; 33: 137-141.
108. Lin SK, Kok SH, Lin LD, et al. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 24-29.
109. Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 514-517.
110. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 25-31.
111. Partida-Rodriguez O, Torres J, Flores-Luna L, et al. Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int J Cancer* 2009 Jul 22. [Epub ahead of print]

112. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990; 32: 242-251.
113. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol* 2001; 72: 590- 597.
114. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara YS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Diseases* 2002; 8: 254-260.
115. Chapple ILC, Gilbert AD. *Understanding Periodontal Disease; Assessment and Diagnostic Procedures in Practice*. London: Quintessence, 2002: 36-37.
116. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 707-711. Epub 2007 Feb 28.
117. Stashenko P, Wang CY. Characterization of bone resorptive mediators in active periapical lesions. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 Suppl 1: 427-432.
118. Mei LX, Liu Z, Zhang B. [IL-1alpha, IL-1beta and TNF-alpha mRNA expression in experimental periapical lesions in the rat]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2001; 10: 16-18.