

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA
HÜCRESİNDE OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF STRESİN
İNCELENMESİ**

Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU

Tıbbi Biyokimya
DOKTORA TEZİ

Ankara
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA HÜCRESİNDE
OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF STRESİN İNCELENMESİ**

Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU

Tıbbi Biyokimya
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT

Ankara
2023

ONAY SAYFASI**KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA HÜCRESİNDE
OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF STRESİN İNCELENMESİ****Öğrenci: Hatice DOĞAN BUZOĞLU****Danışman: Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT**

Bu tez çalışması 18/01/2023 tarihinde jürimiz tarafından "BİYOKİMYA Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Kamer KILINÇ*
(TOB ETU Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye: *Prof. Dr. Bahar ÖZÇELİK*
(Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı)

Üye: *Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN*
(Ufuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye: *Prof. Dr. Nermin TARHAN*
(Hacettepe Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı)

Üye: *Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN*
(Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

13 Şubat 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren.... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

13/02/2023

Hatice DOĞAN BUZOĞLU

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT'ın danışmanlığında tarafımdan retilildiđini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Hatice DOğAN BUZOğLU

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, 2. Doktora eğitimimi gerçekleştirdiğim bu uzun yolda bana her konuda destek olan, hayatıma dokunan, bu doktora tezinin ortaya çıkmasında büyük katkısı ve emeği olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT'a,

Doktora tezim süresince her konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana çalışmalarında destek olan, yol gösteren, sevgili Dr. Mehmet ÖZCAN'a ve her zaman güleryüzlü, çalışkan, enerjik ve disiplinli haliyle yardım ve desteklerini esirgemeyen Ayşe BURUS'a,

Doktora eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiğim, beni içtenlikle bölüme kabul eden Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyesi ve asistan arkadaşlarıma,

Bu tez çalışmasının görünür hale gelmesinde büyük emekleri olan, bana her zaman destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, güzel insan Prof. Dr. Dilara Zeybek ve sevgili Özlem Bozdemir'e,

Bütün akademik hayatım boyunca her zaman destek olan, bana yol gösteren, her demoralize olduğumda bana güç veren, Endodonti Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Bahar Özçelik'e ve bu doktora eğitimim süresince bana bölümümde yardımcı olan ve destek veren tüm Endodonti bölümüne,

Ve sevgili aileme, hayallerimi gerçekleştirmem için her zaman bana destek olan, doktora eğitimim süresince yaşadığım her güçlükte bana cesaret veren, eşim Hüseyin Buzoğlu'na, ileride akademik hayatlarında onlara örnek olabilmeyi hayal ettiğim, bana destek olan güzel kızlarım Yasemin ve Nevran'a, şu an hayatta olmasalar da benim başarılarımla her zaman gurur duyan anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Doğan Buzoğlu, H. Karyojenik Bakterilerin Dental Pulpa Hücresinde Oluşturduğu Oksidatif Stresin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Çürük yapıcı patojen mikroorganizmalar (karyojenik mikroorganizmalar) pulpal inflamasyon ve enfeksiyonun majör kaynağıdır ve salgıladıkları hücre zarı komponentleri ile reaktif oksijen moleküllerinin (ROS) oluşumuna dolayısıyla da oksidatif hasarın artmasına neden olurlar. Bu çalışmada sağlıklı insan diş pulpasından hazırlanan primer hücre kültüründe karyojenik mikroorganizmaların oluşturduğu oksidatif stres parametreleri olan ROS, Glutasyon (GSH), Glutasyon S-Transferaz (GST) ve oksidatif hasarın elimine edilmesinde etkin bir antioksidan molekül olan N-asetilsistein'in (NAC) etkisi incelendi. Bu amaçla sağlıklı genç bireylerden gömülü yirmi yaş dişlerinden elde edilen sağlıklı diş pulpaları ile primer hücre kültürü hazırlandı. 4.-7. Pasaj aralığındaki dental pulpa hücreleri 40 µg/ml lipopolisakkarit (LPS), 40 µg/ml lipoteik asit (LTA) ve 0,3 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) ile tek başına ve 10 mM NAC preinkübasyonu ile inkübe edildi. Dental pulpa hücrelerinde ROS, GSH ve GST protein düzeyleri ve immunohistokimyasal boyamaları yapıldı. Ayrıca akım sitometri ile hücre canlılığı ve nekroz-apoptoz düzeyleri incelendi. Gruplar arası istatistiksel farklılıklar Kruskal Wallis analiziyle, ikili karşılaştırmalar da Mann-Whitney-U analiziyle $\alpha=0,05$ güven aralığında değerlendirildi. Hücre canlılığının LPS, LTA ve H₂O₂ uygulamalarında istatistiksel olarak fark yaratmayacak düzeyde azaldığı, NAC preinkübasyonunun önemli bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). NAC preinkübasyonunun LPS, LTA ve H₂O₂ uygulanan dental pulpa hücrelerindeki ROS düzeylerini önemli derecede azalttığı hem biyokimyasal analizlerle hemde de immünfloresans yöntemiyle gözlenmiştir ($p<0.05$). Biyokimyasal analiz sonuçları LPS, LTA ve H₂O₂ inkübasyonunun dental pulpa hücrelerinin hücre içi GSH değerlerini düşürürken, NAC preinkübasyonunun hücre içi GSH'ı rejenere etmede yetersiz kaldığını gösterdi. Diğer taraftan immün boyama sonuçlarına göre NAC+ H₂O₂ kontrole göre hücre içi GSH'ı önemli derecede artırmıştır ($p<0.05$). Deney grupları arasında GST enzim aktivite değerleri açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak LPS, LTA ve H₂O₂ dental pulpa hücrelerinde oksidatif stresi farklı düzeylerde etkilerken, NAC molekülü ROS düzeylerini azaltmasına rağmen hücre içi GSH düzeyleri üzerine belirgin bir etki gösterememiştir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, dental pulpa, GSH, GST, inflamasyon, oksidatif stres, ROS.

Bu çalışma H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje ID: 18034)

ABSTRACT

Dogan Buzoglu, H, Evaluation Of Oxidative Stress Caused By Cariogenic Bacteria In Dental Pulp Cell. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Programme PhD Thesis, Ankara, 2023. Caries-causing pathogenic microorganisms (cariogenic microorganisms) are the major source of pulpal inflammation and infection, and they cause the formation of reactive oxygen molecules (ROS) with the cell membrane components they secrete, thus increasing oxidative damage. In this study, the effects of ROS, Glutathione (GSH), Glutathione-S-Transferases (GST), which are the oxidative stress parameters caused by cariogenic microorganisms, and N-acetylcysteine (NAC), an effective antioxidant molecule, on the elimination of oxidative damage in primary cell culture prepared from healthy human dental pulp were investigated. For this purpose, primary cell culture was prepared with healthy dental pulps from wisdom teeth extracted from young individuals. Dental pulp cells in the passageway were incubated with 40 µg/ml lipopolysaccharide (LPS), 40 µg/ml lipoteic acid (LTA) and 0.3 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) alone or with 10 mM pre-incubation. ROS, GSH and GST protein levels and immunohistochemical staining were performed in dental pulp cells. In addition, cell viability and necrosis-apoptosis levels were examined by flow cytometry. Statistical differences between groups were evaluated by Kruskal Wallis analysis followed by Mann-Whitney-U test for pairwise comparisons at $\alpha=0,05$. It was observed that cell viability decreased statistically insignificantly in LPS, LTA and H₂O₂ applications, and NAC pre-incubation did not cause a significant change ($p>0.05$). It was observed that NAC preincubation significantly reduced ROS levels in dental pulp cells treated with LPS, LTA and H₂O₂, both by biochemical analyzes and by immunofluorescence method ($p<0.05$). Biochemical analysis results showed that LPS, LTA and H₂O₂ incubation decreased intracellular GSH values of dental pulp cells, while NAC preincubation was insufficient to regenerate intracellular GSH. On the other hand, according to the immunostaining results, NAC+ H₂O₂ significantly increased intracellular GSH compared to the control ($p<0.05$). No significant difference was observed between the experimental groups in terms of GST enzyme activity values. As a result, while LPS, LTA and H₂O₂ affected oxidative stress in dental pulp cells at different levels, although NAC molecule reduced ROS levels, it did not show a significant effect on intracellular GSH levels.

Key words: Apoptosis, dental pulp, inflammation, GSH, GST, oksidative stress, ROS.

This study was supported by H. U. Scientific Research Unit (Project ID: 18034).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dental Pulpa	3
2.1.1. Ekstrasellüler Matriks (ECM)	4
2.1.2. Pulpa Hücreleri	5
2.2. İnflamasyon	7
2.2.1. Dental Pulpa İnflamasyonu	8
2.3. Oksidatif Stres	10
2.3.1. Serbest Radikallerin Nötralizasyonu- Antioksidan Mekanizma	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Kimyasallar ve Gereçler	21
3.2. Pulpa Dokularının Elde Edilmesi ve Primer Hücre Kültürünün Kurulması	22
3.2.1. Pulpa Dokularının Toplanması	22
3.2.2. Primer Hücre Kültürünün Kurulması	23
3.3. Deneyde Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması	25
3.4. Doz Belirleme Çalışmaları	25
3.4.1. Akım Sitometri Ölçümleri	26
3.4.2. WST Analizi	26
3.4.3. MTT Analizi	26
3.5. Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Sayısının Belirlenmesi	27

3.6. Hücre Canlılığı, İmmünohistokimyasal İncelemeler ve Biyokimyasal Analizler	28
3.6.1. Annexin V ile Hücre Canlılığının ve Erken Apoptozun Belirlenmesi	28
3.6.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler	28
3.6.3. İmmünfloresans ROS İşaretleme	29
3.6.4. Biyokimyasal İncelemeler	29
3.7. İstatistiksel İnceleme	32
4. BULGULAR	33
4.1. Dental Pulpa Hücre Kültüründe Yapılan Ön Deney Sonuçları	33
4.1.1. Doz Belirleme Çalışmaları	33
4.1.2. Hücre Optimizasyonu (MTT için)	35
4.2. Hücre Canlılığının İncelenmesi, Erken Apoptoz ve Nekroz sonuçları	36
4.2.1. Akım Sitometri Sonuçları	36
4.3.2. GSTP1 İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları	39
4.3.3. ROS İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları	41
4.4. Biyokimyasal Parametreler	41
4.4.1. Total protein düzeyleri	41
4.4.2. ROS Ölçüm Sonuçları	42
4.4.3. GSH Düzeyleri	43
4.4.4. GST Enzim Aktivite Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER	65
Ek 1. Etik Kurul Onayı	65
Ek 2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	66
Ek 3. Tez Çalışması Dijital Makbuz	67
9. ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER ve KISALTMALAR

BSA	Sığır serum albümini
BMP	Kemik morfogenetik protein
BSP	Kemik sialo-protein
Ca²⁺	Kalsiyum
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CTCF	Düzeltilmiş toplam hücre floresansı
DCFDA	Diklorofluroescin diasetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoksit
DPSC	Dental pulpa kök hücresi
DTNB	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
ECM	Ekstrasellüler matriks
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
FBS	Fetal sığır serumu
G6PDH	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
GSTP1	Glutasyon S-transferaz P1
HOCl	Hipoklöröz asit
HOO•	Hidroperoksil radikali

HNO₂	Nitröz asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IL-β1	İnterlökin- Beta1
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteik asit
M	Molar
Mg	Miligram
mM	Milimolar
MAPK	Mitojen aktif proteinkinaz
MMP	Matriks metalloproteinaz
MSC	Mezenkimal kök hücreleri
MTA	Mineral trioksit aggregate
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
NAC	N-asetil-sistein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
N₂O₃	Dinitrojen trioksit
NO	Nitrik oksit
NO-	Nitrojen dioksit
¹O₂	Singlet oksijen
OONO-	Peroksinitrit
PAMP	Ppatojen veya zararlı moleküllerle ilişkili moleküler kalıpları
PBS	Fosfat tamponlu salin
PMNL	Polimorfo nükleer lökositler

PRR	Patojen tanıma reseptörleri
RANKL	Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROO•	Peroksil
ROS	Reaktif oksijen türleri
SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit dizmutaz
O₂•⁻	Süperoksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
TCA	Trikoloroasetik asit
TEAM	Trietanolamin
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
TIMP	Doku inhibitör matriks proteazlar
TNF-α	Tümör nekrozis faktör- alfa
TLR	Toll benzeri reseptör
TNB	5-Merkapto-2-nitro benzoik asit
μg	Mikrogram
WST	Formazan-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. A. Diş pulpasının şematik görünümü. B. Pulpanın tabakaları ve pulpa-dentin kompleksi	4
2.2. Glutasyonun okside ve redükte formunun moleküler yapısı	15
2.3. GSH ilişkili enzimler	16
2.4. N-asetil sisteinin hücre içine alınarak glutasyon molekülünün sentezlenmesi	18
3.1. A: Çekilmiş dişin yüzeyleri temizlendikten sonraki görüntüsü, B: Dişin ikiye ayrılmış şekli, C: Diş pulpası, D: Besi yeri içinde taşınması.	23
3.2. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine ait faz kontrast görüntüleri. Eksplant kültür sonrası doku parçalarından (beyaz ok) atan iğsi fibroblast hücreleri (siyah ok) izlenmektedir	24
4.1. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerinde hücre canlılığının (%) WST analizi	34
4.2. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine LTA, LPS, H ₂ O ₂ (24 saat), NAC (4 saat) ve kombine uygulamalar sonrası faz kontrast görüntüleri. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA1 (15 µg/ml), D: LTA2 (20 µg/ml), E: H ₂ O ₂ (0.3 mM), F: NAC (10 mM), G: NAC +LPS, H: NAC + LTA1, I: NAC + LTA 2, J: NAC + H ₂ O ₂ (Faz kontrast X100)	34
4.3. MTT yöntemiyle dental pulpa hücre kültüründe hücre optimizasyonu sonuçları	35
4.4. Dental pulpa hücrelerinin LPS, LTA, ve H ₂ O ₂ ile muamelesi sonrası MTT testi ile hücre canlılık (%) sonuçları (1x10 ⁴ hücre/kuyucuk).	35
4.5. Akım sitometri sonuçlarının histogram görselleri	37
4.6. Dental pulpa hücrelerinin LPS, LTA, H ₂ O ₂ ve NAC uygulamaları sonrasında flow sitometri yöntemi ile canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları (% oran) (Ortalama ± SD)	37
4.7. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H ₂ O ₂ , NAC ve kombine uygulamalar sonrası anti-glutasyon ile immunfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H ₂ O ₂ (0,3 mM), E:	

- 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂.
(Faz Kontrast X400) 38
- 4.8.** Kantitatif floresan görüntü analizi. Deney gruplarında Glutatyon'un immunfloresan işaretli görüntülerinden hesaplanan düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) (10 alanın CTCF ortalaması). Hata çubukları SEM'i temsil etmektedir 39
- 4.9.** Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H₂O₂, NAC ve kombine uygulamalar sonrası anti-GSTP1 ile immunfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H₂O₂ (0,3 mM), E: 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂.
(Faz Kontrast X400) 40
- 4.10.** Kantitatif floresan görüntü analizi. Deney gruplarında GSTP1'in immunfloresan işaretli görüntülerinden hesaplanan düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) (10 alanın CTCF ortalaması). Hata çubukları SEM'i temsil etmektedir 40
- 4.11.** Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H₂O₂, NAC ve kombine uygulamalar sonrası DCFDA ile immunfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H₂O₂ (0,3 mM), E: 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂. (Faz Kontrast X400) 41
- 4.12.** Dental pulpa hücrelerinde ROS düzeyleri. A: % ROS değişimlerinin protein düzeylerine oranı, B: % ROS değişimlerinin hücre canlılığına oranları 42
- 4.13.** Dental pulpa hücrelerinde LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına ve NAC uygulaması sonrasında Glutatyon düzeylerindeki değişimler (nmol/mg protein) 43
- 4.14.** Dental pulpa hücrelerinde LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına ve NAC preinkübasyon gruplarında GST enzimi spesifik aktivite düzeylerindeki değişimler (nmol/mg protein.dk⁻¹) 44

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
4.1. Dental pulpa dokusu alınan hasta grupları	33
4.2. Deney gruplarının total protein düzeyleri (mg protein) (Ortalama± SD)	42



1. GİRİŞ

Dental Pulpa, odontoblastların varlığı ve sert mineralize bir doku ile çevrili olması ile karakterize edilen oldukça özelleşmiş bir mezenkimal dokudur. Apikal bölgeden çıkan bir kan damarı ağı ve sinir demetleri tarafından infiltre edilir. Pulpa odasının anatomik düzenlemesi nedeniyle, diş pulpası minimal kollateral kan akımına sahiptir ve bu da bağışıklık sisteminin enfeksiyonlarla savaşma yeteneğini bozar. Diş pulpasının mekanik, kimyasal, termal ve mikrobiyal faktörler tarafından hasar görmesi, karmaşık vasküler, lenfatik ve lokal doku reaksiyonları dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar yanıtları aktive eder. Çürük yapıcı patojen mikroorganizmalar (karyojenik mikroorganizmalar) pulpal inflamasyon ve enfeksiyonun majör kaynağıdır. Çürük lezyonu sonucu gelişen pulpal inflamasyon, proinflamatuvar sitokinlerin fazla miktarda salınımı ve akabinde proteolitik enzimlerin yıkımıyla karakterizedir (1-4).

Mikroorganizmalar salgıladıkları hücre zarı komponentleri ile oksidatif stres hasarı oluşturabilmektedir. Çürük yapıcı patojen mikroorganizmalar pulpal inflamasyon ve enfeksiyonun majör kaynağıdır ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna dolayısıyla oksidatif hasarın artmasına neden olurlar. Patojen bakteriler, hücre zarı komponentlerinin Polimorfonükleer lökosit (PMNL) ile bağlanması, Nikotinamid dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH-oksidad) şantından süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), hipokloröz asit ($HOCl$) veya singlet oksijen ($^1O_2$) oluşumuna neden olabilmektedir (5-8). Bu moleküller canlı sisteme verdikleri zararlı etkileri nedeniyle ROS olarak tanımlanırlar. Biyolojik hasara neden olan ROS'un zararlı etkileri oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksijen radikali sitokinlerin, kemotaktik ajanların ve adezyon moleküllerinin salınımını stimüle edebilir, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına neden olabilmektedir (7, 9, 10).

Antioksidanlar, canlı dokularda istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarını önleyebilen veya geciktirebilen ve DNA, protein ve lipid gibi hücrel bileşenler için koruma sağlayan çok çeşitli enzimler ve/veya moleküllerdir. Antioksidanlar, aynı zamanda, inflamatuvar sitokinlerin sinyal iletimini modifiye veya bloke etmek yoluyla inflamatuvar cevaba erken müdahale edebilirler (11-13). Tiyol grubu taşıyan bir

tripeptit olan Glutatyon (GSH), hücrede sentezlenebilen ve ROS'u ortadan kaldırarak oksidatif strese karşı hücrel bir antioksidatif yanıt oluşturan antioksidan bir moleküldür. Ayrıca hücrelerdeki kimyasalları detoksifiye eder ve biyolojik zararlı lipid peroksidasyonuna karşı korur. Serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar ve peroksidazlar da dahil olmak üzere çok sayıda enzim için substrat görevi görür. Oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş GSH formlarında işlev görür. ROS üretimindeki aşırı artış, GSH ve GSSG arasındaki oranı değiştirir (14, 15).

NAC, çeşitli hastalıklarda inflamasyonu azaltan, hücrel GSH'un önemli bir öncülü olarak, glutatyon redoks döngüsünü destekleyen hücrel bir antioksidandır. Plazma proteinlerindeki ve hücrelerdeki bir sülfidril (SH) kaynağı olması dışında hidroksil, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi serbest radikallerin direk uzaklaştırıcısı olarak antioksidan özelliğe sahip bir moleküldür (16). Son yıllarda diş hekimliğinde de pek çok çalışmada etkin bir antioksidan ve antiinflamatuvar ve hatta antibakteriyal ajan olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (17, 18).

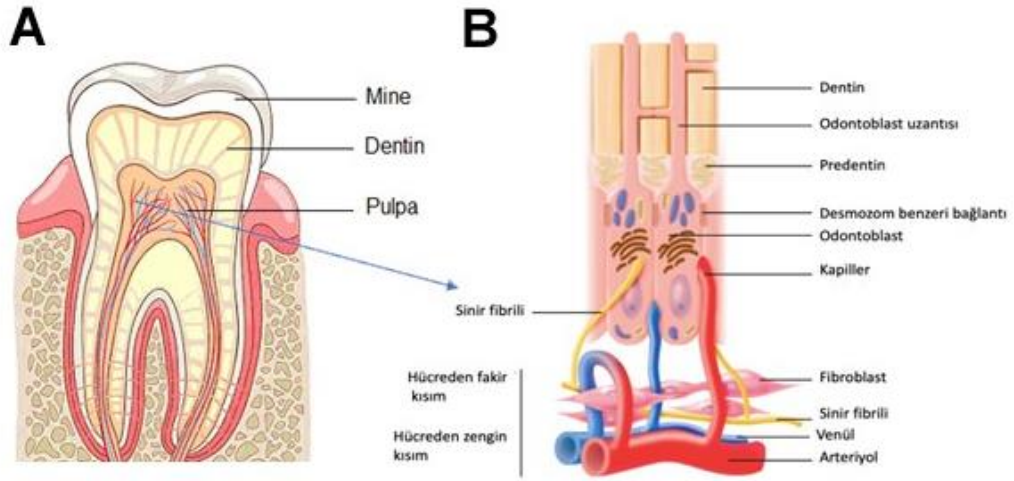
Patojen mikroorganizmaların dental pulpa hücrelerinde oksidatif stres oluşturmadaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada sağlıklı insan diş pulpasından hazırlanan primer hücre kültüründe karyojenik mikroorganizmaların oluşturduğu oksidatif stres döngüsünün incelenmesi ve de oksidatif hasarın elimine edilmesinde etkin bir antioksidan molekül olan N-asetil-sistein (NAC), bu hasarı tamirindeki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla pulpa hücrelerinin, literatürde ROS oluşumuna neden olduğu daha önce çalışmalarla gösterilen H₂O₂, LTA (*Staphylococcus aureus*) ve LPS (*Porphyromonas gingivalis*) ile muamele edilmesi ile ROS, Glutatyon-S-transferaz (GST) ve hücre içi GSH düzeyleri incelendi. Bunlara ilaveten hücre canlılığı ve nekroz apoptoz değişimleri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental Pulpa

Son yıllarda dental pulpanın mezenşimal kök hücre kaynağı olarak uygun ortamlarda odontojenik, nörojenik, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik benzeri dokulara farklılaşabilmesi, kolay elde edilebilen bu dokunun rejeneratif tıpta kullanımını cazip hale getirmiştir (19-21). Farklılaşabilme yeteneğine sahip bu hücreler aynı zamanda diş dokusundaki inflamasyon sırasında da aktif rol almakta ve iyileşmeyi indükleyebilmektedirler (21-23). Bu nedenle bu dokunun öncelikle içeriğinin çok iyi bilinmesi gerekir.

Dental pulpa, etrafı mineralize dentin dokusuyla çevrili, kendisi mineralize olmayan özel bir gevşek bağ dokusudur. Dişin orta kısmında lokalize olan dental pulpa, anatomik ve fonksiyonel olarak, dentin ile birlikte “dentin-pulpa kompleksi” olarak ilişkilendirilir. Fakat biyolojik olarak birbirinden farklı dokulardır (1, 24). Diş pulpası, dişlerin oluşumu, beslenmesi, korunması ve innervasyon özelliklerini sağlar. Dentin pulpa kompleksi en dışta odontoblast hücre tabakası ile başlar, onun altında dar bir bölgede kan kılcal damarları, miyelinsiz sinir lifleri ve ince fibroblastların sitoplazmik uzantılarının yerleştiği hücreden fakir tabaka ile devam eder. Merkeze doğru yaklaştıkça dendritik hücreler benzeri bağışıklık hücreleri, farklılaşmamış mezenkimal kök hücreleri (MSC) ve bol miktarda fibroblast hücrelerinin yer aldığı hücreden zengin tabaka vardır. Vasküler pleksus ile sinirler pulpanın merkezinde yer alır (Şekil 2.1), (1, 25).



Şekil 2.1. A. Diş pulpasının şematik görünümü. B. Pulpanın tabakaları ve pulpa-dentin kompleksi.

2.1.1. Ekstrasellüler Matriks (ECM)

Yetişkin diş pulpası, gevşek bağ dokusundan oluşan ekstrasellüler matriks'in oluşumundan ve devrinden sorumlu olan hücreleri içerir. Genel olarak dentin yapımından sorumlu odontoblastlar, kolajen yapımından sorumlu fibroblastlar, ana hücrelerini oluştururken, savunma hücreleri ve farklılaşmamış kök hücreleri de içerir. Vasküler hücreler, perisitler, nöral hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler, lenfositler, mast hücreleri bu hücre grupları arasında sayılabilir. Bu yapının içinde kollojen olan ve olmayan, protein, karbonhidrat ve su komplekslerinden oluşan yapılar mevcuttur (1, 26). Proteoglikanlar (PG), onları suya bağlayan glikozaminoglikan zincirlerinin eklendiği bir protein çekirdeğinden oluşan, hücre dışı ve hücre yüzeyi ile ilişkili büyük bir molekül grubudur. Bu kompleksler, glikozaminoglikanların, yani hyaluronik asit, kondroitin sülfat, dermatan ve keratan sülfat ve diğer glikoproteinlerin kombinasyonlarından oluşur. ECM'in proteinleri, glikoproteinleri ve proteoglikanları, hücre matrisi yapışması ve sinyalleşmesinde işlev görür; besinlerin, atık ürünlerin ve çözünür sinyal moleküllerinin difüzyonunu düzenler. Hyaluronik asit ile birlikte PG'lar, pulpanın hücreler arası matrisinin viskozitesine önemli ölçüde katkıda bulunur. (27).

Ayrıca fibronektin, osteonektin, kemik sialoproteinleri (BSP), kemik morfogenetik proteinler (BMPs), matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve doku inhibitör matriks proteazlar (TIMPs) benzeri kollajen olmayan ECM komponentlerinin oluşturduğu yapılar mevcuttur (1, 28). Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve pulpadaki diğer inflamatuvar mediatörleri fibroblastlar, endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri tarafından normal koşullarda ve inflamasyon sırasında artan miktarlarda eksprese edilir (1, 29-31). Son yıllarda TGF- β nın pulpa hücresi davranışları üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde araştırılmaktadır (32, 33).

Pulpanın temel organik bileşenlerinden biri olan kolajen hem odontoblastlar hem de fibroblastlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Amino asit yapısına bakıldığında, üçte biri glisin, %23 prolin (%50 hidroksiprolin), lizin (çoğunlukla hidroksilizin), alanin ve serin gibi kısa zincirli aminoasitler (yaklaşık %13) den oluşur (34). Tropokollajen, ışık mikroskobu altında arjirofilik veya retiküler fibriller yapıda olgunlaşmamış bir kollajen lifidir. Tropokollajen molekülleri daha büyük lifler halinde toplanarak kollajen liflerini oluştururlar. Kollajen lifleri elastik değildir ancak dokuya tutarlılığını ve gücünü veren büyük bir gerilme direncine sahiptir. Pulpa doku kollajeninin büyük kısmı tip I ve III, eser miktarda tip V ve tip VI dan meydana gelir. Kollajen tip IV bazal membranlarda bulunur. Tip III kollajen, dağılımı ise retiküler liflere benzeyen ince dallı filamentler olarak görünür (1, 35).

2.1.2. Pulpa Hücreleri

Odontoblastlar

Odontoblastlar hem diş gelişimi hem de yaşlanma sırasında dentinogenezden sorumlu olduklarından, odontoblast dentin-pulpa kompleksinin en karakteristik ve özelleşmiş hücresidir. Dentini oluşturan tabakanın ana hücresi olan odontoblast, dentinden pulpaya yaklaşıldığında karşılaşılan ilk hücre tipidir. Glikoprotein sentezi ve salgılanmasının karakteristik morfolojisini kazanarak farklılaşır (36). Glikoprotein, odontoblast tarafından mineralize edilebilir hale getirilen predentin matrisini oluşturur; Dentinogenez sırasında, odontoblastlar dentini ve dentin tübüllerini oluşturur ve tübüllerin içindeki varlıkları dentini canlı, duyarlı bir doku yapar. Odontoblastların, osteoblastların ve sementoblastların ultrastrüktürel özellikleri

benzer şekildedir; her biri oldukça düzenli bir granüllü endoplazmik retikulum, belirgin bir golgi kompleksi, salgı granülleri ve çok sayıda mitokondri içerir. Bu hücreler RNA bakımından da zengindir ve çekirdeklerinde bir veya daha fazla belirgin çekirdekcik bulunur. Bunlar protein salgılayan hücrelerin genel özellikleridir (24, 27, 36).

Fibroblastlar

Fibroblastlar mezenkimal dokudan köken alır ve diş pulpasında en çok bulunan bağ dokusunun baskın hücreleridir. Pulpa boyunca dağılmış olmasına rağmen, fibroblastlar özellikle hücre açısından zengin bölgede bol miktarda bulunur. Erken farklılaşan fibroblastlar poligonaldır. Geniş ölçüde ayrılmış ve ECM içinde eşit olarak dağılmış görünmektedir. Fibroblastlar, küçük bir sitoplazma ve çekirdek içeren yoğunlaştırılmış kromatin ile uzatılmıştır. Kolajen, (tip I ve III) elastin, proteoglikanlar, glikoproteinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve proteinazlar gibi ECM'in lifli elementlerini içeren çok çeşitli hücre dışı molekülleri sentezleyebilir ve salgılayabilirler. Böylece ECM'in matris proteinlerini üretir ve korurlar. Ayrıca kollajeni fagosit edip sindirebildikleri için, pulpadaki kollajen döngüsünden sorumludurlar (24, 37, 38).

Fibroblastlar, MMP ailesi gibi proteolitik enzimleri aktif olmayan öncüller (proenzim) olarak salgırlar. Daha sonra aktif hale gelmek için değişime uğrarlar. Kollajen bağ dokusunun normal fizyolojik döngüsü ve yeniden şekillenmesi için hücre içi ve hücre dışı parçalanmayı düzenlemek üzere salgılanırlar (38).

Farklılaşmamış Mezenkimal Kök Hücreleri (MSC)

Pulpanın birçok fibroblastı, nispeten farklılaşmamış MSC'dir. Uygun sinyaller verildiğinde diğer hücre soylarına farklılaşabildikleri için bazı ortak özellikleri paylaşırlar. Kemik ve yağ dokularından elde edilen MSC gibi, pulpal MSC de kültürde çok kolay çoğalır ve uyarıldıklarında odontojenik, nörojenik, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik benzeri dokulara farklılaşma yeteneğine sahiptirler. (1, 19, 20).

Bağıışıklık Hücreleri

Normal bir diş pulpası, homeostazı sürdürmek için dendritik hücreler ve makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık hücrelerine sahiptir. Özellikle makrofajlar bağışıklık tepkilerinde yer alan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini eksprese eden hücrelerdir (39, 40). Jontell ve ark. (41) normal pulpada immünokompetan hücrelerin varlığını bildirmiştir. Sağlıklı diş pulpasında diğer bağışıklık hücreleri; T lenfositler ve az sayıda B-lenfositleri, granulositler, mast hücreleri, plazma hücreleri ve eozinofiller gösterilmiştir. Dendritik hücreler ağırlıklı olarak paraodontoblastik alanda ve pulpa-dentin sınırı boyunca yer alır ve immün modülasyonda görev alır. Bu hücreler, belirgin sitoplazmik uzantılara sahiptir, antijenleri yakalamak için yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Makrofajlar diş pulpasının merkezi kısmında bulunur. Sağlıklı diş pulpasında bulunan makrofajlar, ölü odontoblastları ve apoptotik cisimleri fagosite ederek temizleyici görevi görür. İnflamatuvar süreç sırasında, tüm bağışıklık hücrelerinin sayısı artar. (39, 40, 42).

Diş pulpasının mekanik, kimyasal, termal ve mikrobiyal tahriş ediciler tarafından hasar görmesi, karmaşık vasküler, lenfatik ve lokal doku reaksiyonları dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar yanıtları aktive eder. Patojen mikroorganizmalar diş dentin dokusunda çürük meydana getirdiğinde, bu çürük tedavi edilmediği takdirde pulpa dokusuna kadar ilerleyerek pulpa dokusunda başta geri dönüşümlü bir inflamasyon, sonrasında ise geri dönüşümü olmayan bir pulpa inflamasyonuna ve de sonuç olarak hücre ölümüne neden olabilmektedirler. Diş dokusunda meydana gelen inflamasyon vücudun diğer dokularında meydana gelen inflamasyona benzemekle beraber anatomik yapılarındaki farklılık inflamasyonun doğasında da bazı değişimlerin oluşmasına neden olmaktadır (2, 3, 9, 26, 43).

2.2. İnflamasyon

Travma, ROS, mikroorganizmalar gibi uyaranlara karşı konakçı dokunun geliştirdiği koruyucu bir bağışıklık tepkisidir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemleri tarafından yönetilir. Sistemik vazodilatasyon, vasküler geçirgenlik ve lökosit göçü olaylarıyla doku hasarına karşı akut bir inflamatuvar yanıt oluşturarak doğal bağışıklık sisteminin çalışmasını yönlendirir (44). Makrofajlar, monositler,

dendritik hücreler ve nötrofiller dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık hücrelerinin patojen tanıma reseptörleri (PRR'ler), patojen veya zararlı moleküllerle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP, DAMP) tanıma işlevini gerçekleştirirler. Mitojen aktif protein kinaz (MAP kinaz) yolağı ve Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) aktive edilmesi, Interlökin -1 (IL-1), IL-6 ve Tümör Nekrozis Faktör -Alfa (TNF- α) benzeri proinflamatuvar ve/veya IL-4,10 ve Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta1 (TGF- β 1) benzeri anti-inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin salınımını stimüle eder; fagositoz, bakteri yok etme ve antijen sunumu gibi olaylar tetiklenir (45, 46). Makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak sitokin üretimi için hedef hücrelerdir ve iltihaplanma süreçlerini başlatıp koordine ederler. Bu süreç başlangıçta organizma için avantajlı görülse de kontrol edilemezse aşırı inflamasyona ve buna bağlı birçok inflamatuvar hastalığa yol açabilmektedir (21, 44, 47).

2.2.1. Dental Pulpa İnflamasyonu

Diş çürükleri, çürük yapıcı bakterilerin şeker açısından zengin bir ortamda salgıladıkları asitlerin diş sert dokularını demineralize etmesiyle oluşur. Mine sert dokusunun demineralize olması sonucunda dentin tübüllerine başlangıçta streptokoklar, laktobasiller ve aktinomiçes benzeri bakterilerin de dahil olduğu Gram-pozitif bakteriler, daha sonrada Gram-negatif bakteriler ve metabolitleri nüfuz eder. Bu mikroorganizmaların çoğalması ve metabolik aktivitesi, bakteriyel bileşenlerin dentin tübüllerine salınmasına ve bunların periferik pulpaya doğru difüzyonuna yol açar. Dentin-pulpa arayüzünde konakçı hücreler tarafından bakteriyel bileşenlerin tanınması, antibakteriyel, immün ve inflamatuvar yanıtlar dahil olmak üzere konak koruyucu olayları aktive edilir (2, 4, 9, 48). İnflamatuvar modülasyonunun düzenlenmesinde PRR sınıfına ait Toll benzeri reseptör (TLR) ailesi önemli bir yer tutar (49). Sırasıyla Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri algılamasında yer alan TLR2 ve TLR4, daha önce sağlıklı pulpadaki odontoblast hücre zarında tespit edilmiştir (50). Yapılan çalışmalar odontoblast TLR2'nin LTA'ya bağlanarak hem kendisini hem de sinyal yollarını aktive ettiğini, dentinogenezi inhibe ederek, proinflamatuvar kemokin ve TNF- α proinflamatuvar sitokininin eksprese edilmesine neden oldukları gözlenmiştir (9, 51, 52).

Pulpa ve dentin içindeki bağışıklık hücrelerinin ekstrasvazasyonu ve antimikrobiyal aktivitesi, bakteriyel enfeksiyonla savaşmayı amaçlarken aynı zamanda önemli yan konakçı doku hasarına da neden olabilen moleküllerin salınmasına neden olurlar. Odontoblastların, aralarında beta-defensinler ve nitrik oksidin (NO) olduğu çeşitli antibakteriyel maddeler ürettiği tespit edilmiştir (9, 24). Benzer şekilde pulpada yumuşak doku matrisi yoluyla immün hücre migrasyonu için gerekli olan MMP'leri ve ROS'u artırır. Bunların fazla miktarda artışı da konakçı hücrelere ve dokulara zarar verir (43). Diğer taraftan, LPS inkübasyonunun TLR4 yoluyla, dental pulpa kök hücresinde pro-inflamatuar sitokin salınımını artırırken, uzamış LPS inkübasyonunun ise anti-inflamatuar sitokin salınımını, kök hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Bu da TLR 'nin ve LPS benzeri bakteriyel komponentlerin hem yıkımda hem de rejeneratif olaylarda rol oynayabildiğini gösterir. (53, 54).

Dentin-Pulpa Kompleksinde İnflamasyon-Rejenerasyon Etkileşimi

Dentin demineralizasyonu sırasında dentin matriksinden biyoaktif moleküllerin salınması ve dentin tarafından salgılanan antibakteriyel maddeler, bakteriyel enfeksiyonları erken aşamalarda durdurabilir. Etkilenen bölgede odontoblastlar, primer ve sekonder dentine kıyasla daha zayıf organize ve mineralize bir matriks olan onarıcı (tersiyer) dentini geliştirerek bir dentin bariyeri oluşturur. Yeni dentin pulpayı bakteriyel yan ürünlerden ve bakterinin kendisinden koruyarak pulpa iyileşmesini destekleyebilir (55, 56). Diğer taraftan, odontoblastların sınırlı (veya hiç) çoğalma kabiliyeti olmayan post-mitotik hücreler olması bu sürecin her zaman tamirle sonuçlanmasına engel olur (57, 58).

Dental inflamasyon, çoğunlukla nekroz veya apoptoz yoluyla pulpa yıkımına yol açan olumsuz bir faktör olarak kabul edilmiştir. İnflamasyon, dentin bariyerini aşp pulpaya ulaştığında, diş pulpa iltihabı geri dönüşümlü bir fazda ise, gelişimsel, epitel ve mezenkimal doku arasında bir dizi moleküler ve hücrel sinyal olayı meydana gelir. Pulpa içindeki kök/progenitor hücreler ve perisitler, yaralanma bölgesine ev sahipliği yapmak ve odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmak için harekete geçerek reperatif bir dentin oluşturmak için odontoblastlara farklılaşabilirler (9, 22, 26, 58).

Neves ve ark.(59) makrofajların baskılandığında, onarıcı dentin oluşturma kapasitesinin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Diş pulpasında makrofajların varlığı, odontoblast benzeri hücelere farklılaşabilen Wnt kök hücre aktivasyonu için de gereklidir. Wnt hücrelerinin artmasının, diş pulpasında TGF- β 1'i önemli ölçüde yukarı regüle ettiği ve Wnt/ β -katenin yolunun proinflatuar fazdan, antiinflatuar faza (M1-M2 polarizasyonu) polarizasyonunda bir hızlanma ürettiğini bildirilmişlerdir (59-61).

Birçok çalışma, dental pulpa kök hücrelerinin (DPSC) odontoblast benzeri hücelere farklılaşabildiğini ve dentin/pulpa benzeri bir kompleks oluşturabildiğini göstermiştir (55, 62). Yeni pulpa benzeri doku oluşturmak için, kök kanalında iki doku mühendisliği konsepti uygulanmaktadır; birincisi hücre transplantasyonuna, ikincisi ise “*cell homing*”e dayanır. Transplantasyon yaklaşımında kök hücreler ve büyüme faktörleri uygun bir iskele üzerine yerleştirilerek doğrudan kök kanalına uygulanır. “*Cell homing*” yaklaşımında ise, periapikal dokuların stimüle edilmesi yoluyla lokal kök hücreler periapikal dokulardan rekombinant sinyal molekülleri veya endojen, dentin kaynaklı büyüme faktörleri tarafından çekilir ve kök kanalına göç eder. Ek olarak, “*cell homing*”i, lokal inflammatuar hastalıklar nedeniyle hasar görmüş dentin-pulpa kompleksini eski haline getirmek için de kullanılabilir (55, 63). Onarıcı dentin oluşumu, diş içinde hafif bir inflammatuar yanıt gerektiren karmaşık bir süreçtir (22, 23, 64).

Derin çürüklerin neden olduğu pulpa iltihabı göz önüne alındığında, bakteriyel lipit yan ürünlerinin hücre büyümesini, hücre döngüsü kinetiklerini ve protein sentezini inhibe ederek, hücreler arası ROS'u artırdığı belgelenmiştir (65, 66). Üretilen hücreler arası ROS'un sitotoksitesinin kontrolü, sırayla, reperatif ve rejeneratif süreçte yer alan progenitör kök hücreler gibi belirli pulpa hücrelerinin toplanmasını uyarabilir (24, 67). Bu süreçte oksidatif stresin rolünün incelenmesi bize rejeneratif tedavilerde farklı bir bakış açısının gelişmesini sağlayabilir.

2.3. Oksidatif Stres

Metabolik faaliyetlerin ve çevresel stres faktörlerinin bir sonucu olarak vücut, serbest radikaller veya gerçek radikal olmayan çeşitli reaktif türler üretir. Bir ya da

daha fazla paylaşılmamış elektrona sahip atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Bunlar yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Başka moleküllerden kolaylıkla bir elektron alır (oksidan) ya da bir elektron verirler (redükta). Eşit olmayan sayıda elektrona sahip serbest radikaller, kendilerini stabilize etmek için başka bir elektrona bağlanma eğiliminde olduklarından oldukça reaktif türlerdir. Çok kısa bir yarı ömre sahip olmasına rağmen, bu oksijen, nitrojen veya kükürt türevli türlerin aşırı üretimi, oksidasyon adı verilen geniş bir kimyasal reaksiyonlar zinciri yoluyla biyomoleküllere ve hücrelere zarar verebilir (21, 68, 69).

Gerçekte organizmada tüm yaşamsal faaliyetler, bir serbest radikal olan moleküler oksijene (O_2) ihtiyaç duyar. Oksijen molekülü doğası gereği kararsız, reaktif bir moleküldür, çok kolaylıkla elektron alıp verebilir. Hücrede genellikle gerçek oksijen radikalleri; süperoksit, hidroksil, peroksil ($ROO\bullet$) ve hidroperoksil radikali ($HOO\bullet$) veya gerçek radikal olmayan reaktif oksijen moleküller; singlet oksijen, hipokloröz asit, ve hidrojen peroksit şeklinde bulunurlar. ROS'a ek olarak, nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit ($OONO-$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitröz asit (HNO_2) gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) de oksidatif strese katkıda bulunur ve ilk fırsatta bir başka molekülden elektron çalarak saldırdığı molekülün yapısını bozar ve onu aktiveştirir. Böylece devamlı olarak hücre moleküllerinin aktiveştiği hücre hasarı yapan tepkime zinciri oluşur (11, 12).

Serbest radikallerin (ROS/RNS) endojen olarak üretiminde mitokondriyal elektron transport sistemi (solunum zinciri), ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz enzim yolları en yaygın kaynaklardır. Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve miyeloperoksidazla birlikte Sitokrom P450 de hücre içi ROS'un diğer kaynaklarını oluşturur. Bu enzimler karaciğerde bulunan ksenobiotiklerin metabolizmasının bir sonucu olarak serbest radikalleri üretirler. Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon ve kimyasal ajanlara maruz kalma, besinler ve tıbbi tedaviler gibi sebeplerle metabolik yan ürün olarak da üretilirler (12, 69, 70). Serbest radikallerin kronik inflamasyon, yaşlanma, karsinogenez, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalığın ve patolojik sürecin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (69, 71).

Sağlıklı bir durumda, insan vücudu, endojen veya ekzojen antioksidan moleküller ve enzim sistemleri dahil olmak üzere antioksidan sistemler aracılığıyla oksidan moleküllerin etkilerini nötralize etmek için yeterli mekanizmalara sahiptir. Bununla birlikte, prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge prooksidan lehine değişirse, oksidatif stres denilen olguya neden olur. Bu dengesizlik, antioksidanların tükenmesi veya reaktif moleküllerin (ROS/RNS)/RSS) birikmesi nedeniyle ortaya çıkabilir (69, 72, 73). Ortaya çıkan bu moleküller hücre içi lipid ve protein yapılarının ve DNA'daki bazların da çift bağlarına saldırır ve bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Sonuçta hücre içi lipid, protein, nükleotid koenzimler, karbonhidratlar ve DNA gibi makromoleküller de oluşan hasara bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve hücre toksisitesi gelişebilir.

Oksidatif stres ve inflamasyon arasında sıkı bir ilişki varlığı, araştırmacılar tarafından belgelenmiştir. ROS ve diğer reaktif türler, inflamatuvar yanıtın bir parçası olarak üretilir ve adezyon moleküllerinin yanı sıra anahtar proinflamatuvar hücre içi sinyal yollarını aktive ederek sırayla pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenler ve kronik inflamatuvar durumu indükler (10, 74-76). Çürükle ilişkili bakteriler tarafından da uyarılan bu sitokinler, aynı zamanda aktif mitokondriler tarafından hücrelerde tekrar ROS oluşumuna neden olarak bir döngü oluşturur. Aşırı ROS elimine edilemediğinde mitokondriden sitokrom c salınımı ve efektör kaspazların aktivasyonu sonucu apoptotik hücre ölümü gelişebilir. (77).

Düzenlenmiş bazal ROS seviyesi ise, artan hücre büyüme aktivitesi, doku tamiri, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve damarlanmadaki artışı sağlamak için bir sinyal molekülü görevi görebilir. (24, 78, 79). Bu sinyal yollarının aktivasyonu, genel olarak immün ve inflamatuvar yanıtların amplifikasyonunda ve aynı zamanda onarım ve rejenerasyonda rol alır (9). Rejeneratif tıpta MSC'nin artan potansiyel uygulamaları nedeniyle, MSC farklılaşması üzerine yapılan çalışmalar, ROS'un farklılaşma yönünü belirlemede etkili bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Aslında, farklılaşmamış hücreler, eksojen ROS'a farklılaşmış hücelere göre daha az dirençlidir (80). Yapılan kök hücre farklılaşma çalışmalarında ROS'un artışının osteojenik ve nörojenik farklılaşmayı baskımlarken, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmada indükleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (21, 81, 82).

2.3.1. Serbest Radikallerin Nötralizasyonu- Antioksidan Mekanizma

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan moleküller dahil, insan vücudundaki çoklu mekanizmalar, reaktif moleküllerin yıkıcı etkilerine ve oksidatif strese karşı koymak için antioksidan sistemi oluşturur (83). Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir. Normalde hücrelerde serbest radikaller sürekli oluşur ve organizmada bu serbest radikalleri temizleyen bir antioksidan sistemi vardır. Antioksidan sistemdeki yetersizlik veya serbest radikallerin çok sayıda üretilmesi hücrelerde oksidan/antioksidan dengesini bozarak son derece toksik yan etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir (12, 69, 72).

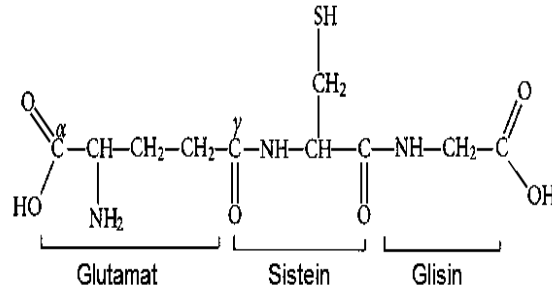
Antioksidanlar, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler. Katalitik metal iyonlarını ortamdaki uzaklaştırırlar. Radikal zincir reaksiyonlarını kırarak reaksiyonların ilerlemelerini engellerler. Bunların yanı sıra serbest radikallere bağlı oluşan hasarı onarıcı etki de gösterirler (84, 85).

Antioksidanlar, etki mekanizmasına (koruyucu veya zincir kıranlar), bulundukları bölgeye (hücre içi, hücre dışı ve membran ilişkili), eriyebilirliklerine göre (suda veya yağda eriyebilenler), koruduğu yapılara göre (DNA, protein veya lipid koruyucular), orijinlerine göre (Endojen, eksojen veya sentetik olanlar) ve de fonksiyonlarına göre (enzimatik veya enzim olmayanlar) olarak sınıflandırılabilir. Endojen olanlar organizmada sentez edilebilen, eksojenler ise dışarıdan diyetle alınan antioksidanlardır. Zincir kıran antioksidanlar (örn: vitaminler, polifenoller, bilirubin, albümin, redükte glutatyon vb.), okside olmadan önce elektron verirler. Daha sonra redükte olmaları gerekir. Yağda eriyen antioksidanlar (örn: vitamin A ve E, bilirubin, redükte ubikinon vb.) ise hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı korurlar (11, 72, 85).

Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), GST, Glutasyon redüktaz (GR) ve Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PDH) antioksidan savunmada yer alan enzimlerdir. GSH-Px glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş formuna (GSSG) dönüştürürken, GR enzimi G6PDH'ın sağladığı NADPH ile GSSG'nin tekrar indirgenmiş formuna dönüşümünü katalizler. Antioksidan enzimlerin temel görevlerinden birisi GSH/GSSG döngüsünü korumaktır. GSH molekülü hücrelerde pek çok yaşamsal olayda aktif rol almaktadır (86).

Glutasyon

Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan GSH (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin), hücre içinde sentez edilebilen okside ve redükte formda işlev gören insan fizyolojisi ve patolojisinde majör rol oynayan bir antioksidan moleküldür. Serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır (86). Hücresel GSH'un yaklaşık %90'ı sitozolde, %10'u mitokondride ve küçük bir yüzdesi endoplazmik retikulumda yer alır. GSH'un glutamat ve sisteinini bağlayan peptit bağı, geleneksel α -karboksil grubu yerine glutamatın γ -karboksil grubu aracılığıyla oluşur. Glutamat ve sistein arasındaki bu sıradışı bağ sayesinde hücre içi peptidazlara karşı korunmaktadır. GSH molekülü yapısında bulunan karboksil gruplarından dolayı iki negatif yük ve amino grubundan gelen bir pozitif yük nedeniyle suda çözünabilir özelliğe sahiptir. Yapısında sistein kalıntısındaki tiyol grubu elektrofilik etkileşimlere açık pozisyonda olmasıyla işlevsellik kazanmaktadır. Tiyol grubunun pKa'sı 9,2 dir (Şekil 2.2), (87, 88).



Şekil 2.2. Glutatyonun okside ve redükte formunun moleküler yapısı.

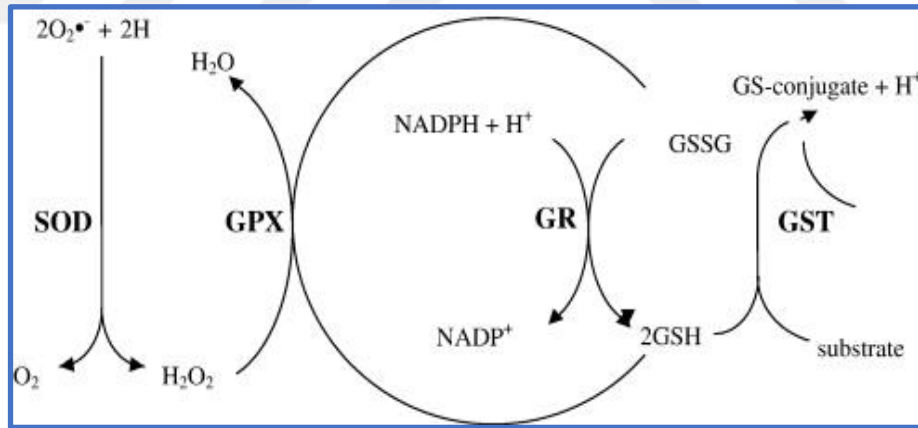
GSH'un ana işlevlerinden birisi ksenobiyotiklerin ve/veya metabolitlerinin detoksifikasyonudur. GST tarafından katalize edilen reaksiyonlarda kendiliğinden veya enzimatik olarak konjugatlar oluştururlar. Hücre içi redoks balansının sağlanmasında yer alan GSH, oksidatif stres tarafından etkilenen sinyal yolunu da regüle eder. Birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan GSH, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Aynı zamanda hücre içinde oksijen radikalleri ile enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir. Bunların dışında; proteinlerin temel tiyol durumunun korunması, sistein için bir rezervuar sağlanması, nitrik oksit homeostazının düzenlenmesi DNA sentezi ve bağışıklık fonksiyonu, hücre çoğalması ve ölümü gibi kritik hücresel süreçlerin modüle edilmesinde görev alır (89, 90).

GSH'un antioksidan işlevi, sistein kalıntısındaki sülfhidril grubunun oksidasyonundan kaynaklanır ve ROS'u doğrudan temizleyerek ve GPx'ın bir substratı olarak hareket ederek proteinlerin temel tiyol durumunu sürdürme gibi benzersiz bir işleve sahiptir. Normal redoks homeostazı sırasında, hücrelerde GSH ve GSSG arasındaki oran, NADPH'in substrat olarak görev yaptığı GR reaksiyonu sayesinde 100:1 oranındadır. Endojen olarak üretilen H_2O_2 , selenyuma bağımlı GSH-Px varlığında GSH tarafından indirgenir. Bu süreçte GSH, GSSG'ye oksitlenir ve bu da GR tarafından NADPH varlığında tekrar GSH'ye indirgenerek bir redoks döngüsü oluşturur. H_2O_2 , sadece peroksisomda bulunan katalaz ile de indirgenebilir. Mitokondri de ise katalaz olmadığı için mitokondriyal GSH hem fizyolojik hem de patolojik olarak üretilen oksidatif strese karşı savunmada kritik öneme sahiptir. (91).

Çürük yapıcı mikroorganizmaların kendisi ya da hücre zarı komponentleri dental pulpada bir inflamasyon kaskadı başlatarak hem proinflamatuvar sitokin salınımına hemde serbest radikallerin artışına yol açabilmektedir (2, 9, 22). Hücre içinde ROS artışı GSH'ın radikalleri temizlemek için kullanılması, dolayısıyla da hücre içinde azalmasına neden olmaktadır. Araştırmalar LPS, dental monomerler (HEMA, TEGMA ve MMA türevi metakrilatlar) ile, dental pulpa hücrelerinin stimüle edilmesinin ROS artışı ve GSH azalmasına neden olduğunu göstermiştir (92-94). Ayrıca GSH'un dental pulpa hücrelerinde HEMA sitotoksitesine karşı koruyucu bir etkiye sahip bulunmuştur (95). Lefeuvre ve ark. ise fibroblastlarda hücre dışı bir sistemde TEGDMA'nın GSH'nin tükenmesine neden olurken GSTP1 aktivitesini modüle ettiğini bildirmişlerdir (96).

Glutasyon S-Transferaz

GST'lar, doğadaki detoksifiye edici enzimlerin en önemli ailelerinden biridir. GST'ların klasik aktivitesi, elektrofilik merkezlere sahip bileşiklerin tripeptit glutatyonla konjugasyonudur (Şekil 2.3),



Şekil 2.3. GSH ilişkili enzimler (97).

Bunların dışında GST'lar hormon biyosentezi, tirozin yıkımı, peroksit parçalanma, dehidroaskorbat indirgeme ve çift bağlı cis-trans izomerizasyonu gibi işlevlere de sahiptirler. Bu süper aile tarafından kataliz edilen anahtar reaksiyon, tripeptit glutatyonun (GSH, γ -glutamil-sisteinil-glisin) elektrofilik bir merkeze sahip olan bir hidrofobik kosubstrat ile konjugasyonudur. GSH ile konjugasyon, bu bileşikler daha çözünür hale getirir.

GST'lar hücrede bulunduğu konuma göre sitozolik (en büyük üst aileyi oluştururlar), mitokondriyal ve mikrozomal (membran bağlı-MAPEG) GST'lar olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır (98). Sitozolik GST'ların kimyasal özellikleri, aminoasit dizilişi ve immununolojik aktivitelerine göre 7 farklı izoenzimi (alfa, mü, pi, sigma, teta, zeta ve omega) vardır. GST'ın fizyolojik substratı GSH'ı bağlayan ve hidrofilik özellikte olan kısım G bölgesi, yapısal olarak farklı substratları bağlayan ve hidrofobik özellikte olan kısım ise H bölgesi olarak isimlendirilir. GST enzim ailesindeki farklı izozimlerinin, H bölgesindeki aminoasit dizilişlerinin farklılık göstermesi enzim ailesinin substrat çeşitliliğine neden olmaktadır (99).

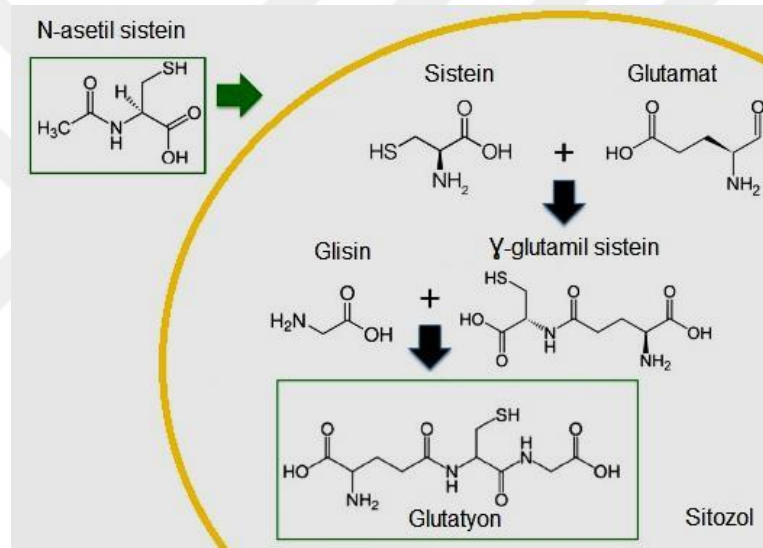
Çeşitli GST'lar farmakolojik açıdan önemlidir. İnsanlarda, çoğu sitosolik GSTlar ilaçlar ve diğer ksenobiyotiklerle konjugasyon reaksiyonlarını katalize eder (98). Alfa ve zeta sınıfı izozimlerin GSH'a bağlı izomerizasyon aktivitelerine sahip olduğu bilinmektedir. Bakterilerde, beta sınıfı GST'lar, kimyasal ve oksidatif streslere karşı koruma, antimikrobiyal ilaç direnci ve ksenobiyotiklerin katabolizması gibi çeşitli farklı işlemlerde yer alır. Yapılan çalışmalar GSTP1 izoenziminin kemoterapötik kanser ilaçlarını GSH konjugasyonu ile inaktive ederek kanser hücrelerinde ilaç direncini indüklediğini göstermiştir (100) (98).

İnflamatuar süreç sırasında artan ROS'un detoksifiye edilmesinde etkin bir molekül olan GSH, tripeptid yapıda büyük bir molekül olduğu için dışarıdan takviye olarak hücre içine alınması mümkün değildir. Bunun yerine hücre içi GSH sentezinde hız kısıtlayıcı bir bileşen olan sistein için, dışarıdan N-asetil sistein molekülünün hücrelere verilmesi, GSH rejenerasyonunu artırarak hücrelerin antioksidan savunma kapasitelerini artırmaktadır (101).

2.3.1.3. N-asetil-sistein (NAC)

L-sisteinin bir N-asetil türevi olan NAC, serbest radikalleri temizlemeye ve metal iyonlarını komplekslere bağlamaya yardımcı olan bir molekül olarak son yıllarda artan şekilde kullanılmaktadır. (18). NAC, doğrudan elektrofilik bir etkileşime girerek serbest tiyol yan zinciri aracılığıyla hidroksil radikali, nitrojen dioksit ve karbon trioksit iyonu, lökositler tarafından üretilen ROS'u detoksifiye eder. NAC, NO ile doğrudan reaksiyona girmemesine rağmen, indirgenmiş ve protonlanmış formu

olan nitroksil (HNO) ile reaksiyona girer (102). Plazma proteinlerindeki ve hücrelerdeki bir SH kaynağı olmasının yanı sıra NAC, kompleksler üretmek için tiyol yan zinciri aracılığıyla Cu^{2+} ve Fe^{3+} gibi geçiş metali iyonlarını ve Cd^{2+} , Hg^{2+} ve Pb^{2+} gibi ağır metal iyonlarını şelatlar. Bu şelasyon işlemi, bu metal iyonlarının vücuttan atılmasını kolaylaştırır (103) Diğer taraftan, NAC'in süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit ile reaksiyonları fizyolojik koşullar altında nispeten düşüktür. Bu radikaller üzerine NAC'in dolaylı antioksidan etkisi, hücre içi GSH'un yenilenmesine dayanır. NAC, L-sistein vermek üzere hücrelerde kolayca deasetillenir, böylece hücre içi GSH sentezini teşvik eder ve LPS ile indüklenen ROS üretimini baskılar (18, 102) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. N-asetil sisteinin hücre içine alınarak glutatyon molekülünün sentezlenmesi.

NAC, anti-inflamatuar aktivitesini, NF- κ B inhibisyonu ve proinflamatuar sitokin sentezinin modülasyonu yoluyla ilerleterek, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. NAC bir antibiyotik olmamasına rağmen, antimikrobiyal özelliklere sahiptir ve tıbbi olarak ilgili patojenlerin bakteriyel biyofilmlerini yıkar. Bu özellikler, pek çok sistemik hastalıkta olduğu gibi NAC'i ağız sağlığını yönetmek için potansiyel bir aday haline getirir (18).

Son yıllarda diş hekimliğinde de pek çok çalışmada etkin bir antioksidan ve antiinflamatuar ve hatta antibakteriyel ajan olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Diş hekimliğinde geçmiş yıllarda NAC, rezin monomer sitotoksisite çalışmalarında oksidatif stresi ve pulpa hücre hasarını önlemek için bir antioksidan

olarak kullanılmıştır (17, 94, 104, 105). Ayrıca sistemik olarak uygulandığında doza bağımlı bir şekilde diş eti fibroblastlarında LPS ile indüklenen inflamatuvar yanıtları baskılamış (106) ve deneysel olarak periodontitis geliştirilen ratlarda alveoler kemik kaybını önlemiştir (107). Son zamanlarda NAC'nin *E. faecalis*'in biyofilm formlarının yanı sıra, planktonik endodontik patojenlere (*Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans* ve *E. faecalis*) karşı güçlü antibakteriyel etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (104, 105).

NAC'in lipopolisakarit kaynaklı oksidatif stresi ve inflamatuvar sitokinleri inhibe etmenin yanı sıra NF- κ B ligandının Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (18). Makrofajlarda ve dişeti fibroblast hücrelerinde interlökin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 ve TNF- α benzeri proinflamatuvar sitokinleri inhibe ettiği ve TGF- β 'yı ise 24 saatlik inkübasyonda arttırabildiği gözlenmiştir (106, 108). Bununla birlikte uzun süreli düşük doz NAC uygulamasının kinaz fosforilasyonunun arttırılması yoluyla proinflamatuvar ekspresyonu arttırdığı bildirilmiştir (109). Son yıllarda yapılan çalışmalarda NAC'nin osteoblast hücreleri kadar pulpa hücrelerine karşı da koruyucu olduğu gösterilmiştir (17, 110). GSH, aşırı ROS'u etkili bir şekilde uzaklaştırdığından, yakın tarihli bir çalışmada Mineral trioksit agregate (MTA) ajanı, çözünür N-asetil sistein antioksidan molekülü ile birlikte kullanılmış ve DPSC'lerin farklılaşma kapasitesini arttırmıştır (110, 111). Bu nedenle, rejeneratif tıpta onarıcı dentin oluşumu ve tedavi modellerinin tasarımında, dentin hasarına yanıt olarak diş pulpasında meydana gelen inflamatuvar süreçleri ve bunların lokal kök hücre aktivasyonu üzerindeki etkilerini bilmek önemlidir (59).

LPS tarafından aktive edilen hücrelerde inflamasyon ve oksidatif stress aynı anda oluşur (46). Diğer taraftan patojen mikroorganizmaların dental pulpa hücrelerinde oksidatif stres oluşturmadaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada sağlıklı insan diş pulpasından hazırlanan primer hücre kültüründe karyojenik mikroorganizmaların oluşturduğu oksidatif stres döngüsünün incelenmesi ve de oksidatif hasarın elimine edilmesinde etkin bir antioksidan molekül olan NAC'in, bu hasarı tamirindeki rolünün incelenmesi hedeflenmiştir. Pulpa hücreleri literatürde ROS oluşumuna neden olduğu daha önce çalışmalarla gösterilen H₂O₂,

karyojenik bakterilere ilişkin LTA (*Staphylococcus. aureus*) ve LPS (*Porfiromonas gingivalis*) ile tek başına veya NAC preinkübasyonu ile muamele edilerek hücre canlılığı, nekroz ve apoptoz düzeylerinin akım sitometri yöntemi ile, ROS, GST enzim aktivitesi ve hücre içi GSH düzeyleri biyokimyasal analizler ve immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle çalışıldı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

GO 18/234 numaralı “Karyojenik Bakterilerin Dental Pulpa Hücresinde Oluşturduğu Oksidatif Stresin İncelenmesi” başlıklı çalışma konusu ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul izni alındı. 18034 no’lu proje ID ile H.Ü. Bilimsel araştırmalar biriminden destek onayı alınarak çalışmaya başlandı. Çalışmamızda dental pulpa dokusundan hazırlanan primer hücre kültüründe planlanan çalışmalar gerçekleştirildi.

3.1. Kimyasallar ve Gereçler

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan genel kimyasallar: Dimetil sulfoksit (DMSO), 5,5-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Dosetaksel, Dulbecco'nun fosfat tampon tuzu (D-PBS), Etil alkol (Etanol), Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (Na_2EDTA), Enhanced Kemilüminesans (ECL), Fenilmetilsülfonil florür (PMSF), Fetal sıgır serumu (FBS), Redükte glutasyon (GSH), Glutasyon redüktaz (GR), GSTP1 için primer tavşan antikoru ve sekonder anti-IgG antikoru, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), N-asetil sistein, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4), Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4), RPMI 1640 (RPMI) besiyeri, Fenol kırmızısı içermeyen RPMI besiyeri, Tris, Tripsin-EDTA, 20 kimyasalları Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD); Trietanolamin (TEAM) ve Serine British Drug Houses Ltd. firmasından (Poole, İngiltere); İzotonik sodyum klorür çözeltisi Eczacıbaşı firmasından (İstanbul, Türkiye), Sığır serum albümini Bio-Rad firmasından (Hercules, CA, ABD), Penisilin-Streptomisin içeren DMEM F12 besiyeri (Gibco, USA) NAC (Kat. No: A7250, Sigma, Darmstadt, GERMANY), H_2O_2 (Sigma 18304-14, Darmstadt, GERMANY) LPS (SMB00610) ve LTA (L2515) Sigma-Aldrich, firmasından (Darmstadt, GERMANY), goat anti-mouse 488 (405310, Biolegend) WST-1 (Kat. No: 5015944001 Roche Applied Science, Mannheim, GERMANY), anti-mouse glutasyon (D8) (ab19534, Cambridge, UK), anti-mouse GSTP1 (3F2C2) (STJ98122, london, UK), goat anti-mouse (ab150113) Diklorofluorescein diasetat (DCFDA) (D 6883, Sigma, St.Louis, MO, ABD), Bradford

reaktifi (Sigma, St. Louis, MO, ABD) trikloroasetik asit (TCA) (Sigma, St.Louis, MO, ABD) sağlandı.

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan kitler: FITC Annexin V Apoptosis Detection kiti BD Biosciences firmasından (San Jose, CA, USA), Bradford Protein Assay kiti Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD) temin edildi. DCFDA-HücreSEL ROS Test Kiti (ab113851) temin edildi.

Çalışmanın farklı aşamalarında kullanılan laboratuvar cihazları: Akım sitometresi (Beckman Coulter, Cytoflex), Biyoanalizör (Agilent 2100 Bioanalyzer), NanoDrop spektrofotometresi (Agilent), Homojenizatör (Qiagen Tissuelyser Lt Bead Mill), vortex (IKA) pH metre cihazı (Consort C830), Santrifüj cihazı (Eppendorf 5417R), Yatay çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101), Analitik terazi (Mettler Toledo AG204), Mikro-plaka spektrofotometresi (Molecular Devices SpektraMax M2), ELISA okuyucusu (Versamax, Molecular Devices), Distile su cihazı (Nanopure Infinity), Derin dondurucu, -80°C (Sanyo), Manyetik karıştırıcı (Elektromag M-21), Mikropipetler (Gilson ve Eppendorf), Floresan mikroskop(Olympus IX73 inverted microscope), (Leica DM 6B), İnkübatör (Heraeus, Hanau, GERMANY) kullanıldı.

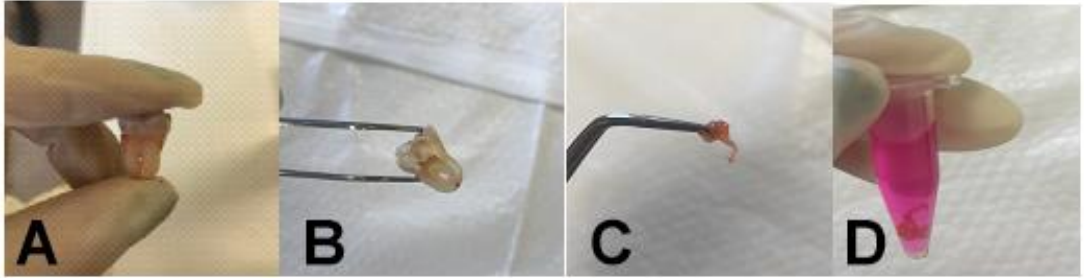
3.2. Pulpa Dokularının Elde Edilmesi ve Primer Hücre Kültürünün Kurulması

3.2.1. Pulpa Dokularının Toplanması

Çalışma protokolümüz için H.Ü. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan GO 18/234 kayıt numarası ile etik kurul onayı alındı. 18-30 yaş aralığında sistemik hastalığı olmayan, son 3 hafta antibiyotik kullanmamış, sağlıklı dişeti dokularına sahip olan bireylerden elde edilen çürüksüz, çene kemiğinde yer olmaması ya da diş sürmesine bağlı sorunlar nedeniyle H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi bölümünde çekimine karar verilen 3 adet gömülü 20 yaş dişi, çekim sonrasında hastaların onam vermesi ile primer hücre kültürü hazırlamak için kullanıldı. Çalışmaya operasyon sırasında sadece tek parça halinde çıkarılan gömülü dişler dahil edildi. Çekim sonrasında dişler içinde fosfat tampon (PBS, pH.7,4) bulunan steril bir

plastik kap içinde H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD kliniğine transfer edildi.

Diş çekimi sonrasında diş yüzeyindeki eklentiler % 70 lik alkol emdirilmiş gazlı bez ile temizlendikten sonra steril bir frez yardımıyla diş boyunca pulpaya ulaşmayan horizontal oluk açıldı. Daha sonra steril bir siman spatülü oluk boyunca yerleştirildi. errahi “davye” yardımıyla ikiye ayrılarak steril pens ile öz odasında bulunan pulpa dokusu çıkarılarak içinde % 5’lik Penisilin-Streptomisin içeren DMEM F12 besi yeri bulunan 1,5 ml’lik plastik tüp içinde H. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD hücre kültürü laboratuvarına ulaştırıldı (Şekil 3.1. A,B,C,D).

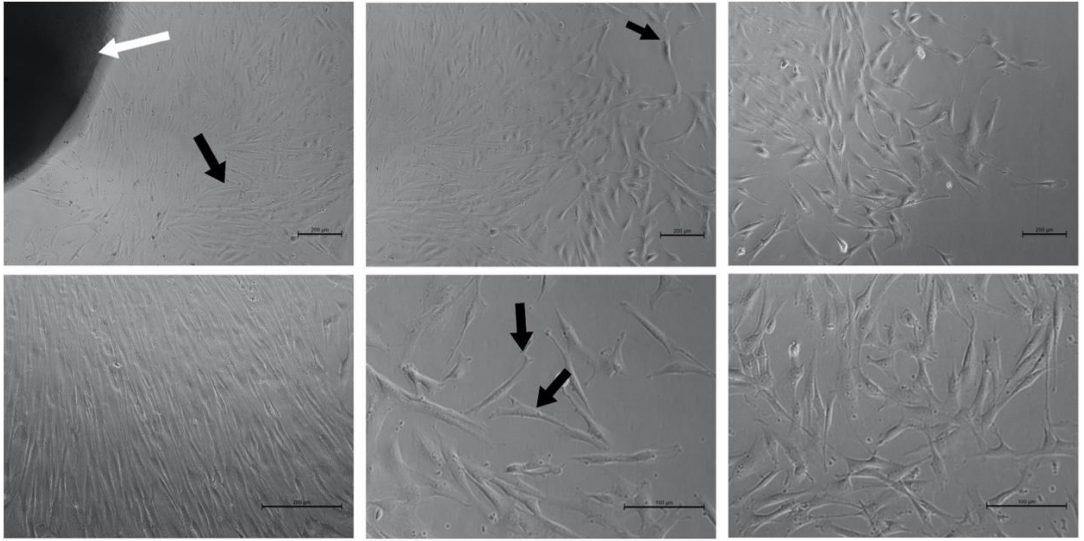


Şekil 3.1. A: Çekilmiş dişin yüzeyleri temizlendikten sonraki görüntüsü, B: Dişin ikiye ayrılmış şekli, C: Diş pulpası, D: Besi yeri içinde taşınması.

3.2.2. Primer Hücre Kültürünün Kurulması

Besiyeri içine alınan pulpa doku örnekleri 500 x g de 10 dakika santrifüjlendi. Pulpa dokuları steril şartlar altında bistüri yardımıyla $\sim 2\text{mm}^3$ büyüklüğünde küçük parçalara bölündükten sonra %10 fetal dana serumu (FBS), %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin (PenStrep) içeren DMEM besiyeri içinde T25 flasklara ekilerek primer kültürleri kuruldu. İki günde bir bu besiyeri ile beslenerek 37°Cde %5 CO₂ li inkübatörde çoğalmaları sağlandı. İnsan pulpa dokusundan eksplant kültür olarak hazırlanan fibroblast hücreleri 7. günde primer odaktan çevreye ilerlemeye başlayarak 14. günde flaskın ortalama %50 sini kapladı. Takip eden günlerde hücrelerin çoğaldığı ve primer odak çevresinde yoğun sıkışık hücreler şeklinde olduğu izlendi.

İnsan pulpa fibroblast hücreleri pasajlanıp flasklara ekildiklerinde şeffaf sitoplazmalarının bulunduğu, ökromatik çekirdeklerinin içinde belirgin çekirdekciklerinin olduğu ve iğsi morfoloji gösterdikleri belirlendi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine ait faz kontrast görüntüleri. Eksplant kültür sonrası doku parçalarından (beyaz ok) atan iğsi fibroblast hücreleri (siyah ok) izlenmektedir.

Hücreler yaklaşık %80 konfluent olduğunda (ekildikleri flasksı %80 kapladıklarında), %0.25 Tripsin-EDTA ile pasajlandı (Şekil 3). Pasaj sonrası hücrelerin bir kısmının üzerine kriyoprotektan olarak %10 dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek dondurulup saklandı, kalan diğer kısmı ise yeni T75'lik flasksara ekilerek 1×10^6 hücre/80 cm² olacak şekilde çoğalmaları sağlandı.

Aşağıda verilen deney grupları oluşturularak, pasaj 4-7 arası hücrelerden ileri biyokimyasal analizler (Total protein, ROS, GST ve GSH) ve immunohistokimyasal çalışmalar gerçekleştirildi.

Deney grupları:

- I)Sağlıklı kontrol grubu,
- II) LPS ile muamele edilen hücre grubu,
- III) LTA ile muamele edilen hücre grubu,
- IV) H₂O₂ ile muamele edilen hücre grubu,
- V) NAC ile muamele edilen hücre grubu,
- VI) NAC+LPS ile muamele edilen hücre grubu,

VII) NAC+LTA ile muamele edilen hücre grubu,

VIII) NAC+H₂O₂ ile muamele edilen hücre grubu olarak planlanmıştır.

3.3. Deneyde Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

NAC: 100 mM stok solüsyonu 10 ml double distile su 163,19 mg NAC ile hazırlandı. Deneyde uygulama yapılacak konsantrasyonlar için FBS içermeyen DMEM F12 besi yeri kullanıldı.

H₂O₂: %34,5-36,5 lık H₂O₂ kullanıldı.

$$M = \frac{0,35(\%) \times 1000 \text{ ml} \times 1,13(\text{gr/ml})}{34,01 \text{ (mol ağırlığı)}} = 11,63\text{M} \sim 12 \text{ M (mol/L)} \sim \text{mmol/mL}$$

34,01 (mol ağırlığı)

10 µl H₂O₂ + 9990 µl distile su = 12 M

1 mM H₂O₂ stok FBS içermeyen DMEM F12 besi yeri ile hazırlandı.

LPS / LTA:

100 µg/ml stok (100 µl 1mg/ml LPS/LTA + 900 µl Besi yeri) solüsyonu hazırlandı.

3.4. Doz Belirleme Çalışmaları

Doz belirlemede ilk önce akım sitometride literatüre bağlı kalarak, LPS, LTA, H₂O₂ ve NAC için farklı konsantrasyonlar denendi. Ölçümler 6x10⁵ ile 1x10⁶ arasında hücrede gerçekleştirildi. Flasklarda % 80 doygunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra pasajlandı. Pasaj 4'e kadar hücreler bu şekilde çoğaltıldı ve pasaj 4'te kaldırılan hücreler tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra 300.000 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plaklara ekildi. Ertesi gün kuyular bir gece için FBS içermeyen besiyeri ile beslendi. Sonraki gün her kuyucuk PBS ile yıkanıp, LPS, LTA ve H₂O₂ içeren solüsyonlardan sırayla 2 ml uygulandı. Kontrol olarak da 2 kuyuya 2 şer ml FBS siz DMEM/F12 kullanıldı. Uygulamalar sonrası 12 ve 24 saat boyunca inkübe

olması için inkübatöre kaldırıldı. Ayrıca VI, VII ve VIII. gruplarda 2saat süreyle 10 mM NAC ile preinkübe edildi.

İnkübasyon süreleri sonunda aynı doz ilaç uygulanan her kuyunun “condition media”ları aynı santrifüj tüplerine alındıktan sonra kuyularda kalan hücreler 1ml tripsin-EDTA ile 4 dk boyunca muamele edildi. Mikroskopide kalktığı belirlenen hücrelerde, 1ml FBS içeren DMEM/F12 besi yeri ile, tripsin inaktive edildi. Ardından 5 dk süreyle 500 x g de santrifüj sonrası oluşan pelletler, 1 ml PBS içinde resüspanse edilerek akım sitometride ölçüm yapıldı. Hücre sayıları tahmini $6 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ aralığında idi.

3.4.1. Akım Sitometri Ölçümleri

LPS (II), LTA (III), H_2O_2 (IV) NAC uygulanmış ve uygulanmamış gruplardaki dental pulpa fibroblast hücreleri RPMI-1640 ile yıkanarak 1ml’de suspense edildi. Tüplerin içine 10 ul Propidyum iyodid (PI) eklenerek 20 dk karanlıkta, oda ısısında inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında ölü hücrelerin yüzdesi belirlendi. Sonuçların IC50 düzeyine ulaşmaması nedeniyle benzer dozlar formazan -1 (WST) ve 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) deneyleriyle de gerçekleştirildi.

3.4.2. WST Analizi

Pasaj 4 ve pasaj 5’e ait hücreler 3×10^4 hücre/kuyu olmak üzere 96 kuyulu plaklara ekildi. Ertesi gün mikroskop altında tutundukları kontrol edilip bir gece FBS içermeyen besiyerinde bekletildi. Sonraki gün farklı gruplarda (II, III, IV, V) değişik dozlar uygulandı. 10µl WST-1 eklendi ve 4 saat inkübatörde bekletildi. Hücrelerin canlılık tespiti mikropilaka okuyucu kullanılarak 450-600 nm’de yapıldı.

3.4.3. MTT Analizi

Deneylere başlamadan önce kuyucuk başına kullanılacak en uygun hücre sayısını belirlemek için hücre optimizasyon deneyleri yapıldı.

MTT bileşiği canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum halkasının kırılması sonucu, mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Oluşan bileşiğin miktarı 570 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülerek (Molecular Devices SpektraMax M2) hücrelerin canlılıkları tespit edilir.

Bu deneyde kuyucuk başına 5×10^3 , 1×10^4 ve 2×10^4 hücre yoğunlukları 100 μ l hacminde besi yeri (%10 FBS, 2 mM L-Glutamin içeren fenol RED içermeyen DMEM F12) 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilerek 5'er örnek üzerinde incelendi. Kontrol olarak tek başına DMEM çözeltisi kullanıldı. Hücrelerin tutunması için 24 saat 37 °C'de %5 CO₂ 'li inkübatörde bekletildi. Daha sonra besi yeri tazelenerek 24 ve 48 saat süreyle tekrar inkübe edildi. Sürenin sonunda besiyeri kaldırılarak kuyucuklara 1mg/ml MTT içeren besi yeri (50 μ l) eklenerek 2 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT çözeltisi kuyucuklardan çekilerek tabanda oluşan formazan kristallerini çözmek için 100 μ l izopropanol alkol eklenerek karıştırıldı. Çözünen formazan bileşiğinin absorbansı 570 nm dalga boyunda mikropkaya okuyucuda ölçüldü.

$$\text{Hücre canlılığı \%} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

Kontrolün absorbans değeri

Absorbans değeri 24 saatlik uygulamada en iyi 1×10^4 hücrede, 48 saatlik uygulamada ise en iyi 8×10^3 hücrede elde edildi. Daha sonra bu hücre sayıları üzerinden 50 ve 100 μ g/ml LTA ve 0,3 ve 0,4 mM H₂O₂ tek başına (24 saat) ve 2 saat NAC preinkübasyonu ile 96 kuyucuklu plakaya 3'er örnek MTT ön deneyi için yerleştirildi.

3.5. Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Sayısının Belirlenmesi

Biyokimyasal analizlerin (total protein, ROS, GST ve GSH) ölçümü için minimum hücre sayısını belirlemek amacıyla 24 saat H₂O₂ ile inkübe edilen hücrelerde (1×10^5 , 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 , $1,6 \times 10^5$) total protein (Bradford yöntemi), GSH (recycling yöntem) ve GST enzim analizlerinin ön deneyleri yapıldı. 4×10^5 hücre sayısının yeterli olacağına karar verildi. 24 saat tutunma ve 1 gece FBS'siz besi yerinde bekleme sonrasındaki hücre sayısı artışları ve inkübasyonunun da yaratacağı hücre ölü

sayısı göz önüne alınarak 12 kuyucuklu plakaya 2 kuyucuk (kuyucuk başına 250×10^3) total protein, GSH, GST, ROS ve immün boyamalar için diğer 2 kuyucukta akım sitometre ölçümlerinde kullanılmak üzere 4 kuyucuğa toplam 1×10^6 hücre ekimi yapılmasına karar verildi. Her hasta için farklı pasajlarda 2 ölçüm alınması planlandı. Bunun üzerine 1 set için (8 deney grubu) ROS ve immün boyamalar dahil yaklaşık total 9×10^6 pulpa fibroblast hücresi kullanıldı. Böylece kurulan bir hücre setinden hem biyokimya analizlerinin hem de immünohistokimya çalışmalarının aynı koşullarda yapılması sağlandı. LPS ve LTA için $40 \mu\text{g/ml}$, H_2O_2 için $0,3 \text{ mM}$ 24 saat inkübasyon ve NAC preinkübasyonu için de 2 saat süreyle 10 mM NAC uygulamasına karar verildi.

3.6. Hücre Canlılığı, İmmünohistokimyasal İncelemeler ve Biyokimyasal Analizler

3.6.1. Annexin V ile Hücre Canlılığının ve Erken Apoptozun Belirlenmesi

İnkübasyon süreleri sonunda aynı doz ilaç uygulanan her kuyunun “condition media”ları aynı santrifüj tüplerine alındıktan sonra kuyularda kalan hücreler $1 \text{ ml } \% 0,25$ tripsin-EDTA ile 4 dk muamele edildi. Daha sonra 1 ml FBS içeren DMEM/F12 ile tripsin inaktive edilerek toplanan hücreler 5 dk süreyle $500 \times g$ de santrifüj sedildi. Oluşan pelletler, 1 ml PBS ile yıkanarak içine ilk toplanan “condition mediaları” ilave edildi. $1 \times$ bağlanma solüsyonu ile süspansiyon edildi. İçinden $100 \mu\text{l}$ alınarak başka bir tüpte $5 \mu\text{l}$ Annexin V ve $5 \mu\text{l}$ 7-AAD eklenerek 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında $400 \mu\text{l}$ $1 \times$ bağlanma solüsyonu eklenerek 1 saat içinde akım sitometri cihazında 1×10^4 hücre sayılarak analiz edildi.

3.6.2 İmmünohistokimyasal İncelemeler

İmmünohistokimyasal incelemeler için hücreler 2×10^4 hücre/kuyucuk olarak özel lamlara ekildi. Ertesi gün mikroskop altında tutunmaları kontrol edilip FBS içermeyen besiyerine geçildi. Bir sonraki gün belirlenen dozlarda H_2O_2 , LPS, LTA, NAC ve NAC+LTA, NAC+LPS, NAC+ H_2O_2 ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler anti-mouse glutatyon (D8), ve anti-mouse GSTP1 (3F2C2) (1:200) antikoları ile bir

gece +4 °C’de inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile üç kere yıkamanın ardından immunoperoksidaz işaretleme için goat anti-mouse ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip di--amino benzidin (DAB) ile 5 dakika bekletildi. Yıkamanın ardından Hematoksilen ile çekirdek boyası yapıp kapatıldıktan sonra mikroskop altında görüntülendi.

İmmünfloresan işaretlemeler için primer antikorlar ile inkübasyonun ardından yıkama sonrası goat anti-mouse 488 ile karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra DAPI ile çekirdek işaretlemesi yapıldı ve floresan kapatma medyumu ile kapatılıp floresan mikroskop altında incelendi. Her kuyudan 40’lık büyütmede alınan beş görüntü ImageJ ile analiz edildi.

3.6.3. İmmünfloresans ROS İşaretlemesi

Deney gruplarında ROS belirlenmesinde DCFDA-HücreSEL ROS Test Kiti kullanıldı. Stok DCFDA solüsyonu tampon solüsyonu ile dilue edilerek 20µM çalışma solüsyonu hazırlandı. DCFDA ile inceleme için hücreler 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekildi. Ertesi gün mikroskop altında tutundukları kontrol edilip, besiyeri FBS içermeyen besiyeri ile değiştirildi. Bir sonraki gün hücrelere H₂O₂ (0,3 mM), LPS (40 µg/ml), LTA (40 µg/ml), NAC (10 mM) ve aynı dozlarda NAC preinkübasyonu ile (NAC+LTA, NAC+LPS, NAC+H₂O₂) uygulandı. İnkübasyon süreleri tamamlanınca iki kere tampon ile yıkandı ve 20 µM DFCDA ile 37°C’de karanlıkta 45 dakika inkübe edildi. DAPI ile çekirdekler işaretlendi. Floresan mikroskop altında incelendi ve fotoğraflandı.

3.6.4. Biyokimyasal İncelemeler

Hücrelerin Parçalanması/Homojenizasyonu

LPS (40 µg/ml), LTA (40 µg/ml) ve H₂O₂ (0,3 mM) ile tek başına ve NAC (10 mM) ile kombine uygulamalar sonrasında tripsin ile kaldırılan hücreler 500 x g de 5 dk satrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre peletleri 1ml PBS ile süspanse edilerek, 15 ml lik tüpler içinde biyokimya laboratuvarına taşındı. Burada 1,5 ml lik ependorflara aktarıldı. Burada tekrar 500 x g de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant

atılarak hücreler 300 µl tampon (pH: 7, 1 mM EDTA içeren 100mM KP) içinde buz içine yerleştirildi. Homojenizatörde 2 defa 15 sn lik süre ile tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Homojenattan ROS ölçümü için 80 µl ayrıldı. Hücreler +4 C'de 10 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatanttan 80 µl GSH için ayrıldı. Geriye Kalan yaklaşık 150 µl süpernatant total protein ölçümü, ROS ve GST için kullanıldı. Tüm ölçümler ikili çalışıldı.

Total Protein Ölçümü

Protein ölçümü Bradford yöntemine göre yapıldı (112). Bu yöntemde önce standartlar hazırlandı. 96 kuyucuklu plakada ilk 2 kuyucuk Blank için kullanıldı (PBS pH:7.00). 20 µl 0.125-0.25-0.50-1 mg/ml BSA örneklerinden standard için her kuyucuğa 5 µl kullanıldı. Hücre örnekleri ve standartlar ikili çalışıldı. 250 µl Bradford reaktifi + 5 µl örnek/standard /kuyucuk için kullanıldı. Önce örnekler sonra Bradford reaktifi konuldu. Protein ölçümü kolorimetrik olarak gerçekleştirildi.

ROS Ölçümü

ROS ölçümü için 2',7' Diklorofluorescein diasetat (DCFDA) Tris-HCl de çözülerek 1 mM stok solüsyonu (0,5 mg DCFDA + 1027 µl Tris HCl pH 7,4) hazırlandı. ROS ölçümü 96'lık düz tabanlı (adhere hücre için uygun) siyah "plate"lere homojenttan alınan 20 µl hücre örneği + 200 µl 10 µM DCHF boyası /well ilavesi 40 dk 37 C de (karanlıkta) inkübe edildikten sonra 485 nm eksitasyon, 525 nm emisyonunda fluometrik olarak gerçekleştirildi). Her örneğin kontrolü için DCFDA boya yerine 20 µl örnek + 200 µl Tris_HCl tamponu ile kendi floresan ışıması ölçüldü ve elde edilen DCFDA'lı ölçüm sonuçlarından çıkarılarak net sonuç elde edildi.

Glutatyon Düzeyinin Belirlenmesi

Glutatyon hücre içinde yaklaşık %95-99 oranında GSH formunda bulunur. Oksidasyon sonucu GSSG oluşur. Bu çalışmada GSH+GSSG düzeyini ölçmek için enzimatik döngü (recycling) yöntemi kullanıldı (113). Bu yöntemde GR aracılığıyla NADPH ile GSSG redükte forma (GSH) dönüşürken, redükte GSH'ın 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid (DTNB) ile reaksiyonu sonucu 2-nitro-5-tiyobenzoik asit (TNB)

oluşur. Oluşan TNB bileşiğinin 412 nm'deki absorbansı ölçülerek toplam GSH miktarları belirlenir.

Hücre homojenizasyonu sonrası santrifüj edilen süpernatanttan 80 µl ayrılarak 500 µl lik ependorflara 80 µl %10 luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edilerek vortexlendi ve $2.250 \times g$ 'de 2 dk oda ısısında santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Elde edilen süpernatantlar üzerine 4 M trietanolamin (TEAM) çözeltisinden % 5 oranında eklenerek örneklerin pH değeri 7.0'e getirildi. Blank olarak % 5'lik TCA kullanıldı. Total hacim 210 µl/kuyucuk olarak belirlendi. Sırasıyla;

1. 10 µl örnek/standart
2. 150 µl çalışma solüsyonu (1 mM EDTA içeren 100 mM KP pH 7.0+ 80,115 U/ml GR +78 µM DTNB)
3. 5 dk inkübe edildi.
4. NADPH (48 µM) ilave edildi.

Mikroplaka okuyucuda 412 nm de 15 dk süresince (5 dk aralıkla endpoint) kinetik ölçüm yapıldı. 10 dk lık endpoint ölçümü sonuçlarında standartlar hesaplanarak standart grafik eğrisi ve y katsayısı hesaplandı. GSH düzeyleri protein miktarına oranlanarak nmol.mg⁻¹ cinsinden hesaplandı.

Glutasyon S-Tranferaz Ölçümü

GST aktivitesi, GSH'un 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ile oluşturduğu konjugasyon ürününün 340 nm'de absorbans artışı üzerinden belirlendi. Aktivite ortamı 1 mM EDTA içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5), 1 mM GSH, 1 mM CDNB %5 etanol içerecek şekilde hazırlandı. 20 µl Örnek kullanıldı. Tüm örnekler ikili çalışıldı. Toplam hacim kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde hazırlandı.

Aktivite ölçümleri oda ısısında 340 nm'de absorbans artışı üzerinden 5 dk süreyle basic kinetic protokolde mikroplaka okuyucuda gerçekleştirildi. Dakika başına enzim aktivitesi hesaplandı. Ölçülen aktivite değeri 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ absorbsiyon katsayısı ve protein miktarına oranlanarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Spesifik aktivite değerleri nmol.mg⁻¹. dk⁻¹ olarak ifade edildi.

3.7. İstatistiksel İnceleme

Örneklem sayısı küçük olduğu için ($n=5$), ölçüm değerleri shapiro -wilk ile normalite testine tabii tutuldu. Normal dağılım gösteren datalar da ($p>0.05$) gruplar arası farklılıklar ANOVA ve ikili karşılaştırmalar Bonferroni testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen datalar da ($p<0.05$), gruplar arası farklılıklar için Kruskal-wallis, ikili karşılaştırmalar için Mann-whitney U testi $\alpha=0,05$ güven aralığında kullanıldı.



4. BULGULAR

Bu çalışmada Tablo 1 de kodlama detayları verilen 3 hastaya ait 20 yaş dişlerinden elde edilen dental pulpa dokusundan H. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD laboratuvarında primer hücre kültürü hazırlandı.

Tablo 4.1. Dental pulpa dokusu alınan hasta grupları.

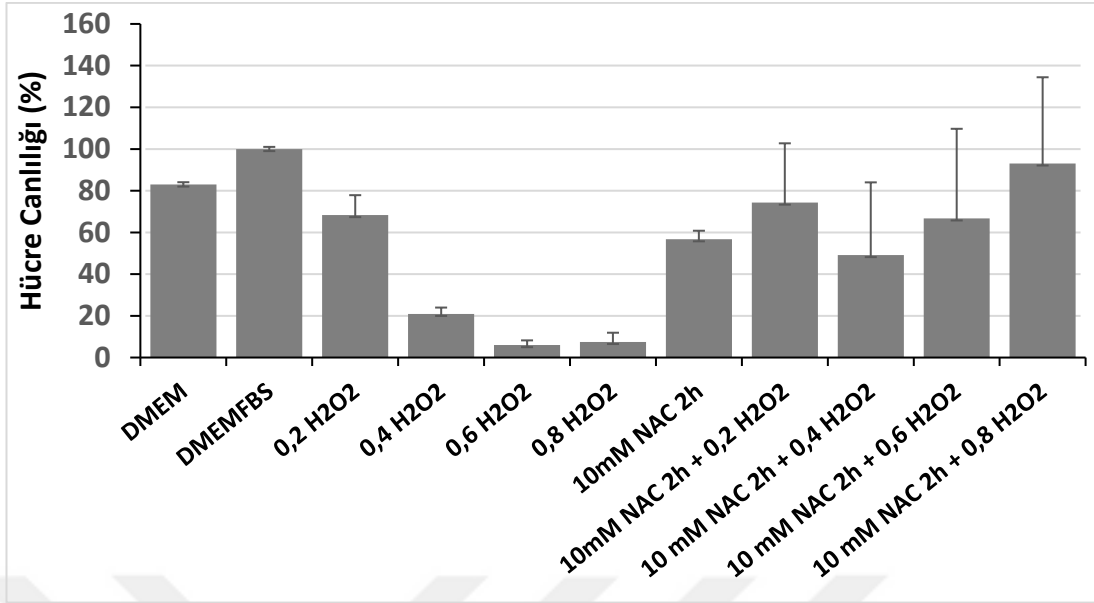
	Hasta 1 (H1E2P4-P6)	Hasta 2 (H1P7)	Hasta 3 (H2P6-P7)
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Kadın
Yaş	19	22	18
Sistemik durum	Sağlıklı	Sağlıklı	Sağlıklı

Uygun koşullarda çoğalmaları sağlanan hücreler 3-7 pasaj aralığında çalışıldı. Deneyin ön çalışmaları 3 ve 5. pasajlarda tamamlandı. Hücrelerin antikorla işaretlenmiş fibroblast olduğuna dair herhangi bir bulgu elde edilmiş olmamasına rağmen faz kontrast mikroskop bulgularından da anlaşılabileceği üzerine bu hücre grubunun fibroblast hakim hücre olduğu değerlendirildi. Çalışmada, LPS, LTA ve H₂O₂ ile muamele edilen dental pulpa fibroblast hücre kültüründe NAC preinkübasyonunun oksidatif stres belirteçleri üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflendi.

4.1. Dental Pulpa Hücre Kültüründe Yapılan Ön Deney Sonuçları

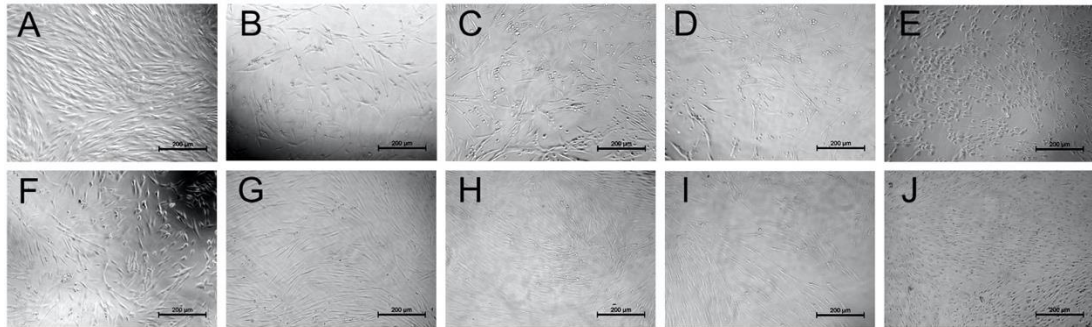
4.1.1. Doz Belirleme Çalışmaları

LPS, LTA, H₂O₂ ve NAC için uygun doz belirleme çalışmalarında hem akım sitometri hem de WST ve MTT analizleri kullanıldı. Bu deneylerde reaktiflerin farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı izlendi. Artan H₂O₂ (0,2-0,8 mM) dozlarında hücre canlılığının belirgin bir şekilde azaldığı (% 68 - % 7) tespit edilirken, 10 mM NAC ile 2 saatlik preinkübasyonun hücre canlılığında rejenerasyona neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerinde hücre canlılığının (%) WST analizi.

H₂O₂ ve NAC dozları belirlendikten sonra yine WST yöntemi ile LPS ve LTA için farklı doz çalışmaları yapıldı. Bu arada deneme dozları ile faz kontrast mikroskopi görüntüleri elde edildi. Görüntüler incelendiğinde kontrol grubuna göre deney gruplarında hücre yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2.).

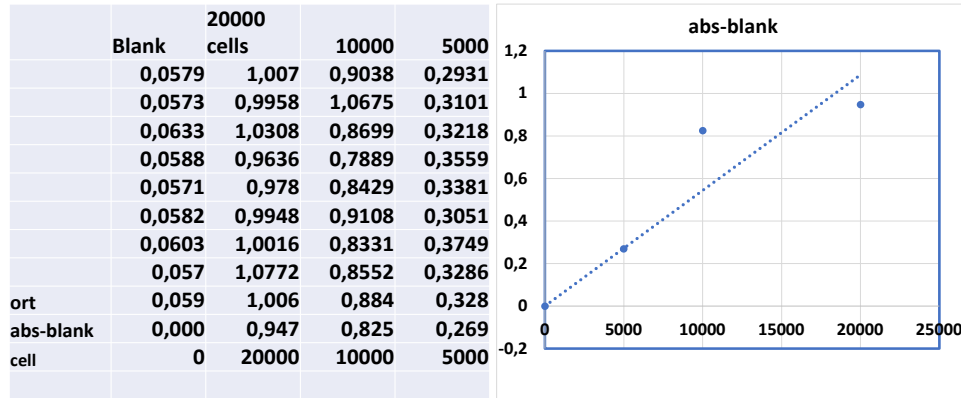


Şekil 4.2. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine LTA, LPS, H₂O₂ (24 saat), NAC (4 saat) ve kombine uygulamalar sonrası faz kontrast görüntüleri. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA1 (15 µg/ml), D: LTA2 (20 µg/ml), E: H₂O₂ (0.3 mM), F: NAC (10 mM), G: NAC + LPS, H: NAC + LTA1, I: NAC + LTA 2, J: NAC + H₂O₂ (Faz kontrast X100).

Uygun optimum dozlara ulaşılamaması nedeniyle MTT yöntemine geçildi. Bu yöntemi ile doz belirleme çalışmalarına devam etmeden önce 96 kuyucuklu plaka için hücre optimizasyon çalışması yapıldı.

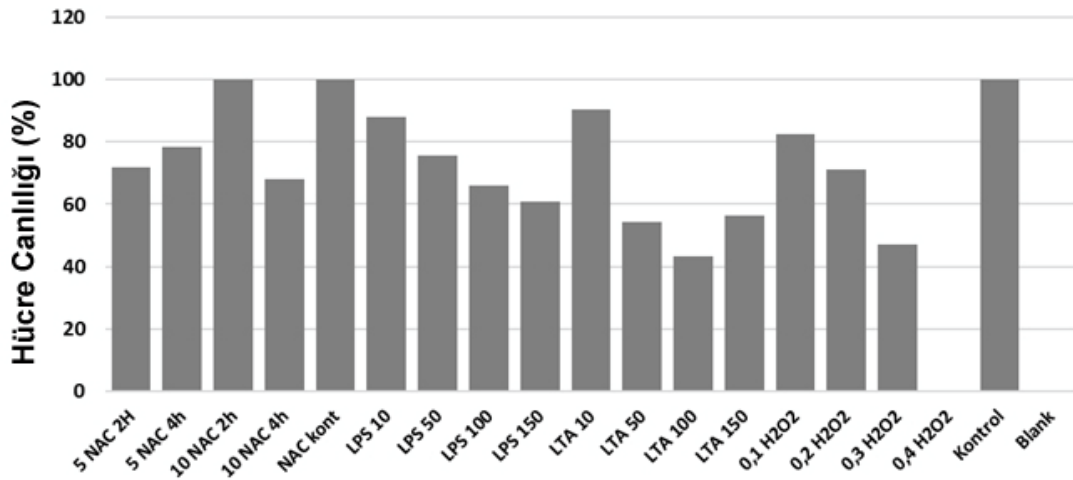
4.1.2. Hücre Optimizasyonu (MTT için)

96 kuyucuklu plakada yapılan doz belirleme ve ROS deneyleri için de hücre optimizasyon deneyi yapıldı. Literatürlede desteklenerek kuyucuk başına 24 saatlik uygulamalarda 1×10^4 hücre kullanılmasına karar verildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. MTT yöntemiyle dental pulpa hücre kültüründe hücre optimizasyonu sonuçları.

Daha sonra 24 saat süreyle hücreler(1×10^4) farklı LPS, LTA ve H_2O_2 ile muamele edildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Dental pulpa hücrelerinin LPS, LTA, ve H_2O_2 ile muamelesi sonrası MTT testi ile hücre canlılık (%) sonuçları (1×10^4 hücre/kuyucuk).

Yapılan doz belirleme çalışmalarında LPS ve LTA'nın çok yüksek dozlarda IC_{50} oranına ulaştığı ve bunun primer hücre kültüründe hücrenin doğası gereği

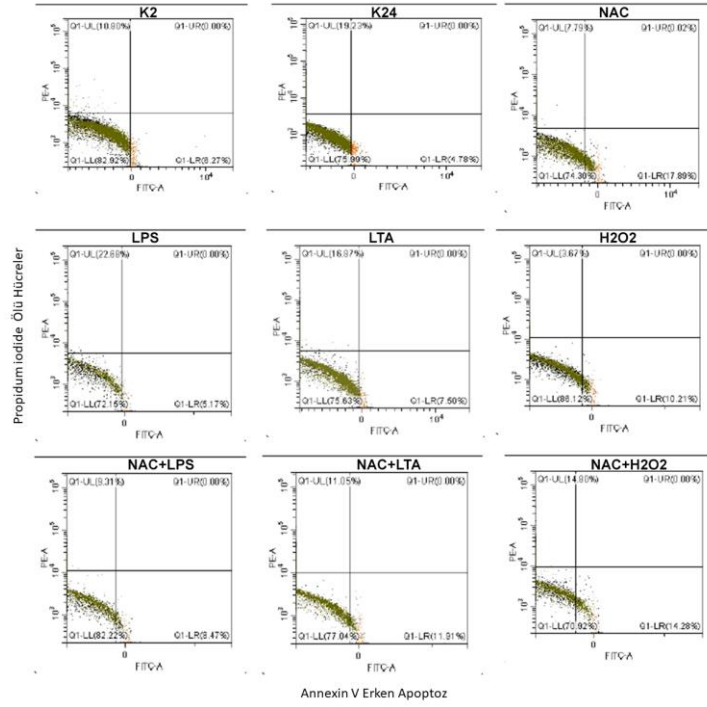
tekrarlanan sonuçları almanın zor olması nedeniyle uygulanacak dozlar LPS ve LTA için 40 µg/ml, H₂O₂ için 0.3 mM ve NAC için 10 mM olarak belirlendi.

Bir deneye başlamadan önce kullanılan hücre hattının büyüme özelliklerini bilmek ve kaydetmek önemlidir. Hücreler aktif olarak çoğalır ve hücre yoğunluğunda logaritmik bir artış meydana gelir. Hücre popülasyonu en yüksek canlılık oranına ulaşır. Bu nedenle bu aşamada hücresel fonksiyonun değerlendirilmesi önemlidir. Bunu değerlendirmek için logaritmik hücrelerde bir örnek için gerekli minimum total hücre miktarı belirlendi. Buna göre yaptığımız çalışma sonucunda biyokimyasal parametreler için minimum hücre sayısı 4×10^5 olarak belirlendi. Akım sitometride de örnek başına $\sim 6 \times 10^5$ hücre kullanılması kararlaştırıldı (örnek başına total 1×10^6 hücre kullanıldı). Ön çalışmaların sonucunda deney aşamasına geçildi.

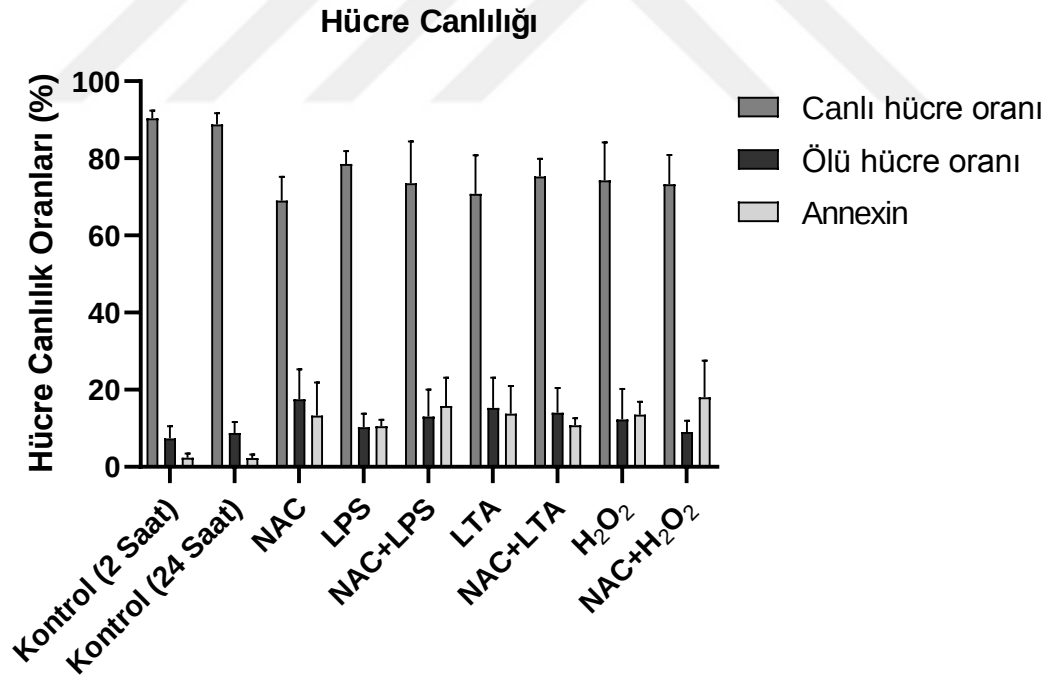
4.2. Hücre Canlılığının İncelenmesi, Erken Apoptoz ve Nekroz sonuçları

4.2.1. Akım Sitometri Sonuçları

Hücre canlılığı çalışmaları 3 hastada farklı pasajlarda 2'şer deney seti kurularak yapıldı. Hücre canlılığının LPS, LTA ve H₂O₂ uygulamalarında istatistiksel olarak fark yaratmayacak düzeyde azaldığı, NAC ön inkübasyonunun önemli bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$). Kontrol grubunda erken apoptoz oranlarının ölü hücre sayısına göre düşük olduğu, kontrole göre kıyaslandığında LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına veya NAC inkübasyonu ile apoptotik hücre sayısını ve ölü hücre sayısını artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6.).



Şekil 4.5. Akım sitometri sonuçlarının histogram görselleri

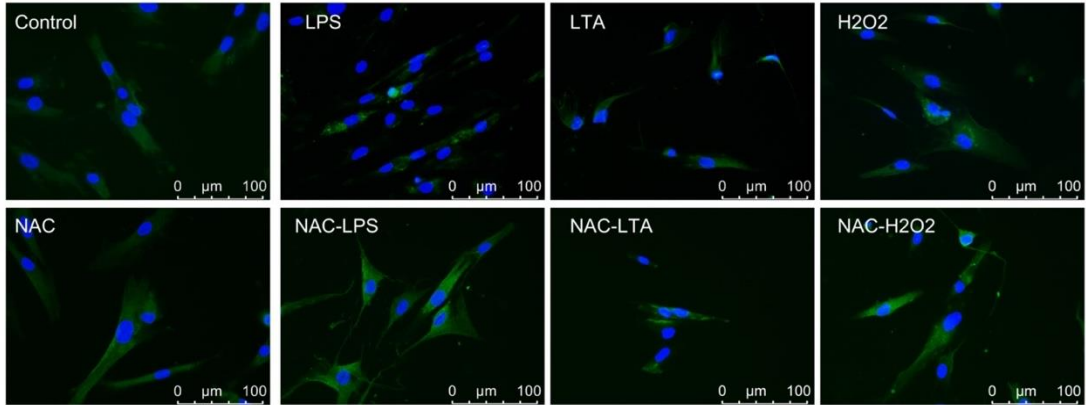


Şekil 4.6. Dental pulpa hücresinin LPS, LTA, H₂O₂ ve NAC uygulamaları sonrasında flow sitometri yöntemi ile canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları (% oran) (Ortalama $\pm$ SD).

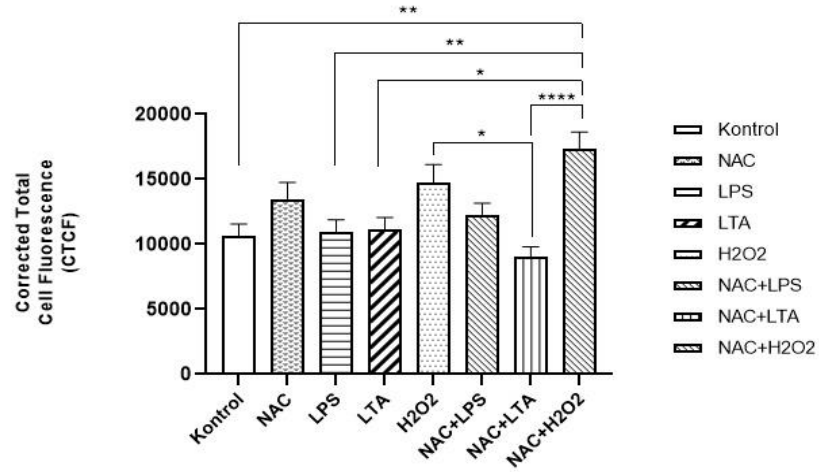
4.3. Dental Pulpa Hücrelerinde İmmünfloresans Boyama Sonuçları

4.3.1. GSH İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları

Glutatyon ile yapılan immünfloresan işaretlemede hücrelerde sitoplazmik granüler işaretlenme gözlemlendi. Deney gruplarına ait hücrelerde GSH immünfloresan işaretlenme yoğunluğunu karşılaştırmak için Image J kullanılarak hücrelerde GSH floresans yoğunlukları ölçülerek düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) hesaplandı. Gruplar karşılaştırıldığında LPS ve LTA uygulanan grupların CTCF değerleri kontrol ile benzer olduğu saptandı. NAC ve H₂O₂ uygulanan gruplarda ise kontrole göre artmış CTCF değerleri saptandı. H₂O₂ öncesi NAC uygulanan (NAC+H₂O₂) grupta CTCF değerinin yüksek olduğu ve bu grupta artmış CTCF değeri kontrol ile kıyaslandığında artışın istatistiksel anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.7., 4.8.).



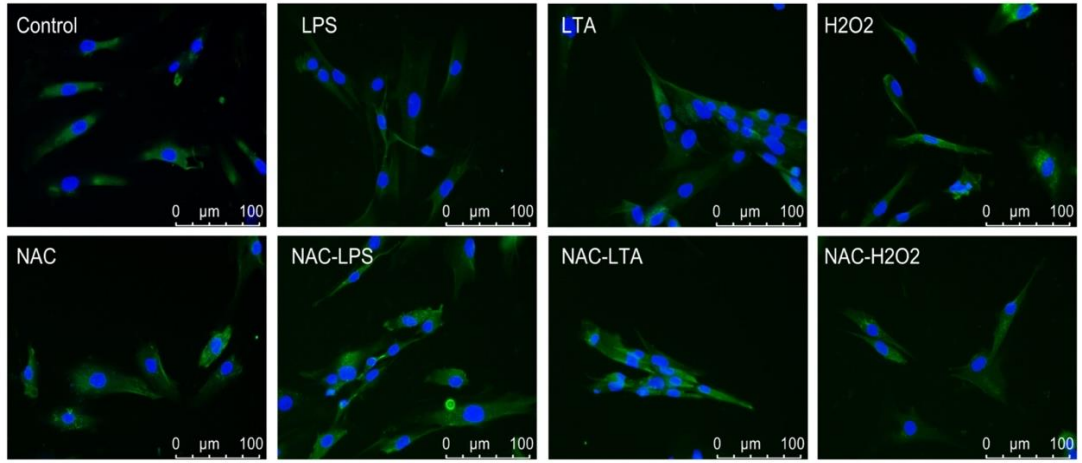
Şekil 4.7. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H₂O₂, NAC ve kombine uygulamalar sonrası anti-glutatyon ile immünfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H₂O₂ (0,3 mM), E: 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂. (Faz Kontrast X400)



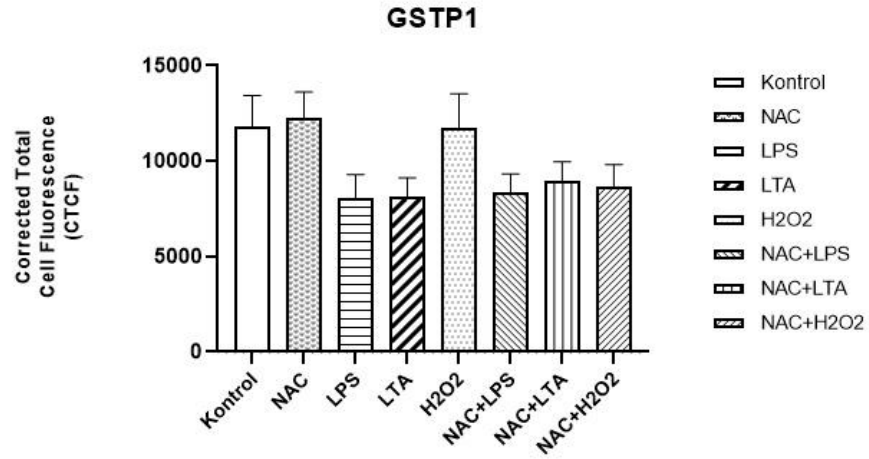
Şekil 4.8. Kantitatif floresan görüntü analizi. Deney gruplarında Glutasyon'un immunfloresan işaretli görüntülerinden hesaplanan düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) (10 alanın CTCF ortalaması). Hata çubukları SEM'i temsil etmektedir.

4.3.2. GSTP1 İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları

GSTP1 ile yapılan immünfloresan işaretlemelemlerde deney gruplarına ait hücrelerin sitoplazmalarında GSTP1 ile pozitif granüler (noktasal) işaretlemler izlendi (Şekil 4.9.). LPS ve LTA uygulanan gruplarda kontrole göre daha az GSTP1 immünfloresan işaretleme izlenirken, NAC ve H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrole benzer ve hatta biraz daha artmış immünfloresan işaretleme gözlemlendi. NAC ile beraber LPS veya LTA veya H₂O₂ uygulanan gruplarda immünfloresan işaretleme kontrole göre daha azdı. Deney gruplarına ait hücrelerde GSTP1 immünfloresan işaretleme yoğunluğunu karşılaştırmak için Image J kullanılarak hücrelerde GSTP1 floresans yoğunlukları ölçülerek düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) hesaplandı. Grupların GSTP1 immünfloresan işaretleme, CTCF açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (Şekil 4.10.).



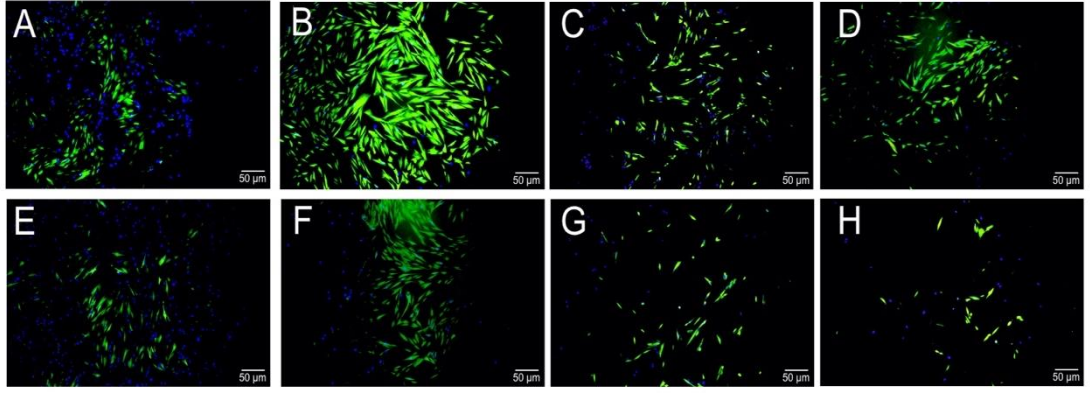
Şekil 4.9. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H₂O₂, NAC ve kombine uygulamalar sonrası anti-GSTP1 ile immunfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H₂O₂ (0,3 mM), E: 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂. (Faz Kontrast X400)



Şekil 4.10. Kantitatif floresan görüntü analizi. Deney gruplarında GSTP1'in immunfloresan işaretli görüntülerinden hesaplanan düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) (10 alanın CTCF ortalaması). Hata çubukları SEM'i temsil etmektedir.

4.3.3. ROS İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları

DFCDA ile yapılan ROS işaretlemesinde LPS uygulanan grupta kontrole göre daha çok hücrede yoğun floresan işaretlenme izlendi. Bu grupta ROS miktarının artması ile beraber floresan şiddetinin arttığı gözlemlendi. NAC uygulanan grupta ise ROS floresan şiddetinin azaldığı saptandı. LPS, LTA ve H₂O₂ gruplarında NAC ile preinkübe edilen gruplara göre ROS floresans şiddetinin daha yoğun olduğu gözlemlendi. Buradan NAC'in pulpa fibroblast hücresinde koruyucu etkisi olduğu sonucuna varıldı. (Şekil 17).



Şekil 4.11. Primer dental pulpa fibroblast hücrelerine H₂O₂, NAC ve kombine uygulamalar sonrası DCFDA ile immünfloresan işaretleme. A: Kontrol, B: LPS (40 µg/ml), C: LTA (40 µg/ml), D: H₂O₂ (0,3 mM), E: 2 saat NAC (10 mM), F: NAC + LPS, G: NAC + LTA, H: NAC + H₂O₂. (Faz Kontrast X400)

4.4. Biyokimyasal Parametreler

4.4.1. Total protein düzeyleri

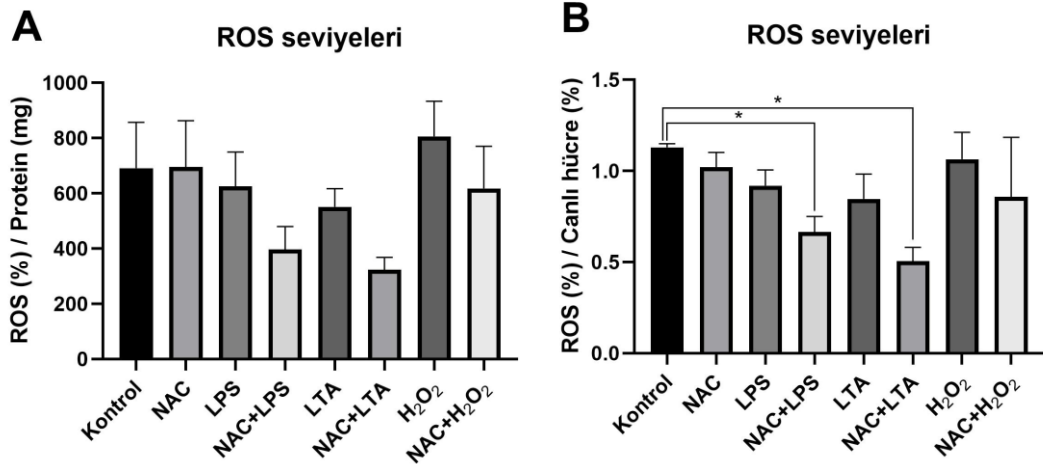
Farklı deney gruplarının protein düzeyleri ve standart sapmaları (SD) Tablo 4.3. de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Deney gruplarının total protein düzeyleri (mg protein) (Ortalama± SD).

Gruplar	ORT	SD
K2	0,141	0,078
K24	0,111	0,091
NAC	0,126	0,050
LPS	0,130	0,030
LPS+N	0,140	0,027
LTA	0,122	0,038
LTA+N	0,130	0,042
H2O2	0,100	0,025
H2O2+N	0,092	0,031

4.4.2. ROS Ölçüm Sonuçları

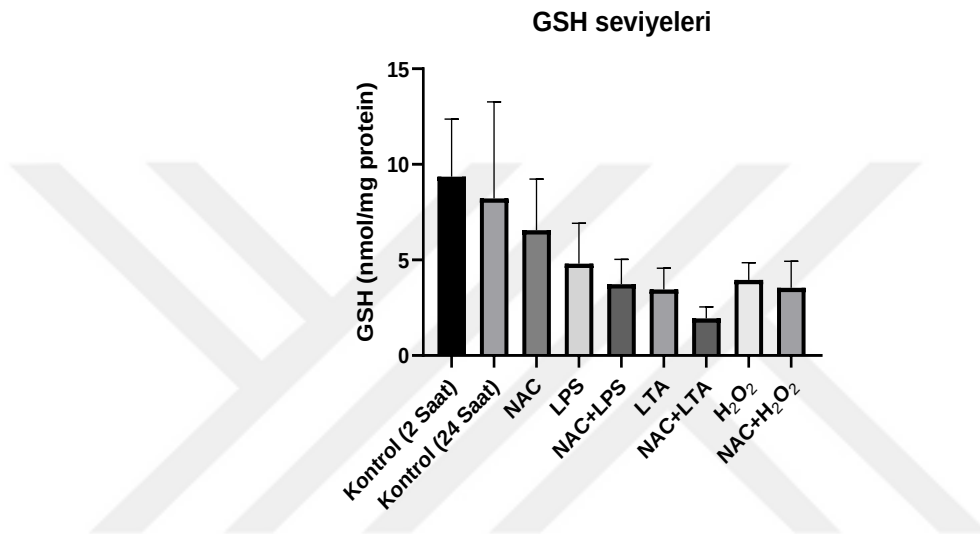
Mg proteine oranlanan ROS değerleri incelendiğinde sadece H₂O₂ 'in tek başına uygulamasının ROS düzeylerini kontrole göre artırdığı, NAC preinkübasyonunun LPS, LTA ve H₂O₂'in ROS düzeylerini azalttığı gözlemlendi. ROS değişim oranlarının mg protein'e veya canlı hücreye oranlanması birbirine benzer bir değişim paterni gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.12). NAC+LPS ve NAC+LTA gruplarının kontrole göre ROS seviyelerini önemli derecede azalttığı belirlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4.12. Dental pulpa hücrelerinde ROS düzeyleri. A: % ROS değişimlerinin protein düzeylerine oranı, B: % ROS değişimlerinin hücre canlılığına oranları.

4.4.3. GSH Düzeyleri

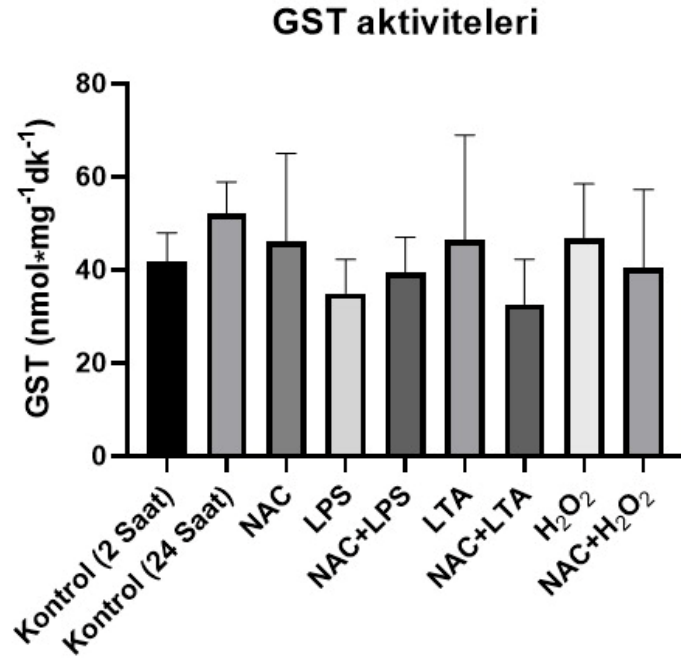
Şekil 19 LPS, LTA, H₂O₂ ve NAC uygulamalarının dental pulpa hücreesindeki GSH düzeylerine etkisini göstermektedir. LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına veya NAC ile kombine kullanıldığında hücre içi glutatyonu önemli, derecede azalttığı, NAC uygulamasının azalan hücre içi GSH'ı yeterince rejenere edemediği gözlemlendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Dental pulpa hücrelerinde LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına ve NAC uygulaması sonrasında Glutasyon düzeylerindeki değişimler (nmol/mg protein).

4.4.4. GST Enzim Aktivite Sonuçları

Farklı deney gruplarının GST spesifik aktivite düzeyleri şekil 4.15 de gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. LPS kontrol grubuna göre GST spesifik enzim aktivitesinde az bir düşüş göstermiştir. Diğer taraftan LPS öncesi NAC uygulaması GST enzimini bir miktar artırmışken, LTA ve H₂O₂ uygulamalarında NAC tersine GST aktivitesini azaltmıştır.



Şekil 4.14. Dental pulpa hücrelerinde LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına ve NAC preinkübasyon gruplarında GST enzimi spesifik aktivite düzeylerindeki değişimler (nmol/mg protein.dk⁻¹).

5. TARTIŞMA

Dental pulpa inflamasyonlarında çürük yapıcı mikroorganizmalar ve metabolitleri dentin tübüllerine nüfuz ederek, pulpa dokusunda inflamatuvar bir sürecin başlamasına ve immünolojik tepkilerin gelişmesine yol açar. Bu süreçte sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve oksidatif stres belirteçleri gibi moleküllerin lokal birikimi ile karakterize olan pulpitislerin oluşumu gerçekleşir (3, 114) (48). İnflamasyon süreçleri son derece karmaşıktır. Lökositlerin, makrofajların ve mast hücrelerinin hasarlı bölgeye alınması, artan oksijen alımı ve ardından bakteriyel toksinler de dahil olmak üzere spesifik uyaranlara yanıt olarak oksitleyici ajanların salınımı nedeniyle “solunum patlamasına” yol açar (115). ROS ve diğer reaktif türler, adezyon moleküllerine ilaveten pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenlerler. Çürükle ilişkili bakteriler tarafından uyarılan bu sitokinler de hücrelerde ROS oluşumuna dolayısıyla da oksidatif hasarın gelişmesine neden olan bir döngü oluştururlar (48, 116).

Buradan yola çıkarak bu çalışmada sağlıklı insan diş pulpasından hazırlanan primer hücre kültüründe karyojenik mikroorganizmaların oluşturduğu oksidatif stres döngüsü ve hücre canlılığı, nekroz-apoptoz yüzdeleri değerlendirildi. Ayrıca oksidatif hasarın elimine edilmesinde etkin bir antioksidan molekül olan NAC’ın, bu hasarı tamirindeki etkisi incelendi. Sonuçlarımız incelendiğinde NAC preinkübasyonunun LPS, LTA ve H₂O₂ uygulanan dental pulpa hücrelerindeki ROS düzeylerini önemli derecede azalttığı biyokimyasal analizlerle ve immünfloresans yöntemiyle gözlenmiştir. Bir çok çalışmada NAC’ın ROS oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. (3, 16, 17, 94, 117). NAC, ROS artışını baskılayarak immünmodülasyon görevi görmektedir. Diğer taraftan Weekate ve ark.(111) LPS ile stimüle edilen pulpa hücrelerinde 5 mM NAC uygulamasının mitokondriyal ROS üzerinde önemli bir değişiklik yaratmadığını ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda NAC’ın dental pulpa hücresinde tek başına uygulanması sonrasında, kontrole kıyasla ROS seviyelerini azaltmadaki etkisi florometrik analizlerde düşük olmasına rağmen immünfloresan boyamada bu etki daha kuvvetli gözlenmiştir. Bu çalışmada immunofloresan işaretleme yöntemi için DCFDA-

Hücresel ROS kiti ile çalışıldı. Kitin kullanım yönergesine göre 20 μ M DCFDA boyası kullanılırken, fluometrik ölçümlerde ise literatürdeki öneriler doğrultusunda 10 μ M konsantrasyonda DCFDA kullanılması sonuçlar arasındaki farklılığın olası nedenlerinden olabileceği düşünüldü.

ROS ve diğer reaktif türler, inflammatuar yanıtın bir parçası olarak üretilir. İnflamasyonda sinyal yollarını stimüle ederek TNF- α , IL-1 β benzeri proinflammatuar sitokinlerin eksprese edilmesini indükleyerek inflammatuar sürecin yönetilmesinde temel görevi olan moleküllerdir. Çürükle ilişkili bakteriler tarafından da uyarılan bu sitokinler, aynı zamanda aktif mitokondriler tarafından hücrelerde tekrar ROS oluşumuna neden olarak bir döngü oluşturur. ROS artışının aynı zamanda antiinflammatuar TGF- β salınımını da stimüle ettiği gösterilmiştir (10, 74-76). TGF- β artışı makrofajlar tarafından da yönetilen, proinflammatuar fazdan antiinflammatuar faza geçerek rejenerasyonu (makrofaj polarizasyonu) stimüle etmede önemli rolü olan bir sitokindir. Dental pulpa hücresinde artan TGF- β 'nın wnt pulpa progenitör hücrelerin odontoblast farklılaşmasını stimüle ettiği gösterilmiştir. Diş pulpasında makrofajların varlığı, odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabilen Wnt kök hücre aktivasyonu için de gereklidir. ROS'un TGF- β artışını indüklemesi, hücre-doku hasarı kadar rejenerasyonda da rolünün olduğunun göstergesidir.

ROS, immünolojik sinyalleme ve inflammatuar aktivasyonun redoks kontrolüne ek olarak bakteri ve parazitlere karşı doğrudan antibakteriyel etkiye sahiptir (118). Makrofajlar sıklıkla istilacı patojenlerle temasa geçen ilk bağışıklık hücreleridir. Bakterilerin makrofajlar tarafından tanınması, birçok hücresel bölmede, Nox2 tarafından üretilen oksidatif patlama tarafından fagositize edilen bakterilerin yok edilmesi dahil olmak üzere çeşitli antibakteriyel roller gerçekleştiren ROS üretimi ile sonuçlanır. En önemli nokta, doku hasarında ROS üretiminin hangi aşamada onarıma veya yıkıma yöneldiğidir (118, 119).

İnflammatuar süreçte düzenlenmiş bazal ROS seviyesi, çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma gibi hücre fonksiyonlarını sürdürmek için bir sinyal molekülü olarak görev yapabilir. Süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi radikalleri içeren ROS, çeşitli immün ve doku yapısal hücre tiplerinde p38 MAPK ve NF- κ B

proteinleri tarafından düzenlenen anahtar proinflatuar hücre içi sinyal yollarını aktive ederek sitokin salınımını uyarabilir (10, 74). Bununla birlikte, bu sinyal yollarının aktivasyonunun genel olarak immün ve inflammatuar yanıtların amplifikasyonunda yer aldığı kabul edilirken, bunların aynı zamanda onarım ve rejenerasyon ilişkili oldukları göz önünde bulundurulmalıdır. Bir çalışmada, ROS'un yapılan kök hücre çalışmalarında farklılaşma yönünü belirlemede etkili bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. (80). ROS'un artışının osteojenik ve nörojenik farklılaşmayı baskımlarken, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmada indükleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (21, 81, 82).

Bu çalışmada NAC tek başına uygulandığında ve kontrol grubunda ROS seviyesinin LPS, LTA uygulamalarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. NAC inflammatuar stimülatör (LPS, LTA ve H₂O₂) varlığında ROS'u azaltmışken, kontrol olarak uygulandığında etkisiz kaldığı gözlenmiştir. Bu durum NAC'ın inflamasyon varlığında aktif hale geldiğinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca NAC ve kontrol gruplarındaki proliferasyon hızına bağlı olarak hücrede gelişen stres neden olarak ROS artışı yaratmış olabilir. Dental pulpa hücresinde hücre döngüsü sırasında proliferasyon hızıyla ROS üretimi arasında nasıl bir ilişki olduğu literatürde netlik kazanmamıştır. Adipojenik ve kondrojenik kök hücre farklılaşmasında ROS'un indükleyici rolünün gösterilmesi, pulpa hücresinde de proliferasyon döngüsünün hızlandığı sırada ROS artışının olma olasılığının incelenmesi, ileriki çalışmalarımıza bir yön verebilmemiz açısından önem arz etmektedir.

Biyokimyasal analizlerde LPS ve LTA uygulamasının H₂O₂ ile kontrol gruplarına kıyasla ROS oluşumunda daha zayıf etki yarattığı gözlenmiştir. DFCDA ile yapılan ROS işaretlemesinde ise LPS uygulanan grupta kontrole göre daha çok hücrede yoğun floresan işaretleme bildirmişlerdir. Guo ve ark (92) da LPS uygulanan dental pulpa hücresinde artmış ROS düzeyi saptamışlardır. ROS molekülleri çok hızlı yapılıp yıkılan moleküllerdir (120). Bu nedenle zamana bağlı ROS değişiminin izlenmesi daha sağlıklı verilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

H₂O₂'nin doza bağlı olarak ROS artışına neden olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (121-123). H₂O₂ aynı zamanda reaktif oksijen molekülüdür. Hücre ölümü, farklılaşma ve hücre proliferasyonunda önemli rolleri vardır. Aynı zamanda

ikincil mesajcı olarak da fonksiyonu vardır. Bizim çalışmamızda H₂O₂, LPS ve LTA'ya karşı pozitif kontrol olarak kullanıldı. Zamana ve kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak yüksek ROS seviyeleri gözlemlendi.

Çalışmamızda derin dentin çürüğü sonrası gelişen pulpal, periapikal ve de periyodontal hastalıklarda inflamatuvar süreçte önemli rol oynayan Gram-negatif basil grubu mikroorganizmalardan birisi olan *P. Gingivalis*'in LPS'i ile dental pulpa hücrelerinde inflamasyon modeli oluşturulması hedeflendi. Literatürde *P. Gingivalis* LPS'inin dental pulpa, periyodontal ligament ve insan keratokistlerinde TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve 8 benzeri proinflamatuvar sitokinleri eksprese ettiği, nötrofil ve makrofajları aktivite ederek inflamatuvar sürecin yönetilmesinde rol oynadığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (124-126). Dental pulpa hücrelerinde ROS artışının gösterildiği çalışmalar incelendiğinde, en yaygın olarak *Escherichia Coli* bakteri komponentlerinin kullanıldığını görmekteyiz (3, 127, 128). Lee ve ark (3)'nın çalışmalarında 10 μ g/mL *E. coli* LPS ile inkübe edilen dental pulpa hücrelerinde önemli ROS artışı gözlenmiştir. *E. coli* LPS'inin de *P. Gingivalis* LPS'ine göre çok daha güçlü inflamasyon oluşturabileceği rapor edilmiştir (129, 130). Diğer taraftan 1-10 μ g/mL doz aralığında kullanılan *P. Gingivalis* LPS'inin dental pulpa hücresinde zamana bağlı olarak proliferasyonu, migrasyonu ve osteoblastik farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir (125, 131). Bunun yanı sıra yakın zamanda dental pulpa kök hücrelerinin doku mühendisliğinde kullanıldığı bir çalışmada *P. Gingivalis*'in proliferasyonu artırırken odontoblastik farklılaşmayı azalttığı, mineral birikiminde ise herhangi bir etki oluşturmadığı belirtilmiştir(132).

LTA gram pozitif karyojenik bakterilerin hücre zarının majör komponentlerindendir. Odontoblastlardaki TLR2, dendritic hücreler ve makrofajları ve de sinyal yollarını stimüle ederler (133). LTA yoluyla TLR2 aktivasyonunun insan odontoblastlarında, dental pulpa fibroblastlarında ve immatür dendritik hücrelerde pro-inflamatuvar sitokinlerin artışı, aynı zamanda proliferasyon ve migrasyonu indüklemişlerdir (52). Bu çalışmada dental pulpa hücre kültüründe *P. Gingivalis* LPS'i ile birlikte karyojenik bakterilerin gram pozitif bakterilerinin küçük bir ailesine ait olan *Staf. Aureus*'un LTA sı inflamasyon modeli oluşturmak üzere kullanıldı. Çalışmamızda LPS ve LTA 40 μ g/ml dozda uygulanmıştır. Yapılan doz

belirleme çalışmalarında öncelikle IC50 değerlerine ulaşılması planlanmıştır. Primer hücre kültüründe standartların sağlanmasının güçlüğü nedeniyle, akım sitometride 40 µg/ml oranının tekrarlanan ölçümlerde yetersiz etki göstermesi sonucu WST ve MTT yöntemleriyle de doz belirleme çalışması yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, çok yüksek dozlarda (100-150 µg/ml) ancak IC50 değerlerine ulaşılabilmiştir. Yang ve ark. (134) 0,01-100 µg/ml doz aralığında LPS (*E coli*) uygulanan dental pulpa hücrelerinde doza bağlı olarak hücre apoptozu meydana geldiği, 100 µg/ml dozdaki LPS in apoptotik seviyesinin % 14 civarında olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan literatür incelendiğinde çok daha düşük dozlarda da istenen inflamatuvar etkinin yaratılmış olması doz belirlemede bizim için kısıtlayıcı bir faktör olmuştur. Bu durumun sonuçlarımızı etkilemiş olması da muhtemeldir.

Hücreyi ilgilendiren tüm kompartmanlar başta mitokondri ve sitozol olmak üzere, oluşan ROS moleküllerini ortamdan uzaklaştıran ya da zararsız moleküllere dönüştüren antioksidan molekülleri salgırlar. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. GSH oksitlendiğinde, GSSG oluşturur ve bu, belirli bir enzim olan glutatyon redüktaz tarafından yeniden indirgenebilir. GSH, GSSG'den enzimatik olarak yeniden üretilbildiği gibi, aynı zamanda GSH'un ROS ile reaksiyonu, çok çeşitli peroksitlerin inaktivasyonunu kolaylaştırarak GSH peroksidazları tarafından da kataliz edilebilir. Hücre içi redoks balansının sağlanmasında majör role sahip olan GSH oksidatif stres tarafından etkilenen sinyal yolunu da regüle eder. İnflamasyon sırasında glutatyon metabolizmasındaki değişiklikler çok net belirlenememiştir (14, 15). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak (92, 122) kontrol ve NAC kontrol grubunda GSH düzeyi yüksekken, LPS, LTA ve H₂O₂ uygulaması sonrasında pulpa hücresinde artan inflamatuvar baskıyla azaldığı saptanmıştır. Buna karşılık NAC ile pre-inkübasyonun GSH düzeylerine herhangi bir pozitif etkisi olmamıştır. Deneylerimizin doz belirleme çalışmalarında 5mM ve 10 mM hücre toksisitesi açısından benzer sonuçlar göstermiştir. Bu nedenle antiinflamatuvar etkinliğinin daha fazla olabileceği düşüncesiyle NAC 10 mM konsantrasyonda kullanılmıştır. Diğer taraftan GSH Immünflorasan yönteminde LPS, LTA ve H₂O₂ inkübasyonu düşük florasan etki

yaratırken NAC ile preinkübasyonunun floresan düzeyini artırarak olumlu sonuç yarattığı gözlenmiştir.

Literatürde inflamasyon sırasında glutatyon metabolizmasındaki değişimler çok net belirlenememiştir. Aslında GSH sentezinde yer alan enzimlerin artan aktivitesi, GSH konsantrasyonunun artmasına neden olabilirken, tersine artan GSH peroksidaz ve GSH transferaz aktivitesi, GSH konsantrasyonunu azaltabilir (14, 15). İnflame pulpa dokularında, GSH düzeyini incelediğimiz bir çalışmamızda (basılmamış data) hücre kültürü çalışmasının aksine GSH oranının sağlıklı kontrollere kıyasla önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda immün boyama örneklerinde de akut pulpitisli pulpa doku kesitlerinde damarlarda güçlü GSH immün reaktivitesi gözlenmiştir. Malmezat ve arkadaşlarının(14) yaptığı çalışmada da ratlarda sepsisin akut fazı sırasında karaciğer, akciğer, kas ve kalp gibi dokularda glutatyon turnoverının arttığı, kanda ise azaldığı rapor edilmiştir. İlaveten hayvan modellerinde septik şokun başlangıç fazında doku GSH konsantrasyonu azalırken GSSG arttığı gözlenmiştir (135, 136). Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda hücre içi GSH düzeylerinin inflamasyonla düştüğü gösterilmektedir (3, 137, 138). Dokular hücre içi çevre kadar hücre dışı çevre, plazma ve pek çok ilave hücre ve enzim kompleksini içerdiği için sonuçları hücre kültürü çalışmalarıyla birebir uyumlu olarak tartışmak mümkün olmayabilir.

Ksenobiyotikleri GSH'a konjuge etme ve böylece hücresel ortamları detoksifiye etme yetenekleriyle bilinmesine rağmen, GST'lar ayrıca önemli hücre sinyalleme etkileri olan substrat olmayan ligandları da bağlayabilir. GST lipit peroksitlerine karşı GSH-Px aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluşturan antioksidan enzimlerdir (139). Bu çalışma sonuçları incelendiğinde dental pulpa fibroblastlarında LPS, LTA ve H₂O₂ nin tek başına veya NAC preinkübasyonu ile uygulananın hem kolorimetrik hemde immünfloresan boyama yöntemiyle incelendiğinde GST spesifik enzim aktivitesi üzerine önemli bir değişime neden olmamıştır.

İnflamasyonun şiddetine veya detoksifikasyon enzimlerinin yetersizliğine bağlı olarak apoptotik hücre ölümü gerçekleşebilir. Apoptoz, doku yapısını veya işlevini bozmadan belirli hücreleri ortadan kaldıran ve çok hücreli organizmaların

gelişimi ve bakımı için çok önemli olan programlanmış bir hücre ölümü şeklidir (22, 140). Apoptoz ayrıca olgun diş pulpasında ve pulpa bakteriyel enfeksiyon, iskemik, mekanik uyaranlar veya diş materyali gibi diş uyaranlara maruz kaldığında ortaya çıkabilir (134, 141) Gram negatif bakterilerin dış hücre duvarının bir bileşeni ve ana virülans faktörü olan LPS, birçok biyolojik etkiye sahiptir.

Bakteriyel LPS dentin tübülleri yoluyla insan diş pulpasında patolojik pulpa değişiklikleri meydana getirebilir. LPS'nin fibroblastlarda, makrofajlarda veya endotel hücrelerinde apoptozu indüklerken nötrofillerin apoptozunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (142, 143). Yang ve ark.(134) E. Coli LPS'inin dental pulpa hücrelerinde oluşturduğu apoptozu inceledikleri çalışmada LPS'in doza bağlı olarak apoptotik hücre varlığını artırdığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *P. gingivalis* LPS'i ve *St. Aerus* LTA'sı bakteriyel stimülant olarak kullanıldı. H₂O₂ ise pek çok çalışmada apoptoz-nekrozu indüklediği daha önceden belirlendiği için pozitif kontrol olarak kullanıldı (17, 121). Kontrole göre kıyaslandığında LPS, LTA ve H₂O₂ tek başına veya NAC inkübasyonu ile apoptotik hücre sayısını ve ölü hücre sayısını artırmıştır.

Yapılan çalışmalar hücre içi GSH'un hücre ölümünün modülasyonunda önemli fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir. Apoptoz, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması ve internükleozomal DNA bölünmesi gibi morfolojik özelliklerle karakterize edilir; Nekroz ise plazma zarının yırtılması veya parçalanması ve ATP tükenmesi ile karakterize edilir (144). Her iki hücre ölümü biçimi de mitokondri tutulumu gibi ortak yolları paylaşır. GSH, hücre ölümünü her iki yönde de modüle eder. GSH, hücre ölümünde yer alan proteinlerin (NFκB, stres kinazları ve kaspazlar gibi) spesifik tiyol kalıntılarının redoks durumunu düzenler. GSH'un tükenmesinin bazı hücre tiplerinde apoptozu başlatmada önemli bir rol oynadığını düşündürür. Bununla birlikte, GSH tükenmesi, çeşitli ajanların neden olduğu hücre ölümünü apoptozdan nekroza dönüştürür. Mitokondriyal GSH tükenmesi, artan ROS seviyelerine ve reaktif nitrojen türlerine, mitokondriyal işlev bozukluğuna ve ATP tükenmesine yol açar. Bu, apoptotiği nekrotik hücre ölümüne dönüştürebilir (144-146). Çalışmamızda NAC'in GSH rejenerasyonunu gerçekleştirememesinin sonucu olarak apoptoz ve hücre ölümü oranlarının artmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada NAC preinkübasyonunun ROS oluşumunu azaltsa da hücre içi GSH'ı rejenere edememesi nedeniyle tek başına bir ajan olarak bu haliyle kullanılabilmesi çok mümkün görülmemektedir. Diğer taraftan rejeneratif endodonti vakalarında pulpa dokusunun hasarlandığı durumlarda sıklıkla kullanılan MTA ve Biodentin materyallerinin ROS oluşumu NAC preinkübasyonu ile önemli derecede azalmıştır (111) . Farklı konsantrasyonlarda NAC ile çalışmalara devam edilebileceği ve benzeri antioksidan moleküllerinde denenmesi rejeneratif endodontinin geleceği açısından önemli olacağı düşünceyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada LPS, LTA ve H₂O₂ ile primer dental pulpa hücrelerinde inflamasyon oluşturularak ROS, hücre içi GSH, GST ve hücre canlılığı-nekroz-apoptoz seviyeleri incelendi. Sonuç olarak dental pulpada H₂O₂ ile yüksek ROS seviyeleri elde edilmişken LPS ve LTA ile ROS düzeyleri düşük kalmış, NAC preinkübasyonu ROS azalmasını indüklemiştir. Ayrıca hücre içi GSH da inflamasyonla azalmıştır. Diğer taraftan NAC molekülü hücre içi GSH'ı restore etmede yetersiz kalmıştır. Daha düşük düzeyde ki NAC molekülünün yanısıra farklı rejeneratif moleküllerin dental pulpadaki oksidatif stresi elimine etmedeki etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

ROS, çeşitli immün ve doku yapısal hücre tiplerinde p38 MAPK ve NF- κ B proteinleri tarafından düzenlenen anahtar proinflamatuvar hücre içi sinyal yollarını aktive ederek sitokin salınımını uyarabilir (10, 74). Özellikle, bu yollar, proinflamatuvar süreçte son derece iyi karakterize edilmiştir ve enfeksiyon ve sitokin stimülasyonu gibi hücrel streslere yanıt olarak hücre dışı sinyal iletiminin merkezinde yer alır. Çalışmalardan elde edilen veriler, bu sinyal yolunun, DPSC'lerin in vitro proliferasyonunu, mineralizasyonunu ve farklılaşmasını doğrudan yönlendirdiğini göstermektedir. Kullanılan rejeneratif moleküller bu yolak üzerinden organize edilerek DPSC'ler üzerine etkinlikleri artırılabilir.

Dental pulpa pek çok hücreye farklılaşabilen, kolay temin edilebilen, mezenşimal kök hücre kaynağı olarak son yıllarda rejeneratif tıp tedavilerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca bu özelliği sayesinde inflamasyonu kontrol etmek için yeni bir yaklaşım sağlayabileceğini tahmin etmek de ilginçtir. MSC'ler, uygun şekilde iletilirse iltihaplı diş dokusunun onarımına yardımcı olacak bir hücre tedavisi yaklaşımı sağlayabilirken, salgılanan aktif bileşenlerinin daha iyi karakterizasyonu, hedeflenen diş dokusu onarımı için yeni moleküllerin tanımlanmasını sağlayabilir. İnflamatuvar yanıtın karakterizasyonuna dayalı olarak teşhis geliştirilirken, inflamasyon modülatörleri, iyileşme yanıtını kolaylaştırmak ve restorasyonun uzun ömürlü olmasına yardımcı olmak için ek olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, restoratif materyallerin NAC gibi antioksidanlarla

desteklenebileceğini göstermiştir. Ancak NAC molekülünün dozaj ve uygulama süresine yönelik çalışmaların devam ederek bu molekülün daha yararlı hale getirilmesi düşünülebilir.

İnflamasyon ve rejenerasyon arasındaki sıkı ilişki, diş dokusunda gelişen inflamasyonun yönetilerek sürecin iyileşme ve rejenerasyona döndürülmesini olası kılabilir. Mikroorganizmalar ve metabolitlerinin yaşam döngüsü ve simbiyotik ilişkileri hakkında daha detaylı çalışmaların yapılmasının önü açılmalıdır. Son yıllarda hücre zarı komponentlerinin doku mühendisliği kapsamında hücrede düşük dozda inflamasyon yaratarak rejenerasyonun stimüle edilmeye çalışılması umut vericidir.

Dental pulpa rejenerasyonuna yönelik önümüzde 2 farklı yön bulunmaktadır. Birincisi dışarıdan doku mühendisliği yoluyla iskeleler oluşturarak gerek rejeneratif moleküllerin (büyüme faktörleri, NAC, quersetin, vitamin benzeri antioksidan moleküller, bakteri ve bakteri komponentleri, mikroRNA'lar, senolitik moleküller, DPSC ler vs) hasarlı pulpaya yerleştirilmesi ve iyileşmenin/rejenerasyonun tetiklenmesidir. İkincisi ise inflamatuvar süreçte hücre ve moleküllerin yönetilmesi yoluyla cell homing yönteminin geliştirilerek kök kanalında sağlıklı bir dokunun oluşturulabilmesidir.

Bu çalışmada dental pulpa hücresinde bir inflamasyon modeli oluşturuldu. her ne kadar başarılı ko-kültür modelleri oluşturulabilse de, hücre kültürü çalışmaları, doğası gereği sıklıkla sadece tek bir hücre tipine yönelik olabilmektedir. Dokular, hücre içi çevre kadar hücre dışı çevre, plazma ve pek çok ilave hücre ve enzim kompleksini içerdiği için sonuçları hücre kültürü çalışmalarıyla birebir uyumlu olarak tartışmak mümkün olmayabilir. Bu nedenle, klinik bir bakış açısıyla, diş pulpası içindeki immün/inflamatuvar olayları azaltabilen ve bakteriyel enfeksiyon çözüldüğünde doku homeostazına ve sağlığına hızlı dönüşü teşvik edebilen moleküler ve hücresel ajanları belirlemek çok önemli görünmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):13-27.
2. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007;33(3):213-9.
3. Lee NH, Lee YH, Bhattari G, Lee IK, Yun BS, Jeon JG, et al. Reactive oxygen species removal activity of davallialactone reduces lipopolysaccharide-induced pulpal inflammation through inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor kappa b pathway. *J Endod*. 2011;37(4):491-5.
4. Massey WL, Romberg DM, Hunter N, Hume WR. The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8(1):30-5.
5. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:755-76.
6. Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S. Hydrogen peroxide produced by oral Streptococci induces macrophage cell death. *PLoS One*. 2013;8(5):e62563.
7. Cooper PR, Chicca IJ, Holder MJ, Milward MR. Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex: Net Gain or Net Loss? *J Endod*. 2017;43(9S):S87-S94.
8. Aqawi M, Sionov RV, Gallily R, Friedman M, Steinberg D. Anti-Biofilm Activity of Cannabigerol against Streptococcus mutans. *Microorganisms*. 2021;9(10).
9. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.
10. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999;18(54):7719-30.
11. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40.
12. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.
13. Aksoy Y. Biochemical Approach to Dental Disease. 2011.
14. Malmezat T, Breuille D, Capitan P, Mirand PP, Obled C. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr*. 2000;130(5):1239-46.

15. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int J Gen Med*. 2011;4:105-13.
16. Sadowska AM, Manuel YKB, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(1):9-22.
17. Paranjpe A, Sung EC, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *J Dent Res*. 2008;87(6):537-41.
18. Pei Y, Liu H, Yang Y, Yang Y, Jiao Y, Tay FR, et al. Biological Activities and Potential Oral Applications of N-Acetylcysteine: Progress and Prospects. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2835787.
19. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
20. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
21. Buzoglu HD, Burus A, Bayazit Y, Goldberg M. Stem Cell and Oxidative Stress-Inflammation Cycle. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2022.
22. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010;38(9):687-97.
23. Neves VCM, Yianni V, Sharpe PT. Macrophage modulation of dental pulp stem cell activity during tertiary dentinogenesis. *Sci Rep*. 2020;10(1):20216.
24. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
25. Frisstad I BE. Structure and functions of the dentin-pulp complex. In: Berman LH HK, editor. 12 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2021.
26. Duncan HF, Cooper PR. Pulp Innate Immune Defense: Translational Opportunities. *J Endod*. 2020;46(9S):S10-S8.
27. Goldberg M, Septier D. Phospholipids in amelogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(3):276-90.
28. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol*. 2006;419:99-113.
29. Takeda K, Oida S, Goseki M, Iimura T, Maruoka Y, Amagasa T, et al. Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells. *Bone*. 1994;15(5):467-70.
30. Sloan AJ, Perry H, Matthews JB, Smith AJ. Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *Histochem J*. 2000;32(4):247-52.

31. Bletsa A, Heyeraas KJ, Haug SR, Berggreen E. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in rat periapical lesions and dental pulp after unilateral sympathectomy. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(6):376-84.
32. Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC, et al. The dynamics of TGF-beta in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci Rep*. 2018;8(1):4450.
33. Salkin H, Gonen ZB, Ergen E, Bahar D, Cetin M. Effects of TGF-beta1 Overexpression on Biological Characteristics of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Stem Cells*. 2019;12(1):170-82.
34. Levine M. *Topics in Dental Biochemistry*. Newyork: Springer; 2011. 31-2 p.
35. Griffin CJ, Harris R. Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp. *Arch Oral Biol*. 1966;11(7):659-66.
36. Gartner LP, Seibel W, Hiatt JL, Provenza DV. A fine-structural analysis of mouse molar odontoblast maturation. *Acta Anat (Basel)*. 1979;103(1):16-33.
37. Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M. Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol*. 2001;46(3):221-8.
38. Haug RS SK, Heyeraas KJ *Ingle's Endodontics 7*. 7 ed. North Caroline: PAMPHUSA; 2019.
39. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):179-200.
40. Nishikawa S, Sasaki F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II-expressing dendritic cells. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(3):303-12.
41. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*. 1987;66(6):1149-53.
42. Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2004;49(1):29-36.
43. Sloan AJ, Couble ML, Bleicher F, Magloire H, Smith AJ, Farges JC. Expression of TGF-beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. *Adv Dent Res*. 2001;15:63-7.
44. Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):629-37.
45. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
46. Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. *Adv Dent Res*. 2011;23(3):302-6.
47. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
48. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*. 2007;33(6):643-51.

49. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
50. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(1):5-13.
51. Durand SH, Flacher V, Romeas 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. *J Immunol.* 2006;176(5):2880-7.
52. Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, et al. Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology.* 2010;215(1):53-9.
53. Mojtahedi H, Hossein-Khannazer N, Mahmoud Hashemi S, Masoudnia M, Askarzadeh M, Khojasteh A, et al. Effects of Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* on Gene Expression Levels of Toll-like Receptors and Inflammatory Cytokines in Human Dental Pulp Stem Cells. *Iran J Immunol.* 2022;19(3):299-310.
54. Liu Y, Gao Y, Zhan X, Cui L, Xu S, Ma D, et al. TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells. *J Endod.* 2014;40(9):1375-81.
55. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 2005;31(10):711-8.
56. Lin CC, Lin WN, Cho RL, Wang CY, Hsiao LD, Yang CM. TNF-alpha-Induced cPLA(2) Expression via NADPH Oxidase/Reactive Oxygen Species-Dependent NF-kappaB Cascade on Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells. *Front Pharmacol.* 2016;7:447.
57. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1367-73.
58. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nor JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011;22(1):3-13.
59. Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep.* 2017;7:39654.
60. Babb R, Chandrasekaran D, Carvalho Moreno Neves V, Sharpe PT. Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/beta-catenin signaling in response to tooth damage. *Sci Rep.* 2017;7(1):3102.
61. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988;334(6179):260-2.
62. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a

- collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008;34(4):421-6.
63. Galler KM, Widbiller M. Perspectives for Cell-homing Approaches to Engineer Dental Pulp. *J Endod*. 2017;43(9S):S40-S5.
 64. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):137-47.
 65. Kim JC, Lee YH, Yu MK, Lee NH, Park JD, Bhattarai G, et al. Anti-inflammatory mechanism of PPARgamma on LPS-induced pulp cells: role of the ROS removal activity. *Arch Oral Biol*. 2012;57(4):392-400.
 66. Mainkar A, Kim SG. Diagnostic Accuracy of 5 Dental Pulp Tests: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2018;44(5):694-702.
 67. Zhang F, Lau SS, Monks TJ. The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis. *Toxicol Sci*. 2011;120(1):87-97.
 68. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11-26.
 69. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
 70. Ping Z, Peng Y, Lang H, Xinyong C, Zhiyi Z, Xiaocheng W, et al. Oxidative Stress in Radiation-Induced Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:3579143.
 71. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-72.
 72. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
 73. Zukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol*. 2018;92:8-17.
 74. Simon S, Smith AJ, Berdal A, Lumley PJ, Cooper PR. The MAP kinase pathway is involved in odontoblast stimulation via p38 phosphorylation. *J Endod*. 2010;36(2):256-9.
 75. Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019;20:247-60.
 76. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5698931.
 77. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.

78. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.
79. Jha N, Ryu JJ, Choi EH, Kaushik NK. Generation and Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Induced by Plasma, Lasers, Chemical Agents, and Other Systems in Dentistry. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7542540.
80. Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev.* 2012;133(5):215-25.
81. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:105135.
82. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev.* 2015;24(10):1150-63.
83. Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):840-60.
84. Duthie GG, Wahle KW, James WP. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr Res Rev.* 1989;2(1):51-62.
85. Diplock AT. Defense against reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 1998;29(6):463-7.
86. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1 Suppl):194S-200S.
87. Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem.* 1982;257(7):3747-53.
88. Josephy PD, Taylor PL, Vervaet G, Mannervik B. Screening and characterization of variant Theta-class glutathione transferases catalyzing the activation of ethylene dibromide to a mutagen. *Environ Mol Mutagen.* 2006;47(9):657-65.
89. Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci.* 1988;13(5):185-8.
90. Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:715-44.
91. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 2013;34(19):4555-63.
92. Guo X, Chen J. The protective effects of saxagliptin against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and damage in human dental pulp cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):1288-94.

93. Nassar M, Dargham A, Hiraishi N, Tamura Y, Tagami J. In Vitro Mitigation of Arsenic-Induced Toxicity by Reduced Glutathione in Rat Pulp Cells. *Eur Endod J*. 2020;5(3):277-81.
94. Jiao Y, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Liu Q, et al. N-Acetyl Cysteine Depletes Reactive Oxygen Species and Prevents Dental Monomer-Induced Intrinsic Mitochondrial Apoptosis In Vitro in Human Dental Pulp Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147858.
95. Nassar M, Hiraishi N, Islam MS, Tamura Y, Otsuki M, Kasugai S, et al. The effect of glutathione on 2-hydroxyethylmethacrylate cytotoxicity and on resin-dentine bond strength. *Int Endod J*. 2014;47(7):652-8.
96. Lefeuvre M, Bourd K, Lorient MA, Goldberg M, Beaune P, Perianin A, et al. TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2004;83(12):914-9.
97. Yan F, Yang WK, Li XY, Lin TT, Lun YN, Lin F, et al. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(6):869-72.
98. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
99. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-75.
100. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev*. 2011;43(2):138-51.
101. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):916-21.
102. Akca T, Canbaz H, Tataroglu C, Caglikulekci M, Tamer L, Colak T, et al. The effect of N-acetylcysteine on pulmonary lipid peroxidation and tissue damage. *J Surg Res*. 2005;129(1):38-45.
103. Koh AS, Simmons-Willis TA, Pritchard JB, Grassl SM, Ballatori N. Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1. *Mol Pharmacol*. 2002;62(4):921-6.
104. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012;38(1):81-5.
105. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol*. 2016;54(4):322-9.
106. Kim DY, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, et al. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res*. 2007;30(10):1283-92.

107. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2009;80(4):672-8.
108. Pinar Karapinar S, Ulum YZ, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF-alpha and TGF-beta1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol*. 2016;68:48-54.
109. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T. Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages. *PLoS One*. 2014;9(2):e87229.
110. Lasalvia A, Cairone F, Cesa S, Maccelli A, Crestoni ME, Menghini L, et al. Characterization and Valorization of 'Sulmona Red Garlic' Peels and Small Bulbs. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(11).
111. Weekate K, Chuenjitkuntaworn B, Chuveera P, Vaseenon S, Chompu-Inwai P, Ittichaicharoen J, et al. Alterations of mitochondrial dynamics, inflammation and mineralization potential of lipopolysaccharide-induced human dental pulp cells after exposure to N-acetyl cysteine, Biodentine or ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2021;54(6):951-65.
112. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
113. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med*. 2015;7(308):308re8.
114. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod*. 2017;43(7):1033-51.
115. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*. 1984;64(5):959-66.
116. Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, et al. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res*. 2011;90(7):830-40.
117. Lee YH, Kim GE, Song YB, Paudel U, Lee NH, Yun BS, et al. Davallialactone reduces inflammation and repairs dentinogenesis on glucose oxidase-induced stress in dental pulp cells. *J Endod*. 2013;39(11):1401-6.
118. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2).
119. Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*. 2011;80(3):580-3.
120. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91(3C):31S-8S.

121. Soares DG, Goncalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent.* 2015;43(6):750-6.
122. Park WH. The effects of exogenous H₂O₂ on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med.* 2013;31(2):471-6.
123. Park WH. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. *Mol Med Rep.* 2013;7(4):1235-40.
124. Kim WH, An HJ, Kim JY, Gwon MG, Gu H, Jeon M, et al. Anti-Inflammatory Effect of Melittin on *Porphyromonas Gingivalis* LPS-Stimulated Human Keratinocytes. *Molecules.* 2018;23(2).
125. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol.* 2014;59(2):167-75.
126. Ko YJ, Kwon KY, Kum KY, Lee WC, Baek SH, Kang MK, et al. The Anti-Inflammatory Effect of Human Telomerase-Derived Peptide on *P. gingivalis* Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production and Its Mechanism in Human Dental Pulp Cells. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:385127.
127. Bindal P, Ramasamy TS, Kasim NHA, Gnanasegaran N, Chai WL. Immune responses of human dental pulp stem cells in lipopolysaccharide-induced microenvironment. *Cell Biol Int.* 2018;42(7):832-40.
128. Jariyamana N, Chuveera P, Dewi A, Leelapornpisid W, Ittichaicharoen J, Chattipakorn S, et al. Effects of N-acetyl cysteine on mitochondrial ROS, mitochondrial dynamics, and inflammation on lipopolysaccharide-treated human apical papilla cells. *Clin Oral Investig.* 2021;25(6):3919-28.
129. Barksby HE, Nile CJ, Jaedicke KM, Taylor JJ, Preshaw PM. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(3):479-87.
130. Morsczeck CO, Drees J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(12):1595-601.
131. Liu J, Tang X, Li C, Pan C, Li Q, Geng F, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015;60(8):1153-61.
132. Rothermund K, Calabrese TC, Syed-Picard FN. Differential Effects of *Escherichia coli*- Versus *Porphyromonas gingivalis*-derived Lipopolysaccharides on Dental Pulp Stem Cell Differentiation in Scaffold-free Engineered Tissues. *J Endod.* 2022;48(11):1378-86 e2.

133. Schweikl H, Buchalla W, Krifka S. Cell responses to cariogenic microorganisms and dental resin materials-Crosstalk at the dentin-pulp interface? *Dent Mater.* 2017;33(5):514-24.
134. Yang H, Zhu YT, Cheng R, Shao MY, Fu ZS, Cheng L, et al. Lipopolysaccharide-induced dental pulp cell apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(11):1027-33.
135. Ikegami K, Lalonde C, Young YK, Picard L, Demling R. Comparison of plasma reduced glutathione and oxidized glutathione with lung and liver tissue oxidant and antioxidant activity during acute inflammation. *Shock.* 1994;1(4):307-12.
136. Keller GA, Barke R, Harty JT, Humphrey E, Simmons RL. Decreased hepatic glutathione levels in septic shock. Predisposition of hepatocytes to oxidative stress: an experimental approach. *Arch Surg.* 1985;120(8):941-5.
137. Chang JH, Kim SG, Kim TW. Alleviation of Oxidative Stress in Dental Pulp Cells Following 4-Hexylresorcinol Administration in a Rat Model. *Appl Sci.* 2021;11:3637.
138. Horsophonphong S, Kitkumthorn N, Sritanaudomchai H, Nakornchai S, Surarit R. High Glucose Affects Proliferation, Reactive Oxygen Species and Mineralization of Human Dental Pulp Cells. *Braz Dent J.* 2020;31(3):298-303.
139. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(9):1373-80.
140. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:267-93.
141. Vermelin L, Lecolle S, Septier D, Lasfargues JJ, Goldberg M. Apoptosis in human and rat dental pulp. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(5-6):547-53.
142. Alikhani M, Alikhani Z, He H, Liu R, Popek BI, Graves DT. Lipopolysaccharides indirectly stimulate apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278(52):52901-8.
143. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 2000;95(12):3823-31.
144. Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22 Suppl 1:S38-42.
145. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(3):238-45.
146. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -649

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 19 MART 2019 SALI
Toplantı No : 2019/08
Proje No : GO 18/234 (Onay Tarihi: 20.02.2018)
Karar No : 2019/08-08

Kurulumuzun 20.02.2018 tarihli toplantısında GO 18/234 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yasemin AKSOY' un sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Dilara ZEYBEK, Öğr. Gör. Dr. Hande CANPINAR ile birlikte çalışacakları ve Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU' nun doktora tezi olan, GO 18/234 kayıt numaralı, "*Karyojenik Bakterilerin Dental Pulpa Hücrelerinde Oluşturduğu Oksidatif Stresin İncelenmesi*" başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 15.03.2019 tarihli araştırmacı revizyonu dilekçeniz Kurulumuzun 19.03.2019 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve **uygun bulunmuştur**. Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Dr. Kübra Simay AYDIN yardımcı araştırmacı olarak proje ekibine dahil edilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Nürten AKARSU	(Başkan)	9. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	10. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	11. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Nedime AĞLAM	(Üye)	12. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖZ	(Üye)
5. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	15. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
8. Doç. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	16. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

Ek 2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu

KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA HÜCRESİNDE OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF STRESİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 12	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 6
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	slidetodoc.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Beykent Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	acikerisim.akdeniz.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.slideserve.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	Lisa Truong, Ian S. Moody, Dylan P. Stankus, Jeffrey A. Nason, Mark C. Lonergan, Robert L.	<% 1

Ek 3. Tez Çalışması Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Hatice Doğan Buzoglu
Ödev başlığı:	KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA HÜCRESİNDE OLU...
Gönderi Başlığı:	KARYOJENİK BAKTERİLERİN DENTAL PULPA HÜCRESİNDE OLU...
Dosya adı:	Turnitin-Tez.docx
Dosya boyutu:	383.58K
Sayfa sayısı:	73
Kelime sayısı:	16,742
Karakter sayısı:	112,087
Gönderim Tarihi:	10-Şub-2023 04:11ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2010861205



9. ÖZGEÇMİŞ

İsim : Hatice

Soyisim : Doğan Buzoğlu

