

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

DERİN DENTİN ÇÜRÜKLÜ DİŞLERDE ASETİLASYON PATERNİ ve
SİTOKİN SEKRESYONUNUN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Sebahat Melike DURUKAN

Danışman
Prof. Dr. Soley ARSLAN

Uzmanlık Tezi

Ekim 2021
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

DERİN DENTİN ÇÜRÜKLÜ DİŞLERDE ASETİLASYON PATERNİ ve
SİTOKİN SEKRESYONUNUN İNCELENMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Hazırlayan
Sebahat Melike DURUKAN

Danışman
Prof. Dr. Soley ARSLAN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDH-2020-9976 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ekim 2021
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Sebahat Melike DURUKAN

YÖNERGEYE UYGULUK SAYFASI

‘‘Derin Dentin Çürüklü Dişlerde Asetilasyon Paterni Ve Sitokin Sekresyonunun İncelenmesi’’ adlı Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Sebahat Melike DURUKAN

Danışman

Prof. Dr. Soley ARSLAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Soley ARSLAN

Prof. Dr. Soley ARSLAN danışmanlığında **S. Melike DURUKAN** tarafından hazırlanan “**Derin Dentin Çürüklü Dişlerde Asetilasyon Paterni ve Sitokin Sekresyonunun İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi **Restoratif Diş Tedavisi** Anabilim Dalı’nda **Uzmanlı Tezi** olarak kabul edilmiştir.

... / ... /

JÜRİ

Danışman : Prof. Dr. Soley ARSLAN
(Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Sezer DEMİRBUĞA
(Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nazire Nurdan ÇAKIR
(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Ana Bilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Fakülte Anabilim Dalının tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Soley ARSLAN
Restoratif Diş Tedavisi
Anabilim Dalı Başkanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim, birlikte çalışma imkanı bulduğumuz tüm çalışmalar ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösterici olan, her daim yardım ve desteğini arkamda hissettiğim, bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük katkıya sahip değerli danışman hocam Prof. Dr. Soley ARSLAN’a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, hoşgörülü ve destekliyiçi yaklaşımı ile hep yanımda olarak bizleri destekleyen değerli hocam, Doç. Dr. Sezer DEMİRBUĞA’ya,

Her konuda fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlanabildiğim hiçbir zaman güler yüz, samimiyet ve emeklerini esirgemeyen anabilim dalımız öğretim üyeleri Dr.Öğr.Üyesi Hacer BALKAYA ve Dr.Öğr.Üyesi Fehime ALKAN AYGÖR’e,

TDH-2020-9976 tez çalışmamızı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı değerli üyesi Dr.Burak TAN ve Esra TUFAN’a,

Diş Hekimliği eğitimim esnasında hayatıma dahil olup arkadaştan öte ailem gibi olan arkadaşlarım, Sıla SOYLU, Eda BİRİCİK, Özge USTA, Ozan TEMİZKANLI, Gözde VANLI’ya

Bölüm arkadaşlarım, Burak KÖSE, Tuğçe AYDIN, Sevim HANÇER’e ve tüm yardımcı personelimize,

Tez çalışmam esnasında hep yanımda olan tüm aşamalarında bana destek olan Eda GÖKDUMAN’a,

Fakültemiz Cerrahi Anabilim dalında görevli asistan arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca her adımda yanımda olan, iyi kötü her günümde ne olursa olsun benimle olan, hayal ettiğimden daha fazlasını yaşamama olanak sağlayan babam Tahsin DURUKAN, annem Nilgün DURUKAN ve en yakın arkadaşım, kardeşim, şefim Gökçe DURUKAN’a herşey için teşekkür ederim.

S.Melike DURUKAN

DERİN DENTİN ÇÜRÜKLÜ DİŞLERDE ASETİLASYON PATERNİ ve SİTOKİN SEKRESYONUNUN İNCELENMESİ

Sebahat Melike DURUKAN

Erciyes Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi, Ekim 2021

Danışman: Prof. Dr. Soley ARSLAN

ÖZET

Diş çürüğü hala en yaygın kronik hastalıkların başında gelmektedir. Diş çürüğü, dış etkenlerle oluşan geri döndürülemez bir hastalıktır. Diş hekimliği ve biyolojik çalışmaların gelişmesi ile çürüğün etiyolojik faktörlerinin detaylı incelemesi, gerekli önlemlerin alınması noktasında oldukça büyük adımlar atılabilmektedir. Diş çürüklerinin kalıtsal yönünün araştırılması ve genetik açıdan ne gibi değişikliklere sebep olduğunu tespit edebilmek günümüzde önem arz etmektedir.

Çalışmamızın amacı, restoratif diş tedavisinde kritik öneme sahip derin dentin çürüklü dişlerin enflamasyona karşı geliştirdikleri yanıtı gen transkripsiyonu ve hücrel sitokin sekresyon düzeylerindeki değişimler incelemektir.

Araştırmamız için 20 adet sağlıklı (SP), 20 adet radyolojik olarak D3 seviyesinde tespit edilen derin dentin çürüklü (EP) 3.molar dişlere ait pulpa dokusu kullanıldı. Her gruba ait 10'ar örnek RT-qPCR analizinde, 10'ar örnek diş Western Blot analizinde kullanıldı. RT-qPCR analizi ile asetile H3-4, TLR2 ve IL-6 sitokinlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi. Western blot analizi ile asetile H3 geni, TLR2, IL-6 ve IFN- δ sitokinlerine ait protein sekresyon seviyeleri incelendi. Sağlıklı pulpa ve derin dentin çürüklü pulpa örneklerinde gruplar arasında istatistiksel karşılaştırması bağımsız t-test ile analiz edilmiştir.

RT-qPCR analizleri sonucunda asetile H3-4 ve IL-6, TLR2 sitokini mRNA gen ekspresyonu değerleri EP ve SP grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Western Blot analizi sonucunda asetile H3 genine ait protein sekresyonu EP grubunda SP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p = 0.01$). IL-6, TLR2 ve IFN- δ sitokinleri seviyesi EP ve SP grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark göstermemiştir ($p > 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Derin dentin çürüğü, Epigenetik modifikasyonları, Asetilasyon, İnflamasyon, İnflamatuvar sitokinler

**INVESTIGATION OF ACETYLATION PATTERN AND CYTOKINE SECRETION IN
TEETH WITH DEEP DENTINE CARIES**

Sebahat Melike DURUKAN

**Erciyes University Faculty of Dentistry
Department of Restorative Dentistry
Specialization Thesis, October 2021
Supervisor: Prof. Dr. Soley ARSLAN**

ABSTRACT

Tooth decay is still one of the most common chronic diseases. Tooth decay is an irreversible disease caused by external factors. With the development of dentistry and biological studies, great steps have been taken in terms of the examination of the etiological factors of caries. It's important to investigate the hereditary aspect of dental caries and to determine what kind of changes it causes in terms of genetics.

The aim of our study was to examine the response of teeth with deep dentin, against inflammation, changes in gene transcription and cellular cytokine secretion levels.

For our research, 20 healthy (SP) and 20 radiologically detected deep dentin caries (EP) teeth pulp tissue were used. 10 samples of each group were used in RT-qPCR analysis, and 10 samples for each tooth were used in Western Blot analysis. mRNA expression levels of acetylated H3-4, TLR2 and IL-6 cytokines were examined by RT-qPCR analysis. Protein secretion levels of acetylated H3 gene, TLR2, IL-6 and IFN- δ cytokines were examined by western blot analysis. Statistical comparison between groups in healthy pulp and pulp samples with deep dentin caries was analyzed by Independent T-Test.

As a result of RT-qPCR analysis, there was no statistically significant difference when acetylated H3-4 and IL-6, TLR2 cytokine mRNA gene expression values were compared in EP and SP groups. In western blot analysis, protein secretion of acetylated H3 gene was statistically significantly higher in the EP group than in the SP group ($p=0.01$). IL-6, TL2 and IFN-gamma cytokine levels did not show a statistically significant difference between EP and SP groups ($p>0.05$).

Keywords: Deep dentine caries, Epigenetic modifications, Acetylation, Enflammation, Cytokines

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGULUK SAYFASI	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
TABLolar LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Epigenetik	3
2.2 Epigenetik Mekanizmalar	5
2.2.1 DNA Metilasyonu	7
2.2.2 Histon Modifikasyonları	10
2.2.3 Kodlanmayan RNA'lar ile Etkileşim	13
2.3 Epigenetiğin Fonksiyonları	13
2.3.1 Genomik Kopyalama (Imprinting)	14
2.3.2 Genomik Gelişim (Development)	14
2.3.3 Çevresel Faktörler	15
2.3.4 Enflamasyon	15
2.3.5 Kanser	16
2.3.6 Yaşlanma ve Hastalıklar	17
2.4. Enflamasyon ile Birlikte Gelişen Epigenetik Modifikasyonlar	17

2.4.1 Enflamasyon ve DNA Metilasyonu.....	17
2.4.2 Enflamasyon ve Histon Asetilasyonu.....	18
2.4.3 Enflamasyon ve Histon Metilasyonu.....	18
2.4.4 Enflamasyon ve miRNA etkileşimi.....	19
2.5 Diş Çürükleri	19
2.5.1. Çürük ve Plak Tanımları	21
2.5.2. Çürüklerin Epidomiyolojisi	22
2.5.3 Çürük Lezyonun Klinik Özellikleri	23
2.5.3.1 Çürük İlerleyişi İle İlgili Klinik Alanlar	24
2.5.4 Çürük Histopatolojisi.....	24
2.5.4.1 Mine Çürükleri.....	24
2.5.4.2 Dentin Çürükleri	26
2.5.4.3 İlerlemiş Çürük Lezyonları.....	31
2.6 Diş Pulpa Dokusu Hücreleri.....	31
2.7 Diş Pulpal Dokusu Enflamasyonunda Rol Alan Sitokinler.....	33
2.7.1 Proenflamatuar Sitokinler.....	34
2.7.2 Kemokinler	35
2.7.3 Anti-inflamatuar Sitokinler	36
2.7.4 Diş Pulpal Dokusu, Sitokinler ve İmmün Yanıt.....	36
2.8 Diş Pulpası Enflamasyonundaki Epigenetik Düzenlemeler	39
2.8.1 Diş Pulpası Enflamasyonunda DNA Metilasyonu	40
2.8.2 Diş Pulpası Enflamasyonunda Histon Modifikasyonları	41
2.8.3 Diş Pulpası Enflamasyonunda miRNA ‘lar.....	42
2.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
2.9.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Ürün Analizi	45
2.9.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Fazları	46

2.9.3 PCR Yönteminin Varyasyonları	47
2.4.4.1 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR).....	47
2.4.4.2 Tersine Transkripsiyonel PCR (RT-PCR).....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3. Doku Örneklerinin Toplanması ve İzolasyonu	56
3.1 Doku Örneklerinin Toplanması.....	56
3.2 Doku Örneklerinden Pulpa Dokusunun İzolasyonu.....	57
3.3 Diş Pulpa Dokularına Ait Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Uygulanması (RT-qPCR).....	57
3.3.1 Diş Pulpal Dokusundan Total RNA İzolasyonu.....	57
3.3.2 cDNA Sentezi.....	58
3.3.3 Ekspresyon Çalışması (qRT-PCR).....	59
3.4 Protein İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	60
3.5 Western Blot Uygulanması	60
3.6 İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR.....	63
4.1 Diş Pulpa Dokusu Hücrelerinin RT-qPCR Bulguları	63
4.1.1 Hedef Genlerin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular ...	63
4.2 Hedef Proteinlerin Western Blot Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	65
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	69
5.1 Tartışma.....	69
5.2 Sonuçlar ve Öneriler.....	74
6. KAYNAKLAR	75

KISALTMALAR

μ L	: mikro Litre
ACH	: Asetilkolini
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
DFPC	: Diş folikülü kaynaklı kök hücrelerinde
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP-1	:Dentin matriks asidik fosfoprotein-1'
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT	: DNA metiltransferaz
DPBS	: Dulbecco's Phospate Buffered Saline
DPKH	: Diş pulpa dokusu kaynaklı kök hücrelerin
DSPP	: Dentin sialofosfoprotein
ELISA	: Enzim bağlantılı immünoabsorban testi
HAT	: Histon asetiltransferazlar
HDAC	: Histon deasetilazlar
HDACis	: Histon deasetilaz inhibitörlerinin
HDM	: Histon demetilaz
HMT	: Histon metiltransferaz
IGF-2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (İnsülin-Like Growth Factor)
IL	: İnterlökin
MeCP2	: Metil-CpG-bağlayıcı protein 2
mL	: mili Litre
mM	: mili Molar

NF-kB	: Nükleer faktör kappa
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PTGS2	: Prostaglandin-endoperoksit sentaz-2
SAM	: S-adenosil metiyoninden
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SHIP1	: İnositol-polifosfat5-fosfataz1'in
TLR	: Toll-benzeri-reseptör; Toll-like-receptor

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Epigenetik mekanizmalar ve genetiğin insan fenotipi üzerine etkisi	4
Şekil 2.2.	Epigenetik mekanizmalar, dolaylı ve doğrudan etkilerine göre iki ayrı grupta sınıflandırılmaktadır.	5
Şekil 2.3.	Doğrudan gen ifadesini etkileyen mekanizmalar.....	6
Şekil 2.4.	DNA metilasyonu işlemi için bir metil grubu (SAM) ve sitozin-fosfat-guanin (CpG) adası bulunmalıdır	7
Şekil 2.5.	DNA Metilasyon Şeması	8
Şekil 2.6.	DNA metilasyonu, DNA metiltransferazların bir ailesi (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) tarafından katalize edilir	9
Şekil 2.7.	Histon Modifikasyonları	10
Şekil 2.8.	Kromozom- Kromatin- DNA şematik görünüm.....	11
Şekil 2.9.	Histon proteinler ve çift zincirli DNA görünümü	11
Şekil 2.10.	Histon Proteinleri:	12
Şekil 2.11.	Mine ve dentin çürük görselleri	20
Şekil 2.12.	Yeni başlayan mine çürüklerinin klinik gözlem verileri	26
Şekil 2.13.	Sağlıklı dentin kesitsel görünümü	27
Şekil 2.14.	Dentin çürükleri ve dentin tübüllerinin kesitsel görüntüleri.....	29
Şekil 2.15.	Oklüzal dentin ve mine çürüklerinin kesitsel görüntüsü	30
Şekil 2.16.	Sitokin ağı.	34
Şekil 2.17.	Enflamasyon, doku hasarı ve bakterilerin ortadan kaldırılması olay zinciri.	38
Şekil 2.18.	PCR'nin ilk döngüsü. Denatürasyon, sertleşme, uzatma.	44
Şekil 2.19.	PCR deneysel tasarımı.	45
Şekil 2.20.	PCR amplifikasyon eğrisinin aşamaları	46
Şekil 2.21.	SYBR Green I Dye eylemi.	48
Şekil 2.22.	Tek sarmallı nükleik asit dizisi	49
Şekil 2.23.	Bir qPCR testinden erime eğrisi analizi.....	49

Şekil 2.24.	qPCR amplifikasyon grafiği.	50
Şekil 2.25.	Western blot prosedürünün akış şeması.....	52
Şekil 2.26	SDS-Page elektroforezinin şeması. Elektromanyetik alanın uygulanması, proteinlerin anoda (+) doğru göç etmesine neden olur.....	54
Şekil 2.27.	Yarı kuru transferde blot sandviçin şeması.....	55
Şekil 4.1.	SP ve EP dokularında hedef gen ekspresyon düzeyleri.	64
Şekil 4.2.	SP ve EP dokularında H3-4, IL6 ve TLR2 genlerinin kat (fold change) değerleri.....	64
Şekil 4.3.	Asetile H3 proteini Western Blot bulguları.	65
Şekil 4.4.	IL-6 Western Blot bulguları.....	66
Şekil 4.5.	IFN- δ Western Blot bulguları.	67
Şekil 4.6.	TLR2 Western Blot Bulguları.....	67

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. cDNA İzolasyon Kokteyli.....	58
Tablo 3.2. Tersine Transkripsiyon Protokolü.....	58
Tablo 3.3. RT-qPCR Kokteyli Bileşenleri	59
Tablo 3.4. RT-qPCR Protokolü	59
Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Referans Gen için Primer Dizileri	60
Tablo 3.6. Çalışmada Kullanılan Hedef Genler için Primer Dizileri	60
Tablo 3.7. Western Blot Çalışmasında Kullanılan Hedef Antibody Bilgileri	61

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Diş çürükleri, günümüzde en yaygın kronik hastalıkların başında gelmektedir. Diş çürüğü; dış etkenlerle oluşan, dişin sert dokularında yıkıma yol açan, başlangıçta bulgu vermeyen, geri döndürülemez bir hastalıktır. Bu noktada diş çürükleri etiyojisine baktığımızda, yetersiz ağız ve diş bakımı, pürüzlü ve tutucu diş yüzeyleri, cilasız dolgular, taşkın yapılmış dolgular, çapraşık diş dizileri, tükürük içeriği ve miktarının yeterli olmaması sayılabilmektedir.

Yıllar içerisinde koruyucu diş hekimliğinde, etiyojik faktörlerin detaylı incelemesi ve gerekli önlemlerin alınması noktasında oldukça büyük adımlar atılabilmiştir. Ancak göz ardı edilen bir diğer noktada diş çürüklerinin kalıtsal yönünün araştırılması ve genetik açıdan ne gibi değişikliklere sebep olduğunu tespit edebilmektir.

Epigenetik, DNA fonksiyonuna bağımlı olmayan gen fonksiyonunda mitotik ve mayotik olarak kalıtsal değişikliklerin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik işlemlerin moleküler temeli karmaşıktır ve kodlanmayan RNA'lar tarafından sentezlenen histonların modifikasyonlarını, DNA'nın metilasyonunu, histon varyantlarının pozisyonlarını ve gen düzenlemesini içerir. Son zamanlarda, birçok çalışma epigenetiği diş sağlığı açısından incelenmiştir.

Pulpa dokusu, diş çürüğü, travma ve diğer olası faktörler sebebi ile zarar görebilir. Pulpa dokusunda meydana gelecek enfeksiyon, moleküler ve/ veya hücrel olaylar yolu ile doku bozulmasına aracılık ederek diş pulpasının enflamatuvar tepkisinin, genetik ve epigenetik olaylar tarafından düzenlenebilmesine sebep olabilmektedir.

Epigenetik değişiklikler, gen ifadesinde temel rol oynar. Ayrıca enfeksiyonların ve diğer çevresel faktörlerin epigenetik değişiklikler ve tetikleyici hastalıklar üzerinde derin etkileri olduğu bilinen bir gerçektir. Literatürde birçok çalışma, histon

modifikasyonlarının dental pulpa kök hücrelerinde farklılaşmaya ve mineralleşmeye neden olabileceğini bildirmiştir. Histon asetilasyonları ve deaktivasyonları, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Mevcut çalışmalar, epigenetik mekanizmaların kontrolü ve takibi ile pulpa onarımı ve yenilenmesini teşvik edebileceğine yönelik umut verici sonuçlar ortaya koymaktadırlar.

Bu çalışmamızın amacı, sağlıklı dişlerden elde edilmiş pulpa dokusu ve derin dentin çürüklü dişlerden elde edilen pulpa dokusunda genetik düzeydeki değişikliklerin histon asetilasyonu temelinde ve inflamatuvar yanıtta sekresyonu kanıtlanmış sitokinlerin varlığının karşılaştırmalı olarak incelenmesidir.

Bu çalışmadaki bir diğer amacımız ise, sağlıklı pulpa dokusu ve derin dentin çürüklü pulpa dokusundaki asetilasyon paterninin incelenmesi yolu ile pulpa dokusunda inflamasyonu tetikleyen epigenetik mekanizmalara netlik kazandırmaktır. Hedefimiz ise derin dentin çürüklü dişlerin restoratif tedavisi sonucu sağ kalımının ve uzun dönemli idamesinin sağlanması için geliştirilebilecek koruma mekanizmaları hakkında yeni bilgiler elde edebilmektir.

Çalışmanın hipotezi:

H_0 ; Sağlıklı dişlere ait pulpa dokusu ile derin dentin çürüklü dişlere ait pulpa dokusu örnekleri arasında Histon H3 geni ve inflamatuvar sitokinler (IL-6, TLR2, IFN δ) arasında, mRNA ekspresyon ve protein sekresyon değerleri arasında farklılık vardır.

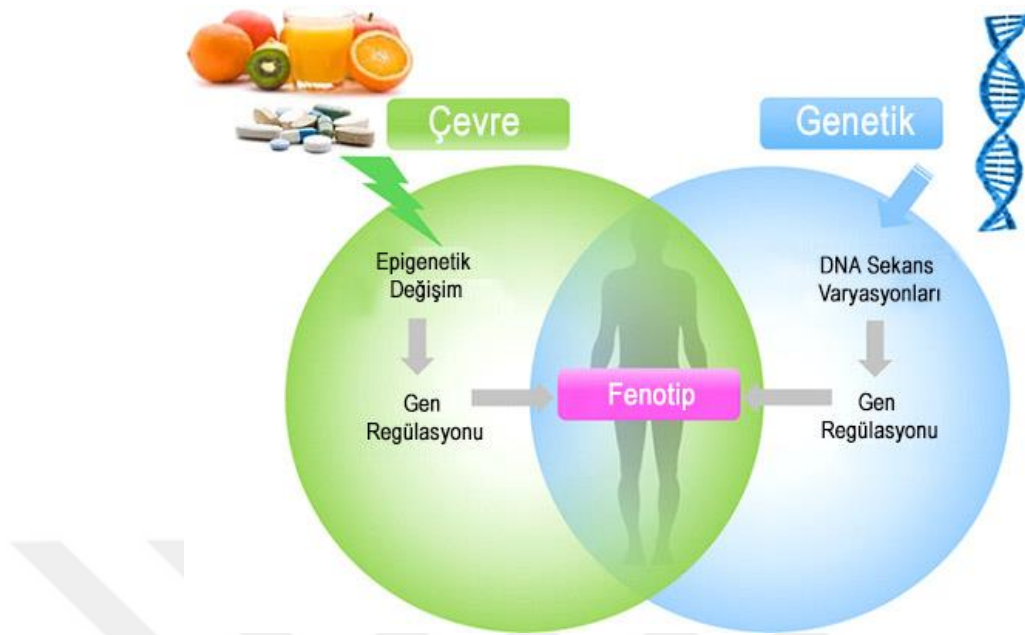
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Diğer bir deyişle, kalıtsal olup genetik olmayan fenotipik varyasyonları incelemektedir. Bu değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilemektedir ancak, DNA dizisinde hiçbir değişiklik gerçekleşmemektedir (1).

Conrad Waddington, epigenetiği “genler ve ürünleri arasındaki fenotipi ortaya çıkaran nedensel etkileşimi inceleyen biyolojinin dalı” olarak tanımlamıştır. Farklılaşmamış embriyoların gelişiminin epigenetik mekanizmalar tarafından değiştirilebileceğini önermiştir. Russo ve ark.’ına (2) göre, epigenetik “DNA dizisindeki değişikliklerle açıklanamayan gen fonksiyonunda mitotik ve/veya mayotik olarak kalıtsal değişikliklerin incelenmesi” olarak tanımlanmıştır.

Epigenetik değişikliklerin altında yatan mekanizmalar karmaşıktır ve kodlayıcı olmayan RNA'lar tarafından DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve gen regülasyonunu içerir. Ek olarak, epigenetik modifikasyonlar potansiyel olarak tersine çevrilebilir ve geçicidir. Birçok çevresel faktör bu mekanizmaları etkiler (Şekil 1). Aynı zamanda, epigenetik değişim gen ekspresyonunu modüle eder ve çeşitli gen fonksiyonlarını etkiler.



Şekil 2.1. Epigenetik mekanizmalar ve genetiğin insan fenotipi üzerine etkisi (3).

Epigenetik mekanizmalar ile ilgili çalışmalar tıp ve biyoloji alanında kapsamlı bir şekilde araştırılarak epigenetiğin patogeneze üzerindeki etkileri ortaya koymaktadır.

Bir organizmanın genel epigenetik durumu olan epigenom, normal gelişimin genomu kadar önemlidir. Çevresel faktörler (besinler, toksinler, enfeksiyonlar, hipoksi) epigenetik faktörler üzerinde derin etkilere sahip olabilir (Şekil 1) ve hastalığa yatkınlığı tetikleyebilir (4). Son çalışmalar fetal ortamın epigenomda değişikliklere neden olabileceğini, gen regülasyonu ve yaşa bağlı hastalıklar için uzun vadeli sonuçları olduğunu göstermiştir (5).

Diş hekimliğinde epigenetik ve epigenetik mekanizmalar ile ilgili çalışmalar dikkat çekicidir, çünkü epigenetik mekanizmalar oral hastalıkların gelişimi ve patolojik süreçleri sırasında gen ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır (6).

Örneğin, epigenetik modifikasyonlar diş gelişimi aşamasında diş anomalilerine yol açabilir (7, 8). Ayrıca, çeşitli epigenetik faktörler, monozigotik ikiz çiftlerinde diş farklılıklarını tetikleyebilir (9).

Son zamanlarda, periodontitiste rol oynayan enflamatuvar sitokinler gibi epigenetik biyobelirteçlerin değiştiği bildirilmektedir (10) Ayrıca, pulpa onarımı ve rejenerasyonu ile ilgili epigenetik mekanizmalar incelenmektedir (10, 11).

Epigenetik değişiklikleri anlamak, genetik hastalıkları tedavi etmek amacıyla yeni terapötik yöntemler geliştirmek için yararlı olabilir. Bu nedenle, epigenetik mekanizmaların genel özelliklerinin araştırılması ve diş hekimliği alanında gelecekteki etkilerini tanımlamak günümüzde önem arz etmektedir.

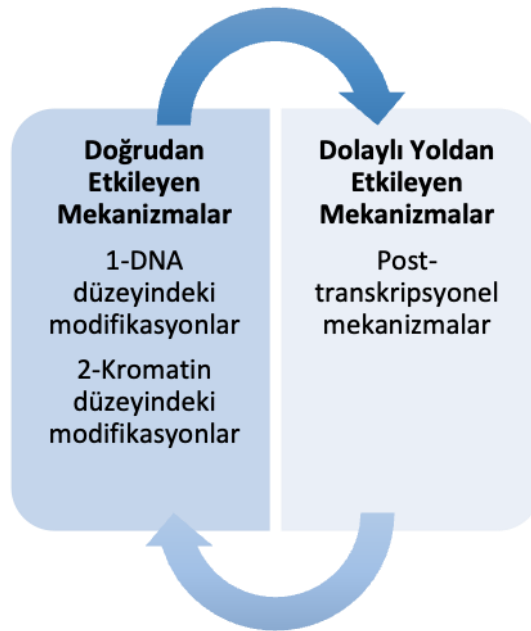
2.2. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar ikiye ayrılır; doğrudan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar, dolaylı yoldan gen ifadesini kontrol eden veya etkileyen mekanizmalar.

Dolaylı yoldan gen ifadesine etkileyen mekanizmalar; post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası, yani ana DNA molekülünden RNA molekülü elde edildikten sonra) mekanizmaları özellikle de kodlanmayan RNA'nın (RNAi vb.) kodlayıcı RNA (mRNA) üzerine etkisi ile protein sentezini engellemesini içerir.

Doğrudan gen ifadesini etkileyen mekanizmalar; DNA düzeyindeki modifikasyonlar ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olarak iki temel mekanizmadan meydana gelir.

Bu modifikasyonlar hem kovalent hem de nonkovalent olabilirler. Genlerin sessizleşmesine neden olurlar. Bu da geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Epigenetik mekanizmalar, dolaylı ve doğrudan etkilerine göre iki ayrı grupta sınıflandırılmaktadır.

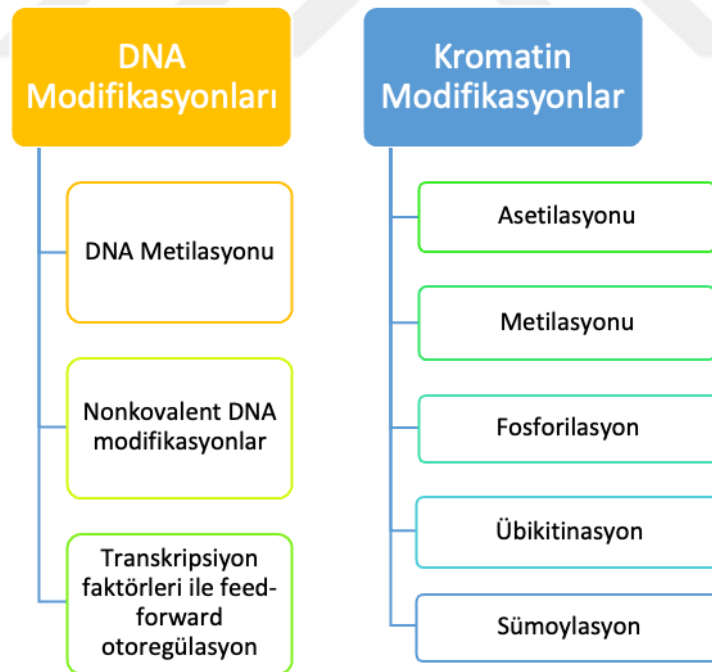
Doğrudan gen etkileyen mekanizmalar, DNA düzeyindeki ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 2.3).

DNA düzeyindeki modifikasyonları üçe ayırabiliriz: DNA metilasyonu (kovalent DNA modifikasyonu), nonkovalent DNA modifikasyonları ve transkripsiyon faktörler tarafından feed-forward otoregülasyondur.

Bu modifikasyonların arasından DNA metilasyonu en bilinen ve en işlevsel olanıdır. Kromatin düzeyindeki modifikasyonları da kovalent ve nonkovalent olmak üzere ikiye ayırabiliriz.

Kovalent modifikasyonlar histon modifikasyonlarıdır. Bunlar; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon, sümoilasyon.

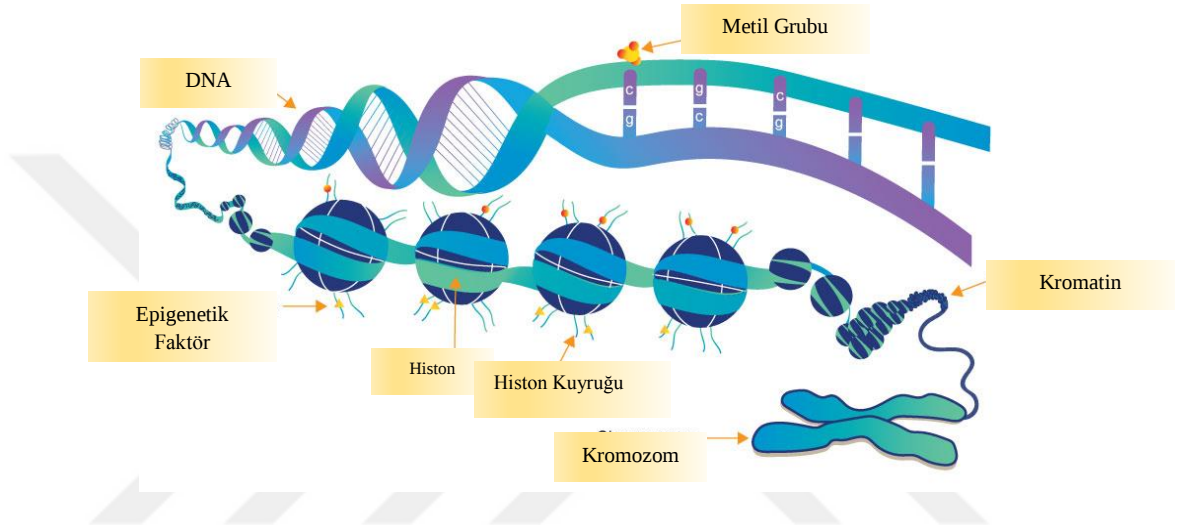
Nonkovalent modifikasyonlar ise; histon takasları, histon katımları, kromatin tadilatı, kodlanamayan RNA ile etkileşim, diğer ajanlarla etkileşim (virüsler, farklı protein grupları) uzun-mesafe kromozom etkileşimleridir (hem kromozom-içi hem kromozomlar-arası).



Şekil 2.3. Doğrudan gen ifadesini etkileyen mekanizmalar. DNA düzeyindeki modifikasyonlar ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olarak iki temel mekanizmadan meydana gelmektedir.

2.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA düzeyindeki en karakteristik kovalent modifikasyon türüdür. DNA metilasyon işlemi, bir metil grubunun S-adenosil metiyoninden (SAM) sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotidlerini DNA zincirine kovalent transferini içerir (12) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. DNA metilasyonu işlemi için bir metil grubu (SAM) ve sitozin-fosfat-guanin (CpG) adası bulunmalıdır (13).

Memeli genomları, CpG adaları olarak adlandırılan çok sayıda CpG bölgesinden oluşur. CpG adaları genellikle DNA metilasyonundan yoksundur ve gen promotörleri bölgesi ile ilişkilidir. DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), metil donör olarak SAM kullanarak DNA metilasyon kalıplarını oluşturur ve sürdürür (12).

DNA metilasyonu normal gelişim için gereklidir ve imprinting, X-kromozomu inaktivasyonu, tekrar elemanlarının baskılanması ve karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir. Memelilerde CpG'lerin %60-90'ı metillenmiştir (14). Metillenmemiş CpG'ler, CpG adaları olarak adlandırılan kümeler halinde gruplanırlar, bunlar çoğu genin 5' düzenleyici bölgelerinde bulunurlar. Kanser gibi çoğu hastalık sürecinde gen promotöründeki CpG adaları anormal aşırı metilasyona (hipermetilasyona) uğrarlar, bunun sonucu kalıtsal aktarımın gerçekleştiği, transkripsiyon susturması olur. DNA metilasyonu gen transkripsiyonunu iki şekilde etkileyebilir.

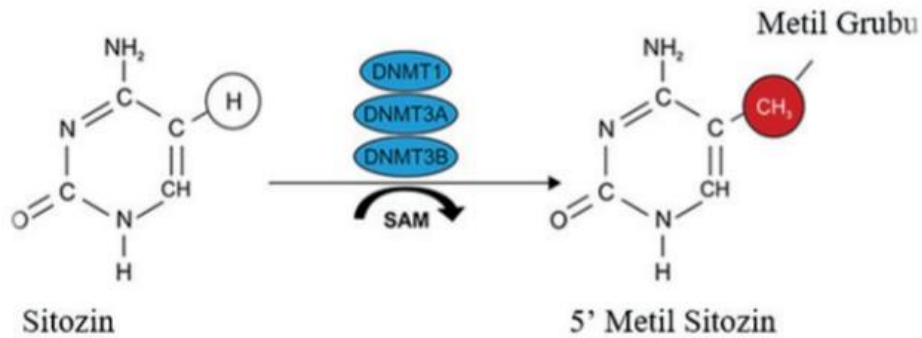
DNA metilasyonu, yakından ilişkili DNA metiltransferazların bir ailesi (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) tarafından katalize edilir (Şekil 2.6) (17)

DNMT1 bir bakım metiltransferazıdır ve memelilerde en bol bulunan DNA metiltransferazdır (18).

DNA metilasyonunun ve histon metilasyonunun ökaryotlarda sıkı kontrol edilen olaylar olduğunu belirtmek önemlidir (19). DNA metilasyonu için metillenmemiş lizin 4 (H3K4) bulunan histon H3 N-terminal kuyruğu gereklidir (20).

Ek olarak, lizin 9 (H3K9me3) üzerindeki histon H3'ün tri-metilasyonu, DNMT1'in aracılık ettiği DNA metilasyonuna katılır (21).

SET-, Ring- ve Tudor alanlarını içeren NP95 proteini, DNMT1'i DNA ve histon H3 metilasyonu (H3K9me3) ile bağlamaktan sorumludur. Bu nedenle NP95, iki ana epigenetik susturma yolunu, DNA metilasyonunu ve histon metilasyonunu koordine eder (21).

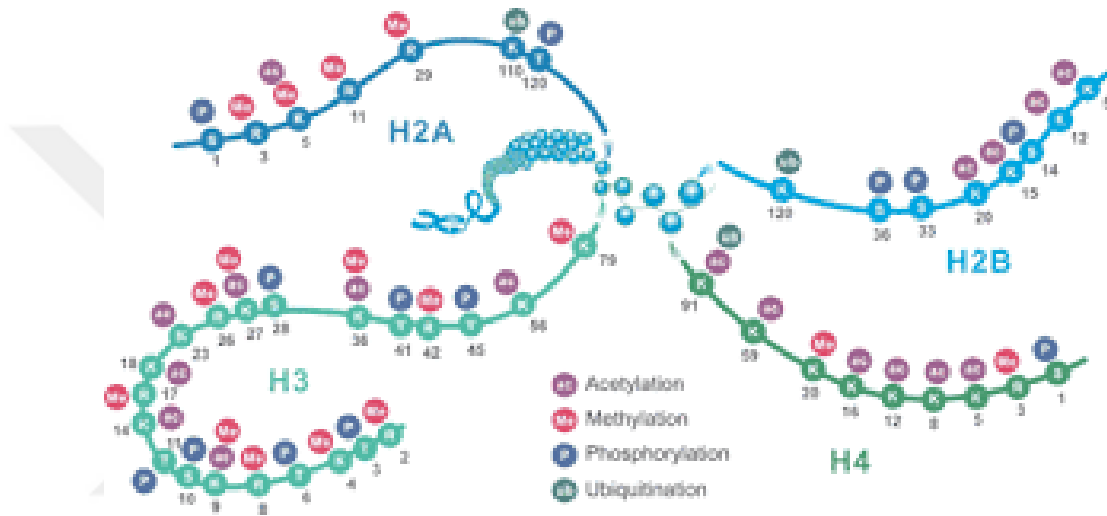


Şekil 2.6. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazların bir ailesi (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) tarafından katalize edilir (22).

Kronik periodontitisin mevcudiyeti sonucu çevre dokularda, DNA metilasyon paternlerinde ve sitokin gen ekspresyonunda değişiklikler gözlenebildiğine dair bulgular mevcuttur. Buna ek olarak, metilasyon paternleri ile sağlıklı ve iltihaplı diş pulpası arasında farklılıklar olabileceği düşünülmektedir (12).

2.2.2. Histon Modifikasyonları

Histonlarda meydana gelen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon, sümoilasyon gibi modifikasyonlar kromatin yapısını değiştirerek gen anlatımını regüle eden kromatin modifikasyonları arasında yer alan epigenetik mekanizmalardır. Bu mekanizmalar arasında en iyi karakterize edilen histon modifikasyonları asetilasyon ve metilasyondur (Şekil 2.7).

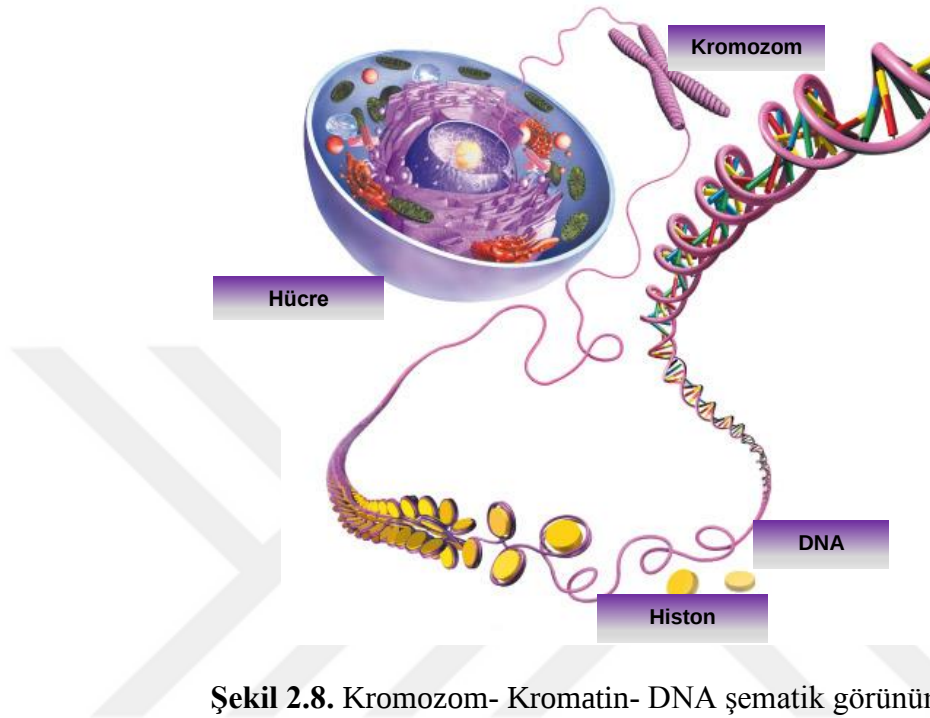


Şekil 2.7. Histon Modifikasyonları; Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon, sümoilasyon gibi modifikasyonlar kromatin yapısını değiştirir (23).

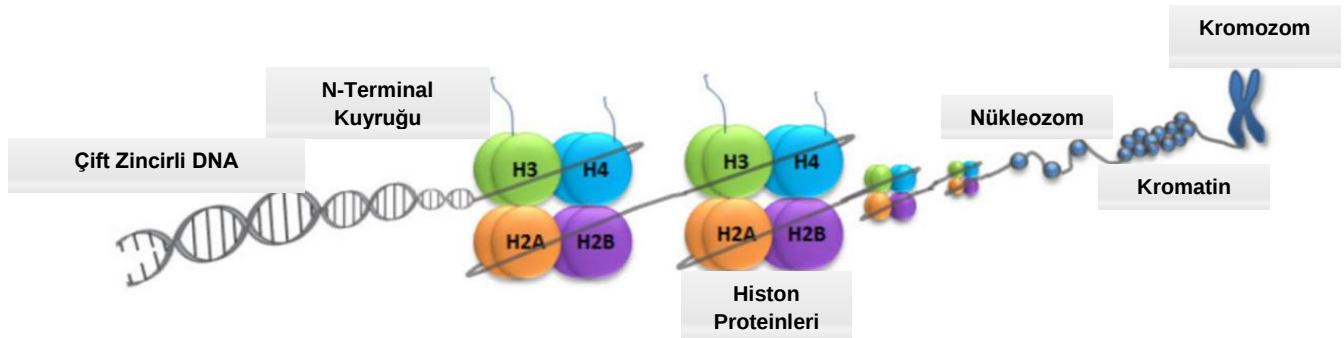
Histon asetilasyonu, histon proteinlerinin N-terminal tırnaklarının lizin kalıntılarında oluşur. Nükleozom yapısını gevşeterek transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını sağlar, aktif gen anlatımına neden olur. Histon asetiltransferaz (HAT) ve Histon deasetilaz (HDAC) histonlara asetil gruplarının eklenmesi ve çıkarılmasını reaksiyonlarında temel rol oynayan enzimlerdir.

Histon metilasyonu, histon proteinlerinin N-terminal tırnaklarının lizin ve arjinin kalıntılarında tekli, çift veya üçlü olarak oluşur. Ortaya çıktığı yere göre transkripsiyonel aktivitede artışa veya aktivitenin baskılanmasına neden olur. Bu reaksiyonlar, histon metiltransferaz (HMT) ve histon demetilaz (HDM) enzimleri ile düzenlenmektedir.

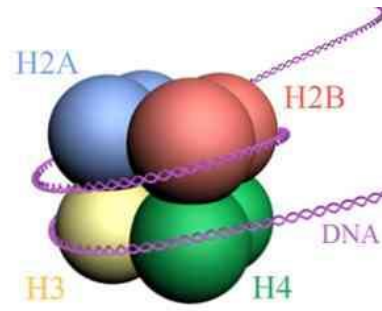
Kromatinin temel birimi olan nükleozom, bir DNA segmenti ve sekiz çekirdek histondan oluşur. Bu histon oktam, H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinin iki kopyasından oluşur. Bu bileşim kromatine sert bir yapı sağlar (Şekil 2.9, 2.10, 2.11).



Şekil 2.8. Kromozom- Kromatin- DNA şematik görünüm (24).



Şekil 2.9. Histon proteinler ve çift zincirli DNA görünümü (25).



Şekil 2.10. Histon Proteinleri: Oktomer yapıya sahiptir, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere merkezde 4 çeşit histon proteini bulundurmaktadır (26).

Çekirdek, histonların translasyon sonrası modifikasyonları (lizin ve argininlerin metilasyonu, asetilasyon, fosforilasyon, übikitinasyon, sumoylasyon) sonucu kromatininin yoğunlaşması veya gevşetilmesiyle meydana gelir. Böylece gen transkripsiyonunu düzenlenmesi beklenen şekilde gerçekleşir.

Histonların modifikasyonu çoğunlukla proteinin N-terminal kuyruklarında gerçekleşir.

Histonların asetilasyonu, transkripsiyonu kolaylaştıran "açık" bir kromatin konformasyonu ile ilişkilidir (27). Nükleozom çekirdeğinde uzantı olarak izlenen asetillenmiş N terminal kuyruğu, DNA'ya transkripsiyona açık bir görünüm sağlar, bu da kromatinin temel transkripsiyon esnasında daha rahat bir yapı kazanması ile sonuçlanır.

Örneğin, asetile histon işaretleri H3K4ac ve H3K39ac, transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilidir. CREB bağlayıcı protein (CREB binding protein; CBP), benzer işlev gören Homolog p300 ve histon asetiltransferazlar (HAT'ler) bu modifikasyonları gerçekleştirir (28). Tersine, histon deasetilazlar (HDAC), asetil gruplarını çıkararak kromatinin daha yoğun hale gelmesine ve gen transkripsiyonunun bastırılmasına neden olur (12).

Son çalışmalar, histon modifikasyonlarının dental pulpa kök hücrelerinde farklılaşmaya ve mineralleşmeye neden olabileceğine dair bulgular sunmuştur (27-29).

Histon asetilasyon ve deasetilasyonları, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği ve pulpa onarımını ve rejenerasyonunu teşvik edebileceğine dair yeni

veriler elde edilmiştir (28-31). Bu nedenle, restoratif diş hekimliğinde epigenetik düzenlemeler üzerindeki çalışmalar günümüzde önem kazanmıştır.

2.2.3. Kodlanmayan RNA'lar ile Etkileşim

Nonkovalent modifikasyonlar arasındaki en karakteristik ve önemli etkileşim kodlanmayan RNA etkileşimidir. Kodlanmayan RNA'lar, bir proteini kodlamamasına rağmen fonksiyonel olarak aktif RNA molekülleridir. Kodlanmayan RNA grubu; transfer RNA'ları (tRNA'lar), ribozomal RNA'lar (rRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve kısa etkileşen RNA'lar (siRNA'lar) gibi çok çeşitli önemli RNA'ları içermektedir.

MikroRNA'ların (miRNA) ve kısa etkileşen (siRNA) RNA'ların, DNA sekansını değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (12, 32). Örneğin miRNA'lar, transkripsiyon sonrası düzeyde hedef genlerinin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen küçük tek iplikli kodlanmayan RNA'lardır.

Guo ve ark.'nın (33) yapmış olduğu çalışmada protein seviyesinin endojen miRNA'lar tarafından azaltılmasının, hedef mRNA'nın dengesizleştirilmesinden kaynaklandığını ileri sürülmüştür. Ayrıca, son çalışmalar, miRNA'ların bir hastalığın gelişimi veya farklılaştırılması sırasında çoklu hayati süreçlerde rol oynadığını bildirmiştir. Diş hekimliğinde yapılan çalışmalar, kodlanmayan RNA'ların spesifik sendromlar, oral kanser ve oral immünoloji gibi oral hastalıklarda yer aldığına dair veriler sunmuştur (34, 35). Ayrıca, son çalışmalar miRNA'ların odontoblast farklılaşmasında rol oynadığına dair bulgular sunmuştur (12).

2.3. Epigenetiğin Fonksiyonları

Bilim insanları uzun yıllardır hastalar için daha iyi teşhis araçları ve terapileri geliştirmek amacıyla girişimlerde bulunmaktadırlar. Epigenetik mekanizmalara dair araştırmalar, kanserin teşhisi, tanısı, gelişimi ve metastatik aşamaları sırasında görülen epigenetik değişikliklerin aktif olarak araştırılmasını ile başlamıştır. 2008 yılından bu yana ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) 'nin en iddialı projelerinden biri olarak araştırılmaya devam edilmektedir. Fetal gelişim, kanserin mevcudiyeti ve ilerlemesi veya yetişkinlerde gelişen otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve ruhsal hastalıklar gibi kronik hastalıkların da epigenetik değişiklikler ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (36).

Epigenetik modifikasyonların gelişimi sonucu gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ve modifikasyonlar birbiri ile ilişkili bulunmuştur (37). Bu değişiklikler; genomik kopyalama (imprinting), genomik gelişim (development), çevresel faktörler, enflamasyon, kanser ve yaşlanma olarak özetlenebilir.

2.3.1. Genomik Kopyalama (Imprinting)

Genomik kopyalama, genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak, farklı ekspresyonudur. Genomik kopyalama epigenetik bir fenomendir.

DNA metilasyonu, genomik kopyalama mekanizmasının altında yatan ana mekanizma olarak kabul edilir. Bu işlem sırasında, bir genin bir kopyası ebeveyn kökenine bağlı olarak DNA metilasyonu ile işaretlenir ve bu metilasyon, DNA metiltransferaz-1 (DNMT1) ile hücre bölünmesi sırasında korunur (36, 38).

DNA metiltransferaz-1 (DNMT1), hemimetillenmiş CpG alanlarını taşıyıcı böylesiyle bu metillenmiş desenler yeni sentezlenen DNA ipliklerine kopyalanır (4).

İnterferon-gama-2'nin (IFN δ -2) gen ekspresyonu fetal gelişim sırasında düzenlenir, interferon-gama-2 (IFN δ -2), fetus için önemli bir somatik büyüme faktörüdür ve herhangi bir hasar veya yanlış düzenleme zararlı sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle, IFN- δ 2 gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik programlama fetüsün doğru gelişimi için önemli bir bileşendir (4).

Günümüze kadar genomik kopyalama ve dış hastalıkları ile ilgili çalışmalara rastlanamamıştır. Bununla birlikte, genomik kopyalamanın gelişimsel anomaliler ile ilişkisi göz önüne alındığında dış hastalıkları ile ilgili sebep sonuç noktasında DNA metilasyonunun her iki taraf için de anahtar mekanizma olduğu dikkate alınması gereken bir konudur.

2.3.2. Genomik Gelişim (Development)

Epigenetik modifikasyonlardan, DNA metilasyonu ve kromatin yeniden modelleme gibi mekanizmaların somatik epigenetik kalıtım, çok hücreli ökaryotik organizmaların gelişimi için oldukça önemli olduğuna dair araştırmalar yapılmıştır (39).

Gen sekansı durağan olmasına rağmen, hücreler birçok farklı türe ayrılır. Farklı işlevleri yerine getirir, çevreye ve hücreler arası sinyale farklı tepkiler verir. Bu nedenle, altta

yatan epigenetik modifikasyonlar, hücrel farklılaşma ve fonksiyonel gelişimde önemli role sahiptir (40).

2.3.3. Çevresel Faktörler

Epigenetik modifikasyonlardan, DNA metilasyonunun çevresel faktörler nedeniyle doğum öncesi döneme kadar erken başladığına dair veriler elde edilmiştir. Örneğin, DNA'nın metilasyonu, fetal beslenmedeki düşük folat değerleri, uterustaki metiyonin veya selenyum seviyelerine bağlı olarak değişebilmektedir. Mevcut durum yetişkinliğe kadar devam edebilir (41).

Barker ve ark. (41)'na göre, intrauterin maruziyetler yetişkinlikte bile süren fetal programlamaya neden olabilir ve kardiyovasküler hastalık ve tip 2 diyabet gibi yetişkin hastalıkları riskini arttırabilir. Bu nedenle intrauterin beslenmenin fetüsün epigenetik programlaması üzerinde önemli bir etkisi olabilir. Örneğin, metiltetrahidrofolat, S-adenozin-metiyonin (SAM) için, DNMT enzimi tarafından sitozin-fosfat-guanin (CpG) kalıntılarını metillemek için kullanılan temel bir metil vericisidir. Hamilelik sırasında maternal folat eksikliği yetersiz SAM düzeylerine neden olabilmektedir (38).

Sonuç olarak, maternal folat eksikliği, bazı genlerin aşırı ekspresyonuna ve fetüste genetik dengesizliğe bağlı DNA hipometilasyonuna neden olabilir (42). Ek olarak, çoklu diyet veya diğer çevresel faktörler yaşam boyunca epigenetik modifikasyonları etkileyebilir. Son çalışmalar çevresel faktörlerin periodontal dokularda bağlantı kaybını arttırabileceğini ve periodontal dokularda patojenlerin virülansını değiştirebileceğini bildirmiştir (42, 43).

2.3.4. Enflamasyon

Enflamasyon, patojenler veya tahriş edici maddeler gibi zararlı uyarılara biyolojik bir yanıttır. Birçok çalışma, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve mikroRNA'lar tarafından hedefleme de dahil olmak üzere epigenetik değişikliklerin bir nedeni olarak enflamasyonu göstermektedir (4, 10, 44). Bazı çalışmalar, bağışıklık yanıtlarının aktivasyonunun potansiyel epigenetik değişikliklere yol açabileceğine dair veriler sunmuştur (45).

Akut enflamasyonda, vücudun bir uyarana ilk tepkisi, lökositlerin ve plazmanın kandan yaralı bölgelere göçünün arttırılmasıyla elde edilir. Enflamasyonun yavaş başlaması ve uzun süre devam etmesi sonucu kronikleşme gerçekleşir. Kronik enflamasyondaki

semptomlar akut enflamasyondaki kadar şiddetli değildir, ancak durum kalıcıdır. Kronik enflamasyon, periodontal hastalık ve diabetes mellitus gibi birçok hastalığın altında yatan temel sebeptir (46).

Enflamatuvar yanıtın karmaşıklığı, sinyale özgü ve gene özgü seviyelerde işlevleri yerine getirmek için sofistike bir düzenleyici ağın geliştirilmesini gerektirir (47). Bu ağ, antimikrobiyal savunma, bağışıklık yanıtı ve doku onarımı ve yeniden modelleme için spesifik genlerin aktivasyonunu içerir (48).

Makrofajlar, kanser ve alerjik yanıtlar dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıklarda kritik roller oynar ve son verilerin analizi, makrofaj fenotipinin elde edilmesinde kromatin modifikasyonlarının önemli olduğunu göstermiştir (49).

DNA metilasyonu ve kovalent histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon vd.) dahil epigenetik fenomenlerle birlikte NF- κ B, FOXP3, IRF ve STAT gibi transkripsiyon faktörlerinin enflamatuvar genlerin düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (47).

Ito ve ark. (45) enflamatuvar sinyallerin, aktif B lenfosit hücrelerinin nükleer faktör kappa (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün histon metilasyon modellerini potansiyel olarak değiştirdiğini ve gen ekspresyonunu teşvik ettiğini bildirmiştir.

2.3.5. Kanser

Birçok epigenetik değişiklik karsinogenezin temel faktörleri olarak doğrulanmıştır. DNA metilasyonu, kanserde görülen iyi karakterize epigenetik bir modifikasyondur. Çoğu tümörde, transkripsiyonel aktiviteyi arttıran hipometilasyonun meydana geldiğine dair bulgular mevcuttur. Bu durum genellikle artan tümör sıklığı ile ilişkilidir (17). Normalde malignite öncesi hücrelere ait değişiklikleri gösteren en erken etkinin epigenetik modifikasyonlar olduğu kabul görmüştür (17). Bu verilerin aksine, bazı çalışmalar tümör baskılayıcı genin hipermetilasyonunun da karsinogenez ile ilişkili olduğunu göstermiştir (16, 49).

Tümör baskılayıcı genler için kullanılan promotörlerin hipermetilasyonu, baskılayıcı genlerin inaktif olması ile sonuçlanır ve tümörün ilerlemesi ile kendini gösterir (50).

Kanser oluşumunun başlangıçta epigenetik rahatsızlıktan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Ancak yakın zamanda Choi ve ark. (51)'nin yapmış olduğu araştırma verilerine göre genetik ve epigenetik modifikasyonların, oral skuamöz hücreli kanserin

moleküler patogenezinin ve p53, p16 ve p21 gibi tümör baskılayıcı genlerin kanserdeki rolünde kritik bir faktör olabileceğini bildirmiştir.

2.3.6. Yaşlanma ve Hastalıklar

Epigenetik modifikasyonların, DNA metilasyonu, histon asetilasyonu ve miRNA'lar ile etkileşim gibi Romatoid artrit (RA) patogenezinde rol oynadığına dair bulgular elde edilmiştir (7, 50, 52).

Birçok çalışma, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve akciğer kanseri gibi kronik enflamasyonların gelişiminde epigenetik modifikasyonların merkezi rolü olduğunu savunmuştur (53-55).

Bağışıklık yanıtındaki yaşa bağlı değişiklikler enfeksiyon riskini artırır ve antijenlerle birlikte kansere karşı artan reaktiviteyi destekler. DNA'nın yaşa bağlı hipometilasyonunun kronik enflamasyon ve kansere neden olabileceği öne sürülmüştür (56, 57).

Periodontitiste Prostaglandin E ve prostaglandin-endoperoksit sentaz-2 (PTGS2) seviyeleri, ilerleyen periodontal lezyonlarda artar, ancak kronik hastalıkta azalma eğilimi gösterir. Kronik periodontitiste PTGS2 geninin ekspresyonunun Promoter hipermetilasyonuna bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (58).

2.4. Enflamasyon ile Birlikte Gelişen Epigenetik Modifikasyonlar

2.4.1. Enflamasyon ve DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, enflamatuvar genlerin düzenlenmesinde önemlidir. Toll-benzeri reseptör 2 (TLR2) geninin promotör hipometilasyonu, kistik fibröziste bronş epitel hücrelerinde bakteriyel peptidoglikan artan pro-enflamatuvar yanıtla ilişkilendirilmiştir (59). DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun, bağırsak epitel hücrelerinde TLR4 geninin düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir (60).

Bakteriyel enfeksiyon dahil çevresel faktörlerin genomun epigenetik durumunda rol oynadığına dair bulgular mevcuttur (4). Yine bakteriyel enfeksiyonun farelerde insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF2) geninin promotöründe hipermetilasyonu indüklediği tespit edilmiştir (61). Farelerde yapılan ekspresyon mikrodizi çalışmaları, maternal enfeksiyonun, birçok kopyalanmış gen dahil olmak üzere temel gelişimsel genlerin plasental ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (62).

İnsan midesinin *Helicobacter pylori* tarafından kronik kolonizasyonu mide mukozasında iltihaplanmaya neden olur ve çoklu onkojenik yolları aktive ettiğine dair bulgular mevcuttur (63). *Helicobacter pylori*'nin mide epitel hücrelerinde DNA metilasyon paterni üzerinde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (64). Katayama ve ark. (65)'ları Runx3 lokusundaki Helikobakter kaynaklı DNA metilasyonunun gastrik epitel hücrelerinde ekspresyon kaybına neden olduğunu göstermiştir.

2.4.2. Enflamasyon ve Histon Asetilasyonu

Histon asetil transferaz enzimleri tarafından yapılan histon asetilasyonu, enflamatuar genleri aktive ederken, artan histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi, enflamatuar gen baskısına neden olmaktadır. Histon asetilasyonundaki artış, histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinde azalma ile ilişkilidir.

Örneğin, çeşitli pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-8 ve IL-12) promotörleri, CBP/p300 tarafından hızla asetillenir, transkripsiyon aktivasyonuna yol açar ve azaltılmış HDAC aktivitesi ile sonuçlanır (66).

Bunun aksine HDAC'lerin toplanması histon deasetilasyonuna ve gen baskısına yol açar. HDAC'ler, hem proenflamatuar hem de antienflamatuar sitokinlerin, ortak baskılayıcı kompleksleri ve FOXP3, STATs, GATAs, ZEB1 ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri yoluyla transkripsiyonunu düzenler (66).

2.4.3. Enflamasyon ve Histon Metilasyonu

Jumonji ailesinin bir üyesi olan Jmjd3, histon izlerini silen indüklenebilir bir enzimdir. Bu proteinin son zamanlarda makrofajlardaki farklılaşmayı ve hücre kimliğini kontrol ettiği ve bu nedenle epigenomun iltihaplanması ve yeniden programlanması arasında bir bağlantı sağladığı bulunmuştur (67). Jumonji3 (Jmjd3), CpG hedef genlerini bağlayarak H3K27me3 seviyelerini ve transkripsiyonel aktiviteleri düzenler. Bakteriyel ürünlere ve enflamatuar sitokinlere maruz kalan makrofajlar bu mekanizma yolu ile indüklenebilir (67). İnterlökin-4 (IL-4) tedavisi, Jmjd3'ün aktivasyonuna ve STAT6 promotöründen H3K27me3 baskılayıcı işaretlerinin salınmasına yol açar. H3K27 metilasyon işaretlerinin Jmjd3 enzimi ile silinmesi, spesifik enflamatuar genlerin ekspresyonunu tetikler.

Bu bulgular, H3K4 ve H3K27 metilasyonunda karşılıklı değişimin, genlerin kontrolü için önemli bir epigenetik süreç olabileceğini göstermektedir (67).

2.4.4. Enflamasyon ve miRNA etkileşimi

Son yıllarda miRNA'ların gelişim, farklılaşma ve hastalıkların düzenlenmesinde etkisi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (68, 69). Yapılan araştırmalarda mikroRNA alt türlerinin birçoğunun enflamatuvar reaksiyonlarda kilit rol oynayan enzimler üzerinde etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Örneğin, miR-155, makrofaj aktivasyonu için önemli bir enzim olan inositol-polifosfat5-fosfataz1'in (SHIP1) üzerinde kritik rol oynamaktadır (70). SHIP1 ağırlıklı olarak hematopoietik hücrelerde eksprese edilir, bunun yanında osteoblastlar ve endotelial hücreler (71) tarafından da eksprese edilmektedir.

miR-132, periferik enflamasyonun kritik bir inhibitörü olan asetilkolini (ACH) mRNA'ya bağlayarak antienflamatuvar etkide aktif rol oynamaktadır (72).

Liu ve ark. (73), miR-147'nin Toll-benzeri-reseptör (Toll-like-receptor; TLR) tarafından uyarılmasının, bir negatif geri besleme döngü mekanizması yoluyla aşırı enflamatuvar yanıtı önlediğine dair bulgular sunmuştur.

TLR'nin stimüle edilmesi sonucu miR-147 uyarılarak hem NF- κ B hem de interferon düzenleyici transkripsiyon faktörünün (interferon regulatory transcription factor; IRF3) aktivasyonuna sebep olur. Ayrıca miR-147, makrofajlarda TLR'nin neden olduğu enflamatuvar yanıtı inhibe etme eğilimi göstermektedir (73). Başka bir çalışmada miR-105'in insan dişeti keratinositlerinde TLR-2 aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir (74). Son zamanlarda, enflamatuvar genlerin TLR4'e bağımlı yeniden programlanmasına iki farklı düzenleme seviyesinin aracılık ettiği öne sürülmüştür (75).

2.5. Diş Çürükleri

Diş çürükleri, (Şekil 2.11) ve periodontal hastalıklar, muhtemelen dünyadaki en yaygın kronik hastalıklardır. Çürük, tarih öncesi çağlardan beri insanları etkilemiş olsa da bu hastalığın yaygınlığı modern zamanlarda dünya çapında büyük ölçüde artmıştır ve bu artış beslenme değişikliği ile güçlü şekilde ilişkilidir. Bununla birlikte, kanıtlar şu anda bu eğilimin 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında birçok ülkede zirveye çıktığını günümüzde ise azalmaya başladığını göstermektedir.



Şekil 2.11. Mine ve dentin çürük görselleri (76).

Bu keşif, 1950'lerde ve 1960'larda kamu su kaynaklarına yaygın olarak florür eklenmesine ve özellikle diş macunu olmak üzere çeşitli ağız hijyeni ürünlerine florür eklenmesi ile ilişkili görülebilir. 1984 yılına gelindiğinde, diş macunu ürünlerinin %94'ü ilave florür içermekteydi.

Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde çürüklerdeki düşüş en çok üst ve orta sınıflarda göze çarparken, alt sosyoekonomik sınıflar ve kırsal kesimde yaşayanlar yüksek diş çürüğü prevalansını korumuştur.

Örneğin, Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırması (NHANES 111) (National Center for Health Statistics, 1994), çürüklerin %80'inin, sıklıkla düşük sosyoekonomik gruplarda veya azınlıklarda bulunan çocukların %20'sinde meydana geldiğini bulmuştur. Bu etki, nüfusun sınırlı bir kesiminin hastalığın çoğunu yaşadığı çürüklerin bir "kutuplaşması" olarak karakterize edilmiştir. Benzer bir kutuplaşma, gelişmiş ülkelerde çürük prevalansının azaldığı, az gelişmiş ülkelerde artmıştır. Bu nedenle çürükler, gerekli diş tedavisini en az karşılayabilen popülasyon segmentlerinde giderek daha fazla tespit edilmektedir.

Ek olarak, çürükler, elle tutulmasa da ağrı, ıstırap ve kozmetik kusurlar şeklinde önemli maliyetlere sebep olur. 1986'da Walter Loesche, çürükleri ve periodontal hastalığı "belki de çoğu bireyin bir ömür boyu uğraşmak zorunda olduğu en pahalı enfeksiyon" olarak tanımladı. Bu ifade, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu haricinde, günümüzde de kabul görmektedir (77).

2.5.1. Çürük ve Plak Tanımları

Diş çürüğü, kalsifiye dokuların lokalize çözünmesi ve tahrip olmasına neden olan, dişlerin bulaşıcı mikrobiyolojik bir hastalığıdır. Dişlerdeki boşlukların (diş yüzeyinin tahrip olması, bir "boşluk" veya kusur oluşturmaları) bakteriyel enfeksiyon belirtileri olduğunu anlamak önemlidir. Klinik uygulamada, bu gerçeği gözden kaçırmak ve tamamen lezyonların onarıcı tedavisine odaklanmak, dolayısıyla hastalığın altında yatan nedeni tedavi edememek mümkündür.

Semptomatik tedavi önemli olmasına rağmen, altta yatan nedenin (yani dişin odontopatik [dişlere hastalık yapan] bakteriden enfeksiyonu) tanımlanmaması ve tedavi edilmemesi hastalığın devam etmesine izin verecektir.

Demineralizasyon ve diş yapısının kaybı ile kanıtlandığı üzere çürük aktivitesi oldukça değişkendir ve bu nedenle bireysel lezyonların seyri her zaman öngörülebilir değildir. Çürük lezyonlar, diş yapısını demineralize etmek için yeterince asidik bir ortam oluşturabilen bir bakteri kütlesi altında oluşur. Diş yüzeyine yapışan jelatinimsi bir bakteri kütlesi, diş plağı olarak adlandırılır. Plak bakterileri, enerji için rafine karbonhidratları metabolize eder ve yan ürün olarak organik asitler üretir. Bu asitler, dişin kristal yapısının çözülmesiyle çürük lezyonuna neden olabilir. Diş yüzeyindeki pH, plak metabolizmasındaki değişikliklerle değiştiğinden çürük lezyonlar bir dizi alevlenme ve gerileme olarak ilerler. Sükroz gibi basit karbonhidratların mevcudiyeti plak metabolizmasını büyük ölçüde uyarır. Çürük aktivitesinin alevlenmeleri, yüksek bakteriyel metabolik aktivite dönemleri ve diş yüzeyine yakın plakta düşük pH ile karakterizedir. Hasarlı diş yapısının yeniden mineralizasyonu, lokal pH 5.5'in üzerine çıktıkça gerçekleşir. Tükürükteki yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ve fosfat iyonları ile remineralizasyon işlemi gerçekleşir.

Demineralizasyon ve remineralizasyon arasındaki dengeyi anlamak, çürük oluşumunu anlamının anahtarıdır.

Çürük oluşumunda bakterilerin rolüne dair kanıtlar oldukça fazladır. Hayvan ve insan modelleri kapsamlı bir dizi çalışmada kullanılmış ve aşağıdaki sonuçlara yol açmıştır (78).

1. Bakteriyel enfeksiyon içermeyen dişlerde; gerek germ free hayvanlarda gerekse henüz oral florada lokalize olmamış dişlerde (şürmemiş) çürük gelişmediği gözlenmiştir.
2. Antibiyotikler, hayvanlarda ve insanlarda çürüklerin azaltılmasında etkilidir.
3. Oral bakteriler, diş minesini in vitro olarak demineralize edebilir ve doğal olarak oluşan çürüklere benzer lezyonlar oluşturabilir.
4. Spesifik bakteriler, çeşitli çürük lezyonlar üzerindeki plaktan izole edilebilir ve tanımlanabilir.

Bakteriyel aktivitenin çürük lezyonların oluşumundaki rolü iyi tanımlanmış olmasına rağmen, ağız florasındaki tek bir organizma ile çürükler arasında neden-sonuç ilişkisi kurmak tam anlamıyla başarılı olmamıştır (78). Oral bakteriler soliter koloniler olarak değil, kompleks bir sistemin üyesi olarak oraya çıkarlar, polimerize glikozun yapışkan matrisi tarafından bir arada tutulan hücre kütleleri olarak bulunan bu bakteriler diş yüzeyine bu matris sayesinde sıkıca tutunmuşlardır. Yaklaşık 200 ila 300 bakteri, maya ve hatta protozoa türü insan oral florasına özgü olduğuna dair bulgular göstermiştir. Plak oluşturan karmaşık bakteri topluluğunun metabolik aktivitesi, bitişik sert ve yumuşak dokuların hastalık varlığını veya yokluğunu belirleyebilmektedir (78).

Sekiz *Mutans Streptococci (MS)* serotipinden oluşan bir grup bakteri çürük ile ilişkilendirilmiştir. Serotipler, a'dan h'ye kadar adlandırılmıştır. MS grubu içi,nde yer alan *Streptococcus mutans* ve *Laktobasil* büyük miktarlarda asit üretebilir (asidojenik), asidik ortamlara toleranslıdır (asidürik), sükroz tarafından kuvvetli bir şekilde uyarılır ve insanda çürük ile ilişkili birincil organizmalar olarak görülmektedir (78).

2.5.2. Çürüklerin Epidemiyolojisi

Diş çürükleri ile ilgili Kuzey Amerika ve Avrupa'da son 50 yılda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, diş tedavisine duyulan ihtiyacın kapsamını ve etkinliğini belirlemede çok yararlı olmuştur. Başlangıçta epidemiyoloji, salgın hastalıkların incelenmesine odaklanmıştır, ancak modern zamanlarda epidemiyoloji, bir nüfusun sağlık ihtiyaçlarının herhangi bir yönünü kapsayacak şekilde genişlemiştir.

Bir popülasyonda belirli bir süre, genellikle 1 yıl içinde yeni hastalık vakaları geliştiren bireylerin sayısı, hastalığın insidansıdır. Hastalığın uzunluğu veya süresi yaygınlığı ve

sıklığı önlemler konusunda önemli bir etkiye sahiptir. Grip gibi kısa süreli hastalıklar için insidans ve prevalans neredeyse aynıdır. Uzun süreler boyunca (yıllar veya on yıllar) devam eden hastalıklar için prevalans, insidansın çok daha üzerindedir.

Çürüklerin en yaygın epidemiyolojik ölçüsü, hastalıklı, eksik veya dolgulu (DMF) kalıcı dişlerin sayısının değerlendirilmesidir. Süt dişlerinin ölçüleri dmf olarak rapor edilir. DMF, etkilenen diş sayısı (DMFT) veya yüzeyler (DMFS) olarak rapor edilebilir (78).

Gelişmiş ülkelerde çürük paterninde izlenen değişiklikler, yakın gelecekte uygulanan cerrahi diş hekimliğinin doğasını önemli ölçüde etkileyecektir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde 65 yaş üstü nüfusun yüzdesi 1980 yılından 2000'lere gelindiğinde iki katına çıkmıştır ve 2030'a kadar nüfusun beşte birini oluşturacağı öngörülmektedir. Böylece daha fazla yaşlı insanın varlığı ve çürük prevalansının azalması nedeniyle, önceki nesillerden daha fazla dişe sahip olacaklardır. Bununla birlikte, bu büyük yaşlı popülasyonun açıkta kalan kök yüzeyleri çürük için yüksek risk altında olacaktır.

2.5.3. Çürük Lezyonun Klinik Özellikleri

Diş yüzeyinde anaerobik hale gelmek için yeterli kütleye (kalınlığa) sahip bir plak topluluğu, karyojenik olma potansiyeline sahiptir. Büyük bir *Streptococcus mutans* popülasyonu, bu oluşumu fiilen garanti eder. Sukroz açısından zengin bir diyet, *Streptococcus mutans*'a seçici bir avantaj sağlar ve organizmanın plak topluluğunda çok sayıda birikmesine izin verir. Sükroz açısından zengin ortam ayrıca *Streptococcus mutans*'ın büyük miktarlarda hücre dışı polisakkarit üretmesine izin verir. Bunlar plakta difüzyon sınırlayıcı bir bariyer oluşturan jelatinimsi bir malzeme oluşturur. Sınırlı difüzyon ve muazzam metabolik aktivitenin kombinasyonu, yerel ortamı anaerobik ve çok asidik hale getirir ve bu nedenle, bitişik diş yüzeyinin çözünmesi için ideal bir ortam sağlar.

Diş yüzeyinde kavitasyon meydana geldiğinde, plak topluluğu için daha tutucu bir yüzey alanı elde edilir. Bu, *Laktobasil* gibi zayıf yapışma kabiliyetine sahip filamentli bakterilerin lezyonda yerleşmesine izin verir. Konakçının diyetinde ve ağız hijyeni uygulamalarında değişiklik olmaması durumunda, diş yüzeyinin kavitasyonu, karyojenik plak topluluğunun büyümesinde ve kavitasyonun genişlemesinde sinerjik biretke oluşturur. Bu, diş yapısının hızlı ve aşamalı olarak tahrip olmasına neden olur.

Mine çürükleri dentin-mine birleşimine (dentinoenamel junction; DEJ) girdiğinde, çürük lezyonun hızlı yanal genişlemesi gerçekleşir çünkü dentin çürük ataklarına karşı çok daha az dirençlidir.

Bu korunaklı, oldukça asidik ve anaerobik ortam, daha önce çürüğün birincil etiyolojik ajanları olduğu düşünülen *Laktobasiller* için ideal bir ortam sağlar, ancak *Laktobasillerin* diş yüzeyine yapışma yeteneği yoktur ve bu nedenle başlangıç çürükleri için etken olma olasılığı düşüktür.

Mine çürüğünün başlamasında muhtemelen en önemli organizmalar *Streptococcus mutans* iken *Actinomyces viscosus*, kök çürüklerinde aktif rol oynayan en olası organizmalardır. Çürük gelişimi ile birlikte, *Laktobasiller* bulundukları yüzeyin özellikleri uygun hale geldiğinde çürük lezyonun önemli sakinleri haline gelir. Asidojenik potansiyelleri ve asidürik yaşam tarzları nedeniyle, *Laktobasiller* muhtemelen dentin çürüklerinin ilerlemesinde çok önemli role sahiptir.

2.5.3.1. Çürük İlerleyişi İle İlgili Klinik Alanlar

Çürük bir lezyonun özellikleri, lezyonun geliştiği yüzeyin doğasına göre değişir. Çürüğün başlaması için birbirinden tamamen farklı üç klinik bölge vardır:

- (a) En duyarlı bölge olan diş minesinin gelişimsel çukurları ve fissürlerinin girintileri;
- (b) Plağı koruyan pürüzsüz mine yüzeyler
- (c) Kök yüzeyleri

Bu alanların her biri farklı yüzey topografyasına ve çevresel koşullara sahiptir. Sonuç olarak, her alan farklı bir plak popülasyonuna sahiptir. Bu farklı lezyon tiplerinin teşhisi, tedavisi ve önlenmesi, her bölgede işleyen farklı etiyolojik faktörleri hesaba katmalıdır.

2.5.4. Çürük Histopatolojisi

2.5.4.1. Mine Çürükleri

Mine, uzun prizmalar halinde düzenlenmiş, çok sıkı bir şekilde paketlenmiş hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Mine prizmaları enine kesitte bir anahtar şeklindedir. Prizmalar, ameloblastların aktivitesiyle oluşur.

Her prizma dentin mine birleşiminden başlar ve tepenin yüzeyine dalgalı, sürekli bir sütun olarak uzanır. Mineralizasyon süreci görünüşte bir şekilde süresizdir ve yüksek ve düşük aktivitenin değişen aşamaları ile karakterize edilir. Düşük aktivite dönemleri, çubuklar içinde "dinlenme hatları" yaratır. Bu dinlenme hatları, komşu prizmalardaki benzer çizgilerle kombinasyon halinde, mine kesitlerinde görülebilen bir yapı oluşturur ve retzius çizgileri olarak adlandırılır. Çatlaklar, nispeten daha yüksek organik içerik ile karakterize edilen bölgelerdir.

Prizma sınırlarındaki hem çizgiler hem de içsel boşluklar, suyun ve hidrojen iyonları gibi küçük iyonların hareketine izin vermek için yeterli gözeneklilik sağlar. Böylelikle mine, küçük moleküllerin serbest hareketine izin vererek ve daha büyük moleküllerin ve iyonların geçişini bloke ederek moleküler bir elek görevi görebilir. Dış minesinin elek benzeri davranışı, yeni başlamış mine çürüklerinin bile bakterilerin nüfuz etmesinden önce neden pulpa tepkisi oluşturabildiğini açıklar. İyonların çürük mine boyunca hareketi, mine yüzeyinin gerçek kavitasyonundan önce alttaki dentinin asitte çözünmesine neden olabilir. Dentin tübüllerinin dış uçlarındaki bu asit saldırısı, bilinmeyen mekanizmalarla pulpa tepkisi başlatır.

Çatlaklar minede daha fazla geçirgenliğe sahip yatay çizgiler oluşturduğundan, muhtemelen pürüzsüz yüzey lezyonlarının yanal yayılmasına katkıda bulunurlar.

Aslında, strialar erken lezyonlarda belirginleşiyor gibi görünmektedir. Oklüzal minede, retzius çizgileri ve mine çubuğu yönleri karşılıklı olarak diktir. Kronun eksenel yüzeylerinde, çizgiler çapraz olarak seyrederek ve yüzeyde hafif çöküntüler halinde sona erer. Çatlakların yüzey tezahürleri, perikimata sırtları arasında uzanan pickerel çizgileridir. Çürükler, tercihen mine prizmalarının çekirdeklerine ve daha geçirgen retzius çizgilerine ilerler, bu da kontakta bulunan mine yüzeyinin zarar görmesini teşvik eder.

Çürük eğilimli hastaların dişlerinde genellikle klinik muayeneden önce temizlenmesi gereken geniş plak birikintileri vardır. Temiz, kuru dişlerde, bir kronun pürüzsüz mine yüzeyindeki en erken çürük kanıtı beyaz bir lekedir. Bu lezyonlar genellikle dişlerin fasiyal ve lingual yüzeylerinde görülür. Beyaz noktalar, yalnızca diş yüzeyi kurduğunda ortaya çıkan ve yeni başlayan çürükler olarak adlandırılan, tebeşirimsi beyaz, opak alanlardır. Bu mine alanları, demineralizasyonun neden olduğu geniş yüzey altı gözenekliliği nedeniyle yarı saydamlığını yitirir. Yeni başlayan çürüklerin beyaz

lekelerini, diş minesinin gelişimsel beyaz nokta hipokalsifikasyonlarından ayırt etmek için özen gösterilmelidir (78).

Yeni başlayan çürükler, mine hidratlandığında (ıslak) görsel olarak kısmen veya tamamen kaybolurken, hipokalsifiye mine göreceli olarak kurutma ve ıslanmadan etkilenmez (Şekil 2.12).

	Nemli Yüzey	Kuru Yüzey	Yüzey Özellikleri	Yüzey Sertliği
Normal Mine	Translüscent	Translüscent	Düz	Sert
Hipokalsifiye mine	Opak	Opak	Düz	Sert
Başlangıç Çürüğü	Translüscent	Opak	Düz	Yumuşak
Aktif Çürük	Opak	Opak	Kavitasyon (+)	Çok Yumuşak
Durmuş Çürük	Opak, Koyu	Opak, Koyu	Pürüzlü	Sert

Şekil 2.12. Yeni başlayan mine çürüklerinin klinik gözlem verileri (78).

Tükürükten gelen kalsiyum ve fosfat iyonları daha sonra mine yüzeyine nüfuz edebilir ve mine lezyonundaki yüksek reaktif kristal yüzeylerde çökebilir. Tükürüğün kalsiyum ve fosfat iyonlarıyla aşırı doygunluğu, remineralizasyon işlemi için itici güç görevi görür. İnsan diş minesinin hem yapay hem de doğal çürük lezyonlarının remineralizasyonu teşvik eden koşullara maruz kaldıktan sonra daha erken histolojik aşamalara gerilediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu remineralizasyon işlemi sırasında eser miktarda florür iyonlarının varlığı, kalsiyum ve fosfatın çökmesini büyük ölçüde artırır, bu da remineralizasyona uğramış minenin aside daha dirençli florapatitin dahil edilmesi nedeniyle müteakip çürük saldırılarına daha dirençli hale gelmesine neden olur. Remineralize lezyonlar klinik olarak sağlam, ancak rengi değişmiş, genellikle kahverengi veya siyah noktalar olarak gözlemlenebilir.

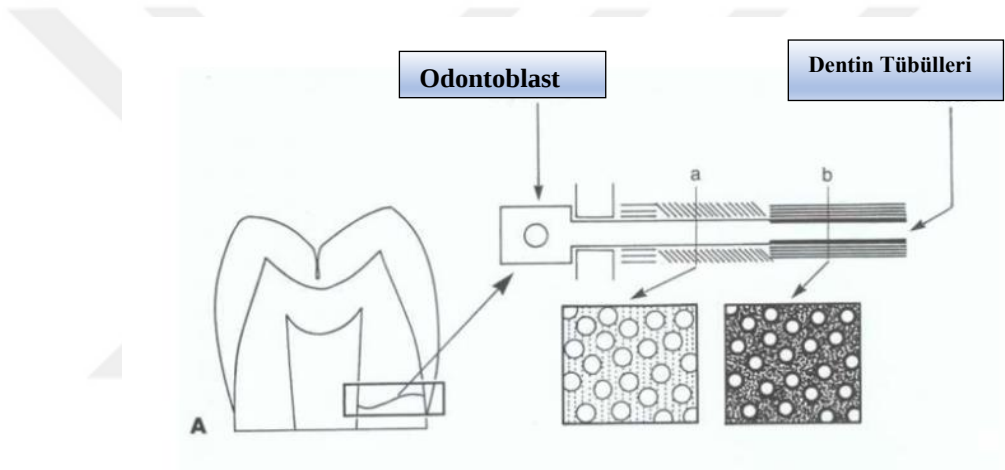
2.5.4.2. Dentin Çürükleri

Dentin, kurondaki mine ve kök yüzeyinde sement ile kaplanan sert dokudur. Dentin, dış pulpa dokusunun çevresi içinde dentinin iç yüzeyini hizalayan odontoblastların kalsifiye ürünüdür. Her odontoblast, bir dentinal tübül içine bir uzantıya sahiptir. Tübüller, pulpadan dentinoenamel bağlantısına kadar tüm dentinin kalınlığını çaprazlar. Tübüller arasındaki boşluğu dolduran intertübüler dentin bir kolajen lifleri ağına gömülü hidroksiapatit kristallerinden oluşan sert ve kemik benzeri bir malzemedir. Tübüllerin duvarları, peritübüler dentin adı verilen pürüzsüz bir mineral tabakasıyla kaplıdır. Normal dentinde tübülü kaplayan ince bir zar her zaman gözlenir. Bu astar zarının

doğası ile ilgili tartışmalar devam etmektedir, odontoblastın gerçek bir plazma zarı olabilir ya da sadece kemik yüzeyinde bulunana benzer bir sınırlayıcı zar olabilir (79).

Membran içindeki materyal, membran odontoblastın bir parçasıysa odontoblastik sitoplazmadır veya membran odontoblastın bir parçası değilse plazmalık bir eksüdadır. Her iki durumda da tübül, intertübüler dentinin remineralizasyonu, peritübüler dentinin eklenmesi ve / veya ağrı algısı için gerekli sıvı hareketine ve iyon taşınmasına izin verir.

Dentindeki çürüğün ilerlemesi, dentinin yapısal farklılıkları nedeniyle üstte yatan minedeki ilerlemeden farklıdır. Sağlıklı dentin görünümünün bilinmesi çürük dentin ilerleyişi için fikir oluşturacaktır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Sağlıklı dentin kesitsel görünümü (78).

Dentin çok daha az mineral içerir ve asitlerin girişi ve mineral çıkışı için bir yol sağlayan mikroskobik tübüllere sahiptir. Dentin-Mine Bağlantısı (DEJ), çürük saldırısına karşı en az dirence sahip alandır ve çürük mineye nüfuz ettiğinde hızlı yanıl yayılmaya izin verir. Bu özelliklerinden dolayı, dentin çürükleri enine kesitte V şeklindedir ve DEJ'de geniş bir tabana sahiptir. Diş çürüğü, dentin içinde mineye göre daha hızlı ilerler çünkü dentin, daha az mineralize içerik nedeniyle asit saldırısına karşı çok daha az direnç sağlar. Çürük, dentin içinde ağrı, demineralizasyon ve remineralizasyon dahil olmak üzere çeşitli yanıtlar üretir. Derin lezyonlarda bakteriyel enfeksiyonu pulpaya yaklaşması haricinde, çürük dentini işgal ettiğinde bile ağrı bildirilmez. Dentin çürüklerinin erken evrelerinde ara sıra kısa süreli ağrı dönemleri hissedilebilir. Bu ağrılar, ağız ortamına kavitasyon ile açılan dentin tübülllerinden sıvının hareket etmesi ile pulpa dokusunun uyarılmasından kaynaklanmaktadır.

Dentinin bakteriyel istilası pulpaya yaklaştığında, toksinler ve hatta muhtemelen birkaç bakteri pulpaya girerek pulpa dokularında iltihaplanma ile sonuçlanır. İlk pulpa iltihabının klinik olarak keskin ağrıların üretilmesiyle belirgin olduğu düşünülmektedir ve her ağrı termal bir uyarıya yanıt olarak sadece birkaç saniye (10 veya daha az) kalmaktadır.

Soğuğa kısa, ağrılı bir yanıt, reversibl pulpitis veya pulpal hiperemiyi düşündürür. Reversibl pulpitis, adından da anlaşılacağı gibi, tahrişe neden olan çürükler zamanında tedavi edilerek ortadan kaldırılırsa dişin iyileşebileceği pulpanın sınırlı bir iltihaplanmasıdır. Pulpa daha şiddetli bir şekilde iltihaplandığında, bir termal uyarı, tipik olarak 10 saniyeden uzun bir süre, uyarının sona ermesinden sonra devam eden ağrı üretecektir. Bu klinik model, çürük temizlendikten sonra pulpanın düzelme olasılığı düşük olduğunda, irreversibl pulpitis düşündürür.

Dişi kurtarmak için restoratif tedaviye ek olarak genellikle pulpa ekstirpasyonu ve kök kanal tedavisi gereklidir. Zonklayıcı ve sürekli devam eden ağrı, yalnızca kanal tedavisi veya pulpa ekstraksiyonu ile tedavi edilen kısmi veya total pulpa nekrozunu düşündürür. Bu klinik özellikler pulpa tedavisi için kılavuzlar olarak yararlı olsa da pulpa semptomlarının geniş ölçüde değişebileceği ve her zaman diş pulpasının histolojik durumunun habercisi olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

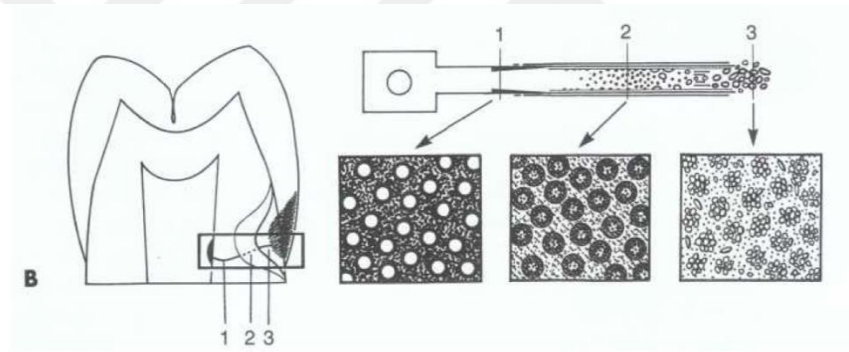
Pulpa-dentin kompleksi, remineralizasyonu başlatmaya çalışarak ve açık tübülleri bloke ederek çürük ataklarına tepki verir. Bu reaksiyonlar odontoblastik aktivite ve fiziksel demineralizasyon ve remineralizasyon sürecinden kaynaklanır. Çürük lezyonunda üç düzeyde dentin reaksiyonu tanımlanabilir:

- (1) Yavaş ilerleyen bir lezyonla ilişkili uzun vadeli, düşük seviyeli bir asit demineralizasyonuna reaksiyon
- (2) Orta yoğunlukta bir saldırıya tepki
- (3) Çok yüksek asit seviyeleri ile karakterize edilen şiddetli, hızla ilerleyen çürüklere tepki

Dentin ve pulpa dokuları canlı kaldığı ve yeterli kan dolaşımına sahip olduğu sürece düşük ve orta yoğunluktaki çürük ataklarına cevap olarak (kendini tamir ederek) tepki verebilir.

Yavaş ilerleyen çürüklerde, vital pulpa, intertübüler dentinin remineralizasyonu ve peritübüler dentinin eklenmesi yoluyla demineralize olmuş dentini onarabilir. Çürük veya hafif çürük ataklarının erken aşamaları, dentin için uzun vadeli, düşük seviyeli asit demineralizasyonuna neden olur. Pulpa dokusunun mikroorganizmalara doğrudan maruz kalması, inflamatuvar bir yanıt için bir ön koşul değildir. Toksinler ve diğer metabolik yan ürünler, özellikle hidrojen iyonu, dentin tübülleri yoluyla pulpaya nüfuz edebilir. Lezyon mineyle sınırlı olsa bile pulpanın inflamatuvar hücrelerle yanıt verdiği gösterilebilir (78).

Dentin, lezyonun ilerleyen enfekte dentin kısmının önünde hem tübüllerin lümeninde hem de etkilenen dentinin intertübüler dentinde kristalin materyalin birikmesiyle ilk çürük demineralizasyon bölümünün uyarısına yanıt verir (Şekil 2.14).

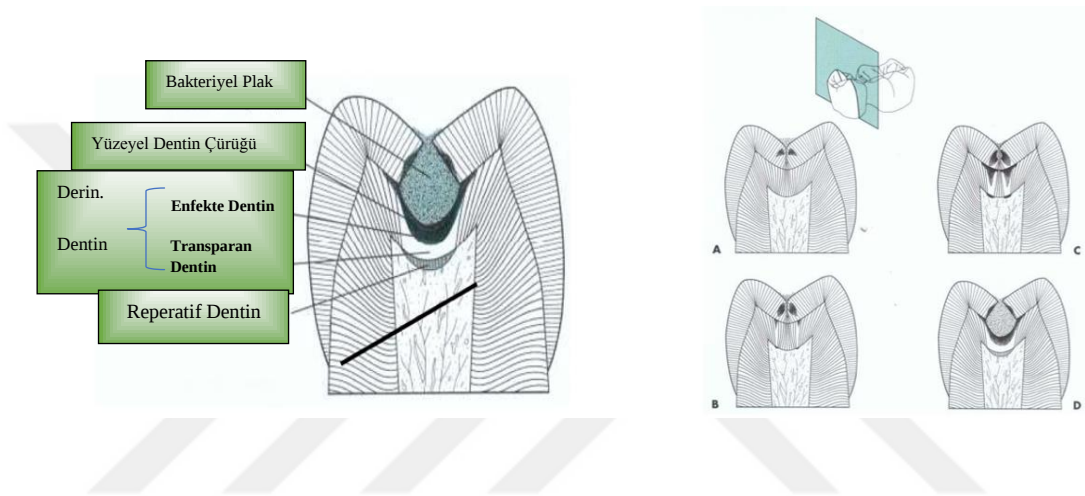


Şekil 2.14. Dentin çürükleri ve dentin tübüllerinin kesitsel görüntüleri (78).

Normal dentinden daha fazla mineral içeriğine sahip olan dentin, sklerotik dentin olarak adlandırılır. Sklerotik dentin oluşumu, yavaş ilerleyen bir lezyonun demineralizasyon cephesinin önünde meydana gelir ve eski bir restorasyon altında görülebilir. Sklerotik dentin genellikle parlak ve daha koyu renklidir.

Karşılaştırıldığında, normal yeni kesilmiş dentin parlak, yansıtıcı bir yüzeyden yoksundur ve sond ucundan biraz penetrasyona izin verir. Sklerotik dentinin görünen işlevi, tübülleri bloke ederek bir lezyonu duvarla örtmektir. Tübül lümen çapındaki azalma nedeniyle sklerotik dentinin geçirgenliği normal dentine kıyasla büyük ölçüde azalır (80). Bu nedenle, bir restoratif materyali sklerotik dentine bağlamak daha zor olabilir.

Etkilenmiş dentinin önünde yer alan dentin tübüllerinin lümeninde kristalin çökeltiler oluşur. Bu tübüller mineral çökeltileri tarafından tamamen tıklandığında, dişin bu bölümü değerlendirme esnasında daha net görünür. Mineral çökeltisinin olduğu bu bölge, şeffaf alan transparant bölge olarak adlandırılır ve hem intertübüler dentindeki mineral kaybının hem dentin tübüllerinde mevcut minerallerin çökmesi ile oluşur. (Şekil 2.15) (78).



Şekil 2.15. Oklüzal dentin ve mine çürüklerinin kesitsel görüntüsü (78).

Oklüzal mine, oklüzal fissürde küçük bir açıklık ile sağlam görünür. Mine, demineralizasyon ile zayıfladığı yerde koyulaşır. Lezyon, yüksek sayıda *S. mutans* ve *Laktobasil* içeren bakteriyel bir tıkaçla doldurulur. Dentin tıkaçın altında enfekte hale gelir Daha derindeki dentin enfekte değildir, ancak büyük ölçüde demineralizedir. Lezyonun altında onarıcı dentin oluşumu başlar.

İkinci düzey dentin yanıtı orta şiddettedir. Daha yoğun çürük aktivitesi, dentinin bakteriyel istilasına neden olur. Enfekte dentin, yüksek asit seviyeleri, hidrolitik enzimler, bakteriler ve bakteriyel hücre kalıntıları dahil olmak üzere çok çeşitli patojenik materyaller veya irritanlar içerir. Bu materyaller, odontoblastların dejenerasyonuna, ölümüne ve lezyonun altındaki tübüler uzantılarda, pulpada hafif bir enflamasyona neden olabilir.

Reperatif dentin, malzemenin tübüllerden difüzyonuna karşı çok etkili bir engeldir ve dentinin onarımında önemli bir adımdır. Şiddetli uyaranlar, reperatif dentine ek olarak

pulpa taşları olarak adlandırılan, bağlanmamış dentinin pulpa odası içinde oluşmasına da neden olabilir. İntertübüler dentinin remineralizasyonu ve peritübüler dentinin eklenmesi veya onarıcı dentin ile dentin onarım yanıtlarının başarısı, çürük saldırısının şiddetine ve pulpanın yanıt verme yeteneğine bağlıdır. Pulpal dokuya kan temini, pulpa tepkileri için en önemli sınırlayıcı faktör olabilir.

Üçüncü düzey dentin yanıtı şiddetli irritasyondur. Çok yüksek asit üretimi seviyelerine sahip akut, hızla ilerleyen çürükler dentin savunmasını aşar ve pulpanın enfeksiyonu, apse ve ölümüyle sonuçlanır. Diğer oral dokularla karşılaştırıldığında, pulpa, iltihaplanmaya karşı düşük dirence sahiptir. Pulpa canlılığının korunması, pulpal dokunun beslemesinin yeterliliğine bağlıdır.

2.5.4.3. İlerlemiş Çürük Lezyonları

Mine lezyonunun gövdesinin artan demineralizasyonu, minenin zayıflamasına ve sonunda çökmesine neden olur. Ortaya çıkan kavitasyon, karyojenik plak için daha da koruyucu ve tutucu bir habitat sağlar ve böylece lezyonun ilerlemesini hızlandırır. DEJ, çürük ataklarına mine veya dentinden daha az direnç gösterir. DEJ'de lezyonun sonuçta ortaya çıkan lateral yayılması, dentinde karakteristik ikinci çürük aktivitesi konisini oluşturur. Nekrotik dentin, klinik olarak ıslak, lapa gibi, kolayca çıkarılabilen bir kitle olarak kabul edilmektedir. Bu dentin tabakası, histolojik görünümde yapısal özelliklerini tamamen kaybetmiştir ve çok sayıda bakteri içerir.

Nadiren, histolojik preparatlarda dentin tübül kalıntıları görülebilir. Nekrotik dokunun çıkarılması, kuru ve kösele gibi görünen daha derin enfekte dentini ortaya çıkarır.

Bakteriyel enfeksiyonun giderilmesi, tüm operatif prosedürlerinin önemli bir parçasıdır. Bakteriler asla lezyonun tamamına kadar nüfuz etmediği için, çürük sürecinden etkilenen tüm dentini çıkarmak gerekli değildir. Operatif prosedürlerde, dentini enfekte veya etkilenmemiş olarak tanımlamak uygundur buna bağlı olarak enfekte dentin temizlenmesi gereken çürük dokusu olarak kabul görür, etkilenmemiş dentin de herhangi operatif işlemde temizlemekten kaçındığımız dentin bölgesini temsil etmektedir.

2.6. Diş Pulpa Dokusu Hücreleri

Diş pulpasının yenilenmesi hasarlı pulpa hücrelerinin tedavi sürecinde çok önemlidir. Restoratif dişhekimliğinde, değişen tedavi kavramları nedeniyle doku rejenerasyonu

giderek önem kazanmaktadır. Rejenaratif prosedürler klinik uygulamalarda aşamalı olarak uygulanmaya başlanmıştır.

Son zamanlarda Duncan ve ark. (29)'ları epigenetik modifikasyonun dental pulpa hücre davranışını etkileyebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmalar, histon deasetilaz inhibitörlerinin (HDACis) enflame pulpal hücre proliferasyonu azaltarak ve mineralizasyonu arttırarak dental pulpa hücrelerinde onarıcı olayları epigenetik olarak teşvik ettiğini göstermiştir. Çalışmalar, HDACis'in osteopontin ve kemik morfojenik protein-2'yi (BMP2) aktivitesini arttırarak mineralleşme ve farklılaşma olaylarını teşvik ettiğini yönünde veriler de sunmuştur (29, 30).

Paino ve ark.'ı (81), HDACis'lerin osteopontin ve kemik sialoprotein ekspresyonunu teşvik ettiğini ve osteokalsin ekspresyonunun down regülasyonuna sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak Hui ve ark.'ları (82) histon asetiltransferaz p300'ün, dentin matriks proteini-1, dentin sialofosfoprotein, dentin sialoprotein, osteopontin ve osteokalsin gibi odontojenik markör genlerin ekspresyonunu modüle ettiğini ve dental pulpa kök hücrelerinde odontojenik farklılaşmayı modifiye ettiğini ileri sürmüştür. Bu nedenle epigenetik değişiklikler, dental pulpa hücrelerinde çekirdek genlerin ekspresyonu ve regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. HDAC'lerin transkripsiyon ve hücre davranışını modüle ederek homeostatik dengeyi düzenlediği geçmiş araştırmalar sonucu elde edilmiş veriler arasındadır (83, 84).

Duncan ve ark. (29), HDACis'lerin restoratif tedavilerde terapötik materyal olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu ileri sürmüştür. Son zamanlarda Hui ve ark. (82) zeste homolog 2 (EZH2)'nin arttırıcısının diş pulpasının iltihabı, proliferasyonu ve rejenerasyonunda bir regülatör olarak etkin rol oynayacağını öne sürmüştür.

Cardoso ve ark. (85)'nın, diş pulpası hücrelerindeki metilasyon paternlerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. İnterferon-gama'nın (IFN- δ) metilasyon paternlerinin sağlıklı ve iltihaplı insan pulpa dokusu arasında farklı olduğuna dair veriler elde etmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada, iltihaplı pulpa dokusunda IFN- δ metilasyonunun azaldığı gözlemlemişlerdir. Son zamanlarda Cardoso ve ark. (110), Toll-benzeri-reseptör2 (TLR2) ve CD14'ün DNA metilasyon kalıplarını sağlıklı ve enflame diş pulpaları üzerinde ifadesini karşılaştırmıştır. Ancak, iki grup arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır.

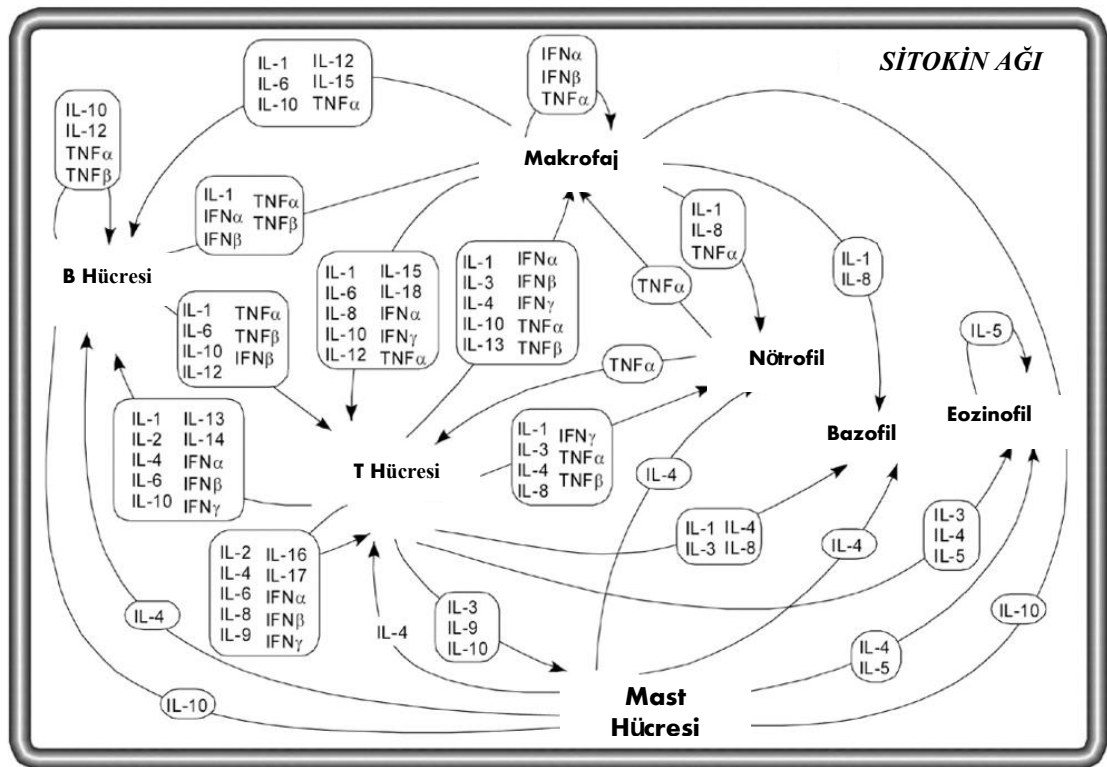
Sun ve ark. (35)'ları, kodlanamayan RNA'ların odontoblast farklılaşmasını ve oral hastalıkları etkileyebileceğini tespit etmişlerdir.

Epigenetik mekanizmaların dental anomalilere ve dentin displazisi ve dentinogenez imperfekta gibi kusurlara neden olabileceğini düşünülmüştür (35). Ayrıca, yarık dudak, yarık damak ve sendromlar gibi dental genetik kusurlar dental kök hücrelerde odontoblast farklılaşması esnasında meydana gelen epigenetik modifikasyonlar ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle dental anomaliler ve epigenetik faktörler arasındaki ilişki ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Her ne kadar diş pulpal doku hücreleri üzerinde epigenetik araştırmalar başlangıç aşamasında olsa da, birçok çalışma diş pulpa dokusu hücrelerini etkileyen epigenetik mekanizmaların önemini vurgulayarak bu mekanizmaların rejeneratif tedavilerin geliştirilmesine katkısı olacağını öne sürülmüştür.

2.7. Diş Pulpal Dokusu Enflemasyonunda Rol Alan Sitokinler

Sitokinler, hücreler tarafından salgılanan küçük proteinlerdir ve hücreler arasındaki etkileşimler, iletişimlerde üzerinde spesifik bir etkiye sahiptirler. Sitokin genel bir isimdir; diğer isimler arasında lenfokin (lenfositler tarafından yapılan sitokinler), monokin (monositler tarafından yapılan sitokinler), kemokin (kemotaktik aktiviteleri olan sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından yapılan ve diğer lökositler üzerinde etkili olan sitokinler) bulunur. Sitokinler, kendilerini salgılayan hücreler üzerinde (otokrin etki), yakındaki hücreler üzerine (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücreler üzerinde (endokrin etki) etki edebilirler (86).

Farklı hücre tiplerinin aynı sitokini salgılaması veya tek bir sitokinin birkaç farklı hücre tipine etki etmesi (pleiotropi) yaygındır. Sitokinler aktivitelerinde gereksizdir, yani benzer fonksiyonlar farklı sitokinler tarafından uyarılabilir. Bir sitokin, hedef hücrelerini ilave sitokinler yapmak üzere uyardığından, genellikle bir kaskad halinde üretilirler. Sitokinler ayrıca sinerjistik veya antagonistik olarak da hareket edebilirler (Şekil 2.16).



Ek olarak, osteoblastlar, osteoklast oluşumunu uyarmak için IL-6 salgılar. Birçok kan damarının düz kas hücreleri ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olarak IL-6 üretir. IL-6'nın bir anti-inflamatuvar miyokin olarak rolüne, TNF- α ve IL-1 üzerindeki inhibitör etkileri ve IL-1ra ve IL-10 aktivasyonu aracılık eder.

Tümör nekroz faktörü (TNF, kaşeksin veya kaşektin; genellikle tümör nekroz faktörü alfa veya TNF- α olarak adlandırılır) bağışıklık sistemi tarafından hücre sinyali için kullanılan küçük bir proteindir. Makrofajlar, bir enfeksiyon tespit ederse, inflamatuvar yanıtın bir parçası olarak diğer bağışıklık sistemi hücrelerini uyarmak için TNF salgırlar. TNF, homolog bir TNF alanına sahip çeşitli transmembran proteinlerinden oluşan TNF süper ailesinin bir üyesidir. TNF-a'nın birincil rolü, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesindedir. TNF, endojen bir pirojen olarak ateş, apoptotik hücre ölümü, kaşeksi ve inflamasyonu indükleyebilir ve tümörijenizi, viral replikasyonu inhibe edebilir ve IL-1 ve IL-6 üreten hücreler yoluyla sepsise yanıt verebilir. TNF üretiminin düzensizliğı, alzheimer hastalığı (88), kanser (89), majör depresyon (90), sedef hastalığıve inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarayol açabilmektedir.

2.7.2. Kemokinler

Kemokinler, küçük sitokinler ailesi veya hücreler tarafından salgılanan sinyal proteinleridir. Adları, yakındaki duyarlı hücrelerde yönlendirilmiş kemotaksiyi indükleme yeteneklerinden türetilmiştir ve kemotaktik sitokinlerdir. Sitokin proteinleri, davranış ve yapısal özelliklerine göre kemokinler olarak sınıflandırılır. Kemotaksiye aracılık etmeleriyle tanınmalarına ek olarak, kemokinlerin tümü kütle olarak yaklaşık 8-10 kilodaltondur ve korunmuş konumlarda 3 boyutlu şekillerini oluşturmak için anahtar olan dört sistein kalıntısına sahiptir.

Kemokinlerin temel rolü, hücrelerin göçüne rehberlik etmek için bir kimyasal uyarın olarak hareket etmektir. Kemokinler tarafından çekilen hücreler, kemokin kaynağına doğru artan kemokin konsantrasyonu sinyalini takip eder. Bazı kemokinler, bu dokularda bulunan antijen sunan hücrelerle etkileşime girerek patojenlerin varlığını tespit edebilmek için lenfositleri lenf düğümlerine yönlendirmek gibi bağışıklık gözetimi süreçleri sırasında bağışıklık sistemi hücrelerini kontrol ederler. Bunlar homeostatik kemokinler olarak bilinir ve kaynak hücrelerini uyarmaya gerek kalmadan üretilir ve salgınlrlar. Bazı kemokinlerin gelişimde rolleri vardır; anjiyogenezi (yeni

kan damarlarının büyümesi) teşvik ederler veya hücreleri hücre sel olgunlaşma için kritik olan spesifik sinyaller sağlayan dokulara yönlendirirler.

Kemokinler fonksiyonel olarak iki gruba ayrılır:

Homeostatik; belirli dokularda yapısal olarak üretilir ve bazal lökosit göçünden sorumludur. Bunlar şunları içerir: CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12 ve CXCL13. Bu sınıflandırma katı değildir; örneğin, CCL20 aynı zamanda pro-enflamatuar kemokin olarak da işlev görebilir (91).

Enflamatuar; bunlar patolojik koşullar altında (IL-1, TNF- α , LPS veya virüsler gibi preinflamatuar uyaranlarda) oluşur ve immün hücreleri enflamasyon bölgesine çekerek enflamatuar yanıtı aktif olarak katılırlar. Örnekler: CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10 (91).

2.7.3. Anti-inflamatuar Sitokinler

Anti-inflamatuar sitokinler, pro-enflamatuar sitokin yanıtını kontrol eden bir dizi immün düzenleyici moleküldür. Sitokinler, insan bağışıklık tepkisini düzenlemek için spesifik sitokin inhibitörleri ve çözünür sitokin reseptörleri ile uyum içinde hareket eder. Enflamasyondaki fizyolojik rolleri ve sistemik enflamatuvar durumlardaki patolojik rolleri giderek daha fazla tanınmaktadır.

Başlıca anti-enflamatuar sitokinler, IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13'ü içerir. Lösemi önleyici faktör, interferon-alfa (INF-a), IL-6 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β , çeşitli koşullar altında anti-inflamatuar veya proinflamatuar sitokinler olarak görev almaktadır. IL-1, TNF-a ve IL-18 için spesifik sitokin reseptörleri ayrıca proinflamatuar sitokinler için inhibitör olarak işlev görebilmektedir (86).

2.7.4. Diş Pulpal Dokusu, Sitokinler ve İmmün Yanıt

Diş pulpal dokusu, sert mineralize materyal ile çevrili son derece özel bir mezenkimal doku iken, odontoblastlar ve stromal fibroblastlar bu boşluktaki ana hücrelerdir (92). Bu özel doku, apikal bölgeden çıkan bir kan damarı ve sinir demetleri ağı tarafından beslenir ve uyarılır (93).

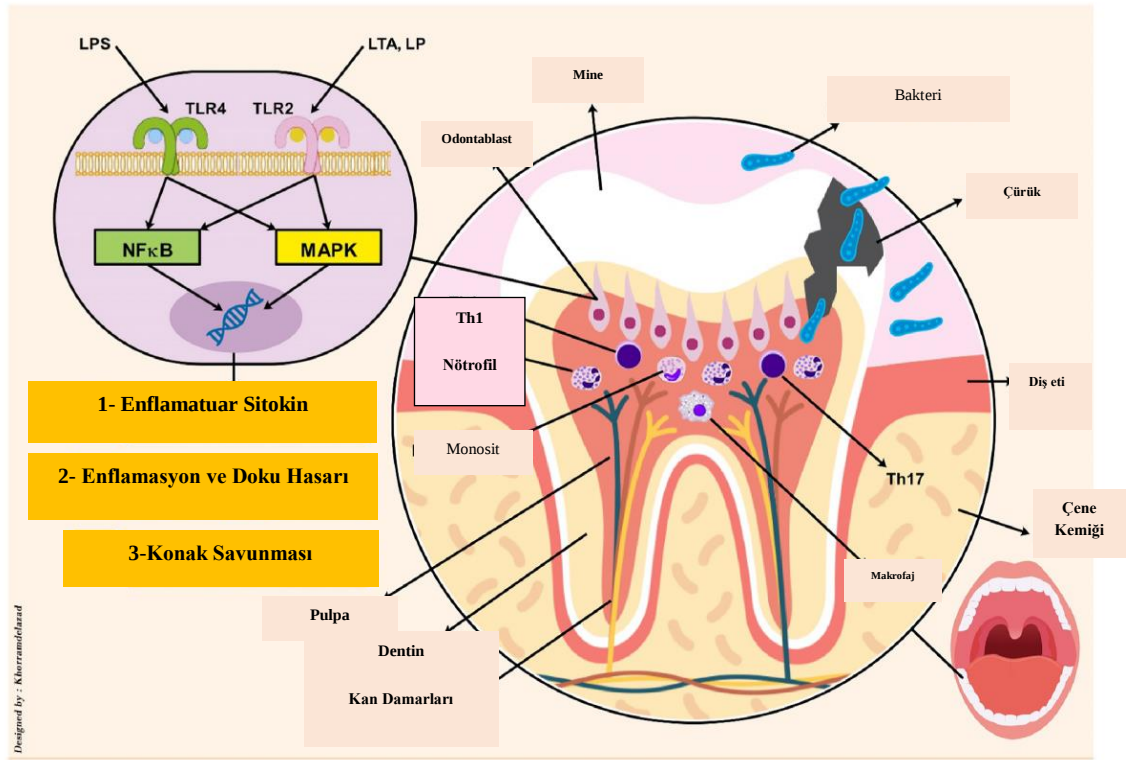
Odontoblastlar ve stromal fibroblastlarla birlikte, farklılaşmamış mezenkimal kök hücre popülasyonları ağırlıklı olarak perivasküler niş ve immün hücreler içinde gözlenir (43).

Normal koşullar altında, nötrofiller bu bölgedeki ana hücre popülasyonunu oluşturur, ancak diş pulpasında dendritik hücreler ve bazen makrofajlar da gözlenebilmektedir.

Enfeksiyöz ajanların uzaklaştırılması ve onarımın teşvik edilmesi nedeniyle, bahsedilen hücreler, odontoblastlar tarafından mekanik bariyerlerin oluşturulması, nöral lifler tarafından duyuların iletilmesi, dental pulpa kök hücre farklılaşması ve immün hücreler tarafından inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretilmesi dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip olabilir (94). Önceki çalışmaların bulguları, diş dokusunda lenfatik sistem ve lenfatik damarların bulunduğunu göstermektedir, ancak bu damarları bu alanda bulunan kan damarlarından ayırt etmek için uygun bir biyobelirteç tam olarak oluşturulmamıştır (95, 96).

Mekanik, kimyasal, mikrobiyolojik ve termal faktörleri içeren çeşitli faktörlerin diş pulpa dokusunu etkilediği bilinmektedir. Bu uyarıcılar, enflamatuvar bağışıklık tepkilerini tetikleyebilir ve vasküler değişikliklere, bağışıklık hücrelerinin birikmesine ve nihayetinde doku hasarına neden olabilirler (97) (Şekil 2.17).

Diş pulpa dokusu benzersiz anatomik koşullara sahiptir ve diş pulpası açığa çıkana kadar fagosit hücreler bakterileri öldüremez. Bu arada diş çürükleri enflamatuvar yanıtta önemli role sahiptir ve bakteriyel invazyon ve çürük miktarının düşük olduğu durumlarda pulpa dokusu, bağışıklık bileşenlerini ve enflamatuvar reaksiyona bağlı oluşacak bakteriyel istila oranını azaltmak için tepki gösterebilir (98). Kanıtlar, intratübüler immünoglobulinler, nöropeptidler, odontoblastlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, olgunlaşmamış dentritik hücre (DC) 'ler ve T hücrelerinin yanı sıra bunların sitokinleri ve kemokinlerinin çürüğe karşı erken enflamatuvar reaksiyondan sorumlu olduğunu göstermiştir (98, 99). Nöropeptitler, bağışıklık hücrelerini doğrudan uyarabilir ve bunlara yanıt verebilir. Ayrıca artan vasküler geçirgenlik, bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonuna neden olur ve iltihaplanma bölgesinde sitokinler ve kemokinler gibi bağışıklık araçlarının konsantrasyonunu artırır.



Şekil 2.17. Enflamasyon, doku hasarı ve bakterilerin ortadan kaldırılması olay zinciri. TLR: Toll benzeri alıcı; Th: T yardımcı; LPS: Lipopolisakkaritler; LTA: Lipoteikoik asit; LT: Lipopeptid; MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz; NFκB: aktifleştirilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir artırıcısı bu enflamatuvar reaksiyon zincirinde görev almaktadır (100).

Nöropeptitler, bağışıklık hücrelerini doğrudan uyarabilir ve bunlara yanıt verebilir. Ayrıca artan vasküler geçirgenlik, bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonuna neden olur ve iltihaplanma bölgesinde sitokinler ve kemokinler gibi bağışıklık araçlarının konsantrasyonunu artırır.

Sonuç olarak, bu faktörlerin toplamı odontojenik pulpa ağrısına, pulpitis, kemik rezorpsiyonuna, pulpa nekrozuna ve apikal periodontitise yol açar. Pulpitiste, CD14, TLR-2 ve TLR4'ü eksprese eden hücrelerin aracılık ettiği vasküler değişiklikler ve IL-8, IL-6, IL-1 sitokinlerinin aktivitesi ile immün yanıt oluşur. Pulpitis, enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanması ile başlar (CCL2, CCL5 vd.).

Akut pulpitis modelinde TLR4'ün inflamatuvar yanıtlara dahil olduğunu kanıtlamak için Lin ve ark. (101)'nin yapmış olduğu çalışmada TLR4'ün, TLR4 antagonistleri tarafından bloke edilmesinin, sinyalleme adaptör moleküllerini, tümör nekroz faktörü-α

(TNF- α) ve IL-1'i önemli ölçüde aşağı regüle ettiğine dair bulgular sunmuşlardır (101). Ayrıca Farges ve ark.(102)'ları odontoblastların TLR2 yoluyla oral patojenlere karşı dental pulpa immün tepkisine katıldığını ve bu tip hücrelerin IL-8 ve IL-6 dahil olmak üzere inflamatuvar sitokinler üretebildiğini öne sürmüldür.

2.8. Diş Pulpası Enflamasyonundaki Epigenetik Düzenlemeler

Diş pulpasını etkileyen birden çok tipik inflamatuvar hastalık mevcuttur. Pulpadaki yıkıcı ve onarıcı süreçlere aktif olarak katılan sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere inflamatuvar mediatörlerin lokal birikimi bu inflamatuvar hastalıklar için karakterizedir (103). Bakteriyel enfeksiyonlar, pulpa hastalıklarında en önemli etiyolojik faktörler arasında yer almaktadır (104). Bakteriler ve toksinleri, pulpal inflamatuvar süreçler sırasında doğrudan stimülasyonda önemli bir role sahiptir (105, 106). Enflamasyon ve onarıcı süreçler arasındaki denge, pulpa enflamasyonunun derecesini ve çoklu sinyal yollarının dahil olduğu etkilenen dişin canlılığında önemli role sahiptir (106-108). Patolojik koşullar altında, odontoblastlar tarafından salgılanan dentin matriksi, gelişen travmaya bağlı olarak indüklenerek onarıcı süreci uyarılmasında görev almaktadır (109). Bununla birlikte, hastaların başlıca şikayetine göre, klinik olarak pulpanın hafif/şiddetli iltihaplanma gibi inflamatuvar durumunu bilmek çok zordur. Ek olarak, odontoblastların sitolojik durumunu hastalardaki pulpa inflamatuvar durumla açıklamak zordur, çünkü diş pulpa dokusu üzerinde (hastalar veya deney hayvan modellerinden) işlenen pulpal histoloji klinik bulgularla iyi bir şekilde ilişkili değildir.

Doku rejenerasyonunun, enflamasyon ve onarım arasındaki denge sonucu oluştuğu gerçeği göz önüne alındığında, dentin matriks proteinlerinin etkisi, pulpa iltihaplanmasını önlemektedir (110). Enfeksiyon kontrolünün, klinik sonuçlarının iyileştirilmesinde anahtar faktör olduğu bildirilmiştir (111, 112).

Epigenetik, periodontitis ve pulpa kaynaklı inflamatuvar hastalıklarda önemli role sahiptir (82, 113). Epigenetik modifikasyonlar potansiyel olarak geri dönüşümlüdür ve bu nedenle, değişikliklerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması, inflamatuvar hastalıklar için yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasında kolaylık sağlayabilecektir (114).

Enfekte pulpa ve periodontal dokulardaki inflamatuvar reaksiyonlar, gen ekspresyonunda değişikliklere neden olabilecek epigenetik modifikasyonları etkilemekte ve

tetiklemektedir (115). Dental pulpa enflamasyonu ile ilgili araştırmalar, epigenetik modifikasyonların dental pulpa hücrelerinin davranışını etkileyebileceğine dair bulgular sunmuştur (30, 31).

2.8.1. Diş Pulpası Enflamasyonunda DNA Metilasyonu

Diş hekimliği alanındaki son çalışmalarda DNA metilasyon paternleri enflamasyon ile değişikliğe uğrayabildiği gösterilmiştir (37).

Sitokin genlerinde CpG metilasyonunu değerlendiren az sayıdaki çalışmaya rağmen, ilk bulgular periodontitis gibi enflamatuvar hastalıkların patogenezinde metilasyonun önemi hakkında fikir vermiştir (116). Kronik periodontitiste DNA metilasyon paternlerinde değişiklikler ve sitokin genlerinin ekspresyonu gözlenebilmiştir.

IFN-gama, makrofaj ve endotelyal hücrelerde çürüğe karşı gelişen ilk pulpal yanıtta enflamatuvar aracı olarak görev almaktadır. IFN-gama pulpa iltihabı sürecinde bağışıklık tepkisini etkileyebilir (117). IFN-gama promotöründeki CpG metilasyonu, IFN-y üretiminin negatif transkripsiyonel bir regülatörü olarak kabul edilir (118). İltihaplı reaksiyon gelişmi pulpa dokularında yüksek IFN-gama, mRNA prevalansı saptanmıştır ve bu pulpa dokusundaki enflamatuvar yanıtın ilk aşamasıdır (119). Verilere ek olarak yapılan çalışmalarda, farelerin mononükleer hücrelerinde metillenmemiş gen sekanslarının yüksek seviyelerde IFN-gama ve mRNA ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir (120). Diş pulpasında iltihabi reaksiyon gelişiminin varlığı, IFN-gama'nın promotör bölgesinde DNA metilasyonu kaybı ile ilişkili görülmüştür. Diş pulpa dokusundaki enflamasyon, tamamen metillenmişten kısmen metillenmiş bir IFN-gama durumuna geçiş ile karakterizedir. Bu bulgular, epigenetik olayların dental pulpadaki IFN-gama modülasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (120).

Ayrıca, Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) geninin promotör hipometilasyonunun artmış pro-enflamatuvar yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir (59). Birçok çalışmada iltihabi pulpa dokularında TLR'lerin ekspresyon seviyesinde bir artış olduğunu gözlemlenmiştir (121). TLR'ler pulpa dokusu onarımında kritik olan osteogenezi ve odontogenez üzerinde etkin rol oynamaktadır (122).

DNA metilasyon profilinin pulpa dokusu enflamasyonu açısından araştırılması, enflamatuvar hastalıklarda bağışıklık tepkisinin gelişimi ile ilgili moleküler mekanizmaları daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

2.8.2. Diş Pulpası Enflamasyonunda Histon Modifikasyonları

Histon modifikasyonlarının gen ekspresyonu üzerinde farklı etkileri vardır (123). Örneğin, histon metilasyonu aktive edilmiş veya bastırılmış bir kromatin durumuna sebep olabilir. H3'ün lizin kalıntıları, 4 ve 36 üzerinde üçlü metilasyonu, aktif transkripsiyona yol açan açık bir kromatin yapısını desteklemektedir (124). Lizin kalıntıları 9 ve 27 üzerinde histon metilasyonu, kromatinin kondenzasyonu ve dolayısıyla gen susturulmasına yol açmaktadır (125).

H3K27 üzerindeki histon metilasyonunun diş pulpa iltihabı ve onarıcı süreçlerde rol oynadığı bildirilmiştir (82, 126). İltihaplı pulpa dokusu ve pulpa hücrelerinde H3K27me3'ün azaldığı ve bununla diş pulpa dokusu rejenerasyon sürecini indükleyebileceği gösterilmiştir (82). Yine Jumonji ailesinin bir üyesi olan Jmjd3, histon H3K27 izlerini silen bir enzimdir. Jmjd 3, bakteriyel ürünlere ve enflamatuar sitokinlere maruz kalan makrofajlarda indüklenebilmektedir. Son zamanlarda makrofajların farklılaşma ve hücre kimliğini kontrol ettiği yönünde bulgular tespit edilmiştir. Bu nedenle, enflamasyon ile epigenomun yeniden programlanması arasında bir bağlantı düşünülmüştür (127).

Histon modifikasyonlarının mekanizmasında yer alan EZH2 epigenetik bir belirteç olarak işlev görebilir (128). Normal ve iltihaplı diş pulpalarında farklı Jmjd3 ve EZH2 ifadeleri tanımlanmıştır. Bu veriler ışığında EZH2'nin diş pulpa enflamasyonunun bir düzenleyicisi olarak kabul edilebileceğini ön görülebilir (82).

Diğer önemli histon modifikasyonu, histon asetilasyonudur (129). Asetilasyon işlemi homeostatik olarak iki grup hücresel enzim, histon asetiltransferazlar (HAT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından dengelenmiştir (130). Histon deasetilaz inhibitörlerinin (HDACis), proliferasyonu azaltarak ve mineralizasyonu artırarak dental pulpa hücrelerinde onarıcı olayları epigenetik olarak teşvik edebileceği öne sürülmüştür. HAT'lar tarafından histon asetilasyonu, enflamatuar genleri aktive edebilirken, artmış HDAC aktivitesi, enflamatuar gen baskısına neden olmaktadır (131, 132).

Çeşitli pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-8 ve IL-12) promotörleri, transkripsiyonel aktivasyona yol açtığı bilinen bir HAT olan CBP / p300 tarafından hızla asetillenir (66). Ayrıca p300 yıkımı, diş pulpa hücrelerinin proliferasyonunu ve odontojenik farklılaşma potansiyelini kısıtlayabilmektedir (73). Mevcut bilgiler, bu mekanizmaların daha fazla araştırılması ihtiyacının yanında HAT'ın pulpa enflamatuar

süreçlerinde önemli rollere sahip olabileceğini göstermiştir. Enflamasyondan sonra birkaç sitokin ve kemokinin promotörlerinde histon H3'ün asetilasyonu, bu bölgelere NF- κ B'nin artmasına neden olabilir. HDAC2, NF- κ B'ye bağlı enflamatuar genleri inhibe ederek bu işlemi tersine çevirebilmektedir (133).

Yukarıdaki araştırmalar, histon asetilasyon modülasyonunun, restoratif diş hekimliği alanında inflamasyon kontrolü, onarım ve rejenerasyon dahil klinik uygulamada uygulanabileceğini öne sürmektedirler (29).

2.8.3. Diş Pulpası Enflamasyonunda miRNA'lar

MicroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası seviyedeki hedef genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır (115). Pulpitis gibi oral enflamatuar hastalıkların enflamatuar tepkisinde birden fazla miRNA bulunabilir (134).

34 çeşit miRNA, iltihabi pulpalarda normal ile karşılaştırıldığında azalan regülasyona uğradığına dair bulgular göstermiştir; bunlardan biri olan miR-221'in, Toll benzeri reseptör (TLR) sinyal yollarında bağışıklık yanıtı gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda rol oynadığını düşündürmüştür (134). Üç miRNA, miR-150, miR-584 ve miR-766, sağlıklı pulpal doku ile kıyaslandığında iltihabi pulpada artan regülasyon göstermiştir (115). miR-155 ve miR-147 gibi miRNA'ların bağışıklık ve enflamatuar yanıtı düzenlemede önemli roller oynayabildiğine dair bulgular mevcuttur (135). Kültürlenmiş makrofajların lipopolisakarite (LPS) maruz bırakılması, makrofaj aktivasyonu sırasında pro-enflamatuar sitokinlerin düzenlenmesinde yer alan miR-155'in artan regülasyonu ile sonuçlanmaktadır (136). MiR-155 eksikliği olan dendritik hücreler, antijenlere yanıt olarak etkili T hücresi aktivasyonunu indükleyememiştir (137).

Buna karşılık, miR-125b'in makrofajlarda lipopolisakkarit (LPS) stimülasyonu üzerinde azalan regülasyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu, mikrobiyal uyaranlara yanıt olarak makrofajların uygun bir enflamatuar yanıtı sağlamak için miR-125b'nin gerekli olduğunu düşündürmüştür (137). Ayrıca miR-147, makrofajlarda TLR'nin neden olduğu enflamatuar yanıtı zayıflatır (138). MiR-146a, TRAF6 sinyalleme molekülünü bloke ederek reseptör sinyalini sınırlar (139). Bir başka araştırmada, miR-105'in TLR-2 regülasyonunu düzenlediğine dair bulgular elde edilmiştir (74).

Son zamanlarda, enflamatuar genlerin TLR4'e bağımlı yeniden programlanmasına miRNA'lar (miR-221, miR-579 ve miR-125b) aracılık edebileceği öne sürülmüştür (75). Dendritik hücrelerin doğuştan gelen tepkisinin ve antijen sunum kapasitesinin negatif bir regülatörü olan miR-152, IL-12, IL-6 ve TNF-a dahil sitokinlerin üretimini engellediğine dair veriler mevcuttur. miR-152'ye benzer doğal yanıtın negatif bir düzenleyicisi olan miR-148, dendritik hücrelerin antijen sunma kapasitesini de düzenlemede görev almaktadır (115).

Bu üyeler arasında IL-6'yı düzenlediği bilinen miR-181a bulunur (140); CCL8'i düzenlediği bilinen miR-181b; IL-2'yi düzenleyen miR-181c (141); ve MMP9 ekspresyonunu düzenleyen miR-181d 181 üyeden sadece birkaçıdır. Bu bulgular, miRNA'ların inflamasyon ve bağışıklıktaki spesifik rollerini ve pulpal patolojinin temel yönlerini vurgulamaktadır. miR-146a'nın dental pulpa enflamatuar süreçte dahil olabilecek IL-17 ekspresyonuna katıldığı bildirilmiştir (142). miRNA'ların endodontik patogeneizde de rol oynayabileceğini öne sürülmüştür.

2.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 1980'lerde Dr. Kary Mullis tarafından geliştirildi. Teknik, belirli bir DNA dizisini tanıma ve yüksek sayıda kopyayı hızlı ve doğru bir şekilde sentezleme yeteneği nedeniyle bir “moleküler fotokopi makinesi” ile karşılaştırılmıştır (143). PCR, moleküler biyolojide ve özellikle kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların teşhisinde, genotiplemesinde devrim yarattı. PCR, 20. yüzyılın en büyük bilimsel keşiflerinden biri olarak kabul edilir.

Bugüne kadar, orijinal PCR yöntemine dayanan çeşitli spin-off teknikleri geliştirilmiştir. Kantitatif PCR (qPCR) olarak da bilinen gerçek zamanlı PCR, PCR amplifikasyonunu ve tespitini tek bir adımda birleştirir. Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) olarak bilinen başka bir teknik, nükleik asit başlangıç şablonu olarak RNA'yı kullanır.

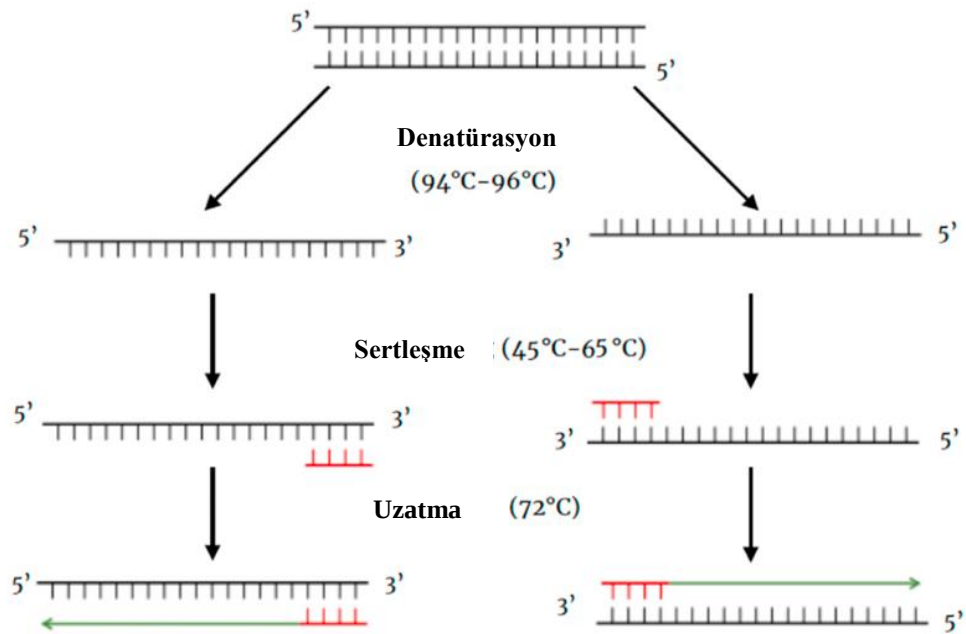
PCR, tüm canlı hücreler tarafından hücre bölünmesinden önce genetik materyallerini kopyalamak için kullanılan fizyolojik bir süreç olan in vitro ve temel bir DNA replikasyonu biçimine benzer (144).

DNA şablonu, DNA polimeraz, primerler ve nükleotidler içeren bir reaksiyon karışımının tekrarlanan ısıtma ve soğutma döngülerini içerir. DNA şablonu, hedef diziyi

içeren DNA'dır. Primerler, ilgili spesifik hedef DNA'yı konumlandıran ve tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla soğutma üzerine ona bağlanan kısa nükleotid zincirleridir. Yeni tamamlayıcı ipliği oluşturmak için DNA polimeraz için bir başlangıç noktası görevi görürler. DNA polimeraz, hedef diziyeye tamamlayıcı yeni DNA zincirlerini sentezleyen bir enzimdir.

Her PCR döngüsü üç adımdan oluşur:

- 1- Denatürasyon—Hidrojen bağlarını parçalayarak DNA'nın çift sarmalını çözmek için 90°C'nin üzerine ısıtılan reaksiyon karışımıdır
- 2- Primer Sertleşme—Primer sertleşmesine izin vermek için 45–65°C'ye soğutulan reaksiyon karışımı. İleri ve geri primerler, tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla DNA'nın zıt ipliklerine hibritlenir. Şablon DNA'nın antiparalel sarmalının 3' uçlarını tamamlayıcı olmalıdırlar.
- 3- Uzatma—Reaksiyon karışımı, DNA polimeraz enzim aktivitesi için en uygun sıcaklığa doğru 72°C'ye ısıtılır. Polimeraz, primer şablon hibrit kompleksine bağlanır ve daha sonra reaksiyon karışımındaki serbest nükleotidleri kullanarak yeni bir tamamlayıcı iplik oluşturur (Şekil 2.18).



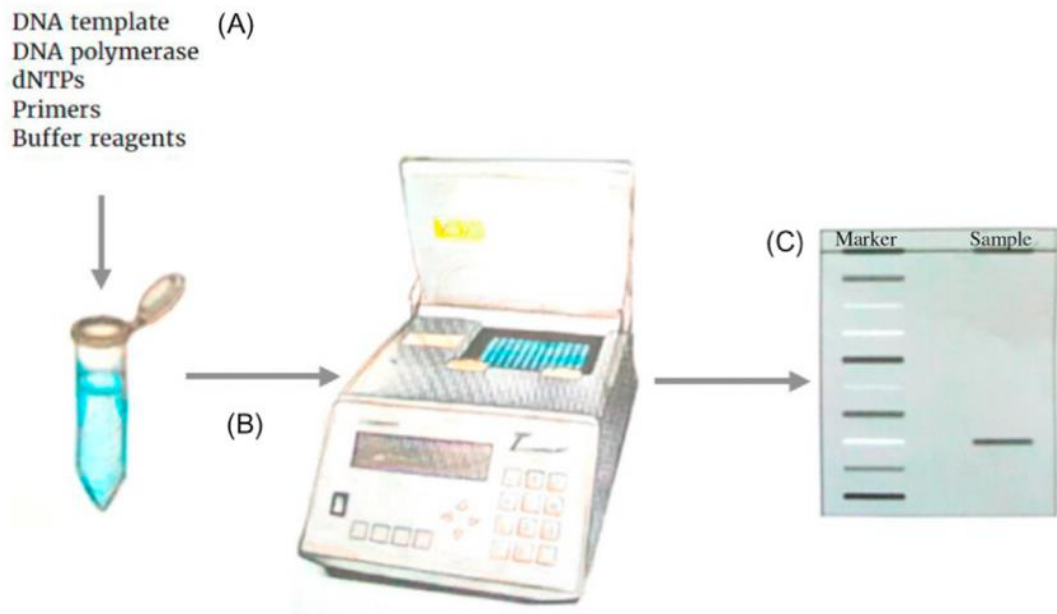
Şekil 2.18. PCR'nin ilk döngüsü. Denatürasyon, sertleşme, uzatma (144).

Uzatmanın ardından reaksiyon, denatürasyon aşamasına geri döndürülebilir ve reaksiyon devam eder. Her döngü, DNA miktarını yaklaşık olarak iki katına çıkarır, çünkü yeni bir DNA dizisi daha sonra bir sonraki döngüde replikasyon için bir şablon görevi görür.

Bu, DNA miktarında üstel bir artışa neden olur. Örneğin, 6 döngüden sonra 26 kopya vardır. PCR ürününün beklenen verimine bağlı olarak toplam 25-40 PCR döngüsü gerçekleştirilir (144).

2.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Ürün Analizi

PCR ürünü veya "amplikon", DNA ürünlerini boyut ve yük temelinde ayıran agaroz jel elektroforezi kullanılarak görselleştirilebilir ve analiz edilebilir (Şekil 2.19). Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (qPCR), bu tür amplifikasyon sonrası analizleri gerektirmez ve bunun yerine ürün, reaksiyon boyunca “gerçek zamanlı” olarak analiz edilir. Jel elektroforezi, bir agaroz jel üzerindeki bir elektrik alanında yüklü moleküllerin ayrılmasını ve ardından etidyum bromür ile boyamayı içerir. Primer dimerler gibi PCR yan ürünleri, jelin dibine yakın dağınık, lekeli bantlar olarak görünür. Bir PCR reaksiyonunu doğrulamanın diğer yolu, amplikonu doğrudan sıralamaktır.

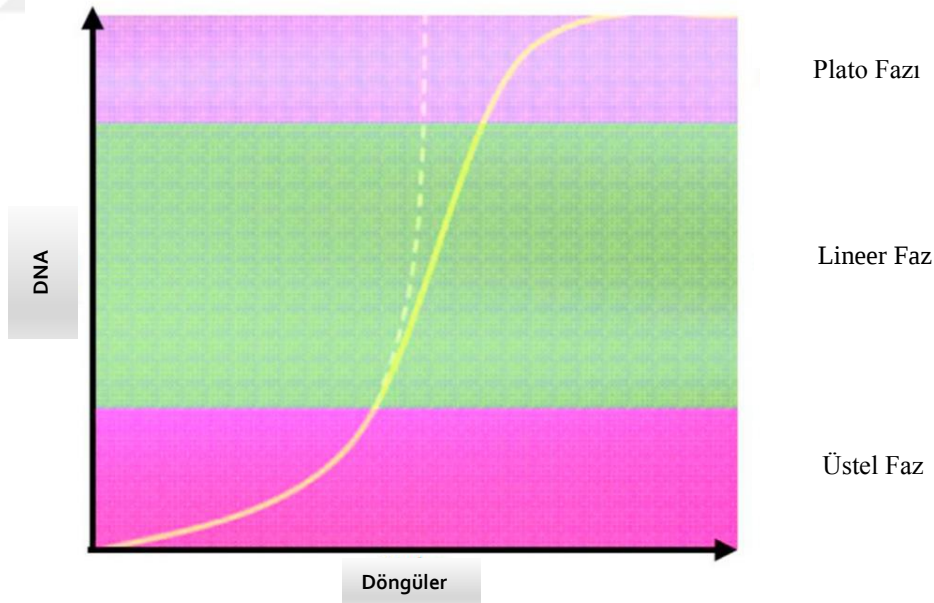


Şekil 2.19. PCR deneysel tasarımı.

(A) Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA şablonu, DNA polimeraz, deoksinnükleotit trifosfatlar (dNTP'ler) ve oligonükleotit primerleri gibi bileşenler gerektirir. (B) PCR reaksiyonları termal döngüleyiciye yerleştirilir. (C) DNA parçasının boyutu jel elektroforezinde değerdendirilir (145).

2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Fazları

PCR reaksiyonu üç aşamaya ayrılabilir bunlar; Üstel, Lineer ve Plato fazlarıdır (Şekil 2.20). Üstel faz sırasında, reaksiyon bileşenleri fazladır ve her döngüde ürünün tam olarak ikiye katlanması vardır. Lineer aşamada, reaksiyon bileşenleri tükenmeye başlar ve sonuç olarak reaksiyon yavaşlar. Plato fazında reaksiyon durur ve daha fazla ürün oluşmaz. Reaktiflerdeki azalma, her PCR tüpündeki farklı reaksiyon kinetiği nedeniyle değişen oranlarda meydana gelecektir. Tükenme oranları lineer fazda değişmeye başlayacak ve her numune farklı bir noktada plato olacaktır. Bu nedenle, kopyalanmış DNA şablon örnekleri bile, aynı miktarla başlamasına rağmen, plato fazında farklı kopya numaralarıyla sonuçlanabilir (145).



Şekil 2.20. PCR amplifikasyon eğrisinin aşamaları (145).

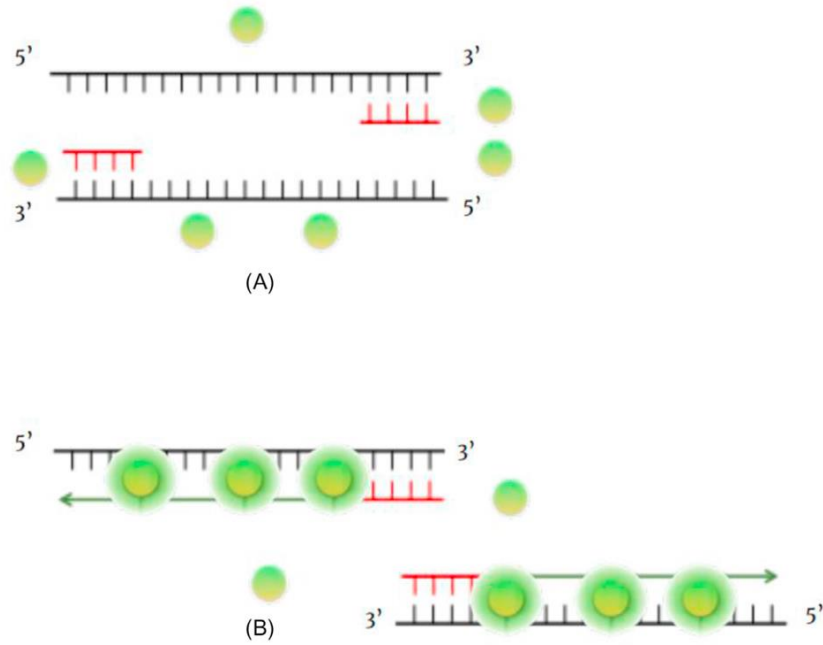
Ürünün tam olarak ikiye katlanması, üstel faz sırasında her döngüde birikir. Lineer fazda, bileşenler tüketildikçe reaksiyon yavaşlar. Plato fazında reaksiyon durur ve daha fazla ürün yapılmaz.

Üstel aşama, yüksek kaliteli nicel veriler sağladığı için veri analizi için idealdir. Konvansiyonel PCR, lineer ve plato fazlarından gelen verileri nicelleştirir. Bu nedenle, geleneksel PCR'dan elde edilen veriler en iyi ihtimalle yalnızca yarı niceliksel olarak kabul edilebilir ve gen ifadesinde yalnızca on kat bir değişikliğin saptanmasına izin verir. Gerçek zamanlı PCR adlı PCR varyantı, PCR reaksiyonunun üstel fazında ölçüm yaparak gen ekspresyonunda iki kat değişikliğin saptanmasına olanak tanır (146).

2.9.3. PCR Yönteminin Varyasyonları

2.9.3.1. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

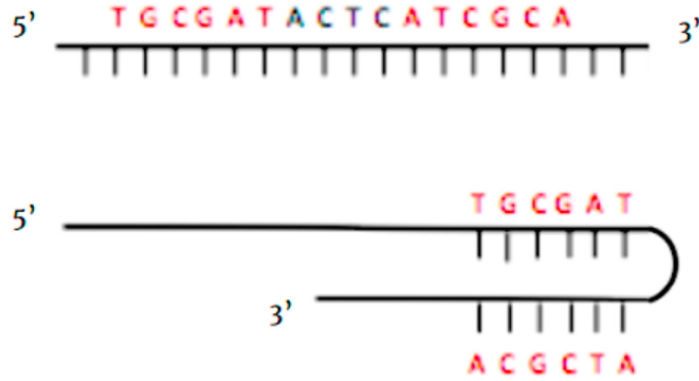
Son yıllarda, PCR'nin teknolojik bir yeniliği olan kantitatif PCR (qPCR), klinik teşhiste giderek daha önemli hale geldi. Kantitatif PCR (qPCR), reaksiyon ilerledikçe hedef DNA'nın saptanmasına ve miktarının belirlenmesine izin verir. Çeşitli floresan kimyaları, PCR ürün konsantrasyonunu floresan yoğunluğuyla ilişkilendirir (147). En yaygın kullanılan floresan DNA bağlayıcı boya SYBR Green I'dir. Çift sarmallı DNA'ya bağlandığında floresan yayar ve floresan yoğunluğu PCR ürününün konsantrasyonuyla orantılı olarak artar (Şekil 2.21).



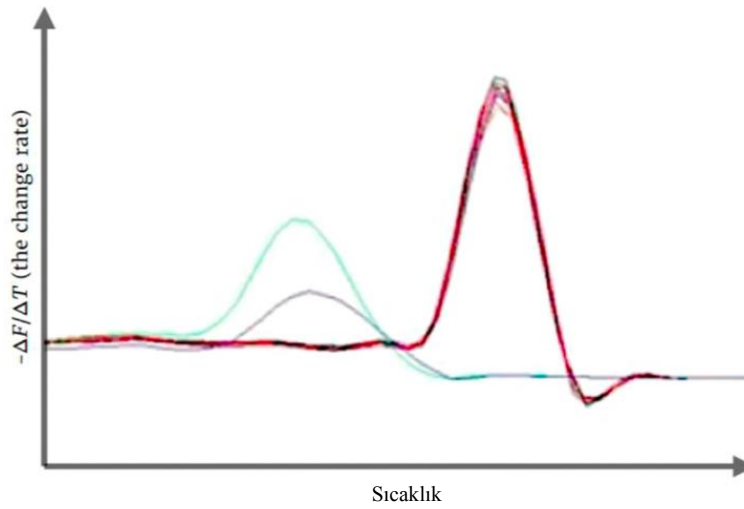
Şekil 2.21. SYBR Green I Dye eylemi. (A) DNA denatüre olduğunda, SYBR Green I Dye serbestçe yüzer ve düşük floresan yayar. (B) SYBR Yeşil Boya çift sarmallı ürüne bağlanır ve floresan verir (148).

SYBR Green I, primer dimerler gibi spesifik olmayan ürünler de dahil olmak üzere herhangi bir çift sarmallı DNA'ya bağlanabilir (148). Bu nedenle, yalnızca seçilen hedef diziyeye bağlanan primerleri dikkatlice tasarlamak önemlidir. Ek olarak, sonuçları doğrulamak ve belirli ürünü sağlamak için boya bazlı yöntemler kullanılırken bir "erime eğrisi" gereklidir. PCR çalışmasının sonunda, reaksiyon karışımı yaklaşık 60°C ila 95°C arasında bir sıcaklık gradyanına maruz bırakılır ve sürekli olarak floresan okumaları toplanır. Belirli bir sıcaklıkta, amplifiye edilen ürün tamamen ayrışır. Bu, SYBR Green I ayrıştıkça floresan emisyonunda hızlı bir düşüşle sonuçlanır.

Çift sarmallı DNA, uzunluğuna, Guanin-Sitozin içeriğine ve baz çifti uyumsuzluklarının ve ikincil yapıların varlığına göre farklı sıcaklıklarda erir (Şekil 2.22). Bu nedenle, bir numunede kaç tane amplifikasyon ürününün bulunduğunu doğrulamak mümkündür. Bağlanma spesifikse, ilgili spesifik ampikonu temsil eden grafikte tek bir sıkı tepe görünmelidir. Primer dimerleri bunun yerine daha düşük sıcaklıklarda daha kısa daha geniş dalgalılar olarak görülür (149) (Şekil 2.23).



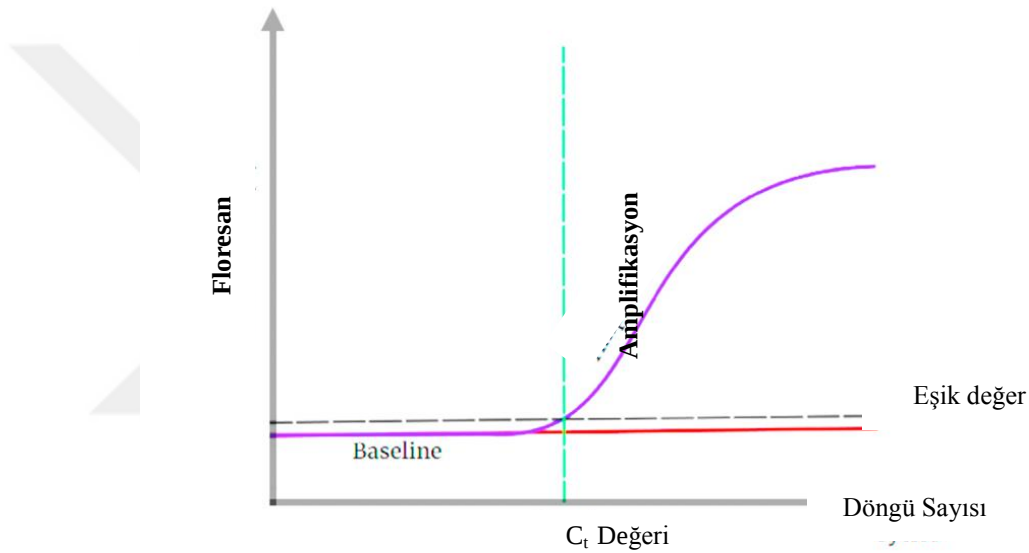
Şekil 2.22. Tek sarmallı nükleik asit dizilerinin uzunluğu içinde tamamlayıcı dizilerin mevcudiyeti nedeniyle, ikincil bir toka yapısı oluşabilir (149).



Şekil 2.23. Bir qPCR testinden erime eğrisi analizi. Tek bir sıkı tepe noktasına sahip tek tip bir erime eğrisi, yalnızca ilgilenilen hedef DNA'nın üretildiği anlamına gelir. Soldaki daha küçük bir tepe, primer dimerler için ayrışma eğrisine karşılık gelebilir (149).

Elde edilen qPCR floresan verileri, X ekseninde döngü numarası ve Y ekseninde floresan ile bir amplifikasyon grafiği üzerinde çizilebilir (Şekil 2.24). Reaksiyonlar, bir PCR ürününün amplifikasyonunun ilk tespit edildiği PCR döngüsü ile karakterize edilir

(150). Amplifikasyon grafiğindeki taban çizgisi, ortalama arka plandır. Eşik, taban çizgisinin üzerindeki floresan seviyesidir. Genellikle otomatik olarak hesaplanır ve üstel fazda ortalama temel değerlerin üzerindeki üç standart sapmaya karşılık gelir. Eşik döngüsü (C_T değeri), floresan sinyalinin arka plan seviyesini aşarak eşiği geçtiği döngü olarak tanımlanır. Buna göre, numunedeki hedef DNA miktarı ne kadar büyük olursa, floresans eşiği o kadar çabuk geçer ve daha düşük bir C_T verir (150).



Şekil 2.24. qPCR amplifikasyon grafiği.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) döngüsü sayısına karşı taban çizgisinden çıkarılan floresan. Eşik döngüsü (C_T), reaksiyonun floresan sinyalinin belirlenen eşik çizgisini geçtiği döngü sayısıdır (150). Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) tahlillerinin normalleştirilmesi için iki ana yöntem vardır: mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyon (151). Mutlak veya göreceli nicelemenin gerekli olup olmadığı, yanıtlanması gereken deneysel soruya bağlıdır.

Örneğin, bir numunedeki hedef moleküllerin tam sayısını, örneğin belirli bir kan miktarındaki viral partiküllerin sayısını ölçmek için mutlak kantifikasyon kullanılır. Alternatif olarak, numuneler arasındaki gen ekspresyonunu karşılaştırmak ve

ekspresyondaki kat farkını hesaplamak için göreceli kantifikasyon/nicelleme kullanılabilir.

2.9.3.2. Tersine Transkripsiyonel PCR (RT-PCR)

Ters transkripsiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (RT)-PCR, RNA hedeflerini arttırmak/amplifiye etmek için kullanılır. RNA şablonu, reverse/tersine transkriptaz enzimi tarafından tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) daha sonra PCR kullanılarak üstel amplifikasyon için bir şablon görevi görür. RT-PCR bir veya iki adımda gerçekleştirilebilir (152).

Tek aşamalı RT-PCR, RT reaksiyonu ve PCR reaksiyonunu aynı tüpte birleştirilmesi sonucunda meydana gelir. Yalnızca diziye özgü primerler kullanılabilir.

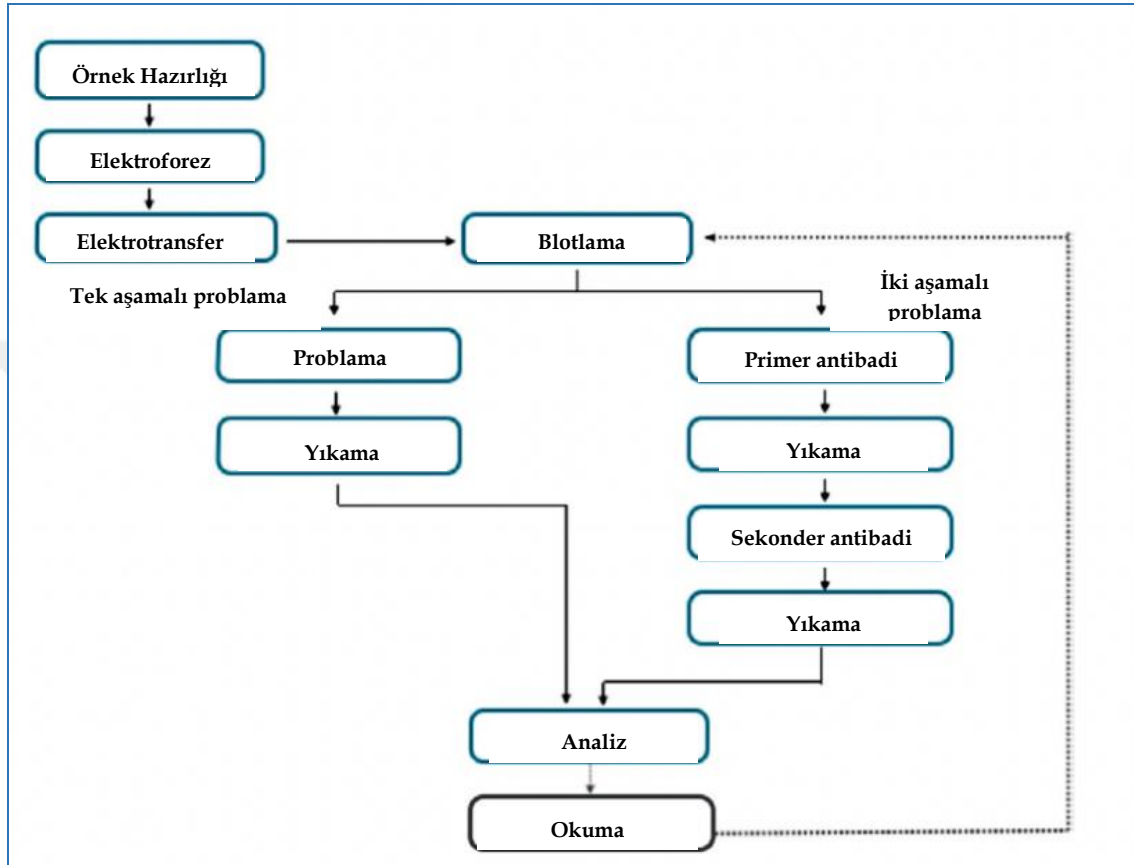
İki aşamalı RT-PCR sırasında, sentezlenen cDNA, PCR için ikinci bir tüpe aktarılır. Oligo (dT) primer, rastgele heksamer primer veya gene özgü primerler kullanılabilir. Oligo (dT) primerleri genellikle mikrozomal (mRNA) RNA'larda (kopyalanmış gen dizileri) 3' poli (A) kuyruklarına hibritleştikleri için tercih edilirken, rastgele primerler ribozomal RNA dahil her şeyi hazırlayabilme kapasitesine sahiptir (152). Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları vardır. Tek aşamalı reaksiyonların kurulumu daha kolaydır ve yüksek verimli tarama için idealdir. İki aşamalı reaksiyonlar, tek bir RNA örneğinden birkaç mesajın tespiti için idealdir.

2.10. Western Blot

Western blotlama veya protein immünoiblotlama, bir hücre veya doku örneğinden spesifik proteinleri saptamak için kullanılan popüler bir laboratuvar tekniğidir. Teknik ilk olarak Towbin ve ark.(156)'larının 1979'da ve Burnette tarafından 1981 yılında (153), DNA, Southern blot (154) ve RNA, Northern blot (155) tespiti için kullanılan benzer tekniklerle eşleşmek üzere türetilmiştir (153, 156).

Western blot, jel elektroforezi ile proteinleri boyutlarına göre ayırmayı gerektirir. Daha sonra, proteinlerin ilgili proteine karşı bir antikor ile problemlenen bir zara elektrotransfere takip eder. Bu teknik, bir numunede belirli bir proteinin varlığını saptamak, fosforilasyon gibi translasyon sonrası değişiklikleri değerlendirmek ve protein komplekslerini karakterize etmek için çok güçlüdür. Western blot varyasyonları olmasına ve belirli bir uygulama için protokolü optimize edebilmesine rağmen, vakaların çoğunda Western blot, esas olarak kullanılan antikorların üretimi ve

karakterizasyonunda yalnızca ince ayarlarla hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Western blot prosedürünün akış şeması (153).

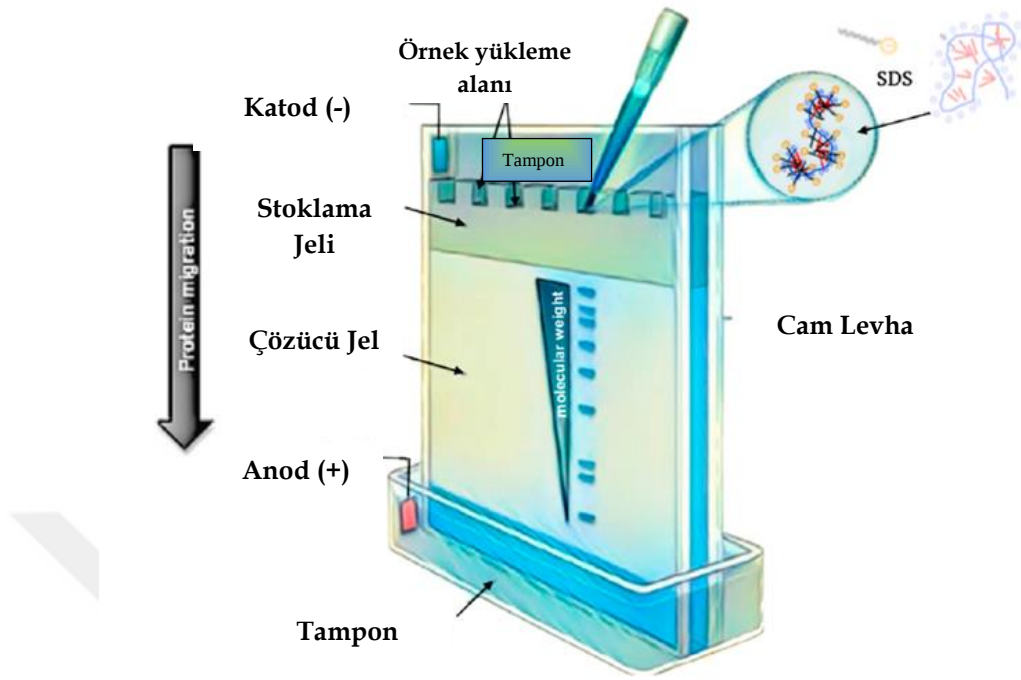
Proteinlerin uyarılara tepkilerinin araştırılması, protein ekspresyonunun yok veya artmış-azalmış olarak değerlendirilmesi, hücreye özgü protein izoformlarının belirlenmesi ve genetik hastalıkların oluşmasından sorumlu proteinlerin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Blotlama (boyama) bir karışımdaki moleküllerin varlığını ölçmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknik ile eşitli ayırım ve tespit yöntemleri kombine edilerek, hücrelerin farklı moleküllerinin sentezi belirlenir, antijenleri tanımlanarak analizi yapılabilir (157).

Western blot'ın ilk adımı numunenin hazırlanmasıdır. Proteinleri çıkarmak ve çözmek için dokularda mekanik veya enzimatik homojenizasyondan önce gelen hücrelerin parçalanmasını gerektirir. Hücresel yapılara (çekirdek, sitoplazma, plazma zarı vb.) ve hücre tipine (örneğin memeli hücreleri, bakteriler, maya) bağlı olarak farklı lizis tamponu kullanılabilir. Tipik olarak, bir tamponlama maddesi (örneğin, Tris-HCl), sodyum klorür gibi tuzlar, deterjan bozucu lipidler ve protein bozulmasını önlemek için proteaz inhibitörlerinden oluşur (158).

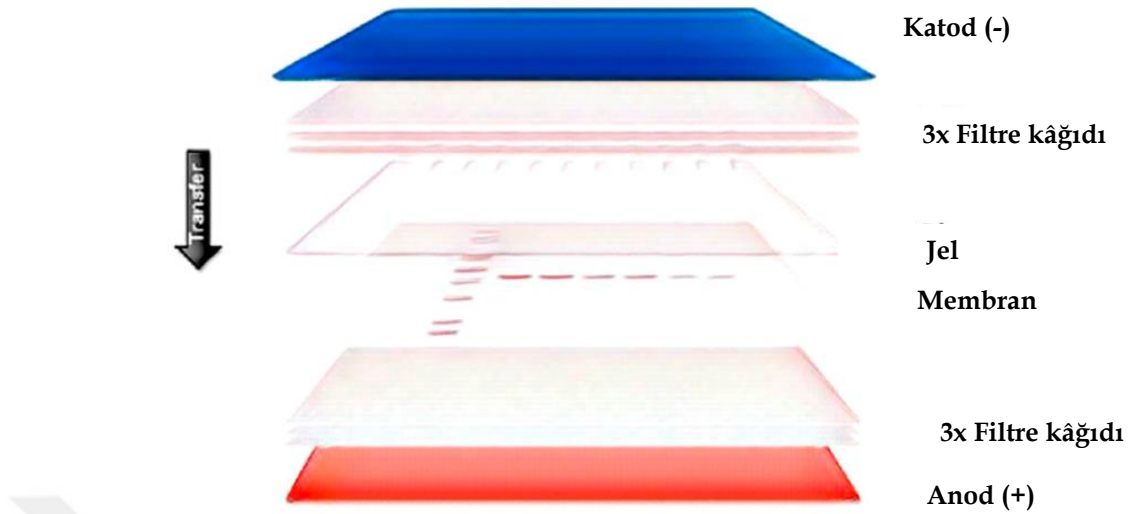
Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik deterjanlar güçlü çözücü maddelerdir ancak aktivitelerini ve etkileşimlerini bozan proteinleri denatüre ederler. İyonik deterjanlar ayrıca sonikasyonla parçalanması gereken kromatinin salınması nedeniyle numunenin viskozitesinde bir artışa neden olur. Buna karşılık, noniyonik (NP-40, Triton X100) ve zwitteriyonik (CHAPS) deterjanlar daha yumuşaktır ve daha az denatüre edicidir. Hücre lizizi, proteazların ve fosfatazların salınmasına yol açar, bu nedenle numuneler 4°C'de tutulmalıdır ve uygun inhibitörlerin kullanılması gerekir. Proteinlerin tamamen denatürasyonunu sağlamak için numuneler genellikle 95°C'de 5-10 dakika kaynatılır, ancak uzun süreli kaynatma protein bozulmasına veya agregasyonuna neden olabilir (158).

Numuneler daha sonra proteinleri yapılarına ve izoelektrik noktalarına (doğal-PAGE) veya boyutlarına göre (SDS-PAGE) ayıran poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) tabi tutulur. Proteinlerin, bir elektromanyetik alana maruz kaldıklarında jel gözeneklerinden geçmek için negatif bir yüke sahip olmaları gerekir. SDS-PAGE'de, tüm proteinler, SDS'nin bağlanması nedeniyle negatif olarak yüklenir (Şekil 2.26).



Şekil 2.26. SDS-Page elektroforezinin şeması. Elektromanyetik alanın uygulanması, proteinlerin anoda (+) doğru göç etmesine neden olur (158).

PAGE ile ayrılan proteinlerin daha sonraki işlemler için jelden elektroforetik transfer (veya elektrotransfer) ile bir zara aktarılması gerekir. Bir zarın jele sıkıca temas ettiği ve bir transfer tamponu içinde filtre kağıdı arasına sıkıştırıldığı bir leke sandviçi hazırlanır. Hava kabarcıkları aktarımı engelleyeceğinden jel ile membran arasında iyi bir temas sağlamak önemlidir. Proteinleri jelden membrana aktarmak için jel yüzeyine dik olarak bir elektromanyetik alan uygulanır (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. Yarı kuru transferde blot sandviçin şeması (158).

Blot sandviç, bir zarın üzerine yerleştirilmiş ve transfer tamponuna batırılmış üç filtre kâğıt tabakası arasına yerleştirilmiş bir poliakrilamid jelden oluşur. Elektromanyetik alan üzerine proteinler katottan (-) anoda (+) doğru göç ettiğinden, zarın jel ile anot (+) arasına yerleştirilmesi gerekir.

Transferin etkinliği proteine (ör. boyut, bileşim), protokole (ör. transfer süresi, tampon) ve ekipmana (ör. elektrotların tipi ve konumu) bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir (158).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 2019/611 sayılı, 11.09.2019 tarihli etik kurul kararı ile onaylanmıştır (Ek-1). Çalışmanın tamamı Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Tüm hastalardan işlem esnasında bilgilendirilmiş onam formu ile izin alınmıştır (Ek-2).

Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu. TDH-2020-9976).

3. Doku Örneklerinin Toplanması ve İzolasyonu

3.1. Doku Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya sistemik problemi olmayan 18-38 yaş aralığında kadın ve erkek hastalar dahil edildi.

Sağlıklı pulpa (SP) grubuna ait doku örnekleri, 20 farklı hastadan elde edildi. Hastalardan alınan dişler, maksiller ve mandibular ark ayrımı yapılmadan, gömülü ve yarı gömülü lokasyonel problemleri ortadan kaldırmak amacı ile çekilmiş 3.molar dişlerden elde edildi. 20 adet SP grubuna ait doku örneklerinin, 10 adeti RT-qPCR çalışmaları, 10 adeti Western blot analizleri için kullanıldı.

Radyolojik olarak D3 seviyesinde tespit edilen derin dentin çürüklü dişlere ait etkilenmiş pulpa (EP) dokusu örnekleri 20 farklı hastadan elde edildi. Hastalardan alınan dişler, maksiller ve mandibular ark ayrımı yapılmadan klinik bulguları nedeniyle çekim endikasyonu konulmuş 3.molar dişlerden elde edildi. 20 adet EP grubuna ait doku örneklerinin 10 adeti RT-qPCR çalışmaları, 10 adeti Western blot analizleri için kullanıldı.

3.2. Doku Örneklerinden Pulpa Dokusunun İzolasyonu

Dişler çekim sonrası %70 'lik etil alkol ile temizlenerek üzerindeki yumuşak doku artıkları uzaklaştırıldı. Ardından mine-sement birleşim noktasından 5 mm apikalde elmas frezler ile (pulpaya zarar vermeden) ufak kesiler oluşturuldu. Dişin kron kısmı cerrahi pensler ile kesi hattından kırıldıktan sonra pulpa dokusu elde edildi ve doku örnekleri iki parçaya ayrıldı.

Birinci parça doku örnekleri, Quantitative Real Time PCR (RT-qPCR) analizinde kullanılmak üzere 1-2 ml RNAlater RNA stabilizasyon solüsyonu içeren 1,5 mL'lik tüplere alındı. Böylece, RNA stabilizasyon solüsyonu ile doku örneklerindeki RNA'nın saklama süresi boyunca stabil kalması sağlandı. Doku örnekleri 2-8 °C'de bir gece bekletildikten sonra -80 °C'de saklandı. İkinci parça doku örnekleri, Western blot analizinde kullanılmak üzere 0.001 mol/L EDTA (pH 8.0), 1 µg/L Aprotinin ve 100 µg/L benzil sülfürlü florid içeren 1,5 mL'lik tüplere alınıp -80 °C'de saklandı.

3.3. Diş Pulpa Dokularına Ait Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Uygulanması (RT-qPCR)

3.3.1. Diş Pulpal Dokusundan Total RNA İzolasyonu

-80°C'de Kantitatif Real Time PCR (RT-qPCR) analizinde kullanılmak üzere her biri ayrı purezol (TriPure Isolation Reagent, Sigma) tüpü içinde bulunan dondurulmuş pulpa dokuları (10 derin dentin çürüklü/10 sağlıklı diş pulpası) oda ısısında 5 dakika bekletilerek çözüldü. Sonrasında dokular enjektör yardımıyla homojenize edildi. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 15 saniye vorteks yapıldı. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. 12000 g'de 20 dakika +4 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir 1,5 mL'lik tüpe alınıp üzerine (aköz faz miktarına bağlı olarak) 300 µl izopropanol eklendi ve birkaç kez alt üst edildi. Tüpler oda ısısında 10 dakika inkübe edildikten sonra 12000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant kısım atıldı. Dipte kalan pellet kısmı üzerine 1 ml %75' lik etanol eklenerek vortekslendi. Sonrasında 7500 g'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilerek pellet yıkandı. Santifüj sonrası oluşan süpernatant atılarak pellet etrafındaki etanol pipetle alınıp temizlendi. Tüpler 20 dakika etanol uçana kadar oda ısısında kurutuldu. Kurutma işleminden sonra RNA'yı içeren pelletlerin üzerine 20 µl NFW (Nuclease Free Water) eklenerek pellet resüspanse edildi. Daha sonra +4°C buzdolabında 15 dakika

bekletildikten sonra Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000) ile izole edilen RNA saflıkları ve konsantrasyonları (ng/ μ l) ölçüldü. Örnekler kullanılabilecek -20 °C’de saklandı.

3.3.2. cDNA Sentezi

iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad) protokolü takip edilerek konsantrasyonları belirlenen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Tablo 3.1’de içeriği verilen cDNA sentez kokteyli kalıp RNA hariç olmaksızın buz üzerinde hazırlandı. Hazırlanan kokteyli etiketlenen PCR tüplerine 15’er μ L bölüştürüldü. Her bir RNA örneğinden kendi tüpüne 5 μ L (1000 ng) eklendi. Tablo 3.2’de sunulan parametrelerde tersine transkripsiyon işlemi CFX Connect Real-Time PCR detection System (BioRad) cihazında gerçekleştirildi. Protokol tamamlandıktan sonra cDNA örnekleri -20 °C’de bekletilerek reaksiyon durduruldu ve örnekler kullanılabilecek -20°C’de saklandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. cDNA İzolasyon Kokteyli

cDNA Kokteyli Bileşenleri	Hacim (μ L)
Reaksiyon Buffer(5x)	4
Kalıp RNA	5
Su, PCR	9
Enzim Karışımı (10x)	2
Total	20

Tablo 3.1. Tersine Transkripsiyon Protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre (dakika)
1	+42 °C	15
2	+85 °C	5
3	+65 °C	15
4	+4 °C	Sonsuz

3.3.3. Ekspresyon Çalışması (RT-qPCR)

Hedef genlerin ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi amacıyla CFX Connect Real-Time PCR detection System (BioRad) cihazında, SsOAdvanced Universal IT SYBR Green Supermix (BioRad) kiti kullanılarak ‘quantitative RT-PCR’ çalışmaları gerçekleştirildi. Tablo 3.3’te içeriği verilen kokteyl cDNA’lar hariç her bir örnek için hazırlandı. 96 kuyucuklu plağa hazırlanan kokteyl 15’er μL dağıtıldı. cDNA’lar ilgili kuyucuklara 1’er μL eklendi. Plate dikkatlice kapatıldı ve santrifüj edilerek cihaza yerleştirildi. Tablo 3.4’te verilen parametreler ile PCR çalışmaları 45 döngü olarak gerçekleştirildi. Bütün örnekler manipülasyondan dolayı doğabilecek hataları önleyebilmek amacıyla çift tekrarlı çalışıldı. Referans gen olarak Tablo 3.5’te primer dizisi verilen TATA Box Binding Protein (TBP) referans geni kullanıldı. İşlem sonunda Ct (eşik değer siklusü) değerleri $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ metodu kullanılarak hesaplandı ve referans gen Ct değerleri ile normalize edildi. Hedef gen olarak Histon H3-4, IL-6, TLR2 kullanıldı primer dizileri Tablo 3.6’da detaylandırılmıştır.

Tablo 3.2. RT-qPCR Kokteyli Bileşenleri

RT-qPCR Bileşenleri	Hacim (μL)
SYBR Green Supermiks	10
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Su, (Nuclease Free)	8
cDNA	1
Total	20

Tablo 3.4. RT-qPCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre
1	95 °C	3 dk
2	95 °C	5 dk
3	60 °C	15 sn
4	40 °C	30 sn

Tablo 3.5. Çalışmada Kullanılan Referans Gen için Primer Dizileri

Referans Genler	Primer Pozisyonu	Primer Dizisi
TBP	GAGTTCTGGAAGGTTTCAGGTTG CGTGGTTTCGTGGCTCTCTT	5' 3'

Tablo 3.6. Çalışmada Kullanılan Hedef Genler için Primer Dizileri

Hedef Genler	Primer	Primer Dizisi
H3-4	CAAGGTGGCTCGAAGA GCCGAGGTCGGTCTTAAA	5' ..3' 5'...3'
IL6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	5'.. 3' 5' ..3'
TLR2	GGAAGCTGGTGGCAATAACT GTGCTGTCCTGTGACATTCC	5'.. 3' 5'.. 3'

3.4. Protein İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Western blot çalışmaları için hazırlanarak -80°C’de saklanan insan kaynaklı diş pulpal dokularından (10 adet derin dentin çürüklü/ 10 adet sağlıklı diş) Tri-reagent (Invitrogen) protokolüne uygun olarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından izole edilen proteinlerin Bradford belirteci ile konsantrasyonları belirlendi. Sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin (BSA)) (Biorad) standart olarak kullanılarak elde edilen standart eğri grafiği yardımıyla protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.5. Western Blot Uygulaması

Örnekler, SDS-PAGE jelle her bir kuyucukta 50 µg protein olacak şekilde yüklendi. Biorad elektorforez sistemi ile 100 Voltta yürütülerek proteinlerin elektorforetik ayrımı gerçekleştirildi. Elektroforezin tamamlanmasının ardından ayrımı gerçekleştirilen proteinler jelden nitroselüloz membrana (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sırası ile; blot kâğıdı, nitroselüloz membran, jel ve blot kâğıdı sıralaması yapılarak

transfer edildi. Membran %5 (w/v) yağsız süt tozu (Blotting- Grade Blocker (#170-6404)) içeren TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl) içerisinde 1 saat bloklandı. Daha sonra 20 dakika süre ile 2 kez %0,5 (v/v) Tween 20 (Sigma, P1379) içeren TBS (TBS-T) ile yıkandı. Primer antikorlarla işaretleme amacı ile membran 12-16 saat, +4⁰C’de çalkalanarak inkübe edildi (Tablo 3.7). İnkübasyon sonrası 20 dakika süre ile 2 kez TBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. HRP ile konjuge edilmiş sekonder antikor (anti-mouse ve anti-rabbit, 1:5000 (Pierce-Thermo) %5 yağsız süt tozu içinde hazırlanan) ile 1 saat inkübe edildi. Clarity Western ECL Substrate (Biorad, #1705061) solüsyonu ile sinyal almak için görüntüleme işlemi yapıldı. Hiperkaset (Amersham Autoradiography cassette, 24x30 cm, RPN11643) içine yerleştirilen membranlar 1-10 dakika karanlık odada inkübe edilip membrandaki protein bantları hiperfilme (Amersham Hyperfilm ECL, 50 sheets, 18x24 cm 28906836) aktarıldıktan sonra film developer (Developer, ILFORD Multigrade, Katalog No:757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam, Katalog No:1758285) geçirilerek, distile su ile yıkandı ve ardından kurutuldu. Daha sonra bu filmler Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarıldı. Referans protein olarak 1/400 oranında TBS-T içerisinde dilüe edilen Beta-aktin (β -aktin) antikoruna kullanıldı. Blotlama işlemi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında mevcut olan SynGene G Box sistemi ile yapıldı. Membrandaki spesifik bantların optik yoğunluğu Image J yazılımı (National Institutes of Health, USA) ile ölçülerek, β -aktin’nin optik yoğunluğuna göre normalize edildi. Her membrandaki standart besleme grubunun normalize edilmiş değerine göre bağlı değerlere çevrildi.

Tablo 3.7. Western Blot Çalışmasında Kullanılan Hedef Antibody Bilgileri

Hedef Antibody	Primer Antibody	Dilüsyon Oranı
Acetyl H3	Acetyl-Histone H3 (Cell Signaling, Lys9/Lys14) Antibody	1:2000
IL-6	Anti-IL-6 (Santa Cruz, sc-130326) Antibody	1:2000
TLR2	Anti-TLR2 (Santa Cruz, sc-21759) Antibody	1:2000
IFN-gamma	Anti-IFN- γ /Interferon gamma (Santa Cruz, sc-8423) Antibody	1:2000

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Çürüksüz pulpa ve çürük pulpa dokusu örneklerinde gruplar arasında (2 grup seviyesi) istatistiksel karşılaştırması Bağımsız T-Testi (Independent T-Test) ile analiz edilmiştir. Veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

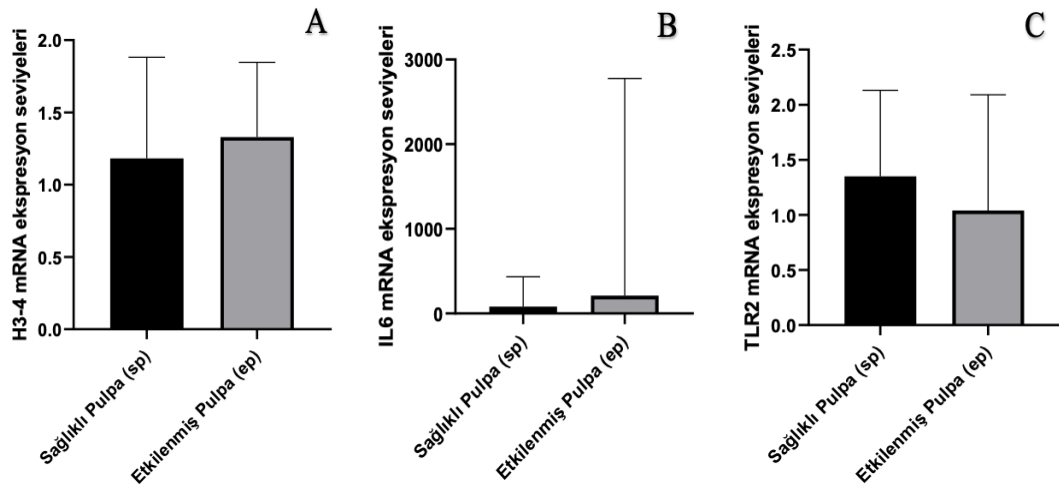
4.1. Diş Pulpa Dokusu Hücrelerinin RT-qPCR Bulguları

4.1.1. Hedef Genlerin RT-qPCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

Sağlıklı (n=10) ve etkilenmiş pulpa (n=10) dokularındaki genetik değişimlerin ve inflamasyon yanıtı gelişiminin mRNA seviyesinde karşılaştırılması amacı ile IL-6, TLR2 ve Histon H4 genleri kullanılarak RT-qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin normalizasyonu amacı ile TBP referans gen olarak kullanılmıştır.

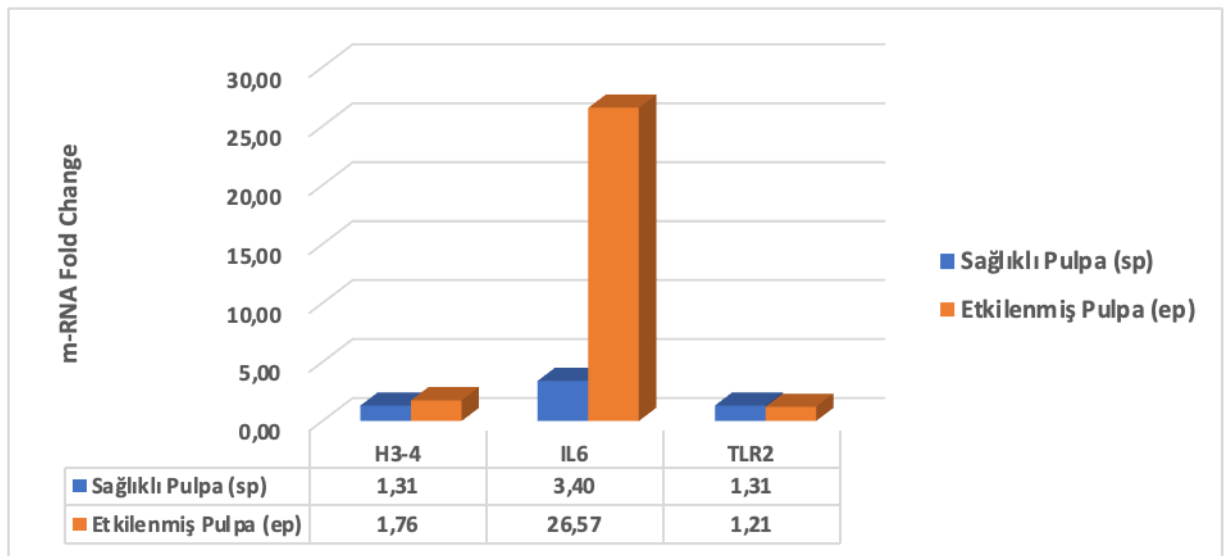
Yapılan çalışmalar sonucunda, Histon H3-4 geninin RT-qPCR analizi ile SP dokusu hücrelerine kıyasla EP dokusuna ait hücrelerde, mRNA ekspresyon seviyesinde göreceli olarak Histon H3-4 gen ekspresyonunun daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1A). Ancak elde edilen bulgularda iki grup arasında istatistiksel açıdan farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

mRNA ekspresyon seviyelerindeki göreceli farklılıklar ayrıca kat değişimi (fold change) analizi ile de desteklenmiştir. H3-4 gen ekspresyonu seviyesi SP grubunda 1.31, EP grubunda 1.61 pozitif değerler olarak bulunmuştur ve her iki hedef dokuda da H3-4 geninin ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$)(Şekil 4.2).



Şekil 4.1. SP ve EP dokularında hedef gen ekspresyon düzeyleri. **A.** *H3-4* geni ekspresyon düzeyi. **B.** *IL6* geni ekspresyon düzeyi. **C.** *TLR2* geni ekspresyon düzeyi. mRNA düzeyi, TBP referans geni ile normalize edilmiştir.

IL-6 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri açısından EP ve SP grupları arası farklılıklar izlenmiştir (Şekil 4.1B). Gruplar arası mRNA ekspresyon seviyelerinin göreceli farklılıkları kat değişimi (fold change) analizi ile desteklenmiştir. IL-6 gen ekspresyonu seviyesi SP grubunda 3.40, EP grubunda 26.57 pozitif değerler olarak bulunmuştur ve her iki hedef dokuda da geninin ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.2).



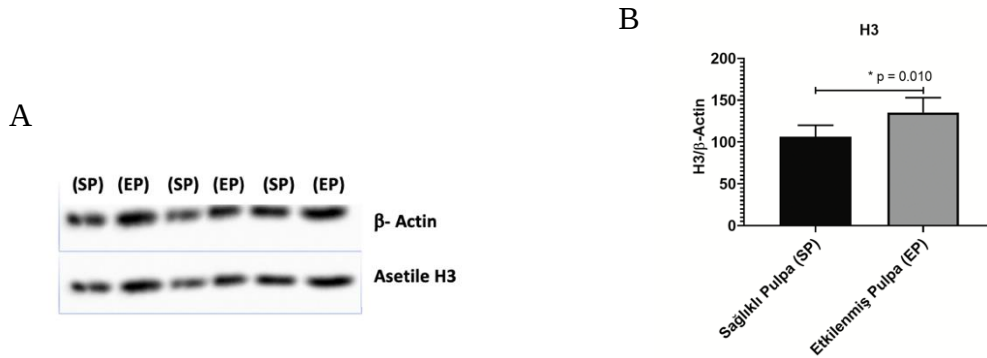
Şekil 4.2. SP ve EP dokularında H3-4, IL6 ve TLR2 genlerinin kat (fold change) değerleri.

TLR2 genine ait mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları incelendiğinde SP grubuna ait örneklerde, EP grubuna kıyasla göreceli olarak mRNA ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1C). Bulguların kat değişimi analiz edildiğinde TLR2 geninin ekspresyonunun SP grubunda 1.31, EP grubunda 1.21 pozitif değerler olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda SP ve EP grupları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.2).

4.2. Hedef Proteinlerin Western Blot Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

Sağlıklı (SP) (n=10) ve Etkilenmiş (EP) (n=10) pulpa dokusundaki genetik değişimlerin ve inflamasyon yanıtı gelişiminin protein seviyesinde karşılaştırılması amacı ile IL-6, TLR2, IFN- δ ve Histon H3 genleri kullanılarak Western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hedef proteinlerin normalizasyonu amacı ile β -actin referans protein olarak kullanılmıştır.

Yapılan Western blot analizi sonucunda, asetile histon H3 geni tarafından kodlanan protein ifadesinin SP grubuna kıyasla EP grubunda istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek oranlarda olduğu görülmüştür ($p=0.01$) (Şekil 4.3 A-B).



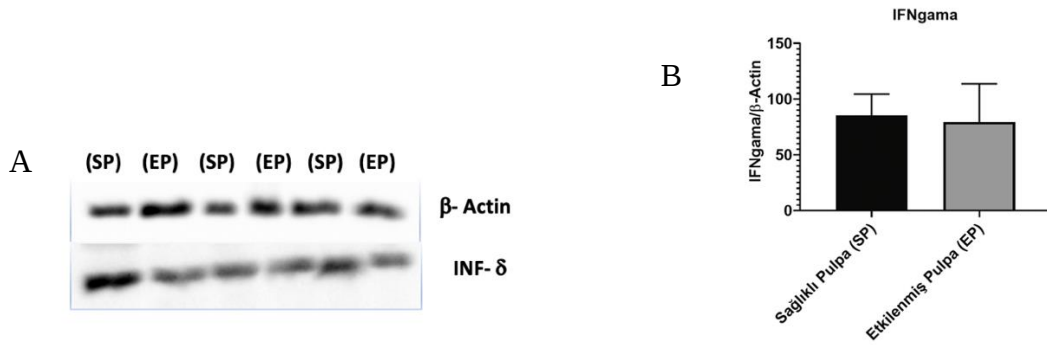
Şekil 4.3. Asetile H3 proteini Western blot bulguları. **A.** Asetile H3 proteinine ait nitrocelüloz membran görüntüsü; EP grubuna ait protein miktarlarının SP grubuna göre göreceli olarak yüksek olduğu izlenmiştir. **B.** SP ve EP gruplarına ait asetile H3 proteini ifade oranlarının yüzdesel grafik ile sunumu.

Çalışmamızda, IL-6'ya ait Western blot analizlerinde EP dokusuna ait hücrelerde SP dokusu hücrelerine kıyasla IL-6 protein ifadesinin göreceli olarak yüksek olduğu görülmüştür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$)(Şekil 4.4 A-B) .



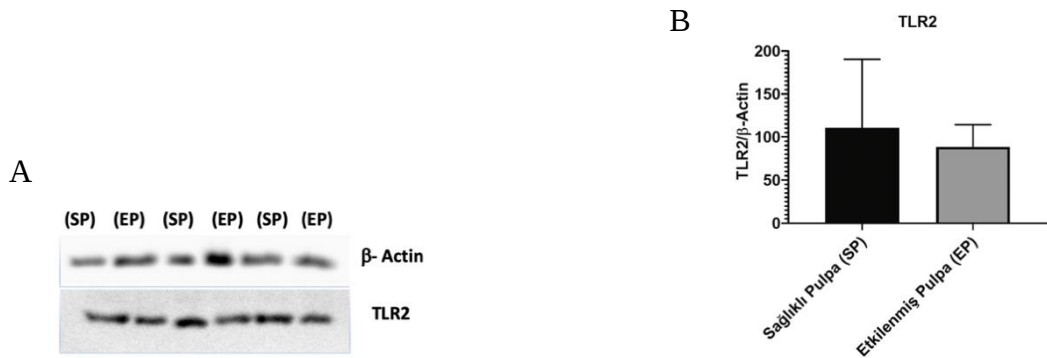
Şekil 4.4. IL-6 Western blot bulguları. **A.** IL-6 proteinine ait nitroselüloz membran görüntüsü, EP grubuna ait protein miktarlarının SP grubuna kıyasla göreceli olarak yüksek olduğu izlenmiştir. **B.** SP ve EP gruplarına ait IL-6 proteinini ifade oranlarının yüzdesel grafik ile sunumu.

Çalışmamıza ait bulgular incelendiğinde, IFN- δ proteinine ait Western blot analizlerinde SP dokusu hücrelerinde EP dokusuna ait hücrelere kıyasla IFN- δ protein ifadesinin göreceli olarak yüksek olduğu görülmüştür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 4.5 A-B).



Şekil 4.5. IFN- δ Western blot bulguları. **A.** IFN- δ proteinine ait nitroselüloz membran görüntüsü, SP dokusu hücrelerinde EP dokusuna ait hücelere oranla IFN- δ protein ifadesi daha yüksek gözlemlenmiştir. **B.** SP ve EP gruplarına ait IFN- δ proteini ifade oranlarının yüzdesel grafik ile sunumu.

Yapılan analizler sonucunda, TLR2'ye ait Western blot analizlerinde SP dokusuna ait hücrelerde EP dokusuna ait hücelere kıyasla TLR2 proteininin ifadesinin göreceli olarak yüksek olduğu görülmüştür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$)(Şekil 4.6 A-B).



Şekil 4.6. TLR2 Western blot Bulguları. **A.** TLR2 proteinine ait nitroselüloz membran görüntüsü, sağlıklı SP dokusu hücrelerinde EP dokusuna ait hücelere oranla TLR2 protein ifadesi daha yüksek seviyelerde gözlemlenmiştir **B.** SP ve EP gruplarına ait TLR2 proteini ifade oranlarının yüzdesel grafik ile sunumu.

TLR2 sitokinine ait Western blot analizi bulguları ile RT-qPCR analizi sonucu elde edilen mRNA ekspresyon seviyelerine ait bulgular uyumlu sonuçlar göstererek elde edilen verileri destekler niteliktedir (Şekil 4.1-C).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Diş tedavilerinin maliyeti ve diş dokusunda artan harabiyetten ötürü gelişen endişeler, minimal düzeyde invaziv, biyolojik temelli yeni restoratif çözümlerin arayışına yol açmıştır.

Diş pulpasının mikroorganizmalar tarafında uyarılması veya pulpa dokusunun ağız ortamı ile direkt teması sonucu, restoratif ve endodontik tedavilerin inflamasyonu kontrol edebilmesi sayesinde tersiyer dentin oluşumu teşvik edilebilmektedir. Ancak bu aşamada tedavi süreci sağlıklı dentinin hacmi, kalitesi ve tedavi esnasında kullanılan malzemenin diş dokusu ile uyumundan etkilenmektedir. Bununla birlikte, şu anda mevcut olan dental materyaller, spesifik olmayan onarıcı etki mekanizmaları, sitotoksik etkilerinin fazla olması ve klinik kullanım esnasında gelişen zorlukları sebebi ile birden çok dezavantaja sahiptir.

İleriye dönük araştırmalar, pulpa iltihabının hücresel düzenleyicileri, enflamasyon ile ilişkili onarım mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, pulpa yanıtlarını tahmin etmek ve yeni tedavi stratejileri tasarlamak için kritik öneme sahiptir (31).

DNA ile ilişkili proteinlerin epigenetik modifikasyonlarının ve kodlanmayan RNA'ların etkilerinin, pulpa dokusu hücreleri ve kök hücre popülasyonlarının kendi kendini yenilemesini kontrol etmesinin yanı sıra mineralize doku gelişimini ve onarımını düzenlediği gösterilmiştir (159).

Gelişen teknolojiler ve yeni araştırma alanları, klinik semptom veren diş çürüklerine kanal tedavisi ihtiyacını ortadan kaldıran, pulpa dokusu rejenerasyon sürecinde etkili yeni dental biyomateryallerin geliştirilmesi için heyecan verici bulgular ortaya koymuştur (31, 160).

Potansiyel yeni bir çözüm olarak histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon-deasetilazlar (HDAC) ile dengelenen DNA ile ilişkili histon asetilasyon sürecini hedefleyen araştırmalar gündeme gelmiştir. Bu dengeyi değiştirmenin diş pulpa hücresi mineralizasyonunu arttırdığını ve hasarlı ve/veya çürükten etkilenmiş pulpa içindeki onarıcı süreçlerde teşvik edici etkisine dair yeni bulgular ortaya atılmıştır (160).

Epigenetik modifiye edici ajanlar, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACis), transkripsiyonel ve hücresel etkilerle asetillenmiş proteinlerin birikmesine yol açan bu dengeyi terapötik olarak değiştirebilir. Vorinostat (SAHA) ve panobinostat gibi HDAC'ler kanserde (161), terapötik olarak kullanılsa da, terapötik uygulamaları osteogenez (132, 162) ve inflamatuvar hastalıklarda da araştırılmaktadır, ancak diş hekimliğinde in vitro çalışmalar ile sınırlı kalmıştır (29).

Histon H3 geni, genlerin dinamik ve uzun vadeli düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen, önemli bir proteindir. Histon asetiltransferaz (HAT') ve histon deasetiltransferaz enzimlerinin (HDAC) aktivitesindeki düzensizlikler, pulpa dokusu hastalıkları ve hücrelerin inflamatuvar yanıtında önemli bir role sahiptir (163). Bu nedenle çalışmamızda sağlıklı ve etkilenmiş pulpa (derin dentin çürüklü) dokusu hücrelerinin histon H3-4 genine ait RT-qPCR analizi ile mRNA ekspresyonu ve Western blot analizi ile asetile H3 gen protein ifadeleri incelenmiştir.

RT-qPCR ve kat değişim analizinde EP grubunda SP grubuna göre mRNA ekspresyon ve gen ifadesi göreceli olarak daha yüksek seviyelerde izlenmiştir.

Bunun yanında asetile H3 gen proteinine ait Western blot analizi sonuçları incelendiğinde EP grubunda SP grubuna göre asetile H3 protein ifadesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Gu ve ark. (164)'nın yapmış olduğu çalışmada sağlıklı diş pulpa dokusu kaynaklı kök hücrelerin asetilasyon mekanizması indüklenmiş ve inhibe edilmiştir. Asetilasyonun indüklendiği DPKH hücrelerinde aktif transkripsiyonun izlendiği hatta onarıcı mekanizmada görev alan dentin sialofosfoprotein'in sekresyonunda artış olduğuna dair bulgular sunmuşlardır.

Gopinathan ve ark. (165)'nin yapmış olduğu araştırmada dental pulpa hücrelerine ait çalışmalarda, histon asetilasyonu ve metilasyonunun dentinin gelişimi ve onarımında yer aldığını gösteren bulgular sunmuştur. Ayrıca odontoblast aktivitesi ile ilişkili

mineralizasyon belirteçlerinden dentin sialofosfoprotein ve dentin matriks asidik fosfoprotein-1'in, diş folikülü kaynaklı kök hücrelerinde H3K27me3 (Histon H3 proteini üzerinde lizin 27'nin tri-metilasyonunu gösteren bir işaretidir; inaktif gen transkripsiyonu belirteci) tarafından baskılandığını ve bununla hücre onarım sürecinin devam etmesinin bir göstergesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Gu ve ark.(164)'nın yapmış olduğu araştırmada, DPKH'lere ait Western blot bulgularında asetilasyon mekanizmasının indüklendiği çalışma gruplarında asetilasyonun baskılandığı gruplara göre asetil H3 protein sekresyonunun bizim çalışmamıza benzer şekilde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamız bulguları göz önüne alındığında H3-4 geninde mRNA ekspresyon seviyelerinin etkilenmiş pulpa hücrelerinde sağlıklı pulpa grubuna kıyasla daha yüksek olması bizlere çürük varlığında mevcut dokuda gen transkripsiyonu ile eş zamanlı olarak onarım mekanizmasının aktif olduğunu destekleyen veriler sunmuştur.

Ayrıca asetile histon H3 protein sekresyonunun etkilenmiş pulpa dokusuna ait hücrelerde sağlıklı pulpa dokusu hücrelerine göre yüksek seviyelerde izlenmiş olması etkilenmiş pulpa dokusu hücrelerinin enflamatuvar reaksiyonlar yönünden daha aktif olabileceğini düşündürmüştür.

Sitokinler, patojenik ajanlara karşı immün yanıtın oluşmasında önemli rol sahiptirler ve potansiyel olarak inflamatuvar yanıtın yoğunluğunu ve süresini düzenler bu nedenle çalışma gruplarımızda IL-6 sitokini seviyelerini belirlemek için araştırmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmamızda EP grubuna ait IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri SP grubuna göre göreceli olarak daha yüksek seviyelerde izlenmiştir. Kat değişimi değerleri de mRNA ekspresyon değerleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Benzer şekilde Western blot analizinde elde edilen veriler dikkate alındığında etkilenmiş pulpa grubunda sağlıklı pulpa grubuna göre IL-6 sitokin ifadesi göreceli olarak daha yüksek değerlerde bulunmuştur.

ElSalhy ve ark.(166)'nın yapmış olduğu çalışmada sağlıklı, çürük ekspoz ve irreversibl pulpitisli dişlerin pulpasından izole edilen kan dokusunda; IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α ve IFN- δ sitokin seviyelerini incelenmiştir. Çalışmada normal pulpa dokusuna kıyasla çürük ekspoz pulpa dokusunda 20 kat fazla IL-6 tespit edildiğini bildirmişler ve bunun

da direkt pulpa tedavisinin uzun vadeli prognozuna yardımcı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yukardaki çalışmaya kıyasla bizim çalışmamızda IL-6 sitokininde sadece göreceli bir artışın olması çürüğün derinliği ile ilişkili olarak inflamatuvar yanıtta farklılıkların bir göstergesi olabilir.

Literatürde, sağlıklı ve çürük diş kaynaklı pulpa dokusu hücrelerinde IL-6 sitokin seviyelerinin Western blot analizi açısından incelendiği bir araştırma ile karşılaşılmamıştır.

IFN- δ , diş pulpa dokusu ve çevre dokuları etkileyen periapikal lezyonların patogeneğinde önemli bir role sahiptir ve IFN- δ 'nin metilasyonu ve deasetilasyonu transkripsiyonel inaktivasyon ile ilişkilendirilmiştir (167). Ayrıca IFN- δ , herhangi bir patojenik uyarının varlığında makrofaj uyarıcı temel sitokindir bu nedenle çalışmamızda çürükten etkilenmiş dişlerin pulpa dokusunda IFN- δ ifadelerini detaylı olarak incelemek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda IFN- δ proteinine ait Western blot analizi sonucunda, etkilenmiş pulpa grubunda sağlıklı pulpa grubuna kıyasla IFN- δ protein ifadesini göreceli olarak daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir fakat bu fark gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır.

Campos ve ark.(168)'ları, periapikal lezyonlu dişler ile perapikal granülomlu dişlere ait pulpa dokularını karşılaştırdıkları çalışmada, IFN- δ genine ait mRNA ekspresyon seviyesinin iki çalışma grubu arası anlamlı farklılık görülmediğini belirtmişlerdir.

Cardoso ve ark. (85) 'nın yapmış olduğu başka bir çalışmada, sağlıklı ve irreversibl pulpitisli dişlere ait pulpa dokuları IFN- δ genine ait mRNA ekspresyonu açısından (DNA metilasyonu) değerlendirilmiştir ve iki çalışma grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Literatüde yer alan bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın verileri bizlere ilerlemiş çürük lezyonu varlığında, IFN- δ 'nin hücresel düzeyde uyarılara karşı gelişen yanıt sonucunda sitokin ve kemokin uyarımı görevini yerine getirerek zaman içerisinde azalma eğiliminde olduğunu düşündürmüştür.

Toll-like reseptörler (TLR), patojenle ilişkili moleküler paternleri tanıyan, evrimsel olarak korunmuş interlökin-1 transmembran reseptörleri süper ailesinin üyeleridir. TLR-

2'nin öncelikle gram pozitif bakterilere karşı bağışıklık tepkilerini aktive etmede rol oynadığını ve TLR-2, TLR-4 gibi yüzey reseptörlerinin, diş pulpasındaki mikroorganizmalar tarafından immün hücrelerin aktivasyonuna katıldığı çalışmalarla gösterilmiştir (117, 169-171).

Bu nedenler göz önünde bulundurularak çalışma gruplarımız arasında farklı seviyelerde gelişebilecek inflamatuvar yanıtın değerlendirilmesi amacı ile TLR2 yüzey reseptörü çalışmamıza dahil edilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda RT-qPCR ve Western blot verileri EP grubunda SP grubuna kıyasla TLR2 sitokin ifadesi göreceli olarak daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir fakat bu fark gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır.

Cardoso ve ark. (117)'nin yapmış olduğu araştırmada sağlıklı ve irreversibl pulpitisli pulpa doku hücreleri üzerinde TLR2 ve TLR4 yüzey reseptörlerinin RT-qPCR analizi ile metillenmiş (inaktif gen transkripsiyonu) ve metillenmemiş (aktif gen transkripsiyonu) DNA frekansları arası farklılıklar incelenmiştir. Grupların metillenmemiş DNA frekansı açısından benzer veriler gösterdiğini belirtmişlerdir. Ancak hem TLR-2 hem TLR-4 (CD-14) yüzey reseptörleri açısından sağlıklı ve pulpitisli doku örnekleri arasında DNA metilasyon paternleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Mutoh ve ark.(121)'ları BALB-c farelerde deneysel pulpa perforasyonu oluşturarak açıkta kalan kavite preparasyonu ile diş çürüğü modeli oluşturarak RT-PCR ve immünohistokimyasal analizler kullanarak çürük pulpa hücrelerinde TLR-2 ve TLR-4'ün mRNA ekspresyonunu incelemişlerdir. Bu analizlerde TLR-2 ve TLR-4'ün pulpitisin erken evresinde eksprese edildiğini ve pulpitisli dişlere ait pulpa dokusunda TLR2 mRNA ekspresyonunun enfeksiyondan 3 saat sonra artmaya başladığı, 9. saatte maksimum seviyeye ulaştığı, 9. saatten sonra yavaş yavaş düştüğü ve 72. saatte belirgin olarak ekspresyon seviyelerinde azalma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir.

Literatürde yer alan bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın verileri değerlendirildiğinde TLR-2 yüzey reseptörünün dokuda patojen tanıma görevini tamamladıktan sonra azalma eğilimi gösterebileceği ve bakteriyel infiltrasyon sürecinin tamamlanması ile geriye dönük artış göstermeyeceği düşünülmüştür.

5.2. Sonuçlar ve neriler

Bu tez çalışmasında sağlıklı diş pulpa dokusu ile derin dentin çürüklü (D3) pulpa dokusu hücrelerinin histon H3 (asetile) genine ait asetilasyon paternleri arası farklılıklar incelenmiştir. Ayrıca IL-6, IFN-δ ve TLR-2 gibi sitokin ve yüzey reseptörlerine ait gen ve protein sekresyonu değerlendirmeleri yapılmıştır.

Western Blot analizinde, derin dentin çürüklü pulpa grubunda asetile H3 geni ifadesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunduğu için H_0 hipotezi desteklenirken, diğer analizlerde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı için H_0 hipotezimiz reddedilmiştir.

Çalışmamız ileriye dönük çalışmalarda benzer metodoloji ile farklı dentin çürüğü seviyeleri ile reversibl-irreversibl pulpitisli çalışma gruplarının birlikte incelenmesi araştırmada eksikliği hissedilen verilerin elde edilebileceğini düşündürmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Martin C. Zhang Yi. Mechanisms of epigenetic inheritance Current opinion cell biology 2007;19:266-272.
2. Russo VE, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation: Cold spring harbor laboratory press; 1996.
3. <https://www.pharmaline.com.tr/epigenetik.html>.
4. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. Journal of dental research. 2009;88(5):400-408.
5. Thompson RF, Einstein FH. Epigenetic basis for fetal origins of age-related disease. Journal of women's health. 2010;19(3):581-587.
6. Williams S, Hughes T, Adler C, Brook A, Townsend G. Epigenetics: a new frontier in dentistry. Australian dental journal. 2014;59:23-33.
7. Fan Z, Yamaza T, Lee JS, Yu J, Wang S, Fan G, et al. BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. Nature cell biology. 2009;11(8):1002-1009.
8. Brooks WH, Le Dantec C, Pers J-O, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. Journal of autoimmunity. 2010;34(3):J207-J19.
9. Townsend G, Richards L, Hughes T, Pinkerton S, Schwerdt W. Epigenetic influences may explain dental differences in monozygotic twin pairs. Australian dental journal. 2005;50(2):95-100.
10. Townsend G, Bockmann M, Hughes T, Brook A. Genetic, environmental and epigenetic influences on variation in human tooth number, size and shape. Odontology. 2012;100(1):1-9.
11. Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. Inflammation research. 2009;58(10):625-629.

12. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of dental research*. 2011;90(1):9-17.
13. <https://www.whatisepigenetics.com/fundamentals/>.
14. Tucker KL. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience. *Neuron*. 2001;30(3):649-652.
15. <https://www.stratech.co.uk/genetex/epigenetics/#1599656413926-d3dfa029-3628>.
16. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature reviews genetics*. 2009;10(11):805-811.
17. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England journal of medicine*. 2003;349(21):2042-54.
18. Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *DNA Methylation: Basic mechanisms*. 2006:203-225.
19. Cheng X, Blumenthal RM. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*. 2010;49(14):2999-3008.
20. Hu J-L, Zhou BO, Zhang R-R, Zhang K-L, Zhou J-Q, Xu G-L. The N-terminus of histone H3 is required for de novo DNA methylation in chromatin. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2009;106(52):22187-22192.
21. Rottach A, Frauer C, Pichler G, Bonapace IM, Spada F, Leonhardt H. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic acids research*. 2010;38(6):1796-1804.
22. Mıhçıoğlu D. Epigenetik Mekanizmaların Besinlerin Biyoaktif Bileşenleri ile İlişkisi. *Beslenme ve diyet dergisi*. 2019;47(3):102-108.
23. <https://www.cusabio.com/c-20829.html>.
24. <http://bit.ly/1MR01RK>.
25. <https://www.creative-diagnostics.com/blog/index.php/what-are-histones/>.
26. <https://tr.thpanorama.com/articles/biologa/nucleosoma-funciones-composicin-y-estructura.html>.
27. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics*. 2009;43:559-599.
28. Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, Harel-Bellan A. Histone acetylation and disease. *Cellular and molecular life sciences CMLS*. 2001;58(5):728-736.

29. Duncan H, Smith A, Fleming G, Cooper P. HDACi: cellular effects, opportunities for restorative dentistry. *Journal of dental research*. 2011;90(12):1377-1388.
30. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR. Histone deacetylase inhibitors induced differentiation and accelerated mineralization of pulp-derived cells. *Journal of endodontics*. 2012;38(3):339-345.
31. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Cooper PR. Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Experimental cell research*. 2013;319(10):1534-1543.
32. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research*. 2011;90(3):430-440.
33. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-840.
34. Wang T, Liu H, Ning Y, Xu Q. The histone acetyltransferase p300 regulates the expression of pluripotency factors and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e102117.
35. Sun Q, Liu H, Chen Z. The fine tuning role of microRNA-RNA interaction in odontoblast differentiation and disease. *Oral diseases*. 2015;21(2):142-148.
36. Katsnelson A. Epigenome effort makes its mark. *Nature publishing group*; 2010.
37. Seo J-Y, Park Y-J, Yi Y-A, Hwang J-Y, Lee I-B, Cho B-H, et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restorative dentistry & endodontics*. 2015;40(1):14-22.
38. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-257.
39. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007;447(7143):425-432.
40. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature immunology*. 2003;4(7):616-23.
41. Barker D, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis *International Journal Epidemiology*. 2002;31:1235-1239.

42. Zaina S, Lindholm MWm, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *The Journal of nutrition*. 2005;135(1):5-8.
43. Oh M, Nör JE. The perivascular niche and self-renewal of stem cells. *Frontiers in physiology*. 2015;6:367.
44. Wu H, Lippmann J, Oza J, Zeng M, Fives-Taylor P, Reich N. Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral microbiology and immunology*. 2006;21(4):238-244.
45. Ito K. Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process. Portland press ltd.; 2007.
46. Dunning T. Periodontal disease-the overlooked diabetes complication. *Nephrology nursin journal*. 2009;36(5):489-495.
47. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature reviews immunology*. 2009;9(10):692-703.
48. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435.
49. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*. 2009;3(1):73-80.
50. Breivik J, Gaudernack G, editors. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*; 1999: Elsevier.
51. Choi S, Myers J. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*. 2008;87(1):14-32.
52. Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):1-9.
53. Rodrigues HM, Jüngel A, Gay RE, Gay S. Innate immunity, epigenetics and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Molecular immunology*. 2009;47(1):12-18.
54. Bowman RV, Wright CM, Davidson MR, Savarimuthu Francis SM, Yang IA, Fong KM. Epigenomic targets for the treatment of respiratory disease. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2009;13(6):625-640.

55. Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2009;15(4):303-7.
56. Yao H, Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(4):375-383.
57. Agrawal A, Tay J, Yang G-E, Agrawal S, Gupta S. Age-associated epigenetic modifications in human DNA increase its immunogenicity. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(2):93.
58. Zhang S, Crivello A, Offenbacher S, Moretti A, Paquette DW, Barros SP. Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(11):953-961.
59. Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J, et al. Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB journal*. 2006;20(6):782-784.
60. Takahashi K, Sugi Y, Hosono A, Kaminogawa S. Epigenetic regulation of TLR4 gene expression in intestinal epithelial cells for the maintenance of intestinal homeostasis. *The journal of immunology*. 2009;183(10):6522-6529.
61. Bobetsis Y, Barros S, Lin D, Weidman J, Dolinoy D, Jirtle R, et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *Journal of dental research*. 2007;86(2):169-174.
62. Bobetsis Y, Barros S, Lin D, Arce R, Offenbacher S. Altered gene expression in murine placentas in an infection-induced intrauterine growth restriction model: a microarray analysis. *Journal of reproductive immunology*. 2010;85(2):140-148.
63. Ding S-Z, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future oncology*. 2010;6(5):851-862.
64. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer research*. 2010;70(4):1430-1440.
65. Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H. *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated

- by nitric oxide produced by macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;388(3):496-500.
66. Villagra A, Sotomayor E, Seto E. Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. *Oncogene*. 2010;29(2):157-173.
 67. Ishii M, Wen H, Corsa CA, Liu T, Coelho AL, Allen RM, et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood, The Journal of the American society of hematology*. 2009;114(15):3244-3254.
 68. Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss medical weekly*. 2009;139(33-34):466.
 69. Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(1):24-38.
 70. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2009;106(17):7113-7118.
 71. Hazen AL, Smith MJ, Despons C, Winter O, Moser K, Kerr WG. SHIP is required for a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood, The Journal of the American society of hematology*. 2009;113(13):2924-2933.
 72. Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A, et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*. 2009;31(6):965-973.
 73. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park Y-J, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2009;106(37):15819-15824.
 74. Benakanakere MR, Li Q, Eskin MA, Singh AV, Zhao J, Galicia JC, et al. Modulation of TLR2 protein expression by miR-105 in human oral keratinocytes. *Journal of biological chemistry*. 2009;284(34):23107-23115.
 75. El Gazzar M, McCall CE. MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance. *Journal of biological chemistry*. 2010;285(27):20940-20951.

76. <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/tooth-caries-and-healthy-superficial-caries-vector-22781004>.
77. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*. 1986;50(4):353-380.
78. Roberson T, Heymann HO, Swift Jr EJ. *Sturdevant's art and science of operative dentistry*: Elsevier health sciences; 2006.
79. Yamada T, Nakamura K, Iwaku M, Fusayama T. The extent of the odontoblast process in normal and carious human dentin. *Journal of dental research*. 1983;62(7):798-802.
80. Pashley DH. Clinical correlations of dentin structure and function. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1991;66(6):777-781.
81. Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, et al. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem cells*. 2014;32(1):279-289.
82. Hui T, Peng A, Zhao Y, Wang C, Gao B, Zhang P, et al. EZH2, a potential regulator of dental pulp inflammation and regeneration. *Journal of endodontics*. 2014;40(8):1132-1138.
83. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews drug discovery*. 2006;5(9):769-784.
84. Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer letters*. 2009;280(2):211-221.
85. Cardoso FP, Viana MB, Sobrinho APR, Diniz MG, Brito JAR, Gomes CC, et al. Methylation pattern of the IFN- γ gene in human dental pulp. *Journal of endodontics*. 2010;36(4):642-646.
86. Zhang Q, Bagrade L, Bernatoniene J, Clarke E, Paton JC, Mitchell TJ, et al. Low CD4 T cell immunity to pneumolysin is associated with nasopharyngeal carriage of pneumococci in children. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(8):1194-1202.
87. Copray J, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Küst B, Liem R, et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of neuroimmunology*. 2001;118(2):203-211.

88. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*. 2010;68(10):930-941.
89. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
90. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*. 2010;67(5):446-457.
91. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012;36(5):705-716.
92. Nör JE. Buonocore memorial lecture: tooth regeneration in operative dentistry. *Operative dentistry*. 2006;31(6):633-642.
93. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of endodontics*. 2005;31(10):711-718.
94. Demarco FF, Conde MCM, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Brazilian dental journal*. 2011;22:3-13.
95. Marchetti C, Poggi P. Lymphatic vessels in the oral cavity: different structures for the same function. *Microscopy research and technique*. 2002;56(1):42-49.
96. Matsumoto Y, Zhang B, Kato S. Lymphatic networks in the periodontal tissue and dental pulp as revealed by histochemical study. *Microscopy research and technique*. 2002;56(1):50-59.
97. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian dental journal*. 2007;52:S4-S6.
98. Hahn C-L, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *Journal of endodontics*. 2007;33(6):643-651.
99. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators of inflammation*. 2015;2015.
100. Khorasani MM, Hassanshahi G, Brodzikowska A, Khorramdelazad H. Role (s) of cytokines in pulpitis: latest evidence and therapeutic approaches. *Cytokine*. 2020;126:154896.

101. Lin J-J, Du Y, Cai W-K, Kuang R, Chang T, Zhang Z, et al. Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-14.
102. Farges J-C, Carrouel F, Keller J-F, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*. 2011;216(4):513-517.
103. Kokkas A, Goulas A, Stavrianos C, Anagianakis G. The role of cytokines in pulp inflammation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2011;25(3):303-311.
104. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatric dentistry*. 2008;30(3):206-10.
105. Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, et al. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *The journal of immunology*. 2006;176(5):2880-2887.
106. Lai W-Y, Kao C-T, Hung C-J, Huang T-H, Shie M-Y. An evaluation of the inflammatory response of lipopolysaccharide-treated primary dental pulp cells with regard to calcium silicate-based cements. *International journal of oral science*. 2014;6(2):94-98.
107. Tziafas D, Smith A, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of dentistry*. 2000;28(2):77-92.
108. Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT, Nör JE. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *Journal of endodontics*. 2006;32(10):951-955.
109. Murray P, About I, Lumley P, Franquin J-C, Remusat M, Smith A. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *Journal of dentistry*. 2000;28(4):277-285.
110. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation–regeneration interplay in the dentine–pulp complex. *Journal of dentistry*. 2010;38(9):687-697.
111. Mjör IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence international*. 2002;33(2).

112. Ward J. Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Australian endodontic journal*. 2002;28(1):29-37.
113. Lindroth AM, Park YJ. Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis. *Journal of periodontal & implant science*. 2013;43(3):111-120.
114. Deng P, Chen Q-M, Hong C, Wang C-Y. Histone methyltransferases and demethylases: regulators in balancing osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International journal of oral science*. 2015;7(4):197-204.
115. Zhong S, Zhang S, Bair E, Nares S, Khan AA. Differential expression of microRNAs in normal and inflamed human pulps. *Journal of endodontics*. 2012;38(6):746-752.
116. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. *Journal of periodontology*. 2008;79:1577-1584.
117. Cardoso FP, de Faria Amormino SA, Dutra WO, Sobrinho APR, Moreira PR. Methylation pattern of the CD14 and TLR2 genes in human dental pulp. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):384-386.
118. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. Differential patterns of methylation of the IFN- γ promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN- γ gene expression between human neonatal and adult CD45RO⁺ T cells. *The journal of immunology*. 2002;168(6):2820-2827.
119. Hahn C-L, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6785-6789.
120. Kersh EN, Fitzpatrick DR, Murali-Krishna K, Shires J, Speck SH, Boss JM, et al. Rapid demethylation of the IFN- γ gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *The journal of immunology*. 2006;176(7):4083-4093.
121. Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, Watanabe K. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *Journal of Endodontics*. 2007;33(10):1183-1186.
122. Muthukuru M, Darveau RP. TLR signaling that induces weak inflammatory response and SHIP1 enhances osteogenic functions. *Bone research*. 2014;2(1):1-13.
123. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

124. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(2):172-183.
125. Cao R, Zhang Y. The functions of E (Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current opinion in genetics & development*. 2004;14(2):155-164.
126. Xu J, Yu B, Hong C, Wang C-Y. KDM6B epigenetically regulates odontogenic differentiation of dental mesenchymal stem cells. *International journal of oral science*. 2013;5(4):200-205.
127. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007;130(6):1083-1094.
128. Hake S, Xiao A, Allis C. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *British journal of cancer*. 2004;90(4):761-769.
129. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-45.
130. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:75-100.
131. Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. Identification of a Gene Encoding a Yeast Histone H4 Acetyltransferase (*). *Journal of biological chemistry*. 1995;270(42):24674-24677.
132. Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, Porro G, Pagani P, Pozzi P, et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2002;99(5):2995-3000.
133. Barnes PJ. Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the american thoracic society*. 2009;6(8):693-696.
134. Kong Q, Liu L, Huang Y, Zhang F, Wei X, Ling J. The effect of octamer-binding transcription factor 4B1 on microRNA signals in human dental pulp cells with inflammatory response. *Journal of endodontics*. 2014;40(1):101-108.
135. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2007;104(5):1604-1609.

136. Worm J, Stenvang J, Petri A, Frederiksen KS, Obad S, Elmen J, et al. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. *Nucleic acids research*. 2009;37(17):5784-5792.
137. Tili E, Michaille J-J, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *The journal of immunology*. 2007;179(8):5082-5089.
138. Lu F, Stedman W, Yousef M, Renne R, Lieberman PM. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *Journal of virology*. 2010;84(6):2697-2706.
139. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National academy of sciences*. 2006;103(33):12481-12486.
140. Pichiorri F, Suh S-S, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, et al. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2008;105(35):12885-12890.
141. Xue Q, Guo Z-Y, Li W, Wen W-H, Meng Y-L, Jia L-T, et al. Human activated CD4⁺ T lymphocytes increase IL-2 expression by downregulating microRNA-181c. *Molecular immunology*. 2011;48(4):592-599.
142. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11(1):1-11.
143. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-65.
144. Baynes J, Dominiczak MH. *Medical biochemistry: Elsevier health sciences*; 2009.
145. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986-994.
146. Reischl U, Kochanowski B. *Quantitative PCR. Quantitative PCR protocols: springer*; 1999. 3-30.

147. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology journal*. 1993;11(9):1026-1230.
148. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology*. 2003;3(1):1-13.
149. Pals G, Pindolia K, Worsham MJ. A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using BRCA1 as an example. *Molecular diagnosis*. 1999;4(3):241-246.
150. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85.
151. Sellars MJ, Vuocolo T, Leeton LA, Coman GJ, Degnan BM, Preston NP. Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: a comparison of relative and absolute quantification procedures. *Journal of biotechnology*. 2007;129(3):391-399.
152. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*. 2008(1):10.3.1-10.3.34.
153. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*. 1981;112(2):195-203.
154. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*. 1975;98(3):503-517.
155. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National academy of sciences*. 1977;74(12):5350-5354.
156. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1979;76(9):4350-4354.
157. ASLIM HP, BULUT O. Western Blot. *Journal of advances in vetbio science and techniques*. 6(1).

158. Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M. Basic science methods for clinical researchers: Academic press; 2017.
159. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014;9(1):3-12.
160. Duncan HF, Smith AJ, Fleming GJ, Partridge NC, Shimizu E, Moran GP, et al. The histone-deacetylase-inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid promotes dental pulp repair mechanisms through modulation of matrix metalloproteinase-13 activity. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(4):798-816.
161. Cheriya V, Hussein MA, Borden EC. Epigenetic regulation of IFNs activity in multiple myeloma by histone deacetylase inhibitors. American association for cancer research; 2006.
162. Boer JD, Licht R, Bongers M, Klundert TVD, Arends R, Blitterswijk CV. Inhibition of histone acetylation as a tool in bone tissue engineering. *Tissue engineering*. 2006;12(10):2927-2937.
163. Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA. Recognition and classification of histones using support vector machine. *Journal of computational biology*. 2006;13(1):102-112.
164. Gu S, Liang J, Wang J, Liu B. Histone acetylation regulates osteodifferentiation of hDPSCs via DSPP. *Frontiers in bioscience*. 2013;18:1072-1079.
165. Gopinathan G, Kolokythas A, Luan X, Diekwisch TG. Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. *Stem cells and development*. 2013;22(12):1763-1778.
166. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *International endodontic journal*. 2013;46(6):573-580.
167. Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, et al. IFN- γ directly inhibits TNF- α -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunology letters*. 2011;137(1-2):53-61.
168. Campos K, Gomes CC, de Fátima Correia-Silva J, Farias LC, Fonseca-Silva T, Bernardes VF, et al. Methylation pattern of IFNG in periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of endodontics*. 2013;39(4):493-496.

169. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1999;96(25):14459-14463.
170. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature genetics*. 2000;25(2):187-191.
171. Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2–promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):205-224.

