

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI**



**PERİAPİKAL LEZYONLARDA MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE
EDİLMİŞ PROTEİN KİNAZ (MAPK) YOLAĞI; SELENYUMUN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

ARŞ. GÖR. DT. NERGİZ BOLAT

**DANIŞMAN
PROF. DR. BULEM ÜREYEN KAYA**

ISPARTA-2021

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

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

“*Periapikal Lezyonlarda Mitojenler Tarafından Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) Yolağı; Selenyumun Etkileri*” adlı Diş Hekimliğinde Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Arş. Gör. Dt. Nergiz BOLAT

İmza

Danışman

Prof. Dr. Bulem Üreyen KAYA

İmza

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, rat molar dişlerinde periapikal lezyon gelişiminde MAPK ve otofaji sinyal yolunu hedef alan moleküler mekanizma mRNA ve protein ifadesi düzeyinde ortaya konulmuştur. Periapikal lezyon oluşumu ile artan otofajik akış ve aktive olan p38 MAPK sinyal iletim süreçleri gösterilmiştir. Sistemik selenyum uygulamasının deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiş ve selenyumun periapikal dokuda enflamasyonu baskıladığı, kemik yıkımını azalttığı, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiş, hücresel düzeydeki MAPK ve otofaji sinyal yolunu baskıladığı ortaya konulmuştur.

Bu çalışma ve diğer periapikal lezyonların moleküler patogeneze ilişkin bilinmezleri aydınlatacak çalışmalar daha spesifik ve hedefe yönelik bir tedavi yaklaşımının uygulanmasını teşvik etmek amaçlanmıştır.

Bu çalışma TDH-2020-8040 proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Isparta, 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve ışıltısıyla bana yol gösteren, yolumu aydınlatıp beni destekleyen, hayallerime ortak olan, tez sürecimde her aşamada yanımda olan, beni güçlendiren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, kendime örnek aldığım ve böyle şahane bir otörle birlikte çalışma fırsatı bulduğum için kendimi ömür boyu şanslı hissedeceğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA'ya,

Uzmanlık eğitimime akademik ve klinik tecrübeleriyle katkıda bulunan ve aynı zamanda tez jürimde de bulunan sevgili hocam Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ'ye,

Her ne kadar biraraya gelemesek de endodontik bilimine katkıları ve değerli görüşleriyle tezime yön veren, tez jürimde bulunma nezaketi gösteren değerli hocam Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU'na

Uzmanlık eğitimimde değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, fikir ve önerileri ile bana destek olan, her ihtiyacım olduğunda yanımda olduğunu bildiğim çok kıymetli ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Murat MADEN'e,

Tez çalışmamın deney aşamalarında engin tecrübesi ve değerli bilgileri, daima pozitif enerjisi, samimiyeti ve dahiyane çözüm yolları ile destek olan Doç. Dr. Halil AŞCI'ya

Tez çalışmamın gen ve protein analizlerinde tecrübesi, idealist çalışma stili ve disipliniyle çalışma şansı bulduğum Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU'ya,

Tez çalışmamın histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerin tüm aşamalarında teorik ve pratik destekleri için Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışma fırsatı yakaladığım, çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik personeline,

Uzmanlık projemizi desteklediği için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatımdaki sevgi, özverileri ve sonsuz destekleri sayesinde kendimi hep güçlü hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	2
ÖNSÖZ	3
TEŞEKKÜR	4
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	8
ŞEKİLLER DİZİNİ	2
TABLolar DİZİNİ	3
RESİMLER DİZİNİ	4
1- GİRİŞ	8
2- GENEL BİLGİLER	10
2.1- Apikal Periodontitis	10
2.1.1- Apikal Periodontitis Prevalansı	10
2.1.2- Enfeksiyon ve İnflamatuvar Yanıt	11
2.1.3- İnflamatuvar Hücreler	12
2.1.4- Sitokinler	14
2.1.5- Kemokinler	15
2.1.6- Diğer İnflamatuvar Belirteçler	16
2.2- Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	18
2.2.1- Konvansiyonel MAPK'lar	19
2.2.1.1- ERK (Ekstraselüler Düzenleyici Kinazlar)	19
2.2.1.2- p38	19
2.2.1.3- JNK	20
2.2.1.4- ERK 5	20
2.2.2- Atipik MAPK'lar	21
2.2.2.1- ERK3/4	21
2.2.2.2- ERK7	21
2.2.2.3- NLK (Nemo Like Kinaz)	22
2.2.3- Endodonti-MAPK İlişkisi	23
2.3- Otofaji	24
2.3.1- HücreSEL Otofajik Akış	24
2.3.2- Otofaji Bakteriyel Patojen İlişkisi ve Enflamasyon	28
2.4- Eser Elementler	33
2.4.1- Selenyum	33
2.4.1.1- Eser Element Olarak Selenyum	33
2.4.1.2- Selenyum Kaynakları ve Dağılımı	34
2.4.1.3- Selenyum Metabolizması ve Fizyopatolojisi	36
2.4.1.4- Homeostazis Sağlanmasında Selenyum	37

2.4.1.5- Antioksidan Olarak Selenyum	38
2.4.1.6- Selenyumun Kanserden Koruma Özelliği	39
2.4.1.7- Selenyumun Antienflamatuvar Özelliği	40
2.4.1.8- Selenyumun Antibakteriyel ve Antivirütik Özellikleri	40
2.4.1.9- Selenyumun Beyin Sağlığı ile İlişkisi	42
2.4.1.10- Selenyumun Doğurganlık ve Üreme Sağlığı ile İlişkisi	42
2.4.1.11- Selenyumun Tiroid Fonksiyonu ile İlişkisi	42
2.4.1.12- Selenyumun Kardiyovasküler Hastalıklardaki Koruyucu Rolü	43
2.4.1.13- Selenyumun İmmün Fonksiyonu	43
2.4.1.14- Diş Hekimliğinde Selenyum Uygulamaları	43
3-GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1- Deney Hayvanları	47
3.2- Selenyum ve serum solüsyonlarının hazırlanması ve uygulanması	54
3.3- Hayvanların ötenazisi	57
3.4- Radyografik İnceleme	59
3.5- Histopatolojik inceleme	62
3.5.1- Histopatolojik Değerlendirme için Örneklerin Hazırlanması	62
3.6- Histomorfometrik Analiz	63
3.7- İmmunohistokimyasal İnceleme	64
3.8- Bakteri kolonizasyonu- Gram boyama	65
3.9- Alveolar kemik kaybı analizi	65
3.10- Gen ve Protein İfadesi Düzeyleri Analizleri	65
3.10.1- Gen İfadesi Analizleri	65
3.10.1.1- Doku Homojenizasyonu	65
3.10.1.2- RNA İzolasyonu	66
3.10.1.3- Örneklerin Homojenizasyonu	66
3.10.1.4- RNA Bağlanması-Elüsyonu	67
3.10.1.5- cDNA Sentezi	69
3.10.1.6- Konvansiyonel PCR	70
3.10.1.7- Agaroz Jel Elektroforezi	72
3.10.1.8- Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR işlemi (qRT-PCR)	75
3.10.2- Protein İfadesi Düzeyindeki Analizler	78
3.10.2.1- Total Protein İzolasyonu	78
3.10.2.2- Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	79
3.10.2.3- Ayırıştırılan Proteinlerin Membrana Transferi	82
3.10.2.4- Membrana Transfer Edilen Protein Örneklerinin Görüntülenmesi	83
3.10.2.5- İmmünoablottama	84

3.11- İstatistiksel Analiz	86
3.11.1- Radyografik Ölçümlerin İstatistik Analizi	86
3.11.2- Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Verilerinin İstatistik Analizi	86
3.11.3- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve İmmunoblotlama Çalışma Verilerinin İstatistik Analizi	86
4- BULGULAR	87
4.1- Radyografik Bulgular	87
4.2- Histopatolojik Bulgular	91
4.3- Histomorfometrik Bulgular	92
4.4- Picro Sirius Red Boyama Bulguları	93
4.5.1- IL-6	95
4.5.2- HIF-1	96
4.5.3- COX-2	97
4.5.4- Kaspaz-3	98
4.6- Moleküler Yöntemlerle Sürdürülen Analiz Bulguları	98
4.6.1- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qrt-PCR)	98
4.6.1.1- Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 Göreceli mRNA İfadesi Düzeyleri	98
4.6.2- İmmunoblotlama Çalışma Bulguları	100
4.6.2.1- Beclin1, ATG5, LC3II, LC3II/LC3I, fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK, p62/SQSTM1 Protein İfadesi Düzeyleri	100
5- TARTIŞMA	106
5.1- Çalışmada Kullanılan Ajanın Seçimi	106
5.2- Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Seçilmesi	109
5.4- Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi	114
5.5- Histomorfometrik Bulguların Değerlendirilmesi	114
5.6- Picro-Sirius-Red Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi	115
5.7- Gram Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi	116
5.8- IL-6 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi	117
5.9- HIF-1 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi	118
5.10- COX-2 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi	120
5.11- Kaspaz-3 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi	121
5.12- Otofajik Belirteçlerin RT-PCR ve Western Blot Bulgularının Değerlendirilmesi	122
5.13- Total p38 MAPK ve Fosforile p38 MAPK Bulgularının Değerlendirilmesi	125
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	127
7- ÖZET	130

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MAPK: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MAP2K: MAPK Kinaz
MAP3K: MAPK Kinaz Kinaz
qRT-PCR: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ser: Serin
Thr: Treonin
TNF: Tümör Nekrotizan Faktör
IL: İnterlökin
HIF: Hipoksiyle İndüklenen Faktör
COX: Siklooksijenaz
LC3: Light Chain 3
ATG: Otofajiyle İlişkili Gen
NF-κB: Nükleer faktör kappa B
RANKL: Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand
RANK: Reseptör aktivatör nükleer kappa B
OPG: Osteoprotegerin
CFU: Koloni oluşturan birim
MIP: Makrofaj Enflamatuvar Protein
MCP: Monosit Kemoatraktan Protein
TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü
Th: T Helper
Treg: T Regülatör
SP: Substant P
VIP: Vazoaktif Bağırsak Polipeptidi
NPY: Nöropeptid Y
CGRP: Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid
NLK: Nemo Like Kinaz

NK: Nörokinin
HSP: Isı Şok Proteinini
NO: Nitrik Oksit
NOS: NO Sentaz
miRNA: Mikro-RNA
ATP: Adenozin Trifosfat
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
TLR: Toll Benzeri Reseptör
MMP: Metalloproteinaz
8-Ohdg: 8-Hidroksideoksi Guanozin
GF: Büyüme Faktörü
GFR: Büyüme Faktörü Reseptörleri
RTK: Reseptör Tirozin Kinaz
Ser: Serin
Tyr: Tirozin
ERK: Dış Sinyal Düzenleyici Kinaz
JNK: C-Jun N-Terminal Kinaz
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
cDNA: Komplementer DNA
Glu: Glutamik Asit
Pro: Prolin
Gly: Glisin
Fos: FBJ Osteosarkoma Onkogen
CREB: Camp Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
C-Myc: Myc Benzeri Transkripsiyonel Düzenleyici
AMPK: Adenozin Monofosfat Protein Kinaz
HPE: Aköz İnsan Plasental Ekstratı
HDPC: İnsan Dental Papilla Hücresi

CMA: Şaperon Aracılı Otofaji

ULK: Unc-51-Benzeri Kinaz

mTOR: Memeli Rapamisin Hedefi Proteini

ICAM: Hücreler Arası Yapışma Molekülü

VCAM: Vasküler Hücre Yapışma Proteini

Gpx: Glutasyon Peroksidaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

µg: Mikrogram

PDL: Periodontal Ligament

GF: Gingival Fibroblastları

µm: Mikromolar

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

µl: Mikrolitre

gDNA: Genomik DNA

PVDF: Poliviniliden Florür

GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat

Dehidrogenaz

kb: Kilo Baz

kDa: Kilo Dalton

Bp: Baz Çifti Sayısı

UV: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Periapikal lezyonlarda otofajik akış (ULK 1 kompleksi: ATG14, Beclin 1, Vps34, Vps 15, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksi: FIP200, ATG13, ATG101, ULK1).

Şekil 2: qRT-PCR yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 göreceli mRNA ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemlili t Testi ile analiz edildi ($p<0,05$); $*<0,05$; $**<0,001$.

Şekil 3. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG5, LC3-II/I, p62/SQSTM1 protein bantlarına ilişkin görüntü. Yükleme kontrol proteini olarak Beta-actin kullanıldı.

Şekil 4. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG5, LC3II, LC3II/LC3I, Thr180/Tyr182 fosfo-p38MAPK/p38MAPK, p62/SQSTM1protein ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemlili t Testi ile analiz edildi ($p<0,05$); $*<0,05$; $**<0,001$.

Şekil 5. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Thr180/Tyr182 p38 MAPK ve p-p38 MAPK protein bantlarına ilişkin görüntü. Yükleme kontrol proteini olarak beta-actin kullanıldı.

Şekil 6. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Thr180/Tyr182 fosfo-p38MAPK/p38MAPK, p62/SQSTM1protein ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemlili t Testi ile analiz edildi ($p<0,05$); $*<0,05$.

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları ve uygulamaları.

Tablo 2. Ratların deney süresince ölçülen ağırlıkları ve ağırlıklara göre hesaplanan anestezi, serum ve selenyum dozları.

Tablo 3. Deney akışı

Tablo 4. Konvansiyonel PCR işlemlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri

Tablo 5. Primer dizi bilgileri

Tablo 6. PCR işleminde kullanılan primerlerin çoğaltacağı bölgelere ilişkin baz uzunluğu bilgileri

Tablo 7. qRT-PCR işlemlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri

Tablo 8. Erime eğrisi analizinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri

Tablo 9. SDS-PAGE jellerinin hazırlanışı

Tablo 10. Radyomikrografik incelemeler ile elde edilen pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait periapikal lezyon alanı ortalama değerleri (mm^2) $\pm$ standart hata.

Tablo 11. Grupların histopatoloji skorlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.

Tablo 12. Histomorfometrik analiz ile elde edilen gruplara ait periapikal lezyon alanı ortalama (mm^2) $\pm$ standart sapma değerleri.

Tablo 13. IL-6 (+), HIF-1 (+), COX-2 (+) ve Kaspaz-3 (+) hücrelerin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.

Tablo 14: qRT-PCR yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 göreceli mRNA ifadesi düzeyleri ve kat artışı cinsinden sunulması

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışma sırasında alt 1. azı dişine ulaşımın sağlanması amacıyla ön dişler ve dilin ekarte edilmesi.

Resim 2. Alt 1. azı diş pulpasının ekspoz edilmesi.

Resim 3. Çalışmada kullanılan bir ratın ağırlık ölçümünün yapılması.

Resim 4. Selenyum solüsyonunun IP olarak uygulanması.

Resim 5. Deney hayvanlarına anestezi uygulanması.

Resim 6. Sakrifikasyondan sonra yumuşak dokuları uzaklaştırılmış alt çeneler.

Resim 7. Formaldehit içeren numaralandırılmış kaplara yerleştirilen alt çene örnekleri.

Resim 8. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenek.

Resim 9. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenekte çenelerin konumlandırılması.

Resim 10. İmage J programı kullanılarak periapikal lezyon boyutu ve piksel değerlerinin hesaplanması.

Resim 11. Alt birinci molar diş ve çevresindeki kemik dokunun önceden soğutulmuş havan ve havan eli yardımıyla homojenize edilmesi.

Resim 12. Homojenize edilen doku örneklerindeki hücrelerin liziz tamponu ile muamele edilmesi.

Resim 13. Lize edilen doku örneklerinden süpernatant kısmının eldesi ve devamında RNA izolasyonu işlemlerinin sürdürülmesi

Resim 14. İzole edilen RNA örneklerinden PCR cihazı ile cDNA sentez işleminin gerçekleştirilmesi

Resim 15. Sentezlenen cDNA örneklerinden konvansiyonel PCR yöntemi ile çalışmada kullanılacak primerlerin optimize edilmesi

Resim 16. Konvansiyonel PCR işlemi hedef bölgelerin çoğaltılması

Resim 17. Agaroz jelinin hazırlanması, örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işleminin başlatılması

Resim 18. Agaroz jel işlemi sonrasında PCR işlemi ile elde edilen ampliconların UV transimilatörde görüntülenmesi

Resim 19. qRT-PCR işleminde örneklerin plate'e yüklenmesi, santrifügasyon ile çöktürülmesi ve kullanılan PCR işlemi parametreleri

Resim 20. Protein izolasyonu işlemi

Resim 21. Dokulardan izole edilen protein örneklerinin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının spektrofotometre ile ölçülmesi.

Resim 22. SDS-PAGE jeli ve izole edilen protein örneklerinin jele yüklenmesi.

Resim 23. SDS-PAGE jel elektroforezi.

Resim 24. SDS-PAGE işlemini takiben jelde ayrıştırılan protein örneklerinin PVDF membrana transfer edilmesi

Resim 25. Transfer işlemi sonrasında PVDF membranına aktarılan protein örneklerine primer antikor uygulanması.

Resim 26. İmmünoiblotlama sonrasında hedef proteinlerin kemilüminesans görüntüleme cihazı ile saptanması.

Resim 27. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Periapikal lezyon yok.

Resim 28. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı. (9,3 mm²)

Resim 29. Selenyum grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı. (4,5 mm²)

Resim 30. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların histopatolojik görünümü, sağlıklı periodontal ligament (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların histopatolojik görünümü (C) Selenyum grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların histopatolojik görünümü, D: dentin, AK: alveolar kemik, pulpa (ince oklar), periodontal ligament (kalın oklar), HE, Barlar=200µm.

Resim 31. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait pulpa dokusunun histopatolojik görünümü, sağlıklı pulpa (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait pulpada yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, şiddetli pulpa enflamasyonu (C) Selenyum grubundaki bir rata ait pulpa

dokusunun histopatolojik görünümü, azalmış yangısal reaksiyon ve hafif şiddette pulpa enflamasyonu, P: pulpa, HE, Barlar=50µm.

Resim 32. (A) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (4,04 mm²), (B) Selenyum grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (0,9 mm²), HE, Barlar=200µm.

Resim 33. Periodontal ligament (oklar) kollajen miktarının görünümü. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait sağlıklı periodontal ligament ve koyu kırmızı renkte sağlam bağdoku, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait yoğun periodontal yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar) nedeniyle ligament kollajeninde azalma ve parçalanmalar, (C) Selenyum grubundaki bir rata ait periodontal ligament dokusunda hafif yangısal reaksiyon ve normal periodontal ligament kollajen görünümü, Picro Sirius Red Metodu, Barlar =50µm.

Resim 34. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, yoğun Gram (+) bakteri boyanması (oklar), (C) Selenyum grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, az sayıda Gram (+) bakteri kümeleri, Gram Boyama Metodu, Bar= 20µm.

Resim 35. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, yoğun Gram (+) bakteri boyanması (oklar), (C) Selenyum grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, az sayıda Gram (+) bakteri kümeleri, Gram Boyama Metodu, Bar= 20µm.

Resim 36. Periapikal bölgede IL-6 immunohistokimyasal boyama, (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

Resim 37. Periapikal bölgede HIF-1 immunohistokimyasal boyama, (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

Resim 38. Periapikal bölgede COX-2 immunohistokimyasal boyama. (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta enflamatuvar hücrelerde ve komşu hücrelerde şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum

grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

Resim 39. Periapikal bölgede Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama. (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta enflamatuvar hücrelerde ve komşu hücrelerde şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta enflamatuvar reaksiyona rağmen az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.



PERİAPİKAL LEZYONLARDA MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE EDİLMİŞ PROTEİN KİNAZ (MAPK) YOLAĞI; SELENYUMUN ETKİLERİ

1- GİRİŞ

Apikal periodontitis esas olarak pulpa dokusu ve kök kanallarındaki mikrobiyal enfeksiyona karşı konak immuno-enflamatuvar cevabın aktivasyonu sonucu meydana gelmektedir. Periapikal dokulardaki patolojik değişiklikler mikroorganizmanın kendisinden, toksinlerinden, zararlı metabolik artıklarından ve kök kanal sistemi içerisinde kalan pulpa dokusundan kaynaklanabilir. Enflamatuvar süreç öncelikle enfekte ve nekrotik pulpada başlasa da periapikal dokulara yayılarak çevre kemik dokuda rezorbsiyona neden olabilir.

Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan MAPK enzimleri, farklı reseptörler tarafından alınan mitojenik uyarıların (büyüme faktörleri, tümör nekrotizan faktör (TNF)- α , interlökin (IL)-1, lipopolisakkarit, reaktif oksijen türleri vb.) kesişme ve/veya birleşme noktalarıdır (1).

Sitoplazmada bulunan bu proteinler çeşitli uyarılara karşı hücresel yanıtların ortaya çıkması için hücre zarından ve sitoplazmadan çekirdeğe sinyal iletilmesinde kritik roller üstlenmişlerdir. Bu sitoplazmik proteinler hücre içindeki diğer proteinlerin, serin (Ser)/treonin (Thr) amino asitlerine fosfat gruplarını aktararak fosforilasyon yolu ile sinyal kaskatlarını düzenlemektedirler (2).

Otofaji, büyüme ve farklılaşma süreçlerinde hücrelerde biriken normal veya işlevsel olmayan ya da hasarlı hücresel bileşenlerin lizozomal yıkım yolu aracılığıyla parçalandığı ve hücresel ham madde olarak hücrelere geri kazandırıldığı yüksek düzeyde regüle edilen kompleks bir mekanizmadır (3).

Hücre yaşam mekanizmasının düzenlenmesinde otofajinin önemi göz önüne alındığında kemik yapımı ve kemik yıkımı arasındaki dengeyi de doğrudan etkileyeceği kaçınılmazdır (4).

Eser elementler; hücre zar geçirgenliğini modüle edebilir, gen ekspresyonunu düzenleyebilir, elektron transportuna, hormon ve vitaminlerin sentezine katılabilirler. Ayrıca vücuttaki antioksidan regülasyonunda önemli rol oynarlar (5).

SEL (selenyum), glutatyon peroksidaz gibi önemli antioksidan enzimlerin etkinliği için gerekli olan eser elementtir (6).

Güçlü bir antioksidan olan selenyumun reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre içi hasarın engellenmesinde ve hücre gelişiminin, canlılığının, genetik faktörlerin ve enzimlerin

düzenlenmesinde hayati role sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca immüno-güçlendirici etkilere de sahip olan selenyumun eksikliği halinde immünosüpresyon geliştiği, düşük dozlardaki selenyum takviyesinin immünolojik fonksiyonların artmasına veya restorasyonuna aracılık ettiği belirlenmiştir (7).

Literatürde periapikal kemik yıkımının MAPK yolağı ve otofaji ile ilişkisi ilk defa bu çalışma ile gösterilmiş ve moleküler patogeneze ait bilinmezler aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ulaşılabilir kaynaklar çerçevesinde selenyumun periapikal lezyonlarda kemik yıkım mekanizması ile ilgili olası etkilerini değerlendiren herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Sistemik selenyum uygulamasının deneysel periapikal lezyon modelinde enflamasyon ve kemik yıkımı şiddeti üzerine olası etkileri hücre içi yollar ve hücreler mekanizmaları ile ortaya konulmaya ve açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarla özellikle periapikal lezyonların oluşumu, devamlılığı ve iyileşmesinde konak modülasyonunun önemine dikkat çekilmiştir ve konak modülasyonunu değiştirebileceği düşünülen daha spesifik ve hedefe yönelik uygulamaların geliştirilmesi teşvik edilmektedir.

Bu amaçla;

- periapikal bölgedeki kemik yıkımı boyutu radyografik ve histomorfometrik olarak,
- enflamasyon şiddeti histopatolojik olarak,
- mikroorganizmaların kök kanalı boyunca penetrasyonu Gram boyama ile,
- Periodontal ligament kollajen yıkımı Picro Sirius Red boyama ile,
- Periapikal IL-6, hipoksiyle indüklenen faktör (HIF)-1, siklooksijenaz (COX)-2 ve Kaspaz-3 ekspresyon yoğunluğu immunohistokimyasal analiz ile,
- MAPK sinyal yolağının değerlendirilmesinde p38 MAPK/fosfo-p38 MAPK protein ekspresyon düzeyi Western-blot (WB) yöntemi ile,
- Hücreler otofajik akışın değerlendirilmesinde light chain 3 (LC3)-II/I, Beclin-1, otofajiyle ilişkili gen 3 (ATG3), ATG5, ATG7, ATG12, ATG16-L1 mRNA gen ekspresyon seviyesi gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile,
- Hücreler otofajik akışın değerlendirilmesinde Beclin-1, ATG5, LC3-II, LC3-II/I, p62/SQSTM1 protein ekspresyon düzeyi WB yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- Apikal Periodontitis

Apikal periodontitis; pulpanın mikrobiyal enfeksiyonu sonrası gelişen, periapikal dokularda kemik yıkımı ve enflamatuvar cevapla karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır (8). Pulpanın nekrozu ve enfeksiyonu sonrası, konağın bağışıklık savunmasının enfeksiyöz ajanları sınırlandırması ve vücuttaki başka bölgelere yayılmasından koruması amacıyla gelişmektedir. Kök kanal enfeksiyonundan kaynaklanan mikrobiyal antijenlerin, periapikal dokuda hem spesifik hem de spesifik olmayan immün yanıtı uyatabildiği bilinmektedir (9).

Apikal periodontitiste kemik yıkımına hem mikrobiyal enfeksiyon hem de savunma reaksiyonunun bir parçası olarak immün yanıt neden olur (8). Apikal periodontitis, histolojik olarak apse, granülom veya radiküler kist olarak sınıflandırılır (10).

Periapikal apse, akut enfeksiyona yanıt olarak hücresel dinamiklerdeki değişimin sonucu olarak pü oluşumunu yansıtırken, periapikal granülom, enflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve iyi gelişmiş fibröz kapsül içeren granülasyon dokusundan oluşur. Granülom, periodontal dokuda yer alan Malassez epitelyal kalıntıları immünolojik olarak uyaranlar sonucu çoğaldığında radiküler kistlere dönüşebilir (11). Granülomlarda ve radiküler kistlerde enflamatuvar hücre, esas olarak mononükleer hücrelerdir. Çalışmalar; sitokinler, kemokinler ve Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B ligand/osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG) sistemini de içeren makrofajların, mast hücrelerinin, T hücrelerinin ve nötrofillerin apikal periodontitis oluşumuna katıldığını göstermiştir (12).

Apikal periodontitiste bulunan hücreler, sitokinler ve diğer enflamatuvar elementler arasındaki etkileşim ve bunların spesifik işlevleri tam olarak açıklanamamıştır (13) ancak çeşitli enflamatuvar uyaranların miktarları ve etkileşimleri, hastalığın durumunu ve ilerlemesini etkileyebilir ve değiştirebilir (14).

2.1.1- Apikal Periodontitis Prevalansı

Dünya genelinde apikal periodontitisli en az bir dişi olan kişilerin yaygınlığının %16 (15) ile %86 (16) arasında değiştiği bildirilmiştir. Yakın tarihli bir sistematik derlemede dünya erişkin nüfusunun yarısının en az bir dişinde apikal periodontitis varlığı gösterilmiştir (17). Bu çarpıcı sonuçlar beraberinde çok sayıda sorunu da akla getirmektedir. Tanı konmamış bir apikal periodontitis gelecekte diş kaybına yol açabilir (18).

Özellikle yetişkin nüfusta diş kaybının yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde karşılaşılabilecek olan bu durum, yaşam kalitesini düşürmektedir (19). Apikal periodontitisin ağrı, rahatsızlık hissi, belki şişlik gibi klinik işaretlerinin dışında lokal etkileri ile birlikte sistemik etkilerinin de değerlendirilmesi giderek ilgi çeken konulardan biri olmaktadır. Son yıllarda apikal periodontitisli hastaların kanında artmış enflamatuvar medyatörler gösterilmeye başlanmıştır (20).

Apikal periodontitisin lokal Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'nin üretimini tetiklediği ve apikal periodontitis varlığında sistemik oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olduğu kanıtlanmıştır. Tüm bu veriler göz önünde bulundurularak apikal periodontitisin sistemik enflamasyon kaynağı olabileceği (21), diyabet gibi sistemik hastalıklarla (22), serbest radikal üretimi etkisi ile nörodejeneratif (Alzheimer gibi), vasküler (ateroskleroz gibi), romatizmal ve muhtemelen kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar arasındaki ilişki dikkat çekicidir (23). Tüm bu çalışmalar çürük önleyici tedbirlerin genel nüfus düzeyinde ele alınmasının önemini tekrar ortaya koymaktadır. Ayrıca apikal periodontitis varlığında hasta bu konular hakkında bilgilendirilmeli ve tedavi ile ilgili kararlar alınırken bu veriler dikkate alınmalıdır. Apikal periodontitisli asemptomatik dişlerin protetik tedavi planına dahil olmayacağı durumlarda izlenen “bekle ve gör” yaklaşımının doğru olmadığı ve bu kararların yeniden gözden geçirilmesi gerekliliği çok nettir (24).

2.1.2- Enfeksiyon ve İnflamatuvar Yanıt

Apikal periodontitis esas olarak kaynağı mikroorganizma olan enflamatuvar bir hastalıktır. Kök kanal sistemi içindeki mikrobiyal yerleşim, organizasyon ve virülans faktörlerinin bilinmesi hastalık sürecinin daha net olarak anlaşılabilmesi açısından önemlidir. Mantarlar, arkeler ve virüsler apikal periodontitis ile ilişkili olmasına rağmen, bakteriler ana mikrobiyal etiyolojik ajanlardır. Oldukça organize ve karmaşık yapılardan oluşan çok türlü biyofilmler-kök kanal mikrobiyotası-temel olarak kök kanalının içinde bulunur. Bazı özel durumlarda, mikroorganizmalar savunma bariyerini aşabilir ve hatta ekstra-radiküler enfeksiyon oluşturabilir (25). Apikal periodontitis patogeneğinde mikrobiyal etkileşimin önemli rol oynadığı açıkça gösterilmiştir (26).

Mikroorganizmalar doğrudan doku hasarına neden olabilir ve/veya enzimler, ekzotoksinler ve metabolik son ürünler dahil olmak üzere ürünlerin salgılanmasıyla immünolojik yanıtı modüle edebilir (27). Farklı virülans faktörleri ile kök kanal

enfeksiyonundaki değişimlere bağlı olarak, apikal periodontitise neden olan immünolojik yanıt zaman içinde deęiőecektir.

2.1.3- İnflamatuvar Hücreler

Apikal periodontitis lezyonlarında enflamatuvar hücrelerin farklı alt popölasyonları gösterilmiştir. Nötrofiller ve onların mikroorganizmalarla etkileşimleri, akut fazda ilk savunma hattı olarak özel bir öneme sahiptir, sonuç olarak doku hasarına ve kemotaksise neden olur. Mast hücreleri ve makrofajlar, kronik apikal periodontitisin önemli enflamatuvar hücre bileşenleridir ancak, bu hücrelerin IL-6 ve diğer enflamatuvar medyatörlerin üretimi ile tam olarak nasıl ilişkili olduğu bilinmemektedir. Bu hücrelerin periapikal kistlerdeki dağılımının incelendiği bir çalışmada, mast hücrelerinin vazoaktif medyatörler gibi çeşitli enflamatuvar medyatörleri hem parçalama hem de üretme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu maddelerin salınımı, enflamatuvar olaylar ve kemik rezorpsiyonu ile doğrudan ilişkilidir ve ayrıca bağışıklık sisteminin diğer hücrelerini de etkiler (12).

Çalışmalar, periapikal granülomlarda ve kistlerde mast hücrelerinin varlığını karşılaştırmış ve kistlerde yoğun olarak bulunduğunu doğrulamıştır. Mast hücrelerinin sub-epitelyal bölgelerde yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar, TNF- α , IL-1 β , makrofaj enflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi enflamatuvar medyatörlerin salınımından sorumlu olduğu için kistlerin büyüme eğilimini açıklayacaktır. Mast hücre degranölasyonu, enflamatuvar ve vasküler değişikliklere neden olabilir, böylece kistlerin oluşumuna ve genişlemesine katkıda bulunur (28).

Makrofajlar ise IL-1 α , TNF- α , IL-6, transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β ve prostaglandin salgılayarak bu lezyonların gelişimi ve onarımı üzerinde etkili olan pro- ve anti-enflamatuvar maddeler üretme yeteneğine sahiptir. Bu sitokinler, osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu, kollajen üretimi ve neovaskülarizasyon yoluyla enflamatuvar süreçlerin başlatılması ve düzenlenmesinde rol oynar (29).

Apikal periodontitis lezyonlarında T hücreleri bulunur, ancak bu hücrelerin aktivasyonu ve işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. T hücreleri sadece immün sistem ile değil ayrıca oral epitel ve oral bakteri hücreleri ile de etkileşime girecek bir dizi olayı başlatma yeteneğine sahiptir. T helper 1 (Th1) ve Th2 hücre cevabı, apikal periodontitis lezyonlarında kemik rezorpsiyonunun ana medyatörü ve makrofajların aktivatörü olduğu düşünölen IL-1 ekspresyonunu modöle eder (30).

Th1 immün yanıtının hem lezyon ilerleyişinde hem de kemik yıkımında rol oynadığına inanılırken, Th2'nin lezyon gelişiminin daha ileri aşamalarında meydana gelen onarım sürecinde önemli olan immünosupresif mekanizmaları içerdiğine inanılmaktadır (31). Bu durum, Th1 sitokinlerinin yokluğunun lezyon gelişimini önemli ölçüde değiştirmediği, ancak Th2 sitokinlerinin eksikliğinin lezyon boyutunda artışa neden olduğu deneysel modellerde gösterilmiştir (32). Bununla birlikte, son bulgular, geleneksel Th1 ve Th2'nin dışında, farklı bir sitokin olan IL-17'nin varlığı ile karakterize edilen bir modeli gösterdiğinden, bu kavramın gözden geçirilmesi gerekmektedir (30).

Granülomlarda Th1 yanıtının ve kistlerde Th2'nin baskın olması, her iki immün yanıtın da hücre temasına ve/veya IL-10 ve TGF-   üretimine bağlı mekanizmalar yoluyla regülatör T hücreleri (Treg'ler) tarafından baskılanabileceğini  ne süren yazarlar tarafından gösterilmiştir (32). Francisconi ve ark. (37), bu hücrelerin g    ile aktif lezyonu inaktif fenotiplerine dönüştürdüğünden, Treg kemoatraktanlarının kullanımının apikal periodontitisin klinik uygulamaları için umut verici bir strateji olabileceğini öne sürmektedir (33).

Esas olarak T hücrelerinin aracılık ettiği lezyonlarda Th1 yanıtının baskın olduğunu bildiren çalışmalarla birlikte, B hücreleri ve/veya plazma hücrelerinin aracılık ettiği lezyonlar Th2 yanıtı sergilemektedir (34).

Bazı yazarlar, T hücrelerinin lezyonun başlangıcında ve gelişiminde, B hücrelerinin ise onarım sürecinde yer aldığını  ne sürmektedir (35). T helper hücrelerinin yeni alt kümeleri ( rneğin Th9, Th17 ve Th22) ve bunların prototipik sitokinleri IL-9 ve IL-22 yakın zamanda keşfedilmiştir. IL-9 ve IL-22 ekspresyonunun inaktif lezyonlarda baskın olduğu bulunmuştur, bu da bu sitokinlerin apikal periodontitis patogenezinde olası bir koruyucu rolünün varlığını düşündürmektedir (36).

Farelerde deneysel apikal periodontitis modeli  alışmaları IL-9 ekspresyonunun lezyonun kontrolünde yardımcı olduğunu göstermiştir. Ancak, IL-9 ve IL-22'nin apikal periodontitisteki immünosupresif rolünü belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (36) (37).

Oseko ve ark. (38), IL-17 knockout farelerin deneysel apikal periodontitis lezyon gelişimine dirençli olduğunu göstermişlerdir, bu da Th17 hücrelerinin ve onların sitokin üretiminin enflamatuvar süreçteki rolünü ortaya koymaktadır.

Dendritik hücrelerin alt kümesi olan Langerhans hücreleri, apikal periodontitis lezyonlarında izlenmekte ve epitelyal proliferatif potansiyele sahip T hücrelerinin kemotaksisi ile güçlü bir şekilde ilişkili görünmektedir. Langerhans hücrelerinin yoğunluğundaki artış, daha yoğun enflamatuvar hücre içeriğine sahip lezyonların gelişimi ile ilişkili faktörlerden birisidir.

Periapikal kist ve granüloomlarda bu hücreleri saptamaya yönelik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, dendritik hücrelerin antijen sunduktan sonra geçirdikleri apoptoz sürecine, bu hücrelerin daha az sayıda olmasıyla karakterize edilen doku onarım sürecine, bu hücrelerin olgunlaşma profiline ve araştırma yöntem farklılıklarına bağlanabilir (39).

2.1.4- Sitokinler

Sitokinler, lökositlerin toplanması yoluyla mikrobiyal ajanlara ve diğer yaralanmalara cevap olarak hücreler tarafından yaralı dokulara salgılanan proteinlerdir (21). Prostaglandinlerle birlikte sitokinler, osteoblastların aktivasyonu ve farklılaşması, fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu, kollajen üretimi ve neovaskülarizasyon yoluyla enflamatuvar süreçlerin başlatılmasına ve düzenlenmesine katılır (14). IL-17 ve TGF- β , apikal periodontitiste bulunan ve esas olarak sırasıyla Th17 ve Treg hücreleri tarafından salgılanan iki önemli sitokindir. Birbirleriyle etkileşime girerek proenflamatuvar ve immün düzenleyici sitokinlerin etkisini karakterize ederler. Bu sitokinlerin zıt etkileri olmasına rağmen karşılıklı inhibisyonları yoktur. TGF- β güçlü bir bağışıklık düzenleyici sitokin iken, IL-17 ve IL-8 üretimini uyararak enflamatuvar süreci yeniden etkinleştirebilir (35).

Kronik apikal periodontitis lezyonlarında alevlenme IL-17 seviyesinin ve lökosit infiltrasyonunun artması ile ilgilidir. Fistülü bulunan ve karışık enflamatuvar hücre içeriğine sahip hastalarda IL-17 seviyesinin yüksek olduğu izlenmiştir. Bu durum enflamatuvar yanıtın alevlenmesini, nötrofil sayısını ve kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır (40). IL-17, nötrofilleri ortama çağırarak, osteoklastları aktive ederek RANK-L üretimini tetiklemektedir (12).

Yüksek TGF- β seviyeleri, apikal periodontitisin iyileşmesinde önemlidir, çünkü TGF- β sadece kemik rezorpsiyonunu inhibe etmekle kalmaz, kollajen sentezini, neovaskülarizasyonu ve fibroblast proliferasyonunu uyararak dokunun yeniden şekillenmesini ve onarımını da teşvik eder. TGF- β ayrıca Treg ve Th17'nin farklılaşmasına da katılmaktadır. TGF- β , enflamatuvar reaksiyonu sınırlamak için Treg'leri indükleyerek ve bir araya getirerek immün yanıtı baskılayıcı rol oynarken, Treg hücre sayısının düşük olması enflamatuvar süreci uyarır (29).

IL-6, makrofajlarla birlikte kemiğin yeniden şekillenmesinde ve immün hücrelerin ve osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşmasında önemli bir sitokindir (12). Yüksek IL-6 seviyeleri semptomatik ve aktif apikal periodontitis lezyonları ile ilişkili bulunmuştur (41).

IL-6 önemli bir proenflamatuvar biyobelirteçtir ve apikal periodontitis lezyonlarının sistemik enflamatuvar durumlarla ilişkisini göstermek için kan ve lokal doku IL-6 seviyeleri arasındaki korelasyonu araştıran birçok çalışmada çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (42).

Kistik lezyonlarda kist kapsülündeki makrofaj sayısı ve TNF- α düzeyleri ile kapsül kalınlığı arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir. TNF- α düzeyi, ana TNF- α kaynağı olduklarından dolayı, kist duvarındaki makrofaj miktarı ile orantılıdır. Kisti çevreleyen dokulardaki makrofajların miktarı ile yüksek TNF- α ekspresyonu arasındaki ilişki de gösterilmiştir, bu durum TNF- α üretimi ile kistlerde doku vaskülarizasyonu arasında ve ayrıca anjiyogenez ve enflamasyon arasında bir korelasyon olduğunu kanıtlamaktadır (43).

2.1.5- Kemokinler

Kemokinler, lökositlerin ve selektinlerin göçü ve aktivasyonu ile ilişkili küçük protein (8-10kD) ailesini temsil etmektedir. Selektin, enflamatuvar hücrelerin damar duvarlarına adezyonunu sağlar (40). Silva ve ark. (44) hem periapikal granülomlarda hem de kistlerde kemokin reseptörlerinin (yani CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3) ekspresyonunu göstermiştir. Bu reseptörler, monosit ve nötrofillerin yanı sıra Th1 ve Th2 hücrelerinde de bulunur (45). Th1 hücreleri ağırlıklı olarak kemokin reseptörleri CCR5 ve CXCR3'ü, Th2 hücreleri esas olarak CCR3 ve CCR4'ü ve monosit/makrofajlar CCR2 ve CCR5'i ifade eder (30).

Periapikal enflamatuvar lezyonlarda yüksek seviyelerde kemokin CXCL12/SDF-1 bulunur ve bu tip lezyonlarda bu kemokini eksprese eden ana kaynak CD117+ mast hücreleridir. CXCL12/SDF-1'in periapikal dokunun tahribatında önemli bir rol oynadığı, muhtemelen immün hücreler, özellikle de mast hücrelerinin infiltrasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir (46).

Periapikal kistlerdeki RANTES, IP-10 ve MCP-1 kemokinlerinin ve CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3 kemokin reseptörlerinin yüksek seviyeleri, granülom ve kistlerin olası evrimi ile ilişkili olabilir. Bununla birlikte, ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış, sitokinlerin Malassez epitelyal artıklarının proliferasyonuna etkisini düşünülmektedir (44).

Nöropeptitler

Nöropeptitler, sentezleri ve salınımları nöronlardan gerçekleştiği ve hedef hücreler üzerindeki hücre dışı reseptörler tarafından aracılık edilen biyolojik eylemlere sahip oldukları için, peptitlerin veya nöromodülatörlerin (47) nörotransmitterleri olarak düşünülmektedir. Afferent nöron liflerinin periferik enflamatuvar süreçlerdeki etkisi bir yüzyıldan fazla bir süredir çalışılmakta ve bu liflerin uyarılmasının vazodilatasyona ve ardından ödeme yol açtığı bilinmektedir (47).

'Nörojenik enflamasyon' terimi, hasar durumunda periferik nöronlarda bir uyarın tarafından tetiklenen ve vasküler geçirgenlik, aşırı duyarlılık ve vazodilatasyon dahil olmak üzere çoklu süreçleri değiştiren nöropeptidlerin salınımı ile sonuçlanan enflamatuvar sürecin bileşenini tanımlar (47). Bu bulgulardan yola çıkarak çalışmalar, Substant P (SP), vazoaaktif bağırsak polipeptidi (VIP), nöropeptid Y (NPY), kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve nörokinin A (NKA) dahil olmak üzere nöropeptidlerin rolüne odaklanmıştır (47). Nöropeptitler, bol innervasyonları nedeniyle apikal periodontitis gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar, VIP'in kemik rezorpsiyonu ve osteoklast fonksiyonlarının düzenlenmesine sebep olduğu için lezyonun büyüme ve olgunlaşma süreçleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir (47, 48).

SP'nin akut ve kronik enflamatuvar lezyonlarda makrofajlarda sitoplazmik olarak eksprese edilmesinin yanında, periradiküler granülomlarda yer alan immün hücrelerde SP dizilimi de gösterilmiştir (47).

Kemiğin yeniden şekillenmesi aşamasına CGRP'nin katılımı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. İndüklenmiş periapikal lezyonlarda aktif osteoklast sayısında azalma, immün reaktif CGRP'nin sinir liflerinin yoğunluğu doruğa ulaştığında gözlenmiştir. Osteoblastlarda bulunan CGRP reseptörleri, sinir sisteminin kemik metabolizması üzerindeki etkisini kanıtlamaktadır (47).

2.1.6- Diğer İnflamatuvar Belirteçler

Hücre koruma mekanizması, zararlı çevresel koşullara ve patojenlere karşı koruyucu bir rol oynayan 'ısı şoku' proteinleri (HSP'ler) (49) olarak adlandırılan polipeptit ailesinin ekspresyonunu içermektedir. HSP'ler, tipik olarak, enflamatuvar medyatörler, yüksek sıcaklık, azalmış oksijen ve enfeksiyöz ajanlar gibi stres sinyalleri tarafından indüklenir ve polipeptitlerin hücre zarı boyunca iki katına çıkması ve translokasyonunda önemli roller oynar (50). HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre aşağıdaki gruplara ayrılır: HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40), HSPD (HSP60) ve HSPB (HSP27) (49).

Periapikal granülom lezyonlarında HSP27 (HSPB1), HSP40 (HSPA6), HSP70 (DNAJC3) ve HSP110 (HSPA4)'nin sağlıklı dokuya oranla yüksek seviyelerde ekspresyonu gösterilmiştir (49). HSP70 ailesinin bir üyesi olan HSPA-4, inaktif granülomlarda daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Bu bulgular, HSP'lerin periapikal lezyon gelişimi sırasında modülatör fonksiyonlara sahip olabileceğini ve bu süreçte farklı ısı şoku genlerinin/proteinlerinin farklı roller oynayabileceğini düşündürmektedir (49).

Nitrik oksit (NO), apikal periodontitiste rol oynayan diğer önemli bir enflamatuvar medyatördür. NO, toplu olarak NO sentazlar (NOS'lar) olarak bilinen bir enzim ailesi aracılığıyla birkaç hücre tarafından üretilen, her yerde bulunan bir serbest radikaldir (51).

NO'nun AP'deki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, çalışmalar NO'nun apikal periodontitis patogenezi sırasında IFN- γ ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokin düzeylerini modüle ettiğini göstermiştir (52). Cintra ve ark. TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-23 ve NO serum düzeylerini bir veya birden fazla apikal periodontitisli dişi olan sıçanlarda değerlendirmişlerdir. Birden fazla dişte apikal periodontitisli sıçanlarda serum IL-6, IL-17, IL-23 ve TNF- α seviyelerinde artış olduğu, öte yandan serum NO seviyelerinin azalmış olduğu bildirilmiştir (53). Bu sonuçlar endodontik enfeksiyonların sistemik sağlığı olumsuz etkilediği hipotezini desteklemektedir.

Mikro-RNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan küçük kodlanmayan RNA'lardır (53). Farklılaşma, çoğalma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri denetlemede görev alır (54). miRNA ifadesindeki değişiklikler, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek çeşitli hücre sinyal yollarını etkiler (54). miRNA ekspresyon profili, odontojenik tümörler dahil olmak üzere pek çok durumda tanısal ve prognostik bir belirteç olarak kabul edilebilir (55).

Reaktif oksijen türleri (ROS), etkileştikleri diğer molekülleri dönüştürebilen kararsız, son derece reaktif moleküllerdir. Proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve nükleik asitlerin etkilendiği bir durum olan oksidatif stres (yani oksidan ve anti-oksidan ajanlar arasındaki bir dengesizlik) sırasında yüksek miktarda ROS üretilir (56). ROS üretimi, endodontik lezyonlarda patojen istilasına karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (56).

Endodontik enfeksiyon sürecinde, bakterilerin fagositlerin yüzeyindeki Toll benzeri reseptörlere (TLR'ler) bağlanması, fagositozun başlamasına, hüморal ve hücrel yanıtların indüklenmesine (sırasıyla lenfositler B ve T tarafından aracılık edilir), sitokinler ve metalloproteinazlar (MMP'ler) ile enflamatuvar medyatörlerin sentezi ve bunun sonucunda ROS üretimine sebep olur (57). ROS ile ilgili belirteç ekspresyonunun artışı hem lokal hem de sistemik seviyelerde apikal periodontitis patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (57). Asemptomatik apikal periodontitis lezyonları, sağlıklı dokuya kıyasla MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarında artışla karakterize pro-oksidatif bir profil göstermektedir (58). Dolayısıyla bu biyobelirteçlerin potansiyel bir teşhis aracı olarak kullanımı düşünülmektedir. Oksidatif stres ortamında kemik metabolizması regülasyonu da değişir (59). Apikal periodontitis lezyonlarında 8-hidroksideoksi guanozin (8-OHdG), oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve kemik rezorpsiyon düzenleyicileri

(RANKL ve OPG) gibi oksidatif stres belirteçlerinin yüksek seviyesi bu lezyonlardaki aşırı kemik rezorpsiyonu sürecini açıklayabilecek bir faktördür (59).

2.2- Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Yolağı

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)'lar, ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, hücre canlılığı, apoptoz, metabolizma, farklılaşma ve motilite ile ilişkili hayatta kalma süreçlerini kontrol ve regüle eden sinyal iletim yollarını oluştururlar (60). Hücre sitoplazmasında yer alan bu proteinler hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında rol oynarlar. MAPK proteinleri, hücre içindeki diğer proteinlerin serin (Ser)/ treonin (Thr) amino asitlerine fosfat gruplarını aktararak etkinliklerini düzenleyebilirler. İnsan genomunda şimdiye kadar 14 MAPK geni ve 7 farklı MAPK sinyal iletimi yolağı tespit edilmiştir (60).

MAPK sinyal yolağının ana hatları, bir veya daha fazla büyüme faktörünün (GF'ler) spesifik büyüme faktörü reseptörleri (GFR'ler) ile etkileşiminden oluşur. Genel olarak, GF'ler, reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin transmembran glikoproteinlerini bağlar, aktive eder, sinyal transdüksiyon kaskadını aktive eder, ardından sitozolik ara maddeler yoluyla sinyal transdüksiyonu ve son olarak efektör genlerin transkripsiyon/translasyon regülasyonunu sağlar (61).

MAPK ailesi klasik ve atipik olarak iki ana gruba ayrılabilir. Klasik MAPK'larda Thr ve tirozin (Tyr) amino asit dizisi (Thr-X-Tyr) korunurken, atipik MAPK'larda bu amino asit dizileri bulunmamaktadır. MAPK ailesi, klasik veya konvansiyonel MAPK'lar olarak adlandırılan dış sinyal düzenleyici kinaz (ERK)1/2, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'lar, p38 MAPK'lar ve ERK5 ile atipik MAPK'lar olarak bilinen ERK3, ERK4, nemo benzeri kinaz (NLK) ve ERK7 MAPK'ları içerir (60). Yapılan araştırmalarda, MAPK ailesinin evrim boyunca korunmuş MAPK, MAPK kinaz (MAP2K) ve MAPK kinaz kinaz (MAP3K) olmak üzere üç kinazdan oluştuğu gözlenmiştir (62). Her bir MAPK kaskadı bu üç kinaz ile çalışır. Bir serin treonin kinaz olan MAPK, MAP2K ile etkinleşir. MAP2K "ikili özgün" bir kinazdır ve hedef MAPK'da bulunan Thr-X-Tyr amino asit dizisini, serin (Ser)/Thr ve Tyr bölgelerinden fosforiller. Hedef MAPK'ın Thr-X-Tyr amino asit dizisindeki X yerine ERK1/2'de glutamik asit (Glu), JNK'da prolin (Pro) ve p38'de glisin (Gly) bulunur. MAPK'ın fosforillenmesiyle yapısal bir değişim gerçekleşir. MAPK'lar bir üst basamaktaki kinazlar tarafından fosforillenmedikçe etkinleşmezler (63).

2.2.1- Konvansiyonel MAPK'lar

2.2.1.1- ERK (Ekstraselüler Düzenleyici Kinazlar)

ERK1; ilk bulunan, kolonize ve karakterize edilen MAPK'dır. Thr ve Tyr'nin büyüme faktörleri ile etkileşmesi sonucunda fosforile olmasıyla keşfedilmiştir (64). Beyin, iskelet kası, timüs ve kalpte özellikle yüksek seviyelerde bulunmaktadır. ERK1 ve ERK2 büyüme faktörleri tarafından aktive edilirken, ERK1/2 Tyr kinaz gibi yüzey reseptörleri tarafından aktive ve modüle edilmektedir (65). Normal fonksiyon durumunda ERK1/2 sitozolik pozisyonda yer alırken; ekstrasellüler stimülasyonla ERK1/2'nin önemli bir kısmı çekirdekte birikmektedir (66).

ERK1/2 hücre proliferasyonunda çok önemli rol oynamaktadır. ERK1/2 aktivitesi mitojenik ajanlarla stimüle edilir. Hücre döngüsünün pozitif regülatörlerinin çoğu ERK1/2'ye etki eder. ERK1/2 fosforile olarak ve MAPKAPK ailesini aktive ederek (RSK, MNK ve MSK'ları) MAPK yolağını etkilemektedir (67).

ERK yolağı, hücre çoğalması hücre ölümü ve hücre iskeletinin şekillenmesinde rol oynamaktadır. ELK-1, ERK1/2'yi fosforile ve aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. ERK'in geçici ve sürekli etkinleşmesi, E-26 bölgesi içeren proteini (ELK-1) fosforilleyerek hücre döngüsü sırasında, FBJ osteosarkoma onkogen (Fos) protein ekspresyonunu uyarmaktadır. ERK1/2, hücre sağ kalımı, proliferasyonu ve farklılaşması gibi çok çeşitli süreçlerde yer almaktadır. Nükleazda, ERK1/2, CREB (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) gibi transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra c-Myc (Myc benzeri transkripsiyonel düzenleyici) ve NF- κ B (nükleer faktör kappa B) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir. Bu, ERK1/2'yi önemli bir anti-tümör hedefi yapar (68).

2.2.1.2- p38

Araştırmalarda p38 MAPK yolağının, p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (SAPK3 veya ERK6 veya MAPK12) ve p38 δ (SAPK4 veya MAPK13) olmak üzere dört izoformu tanımlanmıştır. p38 izoformları hücre stres altında değilken sitoplazmada bulunmaktadır; stres durumunda ise çekirdeğe doğru geçmeye başlarlar (69). İlk bulunan p38, p38- α 'dır; MAPK'ın ikinci modülatörüdür, CSBP, mHOG1, RK ve SAPK2 olarak da adlandırılır. Genellikle stres stimülasyonu sonucunda cevap olarak oluşur. p38- α ve p38- β hücrelerin sınırlarında ve dokularda eksprese edilmelerine karşın p38- γ ve p38- δ daha sınırlı eksprese edilir ve daha özel fonksiyonlara sahiptir (70). p38 α ve p38 β izoformları birçok

dokuda bulunmaktadır; buna karşın p38 γ iskelet kasında ve p38 δ ise çoğunlukla akciğer, böbrek, testis, pankreas ve ince bağırsakta eksprese olur (61). Antienflamatuvar ilaçlar p38- α ve p38- β 'yı adenozin trifosfat (ATP) yarışçı olarak hedefler ve inhibe ederler (71). Memelilerde dört p38 formu da güçlü bir şekilde çevresel stres, enflamatuvar sitokinler, oksidatif stres, UV radyasyon, hipoksi, iske mi gibi pek çok durumda aktive olur (72).

p38 izoformlarının temel fonksiyonu p38 transkripsiyon faktörlerini modüle ederek sitokin ekspresyonunu düzenlemek ve proenflamatuvar sitokin üretmektir (69). p38'in hücre sağ kalımdaki rolüyle ilgili pek çok çalışma yapılmış, apoptoz ve hücre sel stresle de ilişkisi kanıtlanmıştır.

2.2.1.3- JNK

JNK'lar Fos ve Jun aile üyelerini içeren, AP-1 transkripsiyon faktörleridir. Üç adet JNK izoformu vardır; JNK 1/2/3 (SAPK 1/2/3). JNK1 ve 2 kalın dokularda bulunurken JNK 3 esas olarak nöral doku, testis ve kardiyak myosit hücrelerinde yer alır (73).

JNK da p38 MAPK gibi hücre sel stres, ısı şoku, sitokinler, ultraviyole (UV) radyasyon, oksidatif stres, deoksiribo nükleik asit (DNA) ve protein sentez inhibitörleri ve büyüme faktörü eksikliği gibi durumlarda aktive olur. JNK inhibitörü II ve V, ATP'ye geri dönüşümlü olarak bağlanan inhibitördür (74). ERK ve p38 MAPK'lar gibi JNK da stimülasyonla beraber sitoplazmadan nükleusa geçmektedir. İyi tanımlanmış olan c-Jun, JNK substratıdır. JNK1 ve JNK2 c-Jun'un ekspresyonuyla pozitif regüle olmaktadır. JNK1 ve 2 hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli rol oynamaktadır. c-Jun, JNK aktivitesini AP-1 kompleksi ve AP-1 bağlanma bölgesinin gen transkripsiyonu üzerinden etkilemektedir (75).

JNK izoformları aynı zamanda hücre sel stres durumunda apoptotik cevapta da önemli rol oynamaktadır. JNK1 ve 2 inhibisyonunun sitokrom c'nin salınımını inhibe ettiği ve bu sayede JNK'nın intrinsik apoptotik yolağı etkilediği gösterilmiştir (76).

2.2.1.4- ERK 5

ERK5 (big MAPK1-BMK1) diğer MAPK'ların iki katı büyüklüğündedir. ERK5 bütün dokularda eksprese edilmiş olmakla beraber özellikle beyin, timüs ve dalakta yüksek seviyelerde izlenmektedir. ERK5 hücre sağ kalımında olduğu kadar erken embriyonik gelişimde ve vasküler sistemin normal gelişiminde rol almaktadır (77).

ERK5'in üç adet birleştirilmiş formu olduğu bildirilmiştir; ERK5a, ERK5b ve ERK5c (78).

ERK5 seviyesi büyüme faktörü, serum, oksidatif stres ve hiperosmolariteyle artış göstermektedir. MEK5, MAP2K'yi fosforilleyerek ERK5 oluşturmaktadır (77, 79).

ERK5, sitoplazmada lokalizedir ve MEK5 veya diğerleri ile uyarıldığında hücre çekirdeğine geçer. ERK5, Cyclin D1'i eksprese ederek hücrede G1/S tranzisyonunu gerçekleştirmektedir (80).

2.2.2- Atipik MAPK'lar

2.2.2.1- ERK3/4

ERK3, ratların komplementer DNA (cDNA)'sının ERK1 dizilimi köken alınarak (81); ERK4 de ERK3 gibi insan ve ratların DNA'larından benzer yöntemler kullanılarak klonlanıp izole edilmiştir (82, 83). ERK3 ve ERK4 benzer protein yapısına sahiptir; her ikisi de %73 amino asitten oluşmaktadır. ERK3 ve ERK4, yapısında fosfoakseptör olan Tyr kalıntısı içermediği için (Ser-Glu-Gly motifi barındırır) atipik kabul edilmektedir (84).

ERK3 ve ERK4'ün bilinen tek substratı bir MAPKAPK olan MK5'tir. MK5 çeşitli gruplarda çeşitli fonksiyonlarda tanımlanmış olsa da ERK3 ve ERK4 üzerindeki en temel görevi fosforilasyonda rol oynamaktır (85).

ERK4'ün biyolojik fonksiyonu hala tam olarak anlaşılamamış olsa da ERK3 hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre farklılaşması gibi pek çok biyolojik fonksiyona sahiptir (86).

2.2.2.2- ERK7

ERK7, rat cDNA'sının ERK1 kinaz domain diziliminden PCR yöntemi kullanılarak klonlanmış, üretilmiştir. ERK7'nin insan homologuna (insan DNA'sından üretilmiş MAPK) ERK8 denilmektedir (87). ERK7 ve ERK8'in %69'u amino asitten oluşmuştur, bu durum bu MAPK'ların hafif olmasını sağlamaktadır (88). ERK7'nin ERK1 kinaz domain bölgesinde yaklaşık %45 amino asit tespit edilmiştir; bu kısım atipik olan bölgedir, çünkü burası C-terminal uzantısıdır ve konvansiyonel MAPK'larda bulunmaz. C-terminal uzantısının rolü tam olarak anlaşılamamıştır ancak hücre içi lokalizasyonunda ve ERK7'nin otoaktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

ERK3'te olduğu gibi ERK7'nin de N-terminal bölgesi, ubiquitin-proteozom yoluyla degradasyona sebep olmaktadır (87).

in vitro ve *in vivo* çalışmalarda, ERK8'in aktivasyonunun otofosforilasyonla gerçekleştiği görülmüştür. ERK7'nin aksine, ERK8'in fosforilasyonu konvansiyonel MAPK'ların düzenlendiği gösterilmiştir (87). *in vitro* çalışmalarda ERK7'nin substratlarının konvansiyonel MAPK'lardaki gibi myelin basic protein (MBP), c-Fos ve c-Myc olduğu gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalarda ERK8'in substratının sadece MBP olduğu gösterilmiştir. ERK7 ve ERK8'in hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve östrojen ve glukokortikoidlerin işleyişinde görev aldığı da bilinmektedir (89).

2.2.2.3- NLK (Nemo Like Kinaz)

NLK, 1994 yılında konvansiyonel MAPK dizilimlerinden elde edilen primerlerin PCR yöntemiyle kullanılmasıyla bulunmuştur. NLK, %45 amino asit içeriğiyle ERK2 kinaz domaininden elde edilmiştir (90). NLK atipik MAPK olarak tanımlanmaktadır çünkü N- ve C-terminal uzantıları konvansiyonel MAPK'larda yoktur ve aktivasyon loopunda bir adet fosforile edilebilen kalıntı bulunmaktadır (91).

NLK, Wnt yoluyla (wnt1 ve wnt5a) stimüle edilmektedir. IL-6, G-CSF, TGF- β gibi pek çok sitokin NLK'yı aktive ettiği bildirilmiştir. MAP3K'nın doğrudan NLK'yı regüle edip etmediği bilinmemekle birlikte, NLK'nın aktivasyon döngüsü Thr-Gln-Glu motifinden oluşmaktadır. *in vitro* çalışmalarda NLK'nın, pek çok grup protein kinazın indüksiyonuyla otofosforile olduğu gösterilmiştir (92).

Literatürdeki çalışmalarda T-hücre/lenfoid arttırıcı transkripsiyon faktörleri (TCF/LEF) ailesi, STAT gibi pek çok NLK substratı bulunmuştur. NLK aynı zamanda proto-onkogen c-Myb ve Wnt yolunun degradasyonu da doğrudan fosforile olabilmektedir (91).

Tamamlayıcı sinyal yolları, hücre dışı uyarıcılarla (GF'ler veya sitokinler) sonradan etkileşimi başlatacak ve gen ekspresyonunu destekleyen spesifik faktörlerin nükleer translokasyonunda birleşecek şekilde, MAPK yoluna benzer bir yapı sergilemektedir. MAPK yolunun düzenleyici aktivitesi ile ilgili olarak, PI3K/akt/mTOR (fosfoinositid-3-kinaz/v-akt murin timoma viral onkogen homolog 1/rapamisin kinazın mekanik hedefi) ve TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü beta) sinyalleşmesi sonucu, değişen derecelerde etkileşim ve kümülatif sinyal iletimi oluşmaktadır. MAPK sinyalleme bileşenlerinin nükleer

translokasyonu, olası terapötik müdahaleyi temsil eden önemli hücresel süreçlerde düzenleyici sistem olarak işlev görmektedir (93).

2.2.3- Endodonti-MAPK İlişkisi

AMPK, hücreler arası temel enerji sensörüdür, her yerde eksprese edilir ve enerji homeostazını düzenler (94). Çeşitli memeli hücrelerinin farklılaşması veya gelişimi ve AMPK sinyal yolağı ilişkisi hakkında birçok çalışma bildirilmiştir (95). AMPK sinyal yolunun modülasyonu ile insan mezenşimal kök hücreleri (HDPC)'nin odontoblastik farklılaşmasını otofajinin kontrol ettiği de gösterilmiştir (96).

MAPK, üç enzim modülünden oluşan prolin yönelimli bir serin/treonin kinazdır; ERK, JNK ve p38 kinazlar, MTA ile indüklenen odontoblastik farklılaşmada rol oynar. MTA ile indüklenen NF- κ B B aktivasyonu sıçan diş pulpası hücrelerinde önemli bir sinyal iletim yoludur (97). MTA ile insan plasental ekstratının kombine kullanılması sonucunda, insan dental papilla hücre (HDPC)'lerinde NF- κ B B aktivasyonu indüklenirken MAPK yolakları üzerinden hareket ettiği gösterilmiştir (98). MTA, kalsiyum iyonlarının salınımıyla odontojenik farklılaşmada önemli rol oynamaktadır (99). MTA'nın odontoblast farklılaşması ve mineralizasyon etkisi MAPK yolağı ile açıklanmaktadır (100). Farelerde yapılan çalışma sonucunda MTA'nın dental pulpada NF- κ B B yolağı üzerinden odontojenik/osteojenik kapasiteyi arttırdığı görülmüştür (100). MTA'nın p42/44, p38 ve JNK MAPK'ı aktive ettiğini ve etkilerin farklı inhibitörler tarafından kısmen ortadan kaldırılabilceği gösterilmiştir. Ek olarak MAPK'lar, insan DPSC'lerinde, özellikle p42/44 MAPK'da MTA ile indüklenen odontoblastik farklılaşma ile ilişkilendirilmiştir. Birkaç hücrede, aktive edilmiş p42/44 MAPK, hücre hayatta kalmasına ve farklılaşmasına katkıda bulunmuştur (100).

MAPK yolağının diş germ oluşumunda rol oynadığını ve bu yolların mine dokusunu oluşturan ameloblast hücrelerinde rol aldığı bilinmektedir (101, 102). Ancak, florürün, ameloblast benzeri MAPK sinyal yolu üzerindeki etkileri hakkında çok sınırlı bilgi vardır. Fare odontojenik epitelinden elde edilen ameloblast benzeri bir hücre hattı olan LS8'in florürle indüklenen apoptozunda MAPK'nın rolünü araştıran bir çalışmada odontoblast benzeri hücrelerde NaF ile indüklenen apoptozun JNK ve ERK yollarına bağlı olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, dental florozun olası biyolojik mekanizması moleküler düzeyde incelenmiştir (103).

Hem p-ERK hem de p-JNK yollarının LS8 hücrelerinin NaF ile indüklenen apoptozuna katıldığını ortaya konulmuştur. ERK aktivasyonunun dış epitel hücrelerinin gelişimleri sırasında proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir (101).

Karube ve ark. da fare odontoblast benzeri bir hücre çizgisi olan MDPC-23'in NaF ile muamelesi sonrası MAPK aktivasyonunu göstermişlerdir. Araştırmacılar NaF ile muamele sonrası hızla p-JNK, p38 ve p-ERK'nin artan ekspresyonunun zamanla artışına devam ettiğini bildirmişlerdir (103). Ek olarak, bu çalışma, NaF işleminin farklı konsantrasyonlarının apoptotik LS8 hücrelerinde p-p38 protein düzeylerini artırdığını da göstermiştir. İlginç bir şekilde, LS8 hücrelerinin p38 inhibitörü (SB203580) veya bağımsız p38 susturucu RNA transdüksiyon mekanizması tarafından ön tedavisi, kaspazlarda NaF ile indüklenen değişikliği ortaya çıkarmıştır (104).

MAPK kinazlar arasında JNK ve p38 yolları sıklıkla apoptoz indüksiyonu ile ilişkiliyken ERK yollarının hücreleri apoptozdan koruyan hayatta kalma sinyalleri verdiği düşünülmektedir. p38 MAPK yolu, birçok hücre tepkinin önemli bir düzenleyicisidir. p38 MAPK sinyalleşmesinin epitel hücre transformasyonunu negatif olarak düzenlediği iyi bilinmektedir (105).

2.3- Otofaji

2.3.1- Hücresel Otofajik Akış

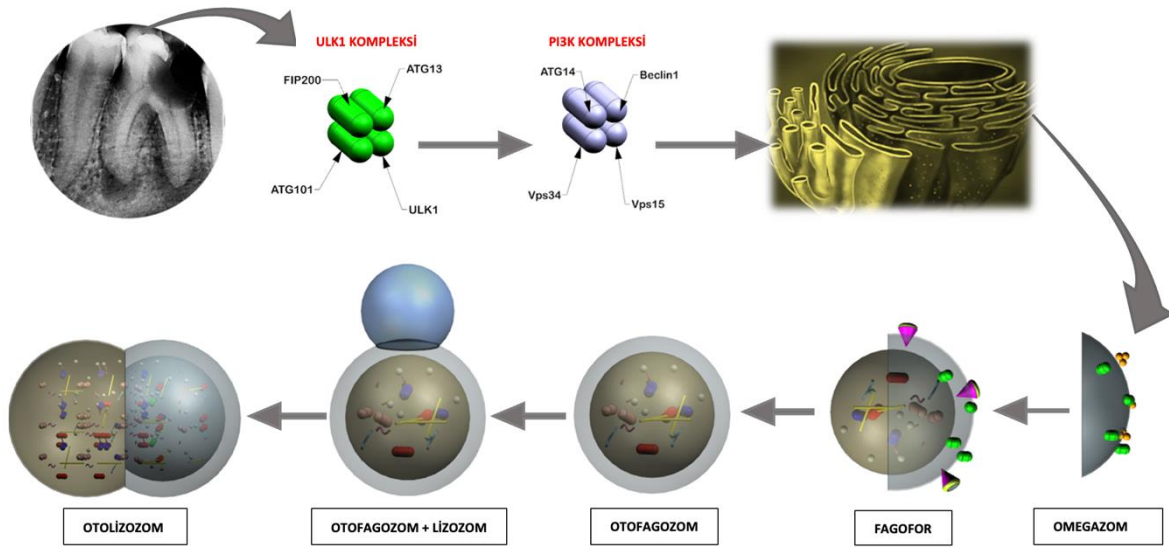
Otofaji, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında meydana gelen evrimsel olarak iyi korunmuş kendi kendine parçalanma işlemidir. Hücresel düzeydeki otofaji çok sayıda özelleşmiş protein komplekslerinin senkronize olarak çalışması ile koordine edilen ileri düzeyde regülasyona sahip kompleks bir moleküler mekanizmadır ve hücresel devamlılık için esansiyel bir süreç olduğu bilinmektedir.

Fizyolojik olarak otofajinin aşırı ya da bazal düzeyin altındaki aktivitesi farklı hücresel yanıtlara neden olabilmektedir. Bazal düzeydeki otofajinin, hasarlı DNA'lar, işlevsiz ya da yarı ömrünü tamamlamış proteinler ile birlikte hasarlı organelleri monomerik alt birimlerine ayrıştırılarak hücresel fonksiyoneliitenin devamlılığını sağlamak üzere gerekli olan ATP'ler ve makromoleküllerin yeniden sentezi için gerekli olduğu bilinmektedir. Fizyolojik koşullar altında hücrelerdeki otofajik aktivite düşük bazal düzeylerde gerçekleşirken; oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi, genotoksik stres, protein sentezinin inhibisyonu, enfeksiyon, hipoksi, yaşlanma, kanser, açlık veya hücre içi

patojen varlığında hızlı bir şekilde indüklendiği gösterilmiştir (106). Bu süreç hücresel düzeyde fizyolojik homeostazisinin sağlanması ve değişen stres koşullarına karşı hücrenin adaptif bir yanıt oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Stres yokluğunda otofaji, hasarlı hücresel bileşenleri parçalamak ve hücrenin enerjik durumunu korumak ve hücresel nutrientlerin geri kazanımı için bazal seviyelerde aktiftir. Araştırmalar bazal seviyedeki otofajik aktivitenin hücresel fonksiyon kaybına sebep olabilecek zararlı protein agregatlarını temizlemek için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle hücrelerde adeta adaptif araç olarak çalışan bu otofajik süreç makrotofaji olarak ifade edilmektedir (106). Buna karşı aşılamayan stres koşulları ya da değişen fizyolojik şartlar altındaki artmış otofaji hücresel ölüm yollarından biri olarak çalışmaktadır ve bu durum otofajik hücre ölümü olarak ifade edilmekle birlikte Tip II hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır (107). Bununla birlikte otofajik sürecin hücrelerde metabolik yeniden programlama, metastaz, immün yanıtlardan kaçınma ve tedavi rezistansı gibi çok sayıdaki önemli hücresel süreçlere de dahil olarak tümör gelişimine ve immün yanıtların regülasyonuna katkı sağladığı belirlenmiştir (108).

Otofajinin yaşlanma ile birlikte nörolojik bozukluklar, kanser ve enfeksiyon gibi çok sayıdaki patofizyolojik süreçte regülasyonunda bozukluklar görülmektedir. Özellikle son yıllardaki çalışmalar değişen otofajik akışın karsinogenez süreci ile olan yakın ilişkisine dikkat çekmektedir. Kanser hücrelerinde otofaji tümör gelişiminin ilk safhalarında hücre için potansiyel olarak zararlı olan protein grupları veya hasarlı organelleri parçalayarak adeta bir tümör baskılayıcı olarak hareket etmektedir (109). Bununla birlikte, tümör gelişiminin ileri aşamalarında otofaji, tümörün içerisinde bulunduğu stresli mikro çevrede hücresel canlılığın devamlılığını sürdürmek için çalışmaktadır ve tümör gelişimini teşvik edici bir mekanizma olarak iş görmektedir. Otofaji hücrelerde üstlenmiş olduğu bu iki yönlü görevinden dolayı “bıçağın iki keskin tarafı” olarak ifade edilmektedir (110). Memeli hücrelerinde üç ana tipte otofaji bulunmaktadır; bunlar mikrootofaji, makrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA)’dır. Her bir tip otofaji morfolojik olarak farklı olsa da üçü de kargonun bozunması ve geri dönüşüm için lizozoma iletilmesiyle sonuçlanmaktadır (111). Bu tipler esas olarak kargonun lizozoma teslimatındaki farklılığa göre birbirinden ayrılmaktadır. Mikrootofaji sırasında, kargoyu yakalamak için lizozomal membranın invajinasyonları veya çıkıntıları kullanılmaktadır. Hedef bileşenin alımı doğrudan lizozomun sınırlayıcı zarında gerçekleşmektedir (112). Mikrootofajide otofajik kargo, lizozom yüzeyi ile doğrudan etkileşime girer ve daha sonra proteazlar tarafından işlenmektedir. Mikrootofajinin memeli hücrelerinde uzun ömürlü protein dönüşümünde rol oynadığı düşünülmektedir. CMA lizozomal membran boyunca ilgili çözünür sitozolik proteinlerin translokasyonuna dayanan oldukça seçici bir otofaji türüdür. CMA,

kargoyu ayırmak için membranöz yapılar kullanmaması, bunun yerine belirli bir pentapeptit motifi içeren kargo proteinlerini tanımlamak için şaperonlar kullanması bakımından mikrootofajiden farklıdır (113). CMA, ara vezikül formasyonuna gerek olmadan kargo taşınması, membran füzyonu veya herhangi bir tür membran deformitesi sağlar. Otofajik substrat bileşenleri (katlanmamış proteinler) sitoplazmayı direkt geçerek lizozomal lümene yerleşir ve bu substratlar doğrudan lizozomal membran boyunca yer değiştirirler (113). Mikrootofaji ve CMA'nın aksine, makrootofajide otofajik hedef olan substrat çift zarlı veziküllerin (otofagozomlar) *de novo* sentezi yoluyla kargonun ayrıştırılarak lizozoma taşınması adımlarını içermektedir (114). Bu süreç; otofajik akış membran nüklealizasyonu, vezikül genişlemesi, otofagozom olgunlaşması, otofagozomun lizozom ile füzyonu ve kargo içeriğinin degradasyonu olmak üzere 5 ana basamakta sınıflandırılmıştır (Şekil 1) (115). Tüm bu süreç otofaji ile ilişkili protein (ATG, Autophagy-related protein)'ler olarak ifade edilen protein gruplarının ardışık olarak çalışması ile dinamik bir şekilde koordine edilmektedir (116).



Şekil 1. Periapikal lezyonlarda otofajik akış (ULK 1 kompleksi: ATG14, Beclin 1, Vps34, Vps 15, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksi: FIP200, ATG13, ATG101, ULK1).

Optimal fizyolojik koşullar altında, otofajinin bilinen bir baskılayıcısı olan nutrient sensörü memeli rapamisin hedefi proteini (mTOR, mammalian target of rapamycin) Unc-51-like kinase (ULK) 1/2 kinazları, Atg13, Atg101 ve FIP200 proteinlerinden oluşan Unc-51-like kinase 1/2 (ULK 1/2) kompleksi ile etkileşimde bulunmaktadır. UNC-51 benzeri kinaz (ULK)/ATG1, otofajik sinyal indüksiyonunda ATG13, ATG101 ve fokal adezyon kinaz ailesi

etkileşimli protein 200 kD (FIP200) ile bir kompleks oluşturarak otofajik süreci başlatan anahtar bir proteindir (152). mTOR ULK1/2'yi fosforile ederek kinaz aktivitesini inhibe etmektedir.

Açlık, hipoksi, enerji gereksinimi gibi fizyolojik değişimlere yanıt olarak ULK1/2; AMP kinaz (AMPK) tarafından aktive edilmektedir. AMPK, hücredeki AMP/ATP oranını algılayarak hücre içi enerji düzeylerinin takibinden sorumludur. Açlık durumunda hücre içi AMP düzeyleri artmaktadır ve AMPK aktivasyonu gerçekleşmektedir. AMPK, bir mTOR inhibitörü olan tüberoskleroz kompleksi 2'nin (TSC2) veya Raptor (regulatory associated protein of mTOR) proteinin fosforilasyonu yoluyla mTOR'u down regüle etmektedir (117). Gerçekleşen bu post-translasyonel modifikasyonlar, ULK 1/2 kompleksinden mTOR'un ayrılmasını teşvik ederek, Atg13 ve FIP200'un fosforilasyonuna aracılık eden ULK 1/2 kinazın aktivasyonuna yol açar (117).

Otofagazom formasyonunun anahtar regülatörü olarak görev yaptığı bilinen Beclin1 ATG'lerin fagofora lokalizasyonu için gerekli olan sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksinin bir parçasıdır ve otofagozomda yer almaktadır (118). Beclin1/ATG6, Vps34, Vps15 ve ATG14L'den oluşan sınıf III PI3K kompleksi, otofagozomların oluşumu için gerekli efektörleri toplamak için fosfatidilinositol-3-fosfat üretimini indükler (118). Böylelikle ULK1 kompleksi (ULK1/2, FIP200, ATG13, ATG101) ve Beclin kompleksi (Beclin1, ATG14L, Vps15, Vps34) aracılığıyla nüklealizasyon ve membran izolasyonu başlatılır.

Veziküler genişleme için ubikitin benzeri konjugasyon sistemi de gereklidir. Sistemlerden biri esas olarak ATG5 ve ATG12'den oluşur; diğeri, fosfatidiletanolaminin (PE)'nin mikrotübülle ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3)/ATG8'e konjugasyonudur. LC3 ilk olarak pro-LC3 olarak sentezlenir ve ATG4 yardımıyla LC3-I oluşur. PE lipid konjugasyonu, LC3-I'in otofajik membrana bağlı LC3-II'ye dönüşümüne yol açmaktadır. LC3-II, otofagozomların zarlarına katılır ve lizozomal füzyona kadar tamamlanmış otofagozomlarda kalmaktadır (152). Bu senkronize çalışan sistem; ATG5, ATG12, ATG16L1 kompleksinin oluşumu ve ATG3, ATG7'nin LC3'e fosfatidiletanolamin (PE) konjugasyonunu gerçekleştirmesi ile birlikte fagofor membran uzaması, hedeflenmiş olan otofajik kargonun membran içerisinde hapsedilmesi ile birlikte otofagozom oluşumu ve lizozomlar ile gerçekleşen füzyon sonrasında otolizozomların oluşması ve kargo içeriğinin lizozomal proteazlar ile degrade edilmesi şeklindeki adımları takip etmektedir (116).

Fagofordaki ubikitin benzeri substratlar için bir otofaji reseptörü olan p62/sequestosome-1 (p62/SQSTM1), otofagozom oluşumunu indüklemek için seçici olarak LC3 ile etkileşime girer ve otofaji sırasında verimli bir şekilde bozulmaktadır. p62/SQSTM1

düzeyleri ile otofajik aktivite arasında ters bir korelasyon bulunmaktadır. Otofajik kargo ile birlikte p62/SQSTM1’de degrade edilmektedir. Bu nedenle p62/SQSTM1, otofajik aktivitedeki değişimin takibi için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (119).

Oldukça kompleks bir şekilde regüle edilen otofajik süreçteki değişimler diyabet, obezite, nörodejenerasyon, yaşlanma, lizozomal depo hastalıkları, kanser, immünite bozuklukları ve enfeksiyöz süreçler gibi birçok patofizyoloji ile ilişkilendirilmiştir (120). Çalışmalar otofajinin hastalıklar üzerindeki çelişkili etkisini ortaya koymaktadır. Fonksiyonel ve kusurlu otofajinin (defective autophagy), çok sayıdaki patolojide birlikte gözlemlendiği belirlenmiştir. Fonksiyonel otofaji (functional), normal hücreleri korumak için patojenleri veya birikmiş proteinleri ortadan kaldırırken, kusurlu otofaji (defective autophagy), patojenler veya tümör hücreleri için koruyucu bir ortam sağlamaktadır (120). Otofajinin bu değişken ve adaptif özelliği birçok araştırmacı tarafından ilgi çekici bulunmakla birlikte bu süreçlerdeki değişen rollerinin altında yatan nedenlerin anlaşılması hastalıkların moleküler patogenezini anlamamız açısından önem taşımaktadır.

2.3.2- Otofaji Bakteriyel Patojen İlişkisi ve Enflamasyon

Patojenik bakteriler ve metabolik ürünleri otofajiyle ilişkili protein ifadelerinde artışa sebep olmakta ve bunun sonucunda otofajik indüksiyon gerçekleşmektedir. Bakteri invazyonu ile farklı birçok otofajik yolağın tetiklenmesi bakteriyel patogenezde otofajinin çok boyutlu rolünü göstermektedir. Farklı otofajik yolların tetiklenmesi ile bakteri hücrelerinin degradasyonu ya da sağ kalımı desteklenebilmektedir.

Otofaji bakteriyel enfeksiyonlar sırasında oynayabileceği rollere göre üç türde gruplandırılmıştır; bunlar antibakteriyel otofaji, non-bakteriyel otofaji ve pro-bakteriyel otofajidir. Antibakteriyel otofaji, bakterinin replikasyonunu kısıtlayarak bakterileri elimine ya da inhibe etmektedir. Non-bakteriyel otofaji, doğrudan bakterilere etki etmez ancak hücresel düzeyde otonom immün cevapları düzenlemektedir. Pro-bakteriyel otofaji ise bakteriyel replikasyonu düzenler ve hücre içi bakteri sağ kalımını sağlamaktadır. Bakteri hücreleri enfeksiyon sürecinde hücre içindeki sağ kalımını sağlayabilmek için konakçı hücrelerin otofajik mekanizmasını kullanmaktadır (121).

Bakteri varlığında otofajinin immünolojik fonksiyonları ve otofaji-enflamasyon ilişkisi son yıllarda dikkat çeken konuların başında gelmektedir. Otofaji doğrudan mikroorganizmayı yok ederek, ya da dolaylı olarak enflamasyonu ve kazanılmış bağışıklık yanıtını ve medyatörlerin salgılanmasını düzenleyerek bağışıklığı modüle etmektedir (122). Makrofajlar,

nötrofiller ve lenfositler dahil olmak üzere enflamatuvar hücrelerin gelişimine, homeostazına ve sağ kalımına etki ederek enflamasyon sürecinde kritik roller oynamaktadır. Bu süreçte transkripsiyonel düzeydeki etkileri, çok sayıdaki sitokinin işlenmesi ve sekresyonunda rol oynaması aracılığıyla enflamasyon sürecine katılmaktadır.

Kalıp tanıma reseptörleri veya PRR'ler (Pattern Recognition Receptors), mikrobiyal patojenler veya hücrel stresle ilgili molekülleri tanımak için bağışıklık sistemi hücrelerince üretilen proteinlerdir. Fagositlerin yüzeyinde bulunan PRR'lerden Toll-benzeri reseptörler (TLR) doğal bağışıklık yanıtın aktivasyonu için gereklidir. Otofaji patojenin konak dokudaki istilasını sınırlandırır. TLR'ler ve otofaji arasındaki etkileşim, konak dokuda patojen istilasına yanıt olarak her iki sistemin etkilerini güçlendirmektedir. TLR'ler, otofajiyi erken dönemde indükleyerek antimikrobiyal aktiviteleri üst seviyeye çıkarırlar (123). Çalışmalar, makrofajlarda TLR ligandları ile otofaji düzeyinin indüklendiğini ve otofajinin indüksiyonunun hücre içi patojenlerin canlılığını inhibe ettiğini bildirmiştir (124). Otofajinin yalnızca doğal bağışıklık yanıtın düzenlenmesinde değil kazanılmış bağışıklık yanıtlarının da düzenlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır. Antijen sunumunda ve T hücrelerinin farklılaşmasında, metabolizmasında ve fonksiyonunda düzenleyici rol üstlenmektedir (125).

Tüm Gram-negatif bakterilerin ana patojenik faktörü olan bakteriyel lipopolisakkarit (LPS)'nin, ilk olarak TLR-2 veya 4 ile etkileşime girerek güçlü bir enflamatuvar yanıtı indüklediği, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yolu aktivasyonu, tümör nekroz faktörü (TNF) - α ve interlökin (IL) -1 β dahil olmak üzere pro-enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimine neden olduğu bilinmektedir (126). İnflamazom, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalara ve konak proteinlerinden oluşan moleküllere karşı enflamasyonun başlatılması ve kaspaz-1 aktivasyonunun düzenlenmesinde görevli olan doğal bağışıklık sistemi elemanıdır. Çoklu protein kompleks yapısına sahip inflamazom sayesinde IL-1 β ve TNF- α gibi olgun sitokinler üretilmektedir. Otofajinin inflamazom aktivasyonunu negatif yönde regüle ettiği gösterilmiştir (127). *Porphyromonas gingivalis* ile uyarılan insan dişeti fibroblast hücrelerinde otofajinin bloke edilmesi sonucu insan dişeti fibroblastlarının daha fazla miktarda TNF- α ve IL-1 β salgıladıkları gösterilmiştir (128). Bu çalışma otofajinin, proenflamatuvar sitokin salgılanmasını sınırlandırmaya katılabildiğini göstermektedir.

Park ve ark.ları *Porphyromonas gingivalis* tarafından uyarılmış otofajinin hassas moleküler mekanizmasının ve esas hedeflerinin aydınlatılmasını amaçlamışlardır (129). THP-1- kökenli makrofajların *Porphyromonas gingivalis* ile enfeksiyonu sonrası LC3- II, Beclin1 ve konjuge ATG5-ATG12 seviyelerindeki artışa dikkat çekmişlerdir. LC3- I'ın LC3- II'ye dönüşümü otofagozom formasyonu için iyi bir belirteçtir. Araştırmanın sonuçları canlı *P.*

gingivalis bakterisinin otofaji sinyal proteinlerinin ifade düzeylerini pozitif yönde regüle etmesi ile otofajiyi uyardığını göstermektedir. Ayrıca periodontitis hastalarının gingival örneklerinde LC3- II ve konjuge ATG5–ATG12 düzeyleri sağlıklı bireylere oranla daha yüksek seviyede bulunmuştur. Aynı araştırma enfeksiyon ile uyarılmış otofajinin bakterinin eliminasyonunda önemli olduğunu ve aşırı miktarda IL- 1 β üretimini de önlediğini göstermiştir (129).

Otofaji her ne kadar hücrel homeostazın sağlanmasında kritik öneme sahip temizleyici görevini üstlense de bazı fırsatçı patojenler otofajiden kaçabilmekte veya otofajik mekanizmayı kendi sağ kalımlarını sürdürebilmek için kullanarak otofagozomal vakuollerin içerisinde çoğalabilmektedir. Lee ve ark. insan dişeti epitelyal hücrelerinde ER-zengin/LC3 pozitif otofajik vakuollerin *Porphyromonas gingivalis*'in çoğalabilmesi ve hücre içinde yaşamını devam ettirebileceği bir ortam sağladığını göstermişlerdir (130). ER, fagofor oluşumunun başladığı merkez olmakla birlikte fagofor membran yapısının oluşumuna önemli katkısı bulunmaktadır (131). *Porphyromonas gingivalis* dişeti epitelyal hücrelerine girdiğinde fagofor oluşumunu indükleyerek kendisi için uygun boşluğu yaratmış olur. Yine başka bir çalışmada *Porphyromonas gingivalis* LPS'nin dişeti oluğu keratinosit hücrelerinde otofajiyi indüklediği ve bakterinin otofagozom ile kolokelize olmasını hızlandığı bildirilmiştir (132). *Porphyromonas gingivalis*'in hücre içi trafiğini gösteren bu çalışmalar probakteriyel otofajiye hizmet eden moleküler mekanizmaların aydınlatılması ile oral kavitedeki fırsatçı bakteriyel enfeksiyonlarda terapötik stratejilere otofajik hedef moleküllerin de dahil edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Otofaji ve enflamasyon arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. Otofaji hem hücre canlılığının sürdürülmesinde hem de hücre ölümünde rol oynayan önemli bir süreçtir. Seçici mitokondrial otofaji (mitofaji) fazla sayıdaki ya da hasarlı mitokondrilerin eliminasyonu ile mitokondrial kalitenin sağlanması ve sürdürülmesine hizmet etmektedir (133). Bir hücrede enerji üretiminde ve otofajik kontrolde esas rol oynayan organel mitokondri olduğu gibi aynı zamanda hücrel reaktif oksijen türlerinin esas kaynağı da mitokondridir. Otofajinin bloke edilmesi, mitokondri kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine ve inflamazomların aktive olmasına neden olmaktadır. Enflamatuvar hastalıklarla mitokondrial hasar arasındaki ilişki bu şekilde açıklanabilir. Bullon ve ark. ilk defa periodontitis hastalarından aldıkları kan örneklerinde mononükleer hücrelerde mitokondrial ROS ilişkili otofajik aktivitede artış olduğunu göstermişlerdir (134). Aynı çalışmada *in vitro* gingival fibroblast hücrelerinde *Porphyromonas gingivalis* LPS'nin ROS kaynaklı otofajiye neden olduğu da bildirilmiştir. Bu çalışma periodontitis gibi enflamasyon veya immün sistem bozuklukları ile ilişkili durumlarda otofajinin önemini göstermektedir.

Hipoksi ve enflamasyon arasındaki ilişki birçok dokuda olduğu gibi periodontal hastalıklarda ve apikal periodontitis lezyonlarında da ortaya konulmuştur. Periapikal lezyonların patogenezinde otofajinin ve hipoksi ortamının olası etkilerini değerlendiren klinik araştırmada periapikal lezyonların gelişiminde ve devamlılığında otofajinin potansiyel bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir (135). Patojen kaynaklı enflamatuvar yanıt (örneğin periapikal lezyon) hipoksik mikroortamlarda gelişmekte ve aynı zamanda bağışıklık hücrelerinden proenflamatuvar sitokinlerin salgılanması hipoksik proteinlerin ekspresyonunu da arttırmaktadır (136). Periapikal lezyonlarda IL-1 β konsantrasyonunun artışı yalnızca enflamasyon varlığını değil aynı zamanda lezyonlarda hipoksik mikroortamların varlığını da işaret etmektedir (135). Hem periapikal kist hem de granülom örneklerinde hipoksi ile ilişkili proteinlerden HIF- 1 α 'nın yoğun olarak izlenmesi kist ve granülomların gelişiminde iskemi neticesinde ortaya çıkan lokalize hipoksinin göstergesidir.

Otofajinin hipoksiye bağlı osteoklastogenezin düzenlenmesine katılımının gösterildiği hücre kültürü çalışmasında otofajinin hipoksik koşullar altında osteoklastogenez için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir (137). Membranöz vakuollerin görünmesi, asidik veziküler organellerin oluşumu, LC3'ün otofagozomlara bölünmesi ve toplanması, otofajik akıda artış ve otofaji ilişkili gen ifadesinin yukarı yönlü regülasyonu ile otofajik aktivite doğrulanmıştır. Araştırma bulguları, hipoksiye maruz kalmanın HIF- 1 α 'nın indüksiyonu ve ardından BNIP3'ün (pro- apoptotik bir protein) aktivasyonu ile sonuçlandığını ve sonunda Beclin1 ve diğer otofajiyle ilişkili genlerin ifadesinin yukarı düzenlediğini bildirmektedir (137). ATG5, ATG7, ATG4 β ve LC3 dahil olmak üzere otofajiyle ilişkili proteinler, osteoklastların kemik yüzeyine tutunduğu sınırın oluşturulması (rough border) ve lizozomal enzimlerin salgılanması için gereklidir (138).

Hipoksi durumunda otofajinin indüklenmesinin diğer bir yolu olan (HIF- 1 α 'dan bağımsız yolak) adenosin monofosfat protein kinaz (AMPK)/mTOR yolağı insan pulpa hücrelerinde ve periapikal lezyonlarda gösterilmiştir (134). Radyografik olarak 10² mm² den büyük periapikal lezyonlarda AMPK protein ifadesi daha yüksekken, 10² mm² den küçük periapikal lezyonlarda ise HIF- 1 α daha yüksek bulunmuştur. Bu durum büyük periapikal lezyonlarda daha aktif otofaji eğilimi olduğu anlamına da gelebilir (134).

Kemik yeniden şekillenmesi ve metabolizmasında otofaji ile ilişkili çalışmalar; otofajinin sadece osteoklast metabolizmasında değil aynı zamanda osteoblast farklılaşmasında ve mineralizasyonunda da rol oynadığını ortaya koymuştur. Nollet ve ark., otofaji proteinleri ATG7 ve Beclin1'in bir osteoblastik hücre hattında mineralizasyon için gerekli olduğunu ve osteoblastlarda ATG5 eksikliğinin *in vivo* olarak azalmış kemik hacmine neden olduğunu

göstermiştir (139). Otofajinin engellenmesi ile mezenşimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasının olumsuz etkilendiği de bildirilmiştir (96). Osteoblast farklılaşmasında hücre morfolojisi ve hücre içi organel içeriklerinde değişiklikler meydana gelmektedir. Sonuç olarak, osteoblastlar osteositlere dönüşür ve mineralize kemik matriksine lokalize olurlar. Otofajik akının yukarı regülasyonu, farklılaşmış osteositlerin kemik matriksindeki hipoksik ve zayıf besin koşullarında hayatta kalması için bir mekanizma olabilir (140).

Otofajinin endodonti ile ilişkili olarak sadece periapikal lezyonlarda değil pulpa odontoblast hücrelerinin embriyonik gelişiminde ve daha sonra odontoblast farklılaşması aşamalarında da kritik öneme sahip olduğu görülmektedir (141). Tüm hücrelerde olduğu gibi odontoblastların homeostazisinin düzenlenmesinde otofajinin rolü büyüktür. Otofaji, enflamasyonun erken aşamasında hücre hasarından koruyucu rol oynarken ilerleyen dönemde hücre ölümüne sebep olmaktadır. Erken dönemde otofajinin inhibisyonu odontoblast hücre canlılığını olumsuz etkilerken geç dönem otofajinin inhibisyonu hücre canlılığına katkı sağlar (142).

Integrin ile ilişkili protein olarak da bilinen CD47, immünoglobulin süper familyasına aittir ve neredeyse tüm hücresel plazma membranlarında ifade edilen bir yüzey molekülüdür (143). Bu molekül makrofaj yüzeyindeki sinyal düzenleyici protein alfa (SIRP α)'ya bağlanarak profagositik sinyali inhibe eder ve normal hücreleri doğal bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesine engel olur (144). Wang ve ark. çürüklü ve pulpitisli pulpa örneklerinde odontoblastlarda CD47'nin azalması ile otofajinin aktive olduğunu ve enflame odontoblastlarda CD47'nin azalmasının devamı ile otofajinin aşırı aktivasyonun hücre apoptozisini indüklediğini göstermişlerdir (145).

Pulpa iltihabı ile otofaji ilişkisinin gösterildiği rat çalışmasında pulpanın ağız ortamına açılması ile enflamasyonun indüklendiği örneklerde otofajik aktivitenin sürece katıldığı gösterilmiştir (146). Ayrıca, otofaji belirteçlerini ifade eden doku alanı, korondan radiküler pulpaya doğru zamana bağlı bir şekilde artmıştır. Bununla birlikte, ekspresyon modeli, koronal ve radiküler pulpitis dokuları arasında farklılık göstermiş, koronal pulpitis dokusunda otofaji ekspresyonu, radiküler pulpitis dokusuna göre daha erken gerçekleşmiştir. Pulpitisin kontrol edilmesinde en kritik role sahip olan odontoblast tabakasında otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu dikkat çekicidir. Dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasının otofaji tarafından regüle edildiğini gösteren *in vitro* çalışmalar bu sonucu desteklemektedir. Otofaji, NF- κ B aktivasyonunu baskılayarak odontoblastların farklılaşma kapasitesini desteklemektedir (147). Otofaji ile ilişkili proteinlerin yüksek düzeyde ifade edildiği diğer hücreler mikrovasküler endotelial hücrelerdir (146). Enflamasyona yanıt olarak otofaji ayrıca

hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM) ve vasküler hücre yapışma proteini-11 (VCAM) gibi hücre yapışma moleküllerini düzenleyerek vasküler yeniden modellemeye katkıda bulunur (148).

2.4- Eser Elementler

Vücut kompozisyonu göz önünde bulundurulduğunda temel bileşenler protein, karbonhidrat, yağ ve vitaminlerin yanında sodyum (Na), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), fosfor (P), bakır (Cu), çinko (Zn), selenyum ve krom (Cr) gibi pek çok mineralin insan metabolizmasında önemli işlevlerinin olduğu açıktır. Bu minerallerden pek çoğunun gereksinimi, etkileri, azlığı veya fazlalığı konusunda çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Bu minerallerin birbirleriyle etkileşimleri ve herhangi birinin eksikliği veya fazlalığı diğer minerallerin veya diğer majör besinlerin fonksiyonlarını etkileyebilir (149).

İnsan metabolizmasında mineraller eser miktarlarda gereklidir. Mineraller, vücuttaki konsantrasyonları miligram ile ifade ediliyorsa makroelement, mikrogram ile ifade ediliyorsa eser veya mikroelement olarak adlandırılırlar (150).

Eksikliği halinde, her defasında aynı ve tekrar oluşturulabilir yapısal ve fizyolojik anormallik gelişen ve yerine konulması ile bu anormalliğin düzelmesi sağlanabilen besin maddesi esansiyel besin maddesi olarak adlandırılır. Bu isimlendirme mineraller için de geçerli olup Na, K, Ca, Mg, P esansiyel makroelementler, Cu, Zn, selenyum, kobalt (Co), manganez (Mn), iyot (I), molibden (Mo), flor (F) ve Cr ise esansiyel mikroelementler grubunda kabul edilirler (151).

Besinsel açıdan önemli eser elementler, enzim, hormon ve vitaminlerle birlikte ko-enzim ve kofaktör oluşturarak yüksek biyolojik aktiviteye sahip olurlar (152).

Eksikliklerine ait tipik belirtilerin, son evreye kadar ortaya çıkmaması, kendilerinin ve yapılarına girdikleri enzim sistemlerinin özgül, hassas ve doğru olarak tekrarlanabilir laboratuvar yöntemlerinin olmayışı veya yaygın olarak kullanılamaması, besinsel ve hücresel düzeyde aralarında etkileşim bulunması nedeniyle eser elementlerin tanınması ve değerlendirilmesi oldukça güçtür (150, 153).

2.4.1- Selenyum

2.4.1.1- Eser Element Olarak Selenyum

Selenyum (Selenyum), Berzelius ve Gahn isimli araştırmacılar tarafından 1817 yılında İsveç'te sülfürik asit kalıntılarından elde edilmiştir. Adı eski Yunan ay tanrıçası Selen'e atfedilmiştir (154).

Memeliler için esansiyel eser element olduğu ise ancak 1957 yılında Schwartz ve Foltz tarafından anlaşılabilmektedir (155).

Selenyum, periyodik cetvelin VI A alt grubunda yer alan, atom numarası 34, molekül ağırlığı 78.96 gr olan, ametalik, gri renkli, katı, yoğunluğu 4,81 g/cm³ olan 220°C'lik erime ve 685°C'lik kaynama noktasına sahip bir elementtir.

Doğada genellikle bakır, çinko, kurşun gibi metallerin sülfidleri ile birlikte bulunur. Gümüş renkli metalik formda ya da daha az stabil olan kırmızı amorf toz şeklinde elde edilir. Havada yanar, sudan etkilenmez, yoğun HNO₃ ve alkalilerde çözünür (156).

Selenyum en yaygın olarak "wet digestion" yönteminin de kullanıldığı fluorometrik yöntemle tayin edilir. Hibrid jenerasyon ve fırınlı atomik absorpsiyon spektrometrisi, nötron aktivasyon analizi, polarografik ve stripping voltametri diğer analiz yöntemleridir (153).

Yeryüzünde selenyum elementinin ana kaynağı, dünya çekirdeğini örten ergimiş volkanik kayalık kütleleridir. Dünyanın her yerinde bulunmakla birlikte dağılımı bölgeler arasında büyük farklılıklar gösterir (157).

En fazla bulunduğu bölgeler Amerika Birleşik Devletleri, İrlanda, Türkistan ve Çin'in bazı bölgeleridir (158).

İsveç, Finlandiya ve Çin'in bazı bölgelerinde toprak selenyum miktarı düşük olup günlük alınan Selenyum miktarı 30-40 µg kadardır (151).

Çeşitli Avrupa ülkelerinde sağlıklı kişilerde normal düzeyde bulunmuştur (159).

Ülkemizde değişik tür süt ve süt ürünlerinin selenyum içerikleri coğrafi yapıya bağlı olarak bölgesel ve mevsimsel değişim göstermekle birlikte genel olarak normal sınırlardadır (160, 161).

2.4.1.2- Selenyum Kaynakları ve Dağılımı

Metabolizması ve fizyopatolojisi düşünüldüğünde insan için en önemli kaynak bitkisel ve hayvansal besinlerdir. Bitkiler ihtiyaçları olmadığı halde topraktaki konsantrasyonuyla

orantılı olarak selenyum depolarlar. Biriktirici özelliği nedeniyle killi topraklarda yetişen bitkilerde selenyum miktarı daha fazladır (162).

Çayır bitkileri, turpgiller ve lifler tahıllardan fazla olmak üzere önemli miktarda selenyum içerirler (163).

Et, deniz ürünleri ve balık da çok iyi birer selenyum kaynağıdır. Az miktarda içme suyunda da bulunur. Öte yandan meyve ve sebzeler (mantar ve sarımsak hariç), süt ve süt ürünleri (yumurta, bazı peynirler, tereyağı hariç), yağlar, içecekler ve pek çok bebek maması selenyum açısından fakir gıdalardır. Hayvanlarda en çok böbrek korteksinde birikir. Kalp kası dışında diğer kaslarda selenyum düşük, karaciğerde ise orta düzeydedir (157, 162).

Türkiye'ye Özgü Beslenme Rehberi (TÖBR) 2004 raporlarına göre yetişkin erkek ve kadının günlük alması gereken selenyum miktarı 55 µg iken; Türkiye Beslenme Rehberi (2015) olarak düzenlenen rehberde bu miktar her iki cinsiyet için 70 µg olarak belirtilmektedir (164, 165).

Diyetle selenyum alımı 7 µg/gün ile 4990 µg/gün arasında değişmekle birlikte; (166) ortalama selenyum alımının Amerika'da 109 µg/gün, (167) İzlanda'da 51 µg/gün, (168) Avustralya'da 71,4 µg/gün (169) olduğu saptanmıştır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, günlük selenyum alım düzeyleri ortalama 30-36,5 µg/gün ve 43-44 µg/gün olarak bulunmuştur (170, 171). Bu sonuçlar ülkemizde diyetle selenyum alımının önerilen miktardan daha az olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda eksiklik bulgularını önlemek için alınması gereken minimum selenyum miktarı 10 µg/gün; tolere edilebilecek maksimum alım ise 400 µg/gün olarak tahmin edilmektedir (172).

Yeni doğanda total glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi ve selenyum düzeyi annelerinden ve diğer erişkinlerden düşüktür. Büyüme çağına olmalarından dolayı bebek ve çocuklarda da düşüktür. Hamile ve emziren kadınlarda selenyum ihtiyacı artmıştır. Bu nedenle eksiklik gelişme riski doğurma çağındaki kadınlarda ve çocuklarda artmıştır. Anne sütündeki selenyum miktarı gıdadakiyle orantılı olup biyoyararlılığı mükemmeldir. Kolostrum ve geçiş sütü olgun süte oranla selenyum içeriği açısından daha zengindir (173, 174).

Selenyum, yaşlılarda total gıda alımında azalmayla orantılı olarak azalır (152). Ayrıca yoğun sigara ve alkol tüketiminin selenyum düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir (174).

Literatürde, lipopolisakkarit enjekte edilerek akut enflamatuar cevabın indüklendiği rat çalışmalarında, serum selenyum konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür. Bu durum akut enflamasyon durumunda selenyum konsantrasyonunda azalma olacağını ve idame edilmesi ihtiyacının doğacağını önermektedir (175).

T-helper farklılaşması serum selenyum seviyesiyle ilgilidir; uygun Th1/Th2 dengesi için optimum selenyum seviyelerinin gerekli olduğu bulunmuştur. Selenyum takviyesinin, Treg hücrelerini artırarak düzenleyici etkileriyle hem aşırı bağışıklığı hem de kronik enflamasyonu önlemeye çalıştığı bilinmektedir (176).

2.4.1.3- Selenyum Metabolizması ve Fizyopatolojisi

Selenyum vücutta duodenum ve proksimal jejunumdan etkili olarak emilir, karaciğer ve eritrositler tarafından hızla alındıktan sonra metabolize olmuş formda plazmaya döner. Eritrositler tarafından indirgenerek plazma proteinlerine bağlanabilecek hale gelir. Alınan selenyumun %55-60'ı idrarla atılır. Toksik seviyelerde ter ve solunumla atılımı önem kazanır (157).

Vücuttaki selenyum düzeyi, serum, plazma ve idrarda selenyum konsantrasyonu ve eritrositlerde glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin aktivitesi değerlendirilerek tayin edilmektedir. En sık kullanılan parametre plazma (veya tam kan) selenyum konsantrasyonudur. Sağlıklı insanda normal değerler ileri derecede değişkenlik göstermekte olup coğrafi duruma, toprak ve gıdalardaki selenyum miktarına bağlıdır. Alınan selenyum miktarının ani azalması plazma konsantrasyonuna ve idrarla atılan selenyum miktarına hemen yansımaktadır. Selenyum konsantrasyonu yüksek olan trombositler kısa ömürleri nedeniyle kısa süreli değişimlere duyarlıdır. GPx aktivitesi ve saç ve tırnaktaki selenyum konsantrasyonları ise uzun süreli selenyum durumu hakkında bilgi verir, kısa süreli selenyum değişikliklerine ise duyarlı değildir (157).

Selenyum için yetişkin bireylerde tolere edilebilecek üst sınır 400 µg/gündür. Selenyum aşırı alımında ilk belirtiler bulantı, kusma ve diyaredir. Birkaç hafta sonra insanlarda saç dökülmesi, tırnaklarda patolojik değişiklikler, gastrointestinal rahatsızlık, bulantı, kusma, nefesin sarımsak gibi kokması, yorgunluk, asabiyet, periferik nöropati, deri döküntüsü ve sinir sisteminin anormal fonksiyonuyla karakterize olan selenozisle sonuçlanır (177, 178).

Selenyum eksikliği durumunda ele alınması gereken konu eksikliğin, organizmanın besinsel ihtiyacı ile diyetdeki biyolojik kullanılabilir element arasındaki dengesizlikten

kaynaklanmakta olduğudur. Selenyum arzı azalmış ya da talebi artmıştır. Jeokimyasal olaylar, endemik yetersizlik sahalarının ve buna bağlı hastalıkların oluşmasına neden olur. Yeme alışkanlıkları da selenyum eksikliğine yol açabilir. Mide salgısını etkileyen patolojiler eser elementlerin emilimini etkileyebilir. Pürifiye parenteral veya enteral beslenme vejetaryen rejimler, bazı mamalarla beslenme ve total parenteral beslenme selenyum eksikliği oluşturabilir (152, 178). Selenyum eksikliği, bazı hastalıkların oluşmasında direkt rol oynayabilir. Selenyum eksikliğinde kardiyovasküler hastalıklar (en tipik örneği Keshan hastalığıdır), iskelet kası tutulumu (miyotonik distrofi, Duchenne tipi müsküler distrofi), karaciğer nekrozu, yetersiz gelişme, katarakt, pankreatik hasar, hemolitik anemi, Glanzmann trombastenisi gibi kan hastalıkları, periodontal hastalık, kistik fibrozis, alkolik siroz, lejyoner hastalığı ve nörolojik dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların risklerinde artış söz konusudur. Düşük selenyum konsantrasyonlarının kanser riskini arttırdığı; desteğinin kanser riskini azalttığı ya da fazla miktarlarının kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir (179, 180, 181, 182).

2.4.1.4- Homeostazis Sağlanmasında Selenyum

Selenyum, selenoproteinlerin bir bileşeni olarak birçok hücresel süreç için önemlidir (183, 184).

in vivo selenyum bileşiklerinin etkinliği, hücre döngüsünün düzenlenmesini etkileme, apoptozu uyarma ve *in vitro* tümör hücresi göçünü ve invazyonunu inhibe etme yetenekleriyle gösterilmiştir (185).

Apoptoz, ökaryotik hücrelerin intihar ettiği ve bir organizmanın normal gelişim ve patolojik koşullar sırasında istenmeyen; kusurlu hücreleri ortadan kaldırmasını sağlayan oldukça korunmuş bir mekanizmadır. İnsanlarda ve hayvanlarda, doku homeostazını sürdürmek için hücre proliferasyonu ve ölümü düzenlenmektedir (186).

Selenyumun hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkisini açıklamak için önerilen birkaç mekanizma vardır ve selenyumun bu süreçlerde anahtar bir rol oynadığı kabul edilmiştir; ancak selenyum mekanizmaları çok karmaşıktır ve tam olarak anlaşılmamıştır. Protein kinaz sinyal iletiminde rol oynar; kaspazların aktivasyonu, p53 fosforilasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile ilgilidir. Yüksek selenyum dozlarıyla indüklenen apoptoz, prostat, kolon ve karaciğer kanseri, lösemi ve lenfoma dahil olmak üzere çeşitli neoplastik hücrelerde tanımlanmıştır. Ayrıca, kemopreventif ve antikanser ajanlar olarak selenyum bileşiklerinin

etkililiğinin, kimyasal formları ve dozları ile ilişkili olduğu da yaygın olarak kabul edilmektedir (187, 188, 189, 190).

Selenyum, doğal olarak organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (sodyum selenit, sodyum selenat) formlarda bulunur (191). Selenit ve selenat *in vivo* olarak selenosisteine çevrilmektedir (192).

Dokularda selenyum “selenometionin” ve “selenosistein” olmak üzere iki farklı formda bulunur. Dokularda sentezlenemeyen selenometionin sadece bitkisel besinler yoluyla alınır, metabolik olarak aktif değildir ve vücutta selenyum yetersizliği meydana geldiğinde kullanılmak üzere depolanır. İnsan vücudu selenometiyoninin %90’ından fazlasını besinlerden ve multimineral takviyelerinden sağlar (193). Selenometiyonin, bağırsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir (194).

Selenoproteinlerde (SelP) bulunan selenosistein selenyumun biyolojik yönden başlıca formudur ve hayvansal kaynaklı besinlerden sağlanır (195). Bununla birlikte, selenosistein, selenoprotein biyosentezi için selenofosfata dönüştürülen hidrojen selenit üretmek için indirgenir. Selenosistein biyolojik pH’da anyonik halde bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar (194). Tüm bu selenobileşikleri hidrojen selenide katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum yoluyla veya trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla atılır (191).

2.4.1.5- Antioksidan Olarak Selenyum

İnsan genomunda 25 selenoprotein geni mevcuttur ve selenoproteinler embriyolojik gelişim ve insan metabolizmasında önemli görevlere sahiptir. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktiviteleriyle birlikte yapısal ve transport fonksiyonları da vardır. Bununla birlikte tioredoksin redüktaz, GPx ve iodo tiroidin deiyodinaz enzimlerinin yapısında yer almaktadır (196).

Tüm dokularda bulunan GPx iki dimerden oluşmuş bir tetramer olup yapısında dört selenyum atomu içerir (197). GPx, hidrojen peroksit lipid peroksidazın redüksiyonunu katalizleyerek hücreleri oksidatif strese korur (198). GPx enziminin yapısında bulunan selenyumun hidrojen peroksit (H_2O_2) ve bazı lipid peroksitlerin zararlı ürünlerini ve hücre içindeki reaktif oksijen radikallerini azaltarak apoptozu başlattığı rapor edilmiştir (199, 200).

Selenyum, selenosistein halinde GPx, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur. GPx, E vitamini ile sinerjik çalışan antioksidan bir enzimdir. İndirgenmiş GPx ile H₂O₂ ve lipid peroksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. Hücre büyümesinin ve tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (201).

Selenometiyonin antioksidan enzimleri ve UCP2 (uncoupling protein 2) protein ekspresyonunu artırır, bu durumda lipid ve proteinlerin sebep olduğu oksidatif hasar azalır (202). Selenyum, superoksit radikallerinin oluşumunu katalize etme kabiliyetine sahiptir; süperoksit oluşturmak için oksijene bir elektron vererek, selenyum atomunun oksidasyonuna neden olur. Oksitlenmiş selenyum atomu daha sonra glutatyon gibi tüm vücut sıvılarında mevcut olan sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girebilir, sülfhidrilin (disülfid bağı oluşumunun) oksidasyonu ile sonuçlanır (203, 204).

2.4.1.6- Selenyumun Kanserden Koruma Özelliği

Selenyum, protein kinaz C, tirozin fosfataz gibi proteinlerin yapısındaki tiyol gruplarının oksidasyonunda ve kanser hücrelerinin apoptozunda rol oynayan çeşitli transkripsiyon faktörlerinde yer almaktadır (205, 206).

Selenyum, kanserojen faktörlerin DNA'ya yapışmasını önler ve tümör büyümesini ve anjiyogenezisi inhibe eder. Selenyumun koruyucu özellikleri konsantrasyonuna ve kimyasal bileşimine bağlıdır, örneğin selenyum-metilselenosistein gibi organik formları düşük toksisite ile kanserin önlenmesinde etkiliyken, mineral yapıdaki selenit kanseri önlemede etkilidir ancak yüksek toksisiteye sahiptir (207, 208, 209).

Prospektif çalışmalar selenyumun akciğer (210), mesane (211), kolorektal (212), karaciğer (213), özofagus, mide-kardiya (214), tiroid (215), ve prostat kanseri (212) riskini azalttığını göstermiştir.

Zen ve ark. selenometiyonin metabolizması tarafından üretilen metilselenolün, fibrosarkom tümör hücrelerini ERK1/2 MAPK yolağı aktivasyonu yoluyla inhibe ettiğini bildirmişlerdir (216).

Bununla birlikte, insan kolon kanseri hücreleri HCT116 ve SW620'de Na selenit aracılığıyla gerçekleşen tümör inhibisyonunun, c-Jun NH2 terminal kinazın (JNK) aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (217).

Selenyumun kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak, reaktif oksijen ürünlerini (ROS) indükleyerek kanser hücrelerinin apoptozunu başlattığı gösterilmiştir. ROS ile indüklenen apoptozun p53'e bağımlı olduğu ve selenyumun kanser hücrelerini tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligant (TRAIL) ve doksorubisin dahil olmak üzere diğer apoptoz indükleyicilere duyarlı hale getirebileceği de gösterilmiştir (218). Kemirgenlerde kemoterapiyle indüklenen oksidatif strese bağlı DNA hasarının ise azaldığı bildirilmiştir (219).

Selenyum ve selenyum içeren yapılar toksik olmayan dozlarda apoptozisi indükleyebilir ve anti-proliferatif etki gösterebilir. Bu yönüyle kanserde kemo-önleyici ve kemoteröpatik etki gösterir (220, 221).

Literatürdeki çalışmalarda, kanserden korunma için 1,5 mmol/l'lik bir serum selenyum konsantrasyonunun gerekli olduğu ileri sürülmüştür (222, 223).

Bununla birlikte selenyum komponentlerinin kemosenstizer olarak kullanılarak, kanser hücresi ABCB1'i inhibe ettiği gösterilmiştir (224).

2.4.1.7- Selenyumun Antienflamatuvar Özelliği

Selenyum, lipopolisakkaritlere yanıt olarak makrofajlar tarafından üretilen TNF- α ve siklooksijenaz-2 seviyelerini azaltır ve adhezyon moleküllerinin (hücreler arası adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü-1) ekspresyonunu aşağı yönde regüle eder. Ayrıca araşidonik asit ve eikosanoidlerin metabolizmasına yardımcı olur. Monosit adezyonunu ve endotel hücrelerinden göçünü azaltır (225).

Selenyum, LPS ile indüklenen nitrik oksit üretimini baskılayarak enflamasyonu azaltmaktadır (226). Selenyumun pro-enflamatuvar sitokin olan TNF- α seviyesini azaltarak NF- κ B'yi inhibe ettiği bulunmuştur. Selenyumun NF- κ B üzerindeki inhibitör mekanizmaları tam anlaşılamamış olsa da NF- κ B, DNA bağlanma aktivitesi için gerekli sistein kalıntılarının redoks kontrolü yoluyla GPx ve tioredoksin redüktaz aktivitesine bağlı olabilir (227).

Son yıllarda selenyum nanopartiküllerine ilgi artmaktadır, çünkü bu nanoparçacıkların düşük toksisite ve mükemmel biyoyararlanım sergilediği bulunmuştur. Wang ve ark. selenyum nanopartiküllerinin NF-KB B'yi bloke ve JNK ile p38 MAPK sinyal yollarının fosforilasyonunu inhibe ederek hücrel nitrik oksit üretiminin azalmasına sebep olduğunu göstermişlerdir. Bu durum selenyum nanopartiküllerinin anti-enflamatuvar özelliğini göstermektedir (228).

2.4.1.8- Selenyumun Antibakteriyel ve Antivirütik Özellikleri

Literatürdeki çalışmalar selenyum nanopartikülü olarak kullanılan organo-selenyumun, intravenöz kateter, kontakt lensler ve ters ozmoz membranları gibi farklı biyomalzemelere ve tıbbi cihazların içeriğine eklendiğinde *Staphylococcus Aureus* ve *Pseudomonas Aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunu engellediğini göstermiştir. Düşük organo-selenyum konsantrasyonları (%0,1 veya %0,2) bu malzemelere bakteriyel bağlanmayı önlemek için yeterli bulunmuştur (203, 204, 229).

Çeşitli çalışmalar nanopartiküller şeklinde elemental selenyumun, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı antimikrobiyal özellikte olduğunu ortaya koymuştur (208, 230, 321).

Mosolygó ve arkadaşlarının 2019'daki çalışmasında metilketon selenoester 9 nanopartikülü, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *C. trachomatis D*'nin farklı suşlarına karşı çok düşük konsantrasyonlarda bile potansiyel antibakteriyel aktivite gösterilmiştir (*Chlamydia trachomatis D* için 0.25 µm) (232).

Nanopartiküller formundaki elemental selenyumun hastane kaynaklı ve tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir patojen olan *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir; hatta bazı araştırmacılar selenyum nanopartiküllerin gümüş nanopartiküllere kıyasla daha düşük toksisite ile daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (233, 234, 235). Ek olarak, organo-selenyumun farklı biyomalzemelere ve tıbbi cihazlara kovalent olarak eklendiği ve *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (204, 229).

Selenyum eksikliği, viral enfeksiyonların insidansı, virülans veya hastalık ilerlemesi ile bağlantılı bulunmuştur (236, 237). Beck ve meslektaşları farelerde selenyum eksikliğinin, RNA virüslerinde mutasyonlara neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, Keshan hastalarında kardiyomiyopati ile sonuçlanan miyokarditin koksaki virüsünün mutasyon geçirmesiyle açıklayabilir (238, 239).

Selenyum eksikliği, HIV ile enfekte hastalarda düşük sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (236). Bununla birlikte, HIV enfeksiyonu olan bireylerde akut faz yanıtı ile kan selenyum konsantrasyonunun düşmesi de düşük serum veya plazma selenyum konsantrasyonuna sebep olabilir (240). Selenyum eksikliğinin koksaki virus, çocuk felci virüsü ve murin influenza virüsünün virülansı artıran mutasyonlara sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar, zayıf

selenyum durumunun daha patojenik virüs suşlarının ortaya çıkmasıyla sonuçlanabileceğini ve bu nedenle hastalıkla ilişkili riskleri ve yükleri artırabileceğini göstermektedir (241).

Moghaddam ve ark. 2020 yılında yayınladıkları çalışmada sistemik selenyum eksikliğinin Covid-19'a bağlı ölüm riskiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (242).

2.4.1.9- Selenyumun Beyin Sağlığı ile İlişkisi

Selenyum beyin sağlığının devamlılığı için çok önemlidir; selenyum eksikliği geri dönüşü olmayan beyin hasarına neden olur (243).

Selenoprotein P, bir yüzey reseptörü olan apoER2'ye bağlanarak selenyumun beyne iletilmesinde özel bir rol oynamaktadır (243). Selenoprotein P sentezleyemeyen farelerde spastisite, anormal hareketler ve spontan nöbetler geliştiği görülmektedir (243, 244).

İnsanlar çalışmaları, selenyumun nöbetler, koordinasyon bozukluğu, Parkinson hastalığı ve bilişsel gerilemedeki bağlantılarını işaret etmektedir. Epileptik nöbetleri olan çocuklarda ve yetişkinlerde ve ateşli nöbet geçiren çocuklarda önemli ölçüde daha düşük serum selenyumu kaydedilmiştir (245, 246, 247).

2.4.1.10- Selenyumun Doğurganlık ve Üreme Sağlığı ile İlişkisi

Erkeklerde GPx4, sperm kuyruğunun orta parçası kılıfını oluşturan mitokondride bulunur. Spermatogenezin erken evresinde, bir peroksidaz olarak GPx4, antioksidan işleviyle spermleri korurken, sonraki evrede, sperm motilitesini sağlamak amacıyla kamçıyı çevreleyen mitokondriyal kılıfın yapısal bir bileşeni olmak için orta parça proteinleri ile çapraz bağlar oluşturur (248). Randomize bir çalışmada, düşük selenyum alımı olan erkeklerin selenyum takviyesi ile (günde 100 µg), sperm hareketliliğini önemli ölçüde artırmıştır (236). Bununla birlikte, yüksek selenyum alımının (günde yaklaşık 300 µg) sperm hareketliliğini azalttığı gösterilmiştir (249).

Kadınlarda ilk trimesterde veya düşük yapmış kadınlarda önemli ölçüde daha düşük selenyum seviyesi kaydedilmiştir (250).

2.4.1.11- Selenyumun Tiroid Fonksiyonu ile İlişkisi

Tiroid bezi tüm dokular arasında en yüksek selenyum konsantrasyonuna sahip olan organdır. Selenyum, tiroid bezinde selenyum bağımlı iyodotironin deiyodinaz ve tiroksinden (T4) triiyodotironin (T3) üretilmesine görev alır. GPx3 yapısındaki selenyum, tiroid hücrelerini,

tiroid peroksidaz tarafından iyodür ve tiroglobulinden T3 ve T sentezinde kullanılmak üzere üretilen hidrojen peroksitten korur (251).

Selenyum otoimmün hipertiroidizmde (Graves hastalığında) semptomların azaltılmasında etkilidir. 6 ay boyunca günde iki kez 100 µg sodyum selenit takviyesi, yaşam kalitesinin artması, daha az göz tutulumu ve Graves orbitopatisinin daha yavaş ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (252).

2.4.1.12- Selenyumun Kardiyovasküler Hastalıklardaki Koruyucu Rolü

Selenoproteinlerin lipidlerin oksidatif modifikasyonunu önlediği, trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve enflamasyonu azalttığıyla ilgili literatür çalışmaları selenyumun kardiyoprotektif etkisini destekler niteliktedir (253). Bununla birlikte 25 gözlemsel çalışmanın meta-analizi, selenyum durumu ile koroner kalp riski arasında anlamlı bir ters ilişki olduğunu göstermektedir (254).

2.4.1.13- Selenyumun İmmün Fonksiyonu

Selenyum eksikliği, antikor üretimi dahil olmak üzere hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığın çeşitli bileşenlerini olumsuz etkiler ve konağın enfeksiyonlara karşı direncini azaltır. İnsanlarda düşük selenyum konsantrasyonları, azalan doğal immün hücre aktivitesi ve artan fırsatçı hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Selenyum takviyesi, aktive edilmiş T hücre proliferasyonu, NK hücre aktivitesi ve sitotoksik lenfosit aracılı tümör sitotoksitesinin arttırılması gibi immünostimülan etkiler göstermiştir (149, 237, 255, 256).

Selenoproteinler, T-hücrelerinin aktivasyonu için gereklidir (257). T hücreleri, oksidatif strese karşı çok hassastır. Yapısında selenoprotein eksikliği olan T hücreleri, reaktif-oksijen türlerinin üretimini baskılamadaki yetersizlikleri nedeniyle, T-hücresi-reseptör stimülasyonuna yanıt olarak çoğalamazlar (257). Skuamöz hücreli karsinomalı hastaların tedavi (ameliyat veya baş ve boyun radyoterapisi) süresince günde 200 µg selenyum (sodyum selenit olarak) takviyesi alması hem tedavi sırasında hem de sonrasında hücre aracılı immün yanıtın önemli ölçüde artmasını sağlamaktadır. Bunun aksine, immün yanıt plasebo alan hastalarda azalmıştır (149).

2.4.1.14- Diş Hekimliğinde Selenyum Uygulamaları

Selenyum, diş hekimliğinde doku onarımında uyarıcı olarak, ROS'a karşı korucu olarak antioksidan özelliğiyle, kollajen üretiminde artış sağlaması yönüyle çeşitli alanlarda kullanım

bulmuştur. Ayrıca selenyumun hücrel devamlılık, protein katlanması ve oksidatif stres yanıtındaki önemli rolü göz önünde alındığında invaziv ve non-invaziv klinik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Selenyum nanopartikülleri, ROS kaynaklı oksidatif hasarı önlemesi, makrofaj proliferasyonunu azaltıp enflamatuvar cevabın kontrolünü sağlayarak kronik periodontal enflamasyondan koruması ve böylelikle implant başarısını arttırması sebebiyle dental implant yüzeylerinde kullanılmaktadır (258).

Nizam ve arkadaşları 2014 yılında insan periodontal ligament (PDL) ve gingival fibroblastları (GF) üzerinde tek başına veya selenyum ile kombine olarak uygulanan a-tokoferolün hem GF'lerde hem de PDLF'lerdeki temel fibroblastik büyüme faktörü ve tip I kollajen seviyelerindeki artışla kollajen üretimini artırabileceğini bulmuşlardır (259).

Bu bulgular, E vitamini ve selenyumun ROS ile indüklenen kollajen yıkımına karşı koruyucu olduğunu gösteren Asman ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu olup E vitamini ve selenyumun kombine kullanılmasının kollajen metabolizması üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (260).

2020 yılında Qataya ve arkadaşları eroziv oral liken planus tedavisinde bukkal mukozaya topikal selenyum uygulamışlardır. Topikal selenyum uygulaması sonrası anlamlı derecede daha az ağrı oluştuğu tespit edilmiştir (261).

Topikal selenyum formülasyonu fikri, kronik sistemik selenyum kullanımının yan etkileri ve selenyum toksisitesi ($>900 \mu\text{g/gün}$) ile selenyum eksikliği ($<30 \mu\text{g/gün}$) arasındaki doz farklılıklarını önlemeye yönelik ortaya çıkmıştır. Topikal selenyum mukoadeziv jelin kullanımıyla birlikte, oral yoldan alınan sistemik etkili selenyumun kronik tüketimi sonucu olası yan etkilerinin ortadan kaldıracağı öne sürülmektedir (262).

SeMet hidrojel, günlük sistemik selenyum alımının ($400 \mu\text{g/gün}$) güvenli üst sınırının yaklaşık %3,5'ine eşdeğer bir miktarda selenyum içerecek şekilde formüle edilmiştir; böylece bukkal dokular üzerindeki olası yan etkinin önüne geçilmesi sağlanmıştır. Ayrıca, selenyumun dokular tarafından daha kolay emilen organik formda (SeMet halde) bulunması sayesinde presistemik eliminasyon gibi farmakokinetik kayıpların önüne geçilmesi amaçlanmıştır. SeMet, aktif amino asit transportu yoluyla absorbe edilir ve selenyum için rezervuar görevi gördüğü yerlerde spesifik olmayan bir şekilde dokulara geçmektedir (263).

Selenyum, periodonsiyum için koruyucu bir eser mineral mikro besin maddesi olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalar, düşük serum selenyum seviyeleri olan diyabetik deneklerde kronik periodontitisin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini bildirmiştir (264).

Literatürde 30-38 yaş arası gingivitis veya periodontitisli hastalarda, dişeti oluğu sıvısı ve serumdaki plazma GPx seviyelerinin incelendiği çalışmada gingivitis veya periodontitisli hastaların sağlıklı olanlara kıyasla daha fazla GPx seviyelerinin olduğu görülmüştür. Ayrıca cerrahi olmayan 6-8 haftalık periodontal tedavi sonrası GPx seviyesinin gingivitis ve periodontitis hastalarında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu durum enflamasyon durumunda GPx seviyesinin arttığını, tedavi halinde ise azaldığını göstermektedir (265).

Selenyum ve selenoproteinlerin hücrel devamlılık, protein katlanması ve oksidatif stres yanıtındaki önemli rolü düşünüldüğünde, kanser gibi kronik hastalıklar gelişmesi sonucu selenoprotein sentezinin veya aktivitesinin değişmesi şaşırtıcı olmamaktadır (266). Thomas ve arkadaşları, tip 2 diabetes mellitus ve periodontal hastalığı olan ve olmayan bireylerin serumundaki glutatyon, katalaz ve selenyum konsantrasyonlarını değerlendirmiştir. Glutatyon, katalaz ve selenyum seviyelerinin, diyabet ve periodontitis hastalarında, sağlıklı gruba kıyasla önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. Periodontitisi olan ve olmayan tip 2 diyabetli hastalar ve periodontitisi olan ancak diyabeti olmayan hastalar kıyaslandığında, periodontitisi olan ancak diyabeti olmayan hastaların plazma antioksidan seviyesi önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur ($p<0,03$). Ayrıca protein karbonil seviyesi (oksidatif stresin bir biyobelirteci) tip 2 diabetes mellitus ve periodontitis hastalarında periodontitis olmayanlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0,07$) (267).

Literatürde diş hekimliğindeki invaziv ve non-invaziv işlemlerde, restoratif materyallerin yapısına eklenen selenyumun biyofilm üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Tran ve arkadaşları, organo-selenyum içeren bir fissür örtücü (SeLECT-DefenceTM)'nin *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus salivarius* biyofilm oluşumunu *in vitro* inhibe etmedeki etkinliğini araştırmışlardır. Organo-selenyum standart polimer kimya yoluyla fissür örtücüye kovalent olarak eklenmiştir. Koloni oluşturan birim (CFU) testi ve konfokal mikroskop ile SeLECT-DefenceTM'nin *S. mutans* ve *S. salivarius* biyofilmelerinin gelişimini tamamen engellediği gösterilmiştir. Anti-biyofilm etkisinin dayanıklılığını değerlendirmek için, SeLECT-DefenceTM 37°C'de PBS içinde 2 ay ıslatılmış ve ıslatma sonrasında biyofilm önleyici etkinin azalmadığı görülmüştür (268).

2019 yılında Amaechi ve arkadaşları organo-selenyum (organo-selenium-containing pit/fissure sealant DenteShield™ (DS)) ve flor içerikli (UltraSeal™ XT Plus (UXT)) iki farklı

fissür örtücünün klinik retansiyon, plak ve çürük oluşumunu engelleme üzerindeki etkilerini kıyaslamışlardır. Elde edilen bulgular her iki ajanın da plak ve çürük oluşumunu önlemede etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca DS Sealent anlamlı derecede daha uzun süre klinik retansiyon göstermiştir (269).

Espaladori ve ark.'nın 2018 yılında kanal içi medikament olarak selenyum kullandıkları çalışmada, 172,94 g/M moleküler ağırlığa sahip olan sodyum selenit tozu kullanılmıştır (270). Literatürde, selenyumun 10 µM üzerindeki konsantrasyonlarda dokular için toksik olduğunu bildirilmiştir (204). Bu çalışmada, selenyumun tek başına veya kalsiyum hidroksit ile kanal içi medikament olarak kullanıldığında kanal içi mikrobiyal yükü azalttığı bildirilmiştir.

Diabetes mellitus, osteoporoz ve osteopeni oluşumuna sebep olabilen bir risk faktörüdür. Delilbaşı ve ark. diyabetli ratlarda intraperitoneal selenyum ile tedavi edilen grupta mandibula kemik yapısının anlamlı derecede daha sağlıklı olduğunu bildirmiştir. Histolojik incelemede selenyum verilmeyen ratların mandibulalarında trabeküler ve kortikal düzensizlik mevcutken selenyum verilen ratların mandibular kemik yapılarının düzenli olduğu görülmüştür (271).

Selenyumun, kanda selenoprotein P'ye bağlı bir cıva (Hg) + selenyum kompleksinin oluşumu ile insanlarda Hg toksisitesine karşı koruyucu etkiler sergilediği öne sürülmüştür. Höl ve arkadaşları amalgam dolgularla ilişkili genel sağlık sorunları açısından selenyum konsantrasyonlarını incelemişler ve amalgam ile ilgili sağlık sorunları olan kişilerin, sağlıklı insanlardan farklı bir selenyum metabolizmasına sahip olabileceğini belirtmişlerdir (272, 273).

3-GEREÇ VE YÖNTEM

'Periapikal lezyonlarda MAPK yolağı; selenyumun etkisi' başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirmek için gerekli olan "Deney Hayvanları Uygulama Sertifikası" programına katılım sonrası bu alanda uygulama yeterlilik belgesi temin edildi (MAKÜ HADYEK). Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.01.2021 tarih ve 01/07 sayılı kararı ile uygun görülen çalışma, Süleyman

Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 8040 proje numarası ile desteklendi.

Tez çalışmasının hipotezi aşağıdaki şekilde kuruldu:

H₁: Periapikal lezyon modelinde sistemik selenyum uygulaması periapikal lezyonlarda enflamasyonla artan otofajik akış ve aktive olan p38 MAPK sinyal iletim süreçlerini baskılar.

3.1- Deney Hayvanları

Bu çalışmada 30 adet 280-400 gr ağırlığında erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar sabit sıcaklık (22±2 °C) ve nem oranında (%55-60) 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta ortam koşullarında Euro type-IV kafeslerde en fazla 5 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Hayvanlar %21 protein içeren hazır standart pelet yem ile bazal miktarda beslenmiştir (*ad libitum*) ve su olarak şehir şebeke suyu kullanıldı. Ratların ağız açıklıklarının, diş boyutlarının, çalışma pozisyonunun, manipülasyon yeterliliğinin laboratuvar şartlarında test edilebilmesi, periapikal lezyon oluşumunun radyografik olarak değerlendirilebilmesi ve oluşan lezyon büyüklüğünün yapılması planlanan analizler için yeterli miktarda olup olmadığının kontrol edilmesi amacıyla 2 adet deney hayvanında ön çalışma yapıldı.

Sarıtekin ve ark.'nın (274) yapmış oldukları çalışmanın ortalama ve standart sapma değerleri alınarak yapılan güç analizine göre (Power: %95, effect size: 0,83) gruplar arasında farklılığın ortaya konulabilmesi için gerekli örnek sayısı 9 olarak belirlenmiş, her bir grupta 10 hayvan kullanılmasına karar verildi

Deney hayvanlarına anestezi için periton içine (intraperitoneal: IP) enjekte edilen %10 Ketamin (Brema %10, Bremer Pharma GmbH, Almanya) %2 Xylazin (Xylazin Bio 2%, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulandı ve anestezi derinliği parmak sıkıştırma testi ile kontrol edildi. Anesteziyi takiben ratların ağız içleri ile alt azı dişleri iyodin solüsyonu ile dezenfekte edildi. Çalışma alanında kullanılacak aletler daha önceden otoklavda steril edildi.

Ratların ağız açıklıklarının, diş boyutlarının, çalışma pozisyonunun, manipülasyon yeterliliğinin laboratuvar şartlarında test edilebilmesi ve periapikal lezyon oluşumunun radyografik olarak değerlendirilebilmesi amacıyla Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'nun kararıyla 28.10.2020 tarihinde bir ön çalışma yapıldı. Ön çalışmada 2 adet ratın alt 1. azı dişlerinin pulparları ekspozite edildi. Ratlar 21. günde sakrifiye

edilerek radyografik olarak değerlendirildi. Bu ön çalışma sonucunda ratların azı dişlerinde pulpa ekspozlarının uygulanabilirliği, konumu, derinliği ve 21. günün periapikal lezyon oluşumu açısından yeterliliği görülmekle birlikte; ratlardan alınan dokuların homojenize edilmesi ve sonrasında RNA izolasyonu ve total protein izolasyonları gerçekleştirilerek sırasıyla RT-PCR temelli gen ifadesi çalışmaları ve SDS-PAGE’i takiben sürdürülen Western blotlama çalışmalarıyla protein ifadelerindeki değişimlerin inceleneceği çalışmalar sürdürüldü. Bu ön çalışma kapsamında elde edilen bulgular 21 günlük periapikal lezyon indüksiyonunun yetersiz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışma süresinin ratların Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul izni (26.11.2020 tarih 09 toplantı ve 08 karar sayılı) alınarak literatürdeki bazı çalışmalarda (275, 300) olduğu gibi 28 gün olarak belirlendi.

Buna bağlı olarak 30 adet yetişkin erkek ratın alt çene sağ ve sol toplam 60 adet 1. büyük azı dişi seçildi, hayvanların canlı ağırlıkları ölçülerek kuyruk kısımlarından numaralandırıldı ve anestezi dozları hesaplandı (Tablo 1).

Deney hayvanları her bir grupta 10 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (Tablo 1).
Gruplar;

1-Negatif kontrol grubu (n=10): Rat dişlerine herhangi bir işlem uygulanmamıştır. 28 gün boyunca 0,5-1 ml hacimde intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla serum fizyolojik (SF) uygulandı.

2-Pozitif kontrol grubu (n=10): Rat alt sağ ve sol 1. büyük azı dişlerinde pulpa ekspozu oluşturularak periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş ve 28 gün boyunca her gün bir doz 0,5-1 ml hacimde ip SF uygulandı.

3-Selenyum grubu (n=10): Rat alt sağ ve sol 1. büyük azı dişlerinde pulpa ekspozu oluşturularak periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş ve 28 gün boyunca her gün bir doz 0,5-1 ml hacimde 0,1 mg/kg dozunda ip selenyum (**Sodium selenate, anhydrous, 99.8+% (metals basis) Alfa Aesar, Massachusetts, ABD**) uygulandı.

Gruplar	0-27. gün	28. gün
Negatif kontrol	PAL oluşturulmadan her gün IP 0,1 mg /kg SF	SAK
Pozitif kontrol	PAL indüklenecek ve her gün 0,1 mg /kg IP SF	SAK

Selenyum grubu	PAL indüklenecek ve her gün 0,1 mg /kg IP Selenyum	SAK
-----------------------	--	-----

Tablo 1. Deney grupları ve uygulamaları. (PAL: Periapikal lezyon, IP: İntraperitoneal SF: Serum Fizyolojik, SAK: Sakrifikasyon)

Pozitif kontrol ve selenyum gruplarındaki 20 adet ratın alt sağ ve sol 1. büyük azı dişlerinin pulpaları, serum fizyolojik soğutmalı düşük devirli döner alete (35.000 devir/dk) takılan ISO 010 ve 006 (NTI, Kahla, Almanya) çelik rond frezler ile okluzal yüzeylerde sınıf I kaviteler hazırlanarak ekspozite edildi. Kök kanallarının açıklığı 10 numaralı K eğesi (Thomas, Bourges, Fransa) ile kontrol edildi. Periapikal lezyon oluşumu için okluzal kaviteler 28 gün boyunca ağız boşluğuna açık bırakıldı.



Resim 1. Çalışma sırasında alt 1. azı dişine ulaşımın sağlanması amacıyla ön dişler ve dilin ekarte edilmesi.



Resim 2. Alt 1. azı diş pulpasının ekspoz edilmesi.



Resim 3. Çalışmada kullanılan bir ratın ağırlık ölçümünün yapılması.

Ratlar		Negatif Kontrol				Pozitif Kontrol				Selenyum			
		0. Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	28. Gün	0. Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	28. Gün	0 Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	28. Gün
1	Ağırlık (gr)	280	272	270	273	298	295	294	298	372	370	358	360
	Ketamin/ Xylazine (mg)	28,0 2,80	-	-	27,3 2,73	29,8 2,98	-	-	29,8 2,98	37,2 3,72	-	-	36,0 3,60
	Selenyum (mg)	0,028	0,028	0,028	0,0273	0,0298	0,0298	0,0298	0,0298	0,0372	0,0372	0,0372	0,0372
	Serum (ml)	0,0028	0,0028	0,0028	0,00273	0,00298	0,00298	0,00298	0,00298	0,00372	0,00372	0,00372	0,00372
2	Ağırlık (gr)	365	365	363	370	305	292	294	305	315	311	305	296
	Ketamin/ Xylazine (mg)	36,5 3,65	-	-	37,0 3,70	30,5 3,05	-	-	30,5 3,05	31,5 3,15	-	-	29,6 2,96
	Selenyum (mg)	0,0365	0,0365	0,0363	0,037	0,0305	0,0292	0,0294	0,0305	0,0315	0,0311	0,0305	0,0296
	Serum (ml)	0,00365	0,00365	0,00363	0,0037	0,00305	0,00292	0,00294	0,00305	0,00315	0,00311	0,00305	0,00296
3	Ağırlık (gr)	330	324	325	323	307	301	295	300	341	330	333	328
	Ketamin/ Xylazine (mg)	33,0 3,30	-	-	32,3 3,23	30,7 3,07	-	-	30,0 3,00	34,1 3,41	-	-	32,8 3,28
	Selenyum (mg)	0,033	0,0324	0,0325	0,0323	0,0307	0,0301	0,0295	0,03	0,0341	0,033	0,0333	0,0328
	Serum (ml)	0,0033	0,00324	0,00325	0,00323	0,00307	0,00301	0,00295	0,003	0,00341	0,0033	0,00333	0,00328
4	Ağırlık (gr)	320	313	305	270	290	274	266	270	313	302	307	315
	Ketamin/ Xylazine (mg)	32,0 3,20	-	-	27,0 2,70	29,0 2,90	-	-	27,0 2,70	31,3 3,13	-	-	31,5 3,15
	Selenyum (mg)	0,032	0,0313	0,0305	0,0270	0,0290	0,0274	0,0266	0,0270	0,0313	0,0302	0,0307	0,0315
	Serum (ml)	0,0032	0,00313	0,00305	0,00270	0,00290	0,00274	0,00266	0,00270	0,00313	0,00302	0,00307	0,00315
5	Ağırlık (gr)	275	271	286	285	255	246	240	250	316	308	315	310
	Ketamin/ Xylazine (mg)	27,5 2,75	-	-	28,5 2,85	25,5 2,55	-	-	25,0 2,50	31,6 3,16	-	-	31,0 3,10
	Selenyum (mg)	0,0275	0,0271	0,0286	0,0285	0,0255	0,0246	0,0240	0,0250	0,0316	0,0308	0,0315	0,0310
	Serum (ml)	0,00275	0,00271	0,00286	0,00285	0,00255	0,00246	0,00240	0,00250	0,00316	0,00308	0,00315	0,00310
6	Ağırlık (gr)	380	385	381	390	350	340	341	349	360	351	352	351
	Ketamin/ Xylazine (mg)	38,0 3,80	-	-	39,0 3,90	35,0 3,50	-	-	34,9 3,49	36,0 3,60	-	-	35,1 3,51
	Selenyum (mg)	0,0380	0,0385	0,0381	0,0390	0,0350	0,0340	0,0341	0,0349	0,0360	0,0351	0,0352	0,0351
	Serum (ml)	0,00380	0,00385	0,00381	0,00390	0,00350	0,00340	0,00341	0,00349	0,00360	0,00351	0,00352	0,00351
7	Ağırlık (gr)	393	394	393	400	315	317	314	308	267	255	256	253
	Ketamin/ Xylazine (mg)	39,3 3,93	-	-	40,0 4,00	31,5 3,15	-	-	30,8 3,08	26,7 2,67	-	-	25,3 2,53
	Selenyum (mg)	0,0393	0,0394	0,0393	0,0400	0,0315	0,0317	0,0314	0,0308	0,0267	0,0255	0,0256	0,0253
	Serum (ml)	0,00393	0,00394	0,00393	0,00400	0,00315	0,00317	0,00314	0,00308	0,00267	0,00255	0,00256	0,00253
8	Ağırlık (gr)	284	277	282	290	302	302	300	305	312	313	312	319
	Ketamin/ Xylazine (mg)	28,4 2,84	-	-	29,0 2,90	30,2 3,02	-	-	30,5 3,05	31,2 3,12	-	-	31,9 3,19
	Selenyum (mg)	0,0284	0,0277	0,0282	0,0290	0,0302	0,0302	0,0300	0,0305	0,0312	0,0313	0,0312	0,0319
	Serum (ml)	0,00284	0,00277	0,00282	0,00290	0,00302	0,00302	0,00300	0,00305	0,00312	0,00313	0,00312	0,00319
9	Ağırlık (gr)	345	330	327	330	276	-	-	-	285	276	285	285
	Ketamin/ Xylazine (mg)	34,5 3,45	-	-	33,0 3,30	27,6 2,76	-	-	-	28,5 2,85	-	-	28,5 2,85
	Selenyum (mg)	0,0345	0,0330	0,0327	0,0330	0,0276	-	-	-	0,0285	0,0276	0,0285	0,0285
	Serum (ml)	0,00345	0,00330	0,00327	0,00330	0,00276	-	-	-	0,00285	0,00276	0,00285	0,00285
10	Ağırlık (gr)	395	403	420	417	355	343	343	357	300	295	297	301
	Ketamin/ Xylazine (mg)	39,5 3,95	-	-	41,7 4,17	35,5 3,55	-	-	35,7 3,57	30,0 3,00	-	-	30,1 3,01
	Selenyum (mg)	0,0396	0,0403	0,0420	0,0417	0,0355	0,0343	0,0343	0,0357	0,0300	0,0295	0,0297	0,0301
	Serum (ml)	0,00395	0,00403	0,00420	0,00417	0,00355	0,00343	0,00343	0,00357	0,00300	0,00295	0,00297	0,00301

Tablo 2. Ratların deney süresince ölçülen ağırlıkları ve ağırlıklara göre hesaplanan anestezi, serum ve selenyum dozları.

3.2- Selenyum ve serum solüsyonlarının hazırlanması ve uygulanması

Selenyum, 10 ml %0,9 NaCl solüsyonu içerisinde 1 mg olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon selenyum grubundaki ratların ağırlıklarına göre (0,1 mg/kg) 28 gün boyunca her gün öğle saatlerinde (12.00-13.00) tek doz IP olarak verildi. Uygulama solüsyonu günlük olarak hazırlandı ve bekletilmeden uygulandı. IP uygulamalar 0.45 x 13 mm iğneye sahip insülin enjektörleri (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye) kullanılarak yapıldı.

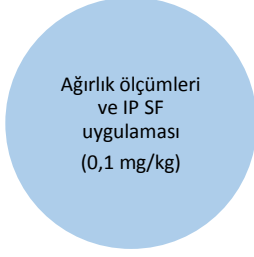
Negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki ratlara ise 28 gün süreyle selenyum grubundakine eşit hacimde 0,1 mg/kg IP serum uygulandı.



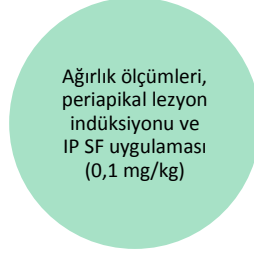
Resim 4. Selenyum solüsyonunun IP olarak uygulanması.

0. GÜN

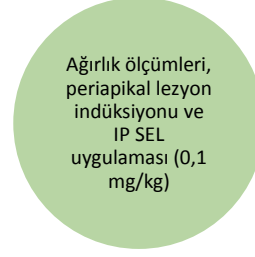
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

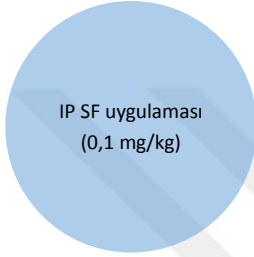


SELENYUM

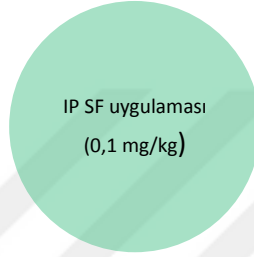


1. GÜN

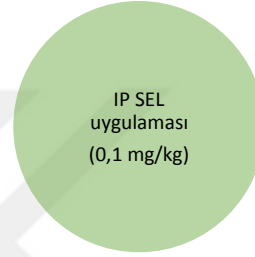
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

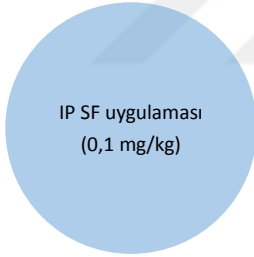


SELENYUM

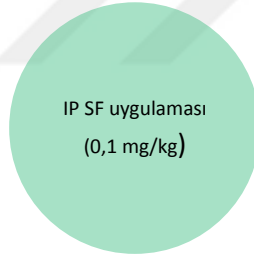


2-10. GÜNLER

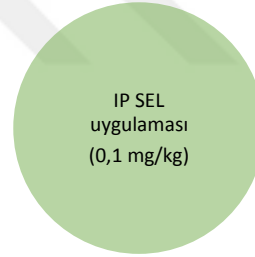
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

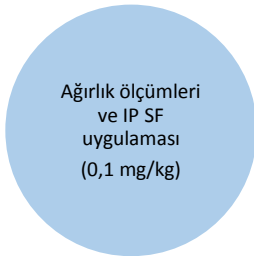


SELENYUM

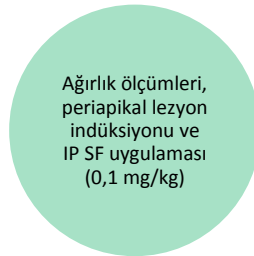


11. GÜN

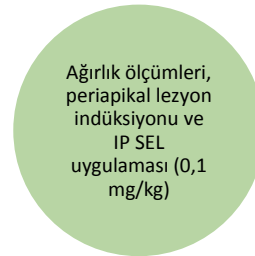
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

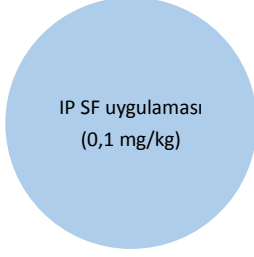


SELENYUM

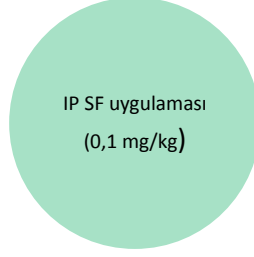


12-20. GÜNLER

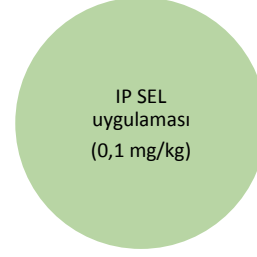
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

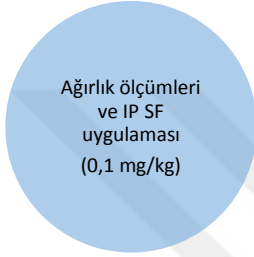


SELENYUM

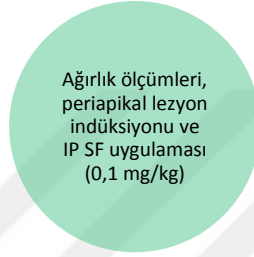


21. GÜN

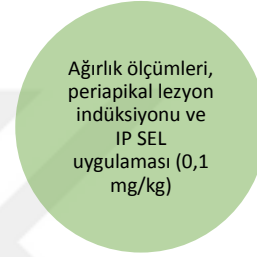
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL

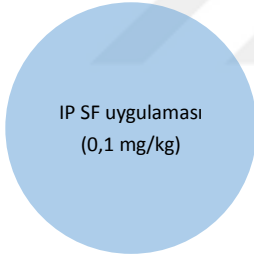


SELENYUM

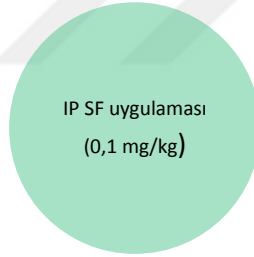


21-28. GÜNLER

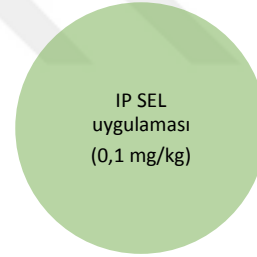
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL



SELENYUM

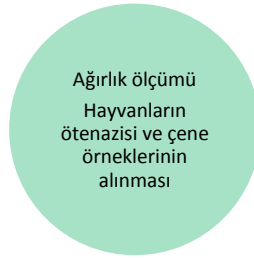


28. GÜN

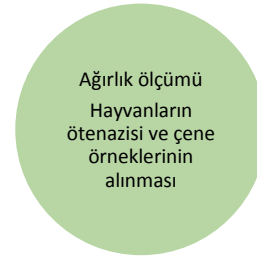
NEGATİF KONTROL



POZİTİF KONTROL



SELENYUM



Tablo 3. Deney akışı.

3.3- Hayvanların ötenazisi

Deney süresi olan 28 gün boyunca deney prosedürü itinalı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneyin 5. günü pozitif kontrol grubuna dahil olan ratlardan birisi öldü.

Yirmi sekiz gün sonunda hayvanlar %10'luk Ketamin (Brema %10, Bremer Pharma GmbH, Almanya) ve %2 Xylazin (Xylazin Bio 2%, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) anestezisini takiben sakrifiye edildi (resim 5). Ötanazi yöntemi olarak cerrahi kanatma (egzanguinasyon) tekniği kullanıldı. Sağ ve sol 1. büyük azı dişleri ile beraber sağ ve sol alt çene kemikleri kafatasından ayrıldı ve çevre yumuşak doku artıkları temizlendi (resim 6).



Resim 5. Deney hayvanlarına anestezi uygulanması.



Resim 6. Sakrifikasyondan sonra yumuşak dokuları uzaklaştırılmış alt çeneler.

Histopatolojik inceleme yapılacak sağ mandibula örnekleri daha önceden hazırlanan numaralandırılmış, %10'luk formaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içeren steril kaplara yerleştirildi (resim 7). Gen ve protein ifadesi düzeyindeki çalışmalarda kullanılacak olan sol çene örnekleri trimlenerek steril eppendorf tüplerine aktarılarak çalışmaların yapılacağı güne kadar -80 °C saklandı.



Resim 7. Formaldehit içeren numaralandırılmış kaplara yerleştirilen alt çene örnekleri.

3.4- Radyografik İnceleme

Sağ ve sol alt 1. büyük azı dişlerin periapikal bölgelerinin radyografik olarak değerlendirilmesi amacıyla, aktif alanı 1050x690 piksel olan dijital sensör (ProSensor, Planmeca OY, Helsinki, Finlandiya) ve 70 Kvp, 7 mA, 0,12 saniye ekspoz süresine ayarlı röntgen cihazı (INTRA, Planmeca OY, Helsinki, Finlandiya) kullanılarak periapikal dijital radyografiler alındı. Tüm örneklerden aynı açı ve aynı uzaklıktan standart radyografiler alınabilmesi için sabit bir düzenek hazırlandı (resim 8).

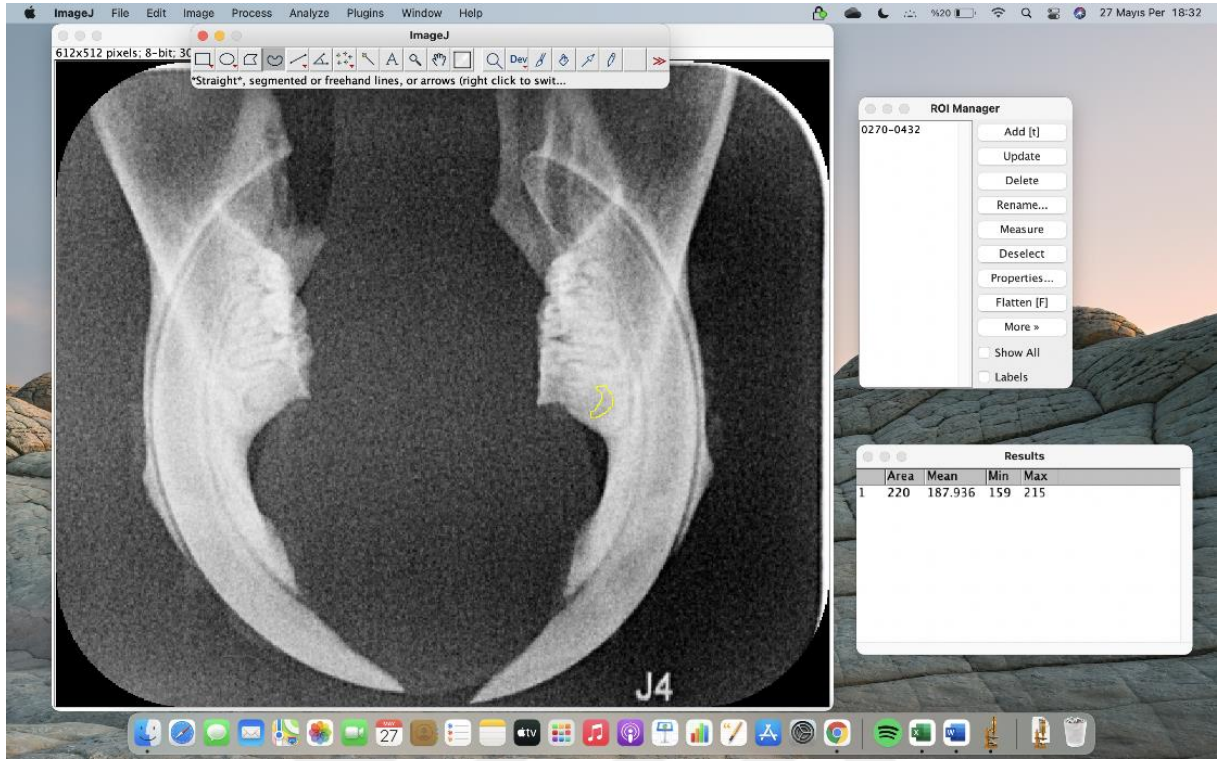


Resim 8. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenek.



Resim 9. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenekte çenelerin konumlandırılması.

Dijital görüntüler Image J (version 1.48, National Institute of Health, ABD) görüntü analiz programına aktarıldı. Program, uzunluğu (mm) ve piksel değeri bilinen bir skala yardımı ile kalibre edildi. Meziyal kök ile ilişkili periapikal lezyon sınırları programdaki serbest çizim aracı ile belirlendi, program tarafından otomatik olarak hesaplanan lezyon alanı (mm^2) ve piksel değerleri kaydedildi (resim 10).



Resim 10. İmage J programı kullanılarak periapikal lezyon boyutu ve piksel değerlerinin hesaplanması.

3.5- Histopatolojik inceleme

3.5.1- Histopatolojik Değerlendirme için Örneklerin Hazırlanması

Nekropsi sırasında toplanan ve diş üzerinde defekt oluşturulmuş sağ mandibula örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için 1 hafta boyunca tespit edildi. Ardından 2 hafta boyunca EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma, St. Louis, MO, ABD) (0,1 M) solüsyonunda dekalsifiye edildi. Yumuşayan çene örnekleri trimlenerek doku takip kasetlerine alındı. Kaset içindeki örnekler bir gün boyunca akan su altında yıkandı. Ardından rutin doku takip prosedürüne alındı. Bu amaçla gece boyunca dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek ertesi sabah parafine bloklandı. Doku takibi için Leica ASP300S model tam otomatik ve kapalı sistem ototeknikon cihazı kullanıldı. Parafin bloklar buzdolabında 4-5 saat soğutulduktan sonra tam otomatik Leica 2155 model rotary mikrotomda (Leica 2155 rotary microtome; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Almanya), tüm örneklerden 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlerin bazıları normal lamlara histopatolojik incelemeler için alınırken bir kısmı

polilizinli lamlara immunohistokimyasal incelemeler için alındı. Bir gece oda ısısında kurumaları için tutulan kesitler ertesi gün boyama prosedürüne alındı. Normal lamlara alınan 3 seri kesitin bir serisi hematoksilen eozin, bir serisi Picro Sirius Red ve bir serisi Gram boyama prosedürü için kullanıldı. Bu amaçla üç seri kesitte deparafinize ve rehidre edildi. Bu işlemler için doku kesitleri 3 ayrı ksilol serisinden 30'ar dakika süreyle geçirilerek dokulardaki parafin tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere geçirilerek ve sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkollere aktararak kesitlere su verildi. Daha sonra rutin boyama için kesitler hematoksilenle (15 dakika) ve eozinle (3 dakika) boyandı. Bağ doku reaksiyonu değerlendirilmesi için Picro Sirius Red metodu ile hazır kit kullanılarak (ab150681, Abcam, İngiltere) üretici firma talimatlarına göre boyandı. Bu amaçla deparafinize ve rehidre edilen kesitlerin üzeri tamamen Picro Sirius Red solüsyonu ile kapatılıp 30 dakika bekletildi. Ardından 2 defa asetik asit solüsyonunda yıkandı. Gram boyama için Bio-optica (04-100803, Bio-optica, İtalya) firmasını hazır boya kitleri üretici firma tavsiyelerine göre boyandı.

Boyama işleminin ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilerek dokuların suyu alındı. Parlatmak için ksilolden geçirilen dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Olympus CX21 model ışık mikroskopunda (CX21, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) incelenen preparatlar Olympus DP26 model kamera ile mikroskopik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Histopatolojik inceleme için her hayvanın çene örneği 2 değişik düzeyde seri kesitler alınarak incelendi. Değerlendirmede Nossa ve ark.'nın (276) kullandığı semikantitatif skorlama yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Buna göre;

0: Normal pulpanın, sağlam odontoblastların bulunduğu, infiltrasyonun, hiperemi ve ödemin bulunmadığı durumlarda,

1: Hafif infiltrasyon, hafif hiperemi ve ödem durumlarında,

2: Orta şiddette infiltrasyon, hiperemi ve ödemin bulunduğu veya hafif nekrozun olduğu durumlarında,

3: Şiddetli infiltrasyon, hiperemi ve ödemin bulunduğu veya belirgin nekrozun olduğu durumlarında, kullanıldı.

3.6- Histomorfometrik Analiz

Dijital görüntüler Image J (version 1.48, National Institute of Health, ABD, <https://imagej.nih.gov>) görüntü analiz programına aktarıldı. Program, uzunluğu (mm) ve piksel değeri bilinen bir skala yardımı ile kalibre edildi. Mezyal kök ile ilişkili periapikal lezyon sınırları programdaki serbest çizim aracı ile belirlendi, program tarafından otomatik olarak hesaplanan lezyon alanı (mm²) ve piksel değerleri kaydedildi (resim 32). Negatif kontrol grubuna ait tüm örneklerde, mezyal kökün periapikal bölgesinde 0,216 mm² çapında standart bir alan seçilerek piksel değerleri kaydedildi.

3.7- İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal incelemeler için polilizinli lamlara çekilerek hazırlanan 6 ayrı seri kesite streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulandı. Bu işlem için kaspaz-3 [anti-caspase-3 antibody (ab4051), (Abcam, İngiltere)]; Cox-2 [COX2 (D-5) antibody (sc-514489), Santa cruz, ABD)]; HIF-1 [FIH-1 (A-5) antibody (sc-271780), Santa cruz, ABD)] ve IL-6 [anti-IL6 antibody, (ab9324)] kullanıldı ve primer antikorlar 1/100 dilüsyonda uygulandı. Sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak DAB (3,3-diaminobenzidine) (Abcam, İngiltere) kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için kesitler deparafinize ve rehidre edildi. Testin tüm aşamalarında kesitler nemli kamaralar içinde tutuldu. Rehidre edilen kesitler, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dakika muamele edildi. Bu işlemten sonra kesitler 10'ar dakika süreyle iki defa tamponlu fosfat solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkandı, nonspesifik antijenik boyamaları önlemek için 45 dakika boyunca ticari normal keçi serumunda (bloking) inkübe edildi. Ardından kesitler yıkama yapılmaksızın primer antikorlar ile kaplandı ve bir gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün dokular aynı şekilde PBS ile yıkandıktan sonra 30 dakika süreyle streptavidin ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra tekrar iki defa 10'ar dakika olmak üzere yıkama işlemi uygulandı. Dokular 30 dakika boyunca biotinli serum ile inkübe edilip aynı şekil ve süreyle yıkandı. Ardından taze hazırlanmış olan DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride) substratı 15 dk süreyle uygulandıktan sonra harris hematoksilin ile karşıt boyama yapılarak boyama prosedürü tamamlandı. Alkol serilerinden geçirilen dokular dehidre edildikten sonra ksilolde parlatıldı ve özel yapıştırıcı (Entellan- Merck) ile lamel kapatıldı. Aynı şartlarda aynı prosedüre uyularak boyanan kesitler ışık mikroskopunda (Olympus CX41) değerlendirildi. Negatif kontroller için primer serum yerine antikor sulandırma sıvıları konuldu. Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation,

Tokyo, Japan) kullanılarak mikrofotografi ve morfometrik inceleme yapıldı. İmmunohistokimyasal boyanma şiddeti 0 ile 3 arasında semikantitatif olarak skorlandı, 0= negatif, 1=hafif ekspresyon, 2=orta ekspresyon ve 3=şiddetli ekspresyon olarak değerlendirildi. Skorlara istatistik analiz yapılarak gruplar arasındaki fark değerlendirildi.

3.8- Bakteri kolonizasyonu- Gram boyama

Diş kronunda, diş kanalında ve diş kökündeki lezyonun bulunduğu bölgelerde bakteri lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla kesitlere Gram boyama metodu uygulandı. Bakteri yoğunluğunun belirlenmesi için De Rossi ve ark.'nın (277) skorum sistemi kullanıldı. Buna göre 0=bakteri yok; 1=diş kronunda bakteri; 2=koronal bölgede bakteri; 3=orta bölgede bakteri; 4=apikal bölgede bakteri; 5=periapikal lezyonda bakteri bulunduğu durumlarda kullanıldı.

3.9- Alveolar kemik kaybı analizi

Alveolar kemik kaybının tespiti için, diş kökü ile en yakın kemik doku arası dijital olarak mikroskop altında ölçüldü ve bu her bir hayvan için tekrar edilerek elde edilen verilere istatistik analiz uygulanarak gruplar arasındaki farklar hesaplandı. Lezyon alanları da ölçülerek sonuçların istatistik analizleri yapıldı.

3.10- Gen ve Protein İfadesi Düzeyleri Analizleri

3.10.1- Gen İfadesi Analizleri

3.10.1.1- Doku Homojenizasyonu

Sakrifiye edilen ratların sol alt 1. molar dişlerini içeren kemik kısmı, gen ifadesi düzeyindeki değişimlerin inceleneceği analizler için separe kullanılarak ayrılmış ve RNase/DNase-free ependorf tüplere yerleştirilerek -80 °C'de saklanmıştır. İlgili çene bölümlerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirebilmek amacıyla örnekler öncelikli olarak sıvı nitrojen içerisinde dondurulup (-196 °C) önceden soğutulmuş havanda ezilerek kemik tozu haline getirildi. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni izolasyon işlemi sonrasında yürütülecek olan çalışmalarda herhangi bir kimyasal girişim kaçınmak içindir. Ayrıca konvansiyonel olarak sert dokuların homojenizasyonunda kullanılan bilyalı öğütücünün tercih edilmemesinin nedeni ise numune miktarlarımızın çok küçük olması ve bu nedenle olası örnek kayıpların önüne

geçilmesidir. Bu kapsamda sürdürülen tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işlemini takiben doku örneklerinden total RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.



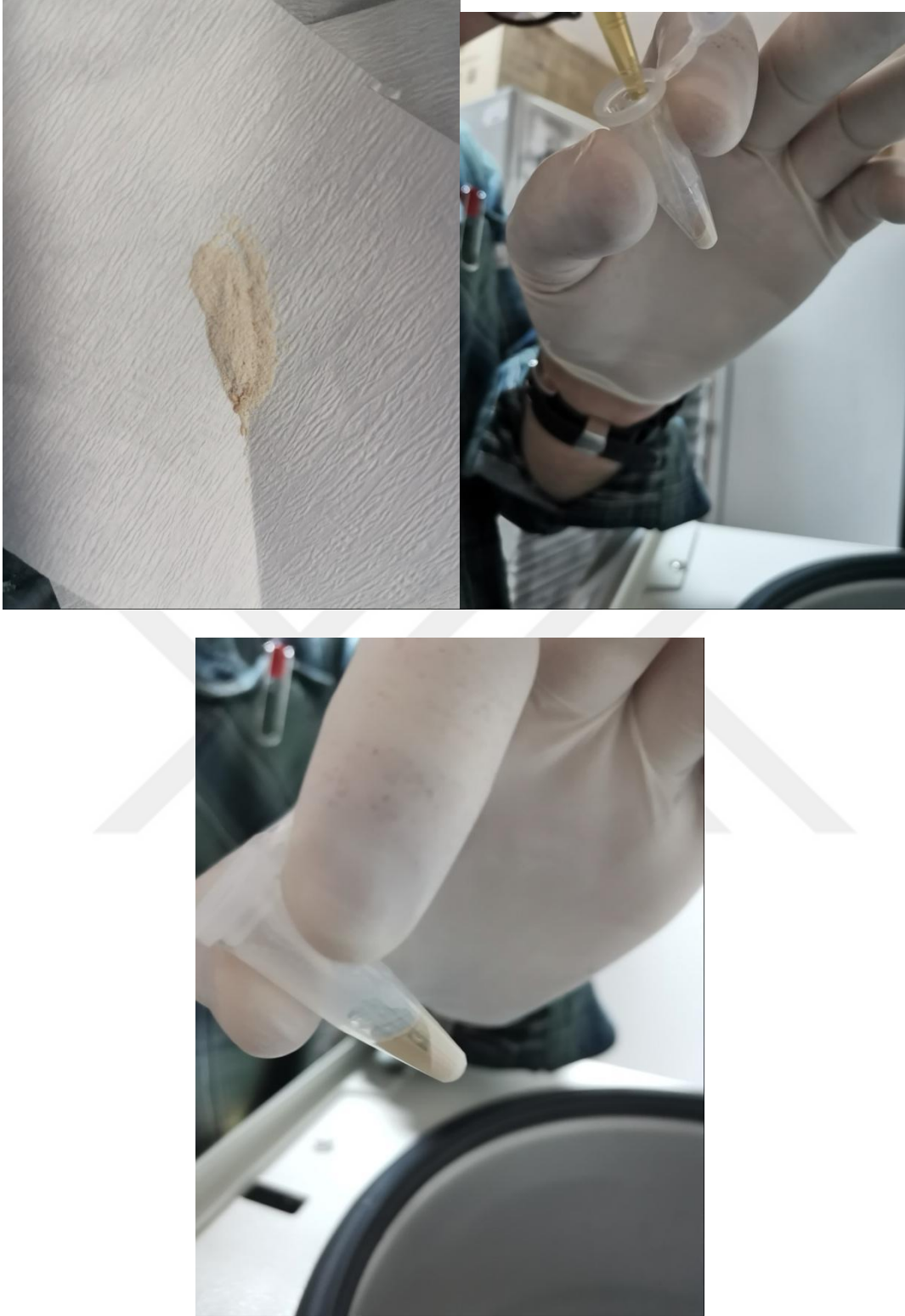
Resim 11. Alt birinci molar diş ve çevresindeki kemik dokunun önceden soğutulmuş havan ve havan eli yardımıyla homojenize edilmesi.

3.10.1.2- RNA İzolasyonu

RNA izolasyonları Monarch® RNA Miniprep Kit (T2010S, New England Biolabs) kullanılarak gerçekleştirildi. Protokol aşamaları üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiş olup örneklerin homojenizasyonu, RNA'nın bağlanması ve elüsyonu adımlarını içermektedir.

3.10.1.3- Örneklerin Homojenizasyonu

Havanda dövülerek kemik tozu haline getirilen çene örneklerinin homojenizasyonunda her 10 mg doku için 300-600 µl 1xDNA/RNA Protection Reagent (T2010S New England Biolabs) kullanıldı. Her 300 µl DNA/RNA Protection Reagent (T2010S New England Biolabs) için ise 30 µl proteinaz K Reaction Buffer ve 15 µl Proteinaz K kullanıldı. Homojenize doku 55 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra vortekslenmiş; daha sonra 2 dakika boyunca 16,000 x g'de santrifüj edildi ve pellet kısmı uzaklaştırılarak supernatant kısım RNase-free mikrofüj tüpüne transfer edildi.

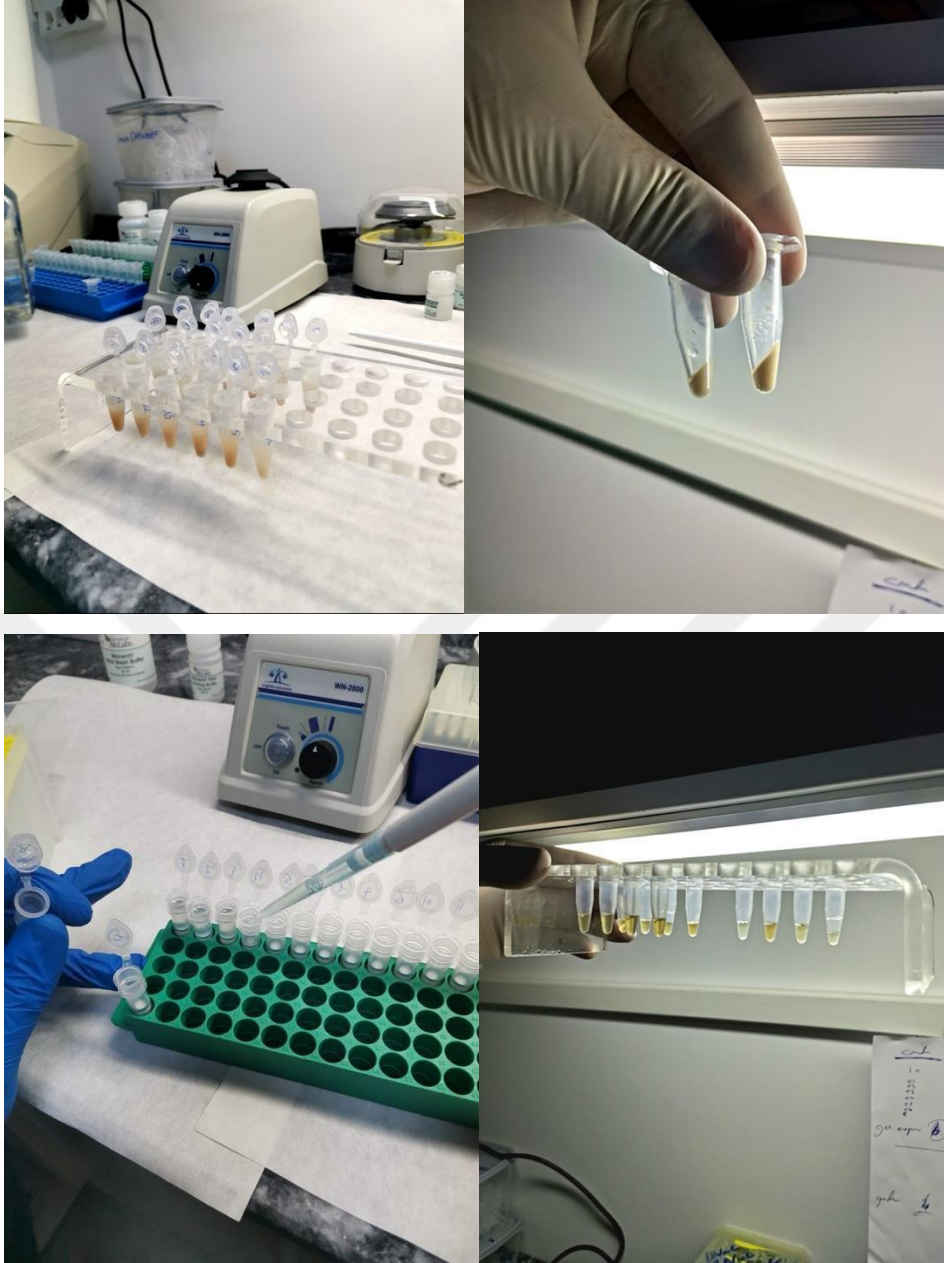


Resim 12. Homojenize edilen doku örneklerindeki hücrelerin liziz tamponu ile muamele edilmesi.

3.10.1.4- RNA Bağlanması-Elüsyonu

Genomik DNA (gDNA)'nın uzaklaştırılacağı kolona önceki adımdan elde ettiğimiz örnek transfer edildi. Bu yol ile örneğimiz içerisinde yer alan gDNA kolona bağlanarak uzaklaştırıldı. Kolon 30 saniye süresince 16,000 x g'de santrifüjlendi. Kolondan geçerek alt bölümde toplanan sıvı kısmın üzerine eşit hacimde etanol eklendi ve bu karışım RNA saflaştırma kolonuna transfer edildi. Kolon 30 saniye süresince 16,000 x g'de santrifüjlendi. Kolonun alt bölümde biriken sıvı faz uzaklaştırılarak kolona 500 µl RNA Wash Buffer eklendi ve 16,000 x g'de santrifüjlendi. Bu işlemi takiben kolona 5 µl DNase I ve 75 µl DNase I Reaction Buffer karışımı pipetlenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adımda kolonda kalmış olan gDNA uzaklaştırılarak olası gDNA kontaminasyonunun önüne geçildi. Takiben kolona 500 µl RNA Priming Buffer eklenerek 30 saniye 16,000 x g'de santrifüjlendi; akabinde 500 µl RNA Wash Buffer eklenip 30 saniye süresince 16,000 x g'de santrifüjlendi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Son basamakta kolon RNase-free bir eppendorf tüpüne aktarılarak 30-100 µl Nuclease-free Water eklenerek 30 saniye süresince 16,000 x g'de gerçekleştirilen işlem ile saf RNA elüye edildi.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi için spektrofotometrede A260/280 ve A260/A230 absorbans değeri ölçülmüştür. Bu oranlar izole edilmiş olan RNA içindeki organik kontaminantların varlığını göstermek için kullanılmaktadır. A260/A230 oranının normal aralıktan düşük olması karbonhidrat, fenol, Guanidin artığı; A260/280 oranının normal aralıktan düşük olması ise protein veya fenol kontaminasyonu ile ilgilidir. Saf RNA örneklerinde A260/280 oranı yaklaşık olarak 2,0'dır. RNA örneklerimizin saflığının belirtilen aralıklarda olduğu görüldü. İzole edilen RNA örneklerinin µg/µl cinsinden konsantrasyonları ve saflık oranları belirlendikten sonra -80 °C'de saklandı.



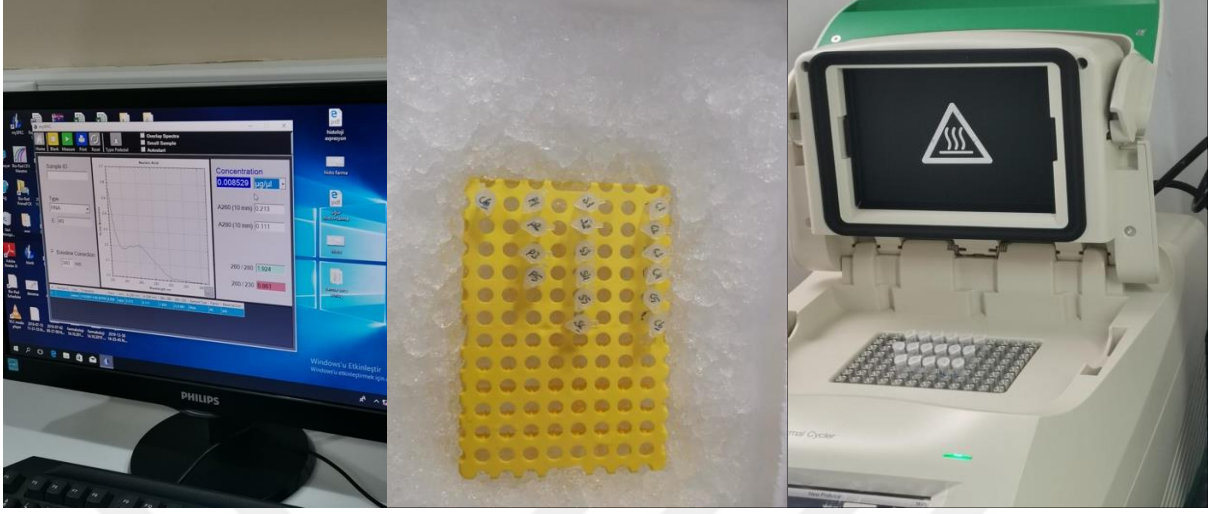
Resim 13. Lize edilen doku örneklerinden süpernatant kısmının eldesi ve devamında RNA izolasyonu işlemlerinin sürdürülmesi.

3.10.1.5- cDNA Sentezi

İzole ettiğimiz RNA örneklerinden cDNA sentezi yapmak üzere iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Lab, Hercules, CA) kullanıldı. Bu aşamada üretici firmanın talimatları takip edildi.

Bu doğrultuda cDNA sentezi için 1 μ g RNA, 4 μ l 5x iScript reaksiyon miksi, 1 μ l iScript revers transkriptaz enzimi RNase free bir tüp içerisinde bir araya getirilerek son hacim RNase/DNase free water 25 μ l'ye tamamlandı. Daha sonra karışımlar 25°C'de 5 dakika,

46°C’de 20 dakika, 95°C’de 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Elde edilen cDNA’lar gen ifadesi çalışmaları yapılınca kadar -20°C’de saklandı.



Resim 14. İzole edilen RNA örneklerinden PCR cihazı ile cDNA sentez işleminin gerçekleştirilmesi.

3.10.1.6- Konvansiyonel PCR

Sipariş edilen primer dizilerinin özgüllüğünün ve reaksiyon koşullarının test edilmesi için konvansiyel PCR işlemi ve takiben elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde ayrıştırılması ve UV transimülatör ile görüntülenmesi adımları takip edilmiştir.

PCR işlemlerinde her bir cDNA örneğinden 1 µl, DNA polimeraz enzimi içeren reaksiyon tamponundan 10 µl, Forward ve Reverse primerlerden final konsatrasyonu 1mM olacak şekilde uygun hacimde alınarak reaksiyon son hacimi RNase/DNase free water ile 20 µl’ye tamamlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı PCR cihazında Table 4’teki program kullanılarak cDNA örnekleri çoğaltıldı.

Ön denatürasyon	95 °C	1 dakika	40 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	
Bağlanma ve Uzama	55 °C	30 saniye	
Final uzama	95 °C	1 dakika	

Tablo 4. Konvansiyonel PCR işlemlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri

PCR işlemlerinde kullanılan primerler MIQE kılavuzuna uygun olarak seçilmiş ve test edilmiştir (Bustin S. et al. 2009). Primer dizilerine ilişkin bilgiler Tablo 5'te paylaşılmıştır.

Gen adı	Primer oryantasyonu	Primer dizileri
Beclin1	Forward	5'-CTCAGGAGAGGAGCCATTTATT-3'
	Reverse	5'-CCCGATCAGAGTGAAGCTATT-3'
ATG3	Forward	5'-TTCGGATGTTGGAGGCTATC-3'
	Reverse	5'-CTGTCCTGCTTTCCAGTGTA-3'
ATG5	Forward	5'-CCACTGGAGAATGACAGATGA-3'
	Reverse	5'-GCTCTGCTTCTCGTTCAGTTA-3'
ATG7	Forward	5'-AGCCCTGCATACTTCTTATTC-3'
	Reverse	5'-GTTAGTTACAGGGATCGTACAC-3'
ATG12	Forward	5'-CCAACCTTCTGTTTCCTGTTTC-3'
	Reverse	5'-GGAATCAACACAGTGCCAATC-3'
ATG16L1	Forward	5'-GCACTGAGCAATGTGTAATGAG-3'
	Reverse	5'-CAGAGCAGTGATCTTCCCTAAC-3'

Tablo 5. Primer dizi bilgileri



Resim 15. Sentezlenen cDNA örneklerinden konvansiyonel PCR yöntemi ile çalışmada kullanılacak primerlerin optimize edilmesi.



Resim 16. Konvansiyonel PCR işlemi hedef bölgelerin çoğaltılması.

3.10.1.7- Agaroz Jel Elektrofrez

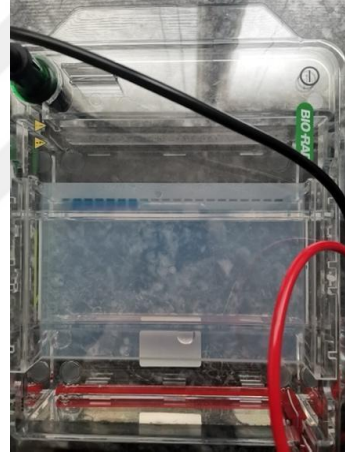
PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 100 V'ta 1 saat süresince 1xTBE (Tris/Borate/EDTA) (108g Tris, 55g Borik asit, 40ml pH 8.0 0.5M EDTA dH₂O ile 1 litreye tamamlandı) tamponu içerisinde elektrofrez işlemine tabi tutuldu. Örnekler 6xYükleme tamponu (Thermo Fisher Scientific) ile karıştırılarak dikkatlice jelde yer alana kuyucuklara aktarıldı. Ayrıca çalışmalarımızda elektrofrez işlemi sonrasında ayrıştırılacak nükleik asitlerin baz uzunluklarının belirlenebilmesi için 50bp'lik DNA markerı kullanıldı. Elektrofrez tankı 1X TBE tamponu ile uygun seviyeye kadar tamamlandıktan sonra elektrofrez işlemi başlatıldı. Nükleik asitlerin jelde görüntülenebilmesi amacıyla yüksek interkalasyon özelliğine sahip etidyum bromür (VWR Life Science, Radnor, PA, USA) kullanılmıştır. Elektrofrez işlemi

sonlandığında jelde ayrıştırılan PCR ürünleri UV transimülatör cihazında 302-324 nm’de görüntülendi (Bio-Rad Gel Doc XR).

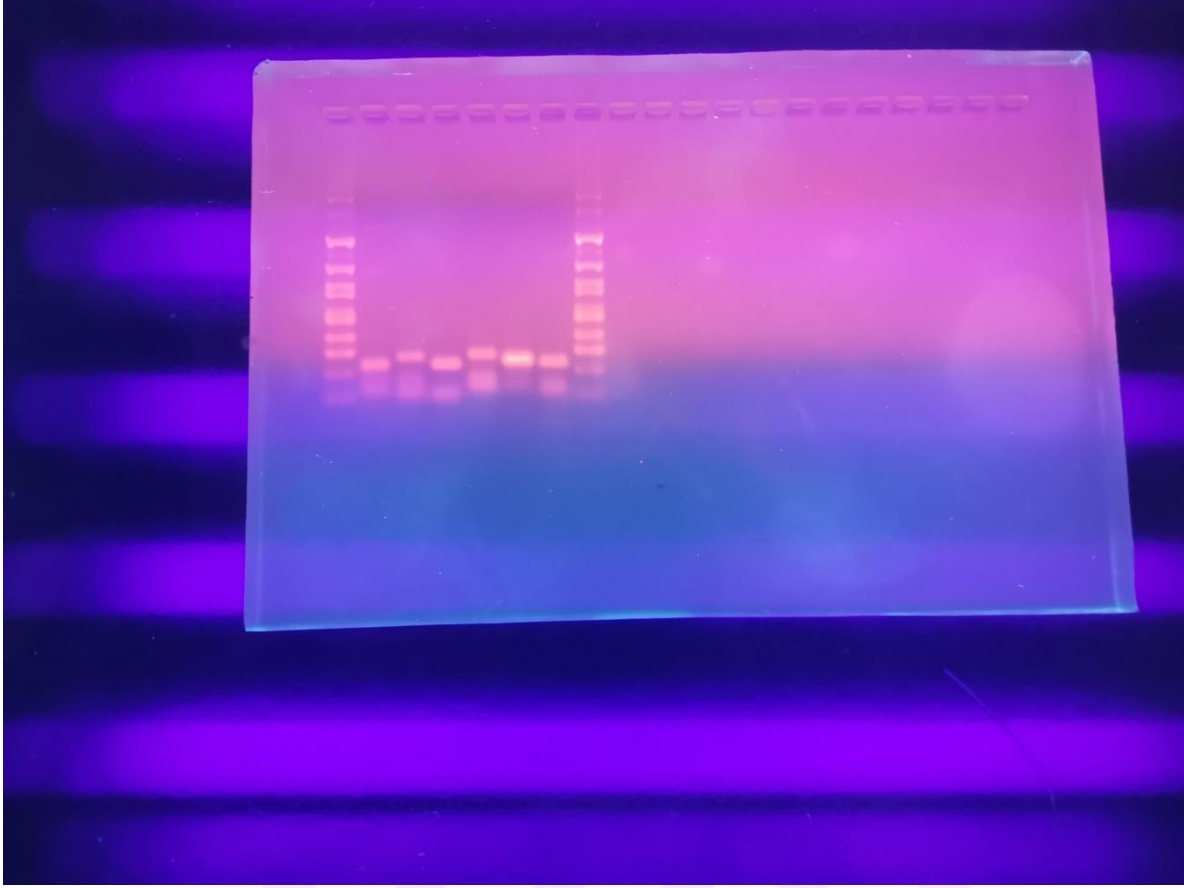
PCR işlemi sonrasında primer çiftlerimizin oluşturduğu amplikon boyutları bilindiğinden agaroz jel işlemi ile ayrıştırma sonrasında jel üzerinde gözlenecek olan nükleik asit bantlarının baz çifti uzunlukları DNA marker (Thermo Fisher Scientific) ile kıyaslanarak doğrulanmıştır. Primer çiftlerinin PCR işlemi sonrasında oluşturduğu amplikonların boyutlarına ilişkin bilgiler Tablo 6’da paylaşılmıştır.

Primer	Beclin 1	ATG3	ATG5	ATG7	ATG12	ATG16L1
Baz Çifti Sayısı (bp)	112	129	111	132	113	113

Tablo 6. PCR işleminde kullanılan primerlerin çoğaltacağı bölgelere ilişkin baz uzunluğu bilgileri.



Resim 17. Agaroz jelinin hazırlanması, örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işleminin başlatılması.



Resim 18. Agaroz jel işlemi sonrasında PCR işlemi ile elde edilen ampliconların UV transimilatörde görüntülenmesi.

3.10.1.8- Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR işlemi (qRT-PCR)

Daha önce izole edilen RNA’lardan sentezlenen cDNA örneklerinden 1 µl alınarak örneklerdeki Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12 ve ATG16L1 mRNA ifade düzeyleri daha önce optimize edilen primerler kullanılarak qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildi.

Bu amaçla iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kiti kullanılarak CFX96 Real-time PCR cihazında (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) analizler sürdürüldü. Reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Her bir cDNA örneği üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. qRT-PCR işlemindeki termal siklus protokolüne ilişkin sıcaklık ve süre bilgileri tablo 7’de sunulmuştur.

Ön denatürasyon	95 °C	10 dakika	
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	45 döngü
Bağlanma ve Uzama (Floresan şiddetin ölçümü)	60 °C	30 saniye	

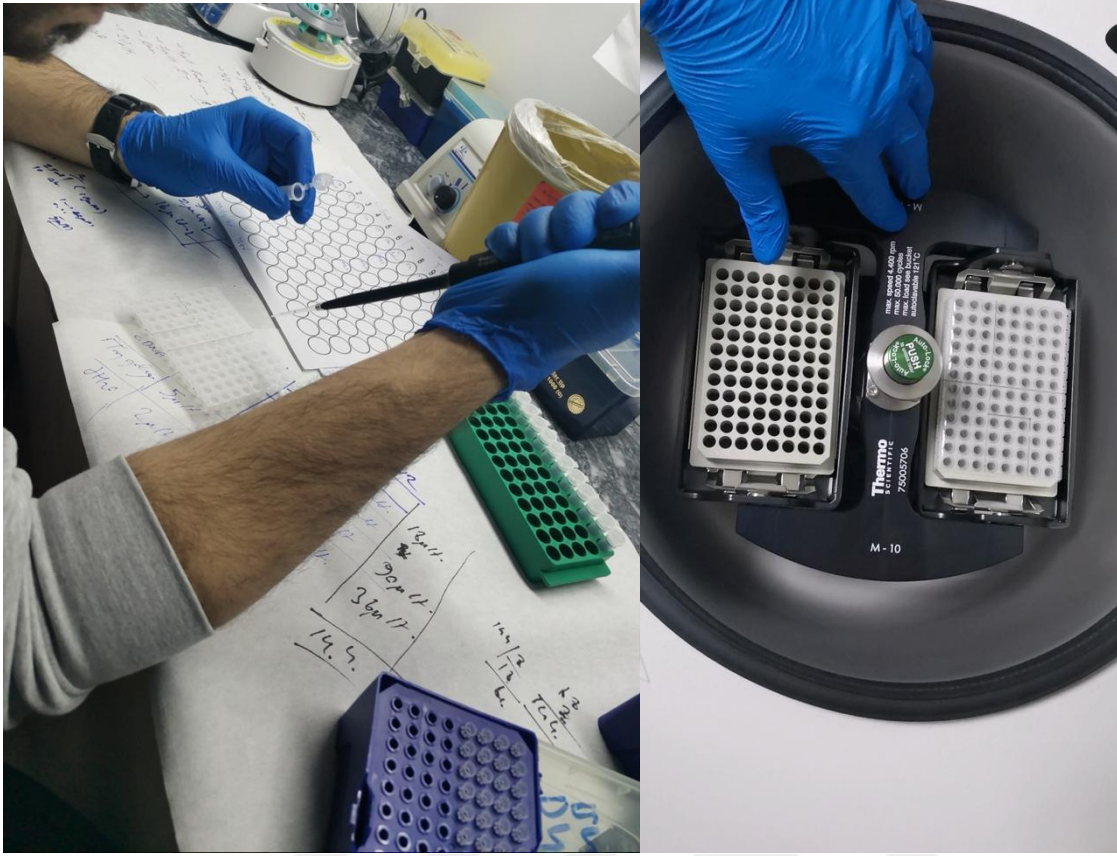
Tablo 7. qRT-PCR işlemlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri.

qRT-PCR işlemini takiben amplifikasyon özgüllüğünü doğrulamak için erime eğrisi analizi gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizine ilişkin sıcaklık ve süre bilgileri tablo 8’de sunulmuştur.

Denatürasyon	95 °C	10 saniye
Bağlanma ve Denatürasyon (Eş zamanlı Floresan şiddetin ölçümü)	60 °C ‘den 94.5°C’ye artış	20 saniye

Tablo 8. Erime eğrisi analizinde kullanılan sıcaklık ve döngü parametreleri

Örneklerdeki gen ifadelerindeki göreceli mRNA ifade düzeylerinin analiz edilmesi işleminde karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılmış olup bir housekeeping gene olan Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) ifade düzeylerine göre normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Resim 19. qRT-PCR işleminde örneklerin plate'e yüklenmesi, santrifüjasyon ile çöktürülmesi ve kullanılan PCR işlemi parametreleri.

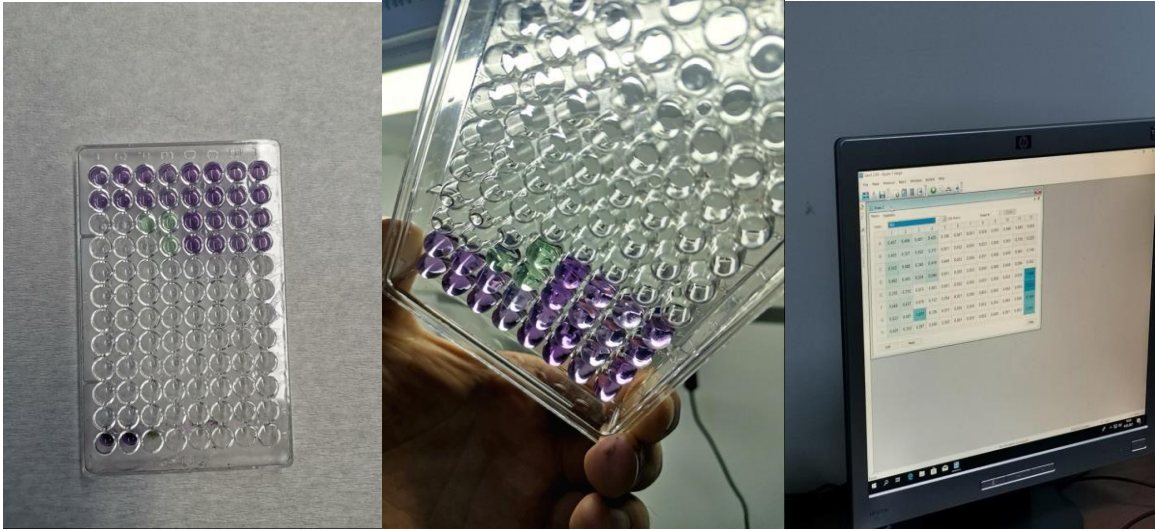
3.10.2- Protein İfadesi Düzeyindeki Analizler

3.10.2.1- Total Protein İzolasyonu

Sıçan dişleri ve lezyonlu kemiği içeren dokulardan protein izolasyonu gerçekleştirebilmek amacıyla örnekler öncelikli olarak sıvı nitrojen içerisinde dondurulup (-196 °C) önceden soğutulmuş havanda ezilerek toz haline getirildi. Homojenizasyon işlemi takiben proteaz inhibitörü (Amresco) içeren Radyo İmmüno Presipitasyon Assay (RİPA) tamponu (1xPBS, %1 Nonidet P-40, 0,5% sodium deoxycholate ve 0,1% SDS, pH 8,0) içerisinde hücreler lize edildi. Lizis işlemi takiben örnekler +4°C'de 10 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüj edilerek çözünür fazdaki proteinler ayrıştırıldı. Bu amaçla santrifüj işlemi sonrasında süpernatant bölümü alınarak pellet bölümü uzaklaştırıldı. İzolasyon işlemi sonrasında numune içeriğindeki total protein konsantrasyonu bikinkolik asit (BCA) protein konsantrasyonu ölçüm metodu ile belirlendi (Thermo Scientific Pittsburgh, PA, ABD).



Resim 20. Protein izolasyonu işlemi.



Resim 21. Dokulardan izole edilen protein örneklerinin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının spektrofotometre ile ölçülmesi.

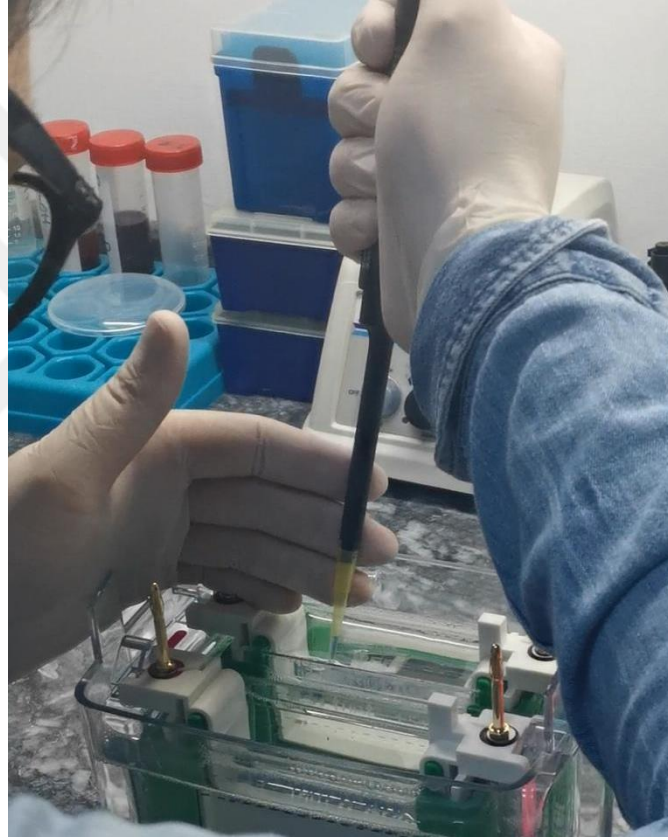
3.10.2.2- Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamit Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Numunelerimizdeki proteinlerin moleküler ağırlığına göre ayırtırmak amacıyla sodyum dodesilsülfat poliakrilamit jel elektroföresi metodu kullanıldı. Bu amaçla %10-15'lik jeller hazırlanarak proteinler ayırtıldı. Tipik olarak, çalışmalarımızda 30-40 µg toplam protein içeriği kullanıldı. SDS-PAGE jellerinin hazırlanması için tablo 9'da sunulan adımlar takip edilmiştir.

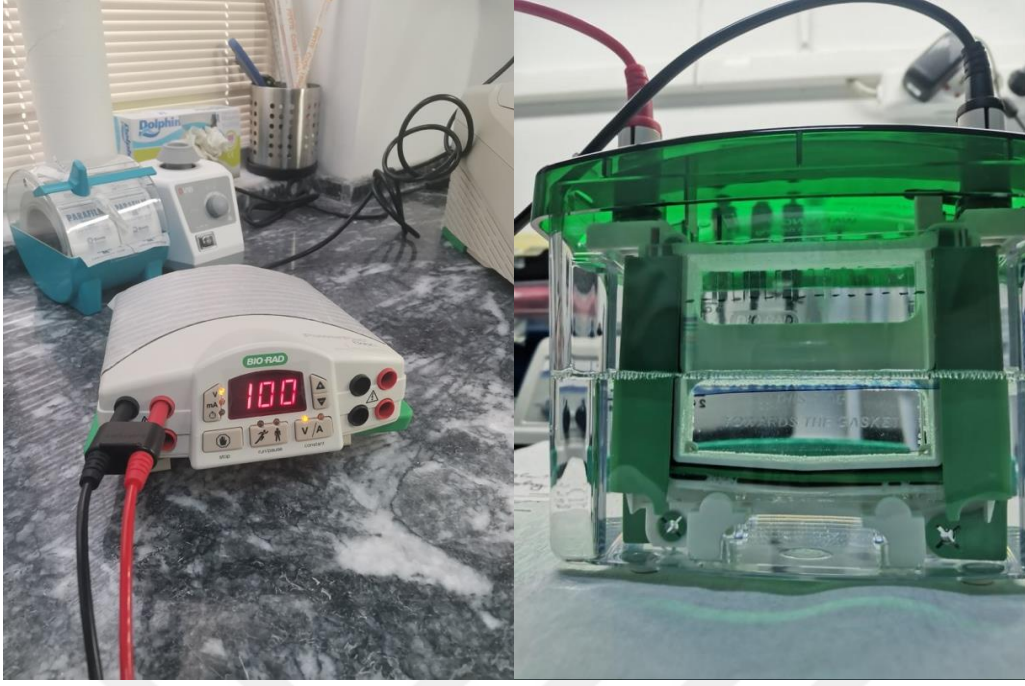
4X AYIRMA JELİ	1 JEL İÇİN KULLANILAN HACİMLER
%40 Akrilamid/bisakrilamid (29:1)	1,25 ml
4X Ayırma tamponu	1,25 ml
Otolavlanmış su	2,5 µl
%10 Amonyum Persülfat (APS) (taze hazırlanmış, 4 °C’de muhafaza edilmiş)	50 µl
TEMED (4 °C’de muhafaza edilmiş)	5 µl
4X YIĞINLAMA JELİ	1 JEL İÇİN KULLANILAN HACİMLER
%40 Akrilamid/bisakrilamid (29:1)	0,25 ml
4X Yığınlama tamponu	0,625 ml
Otolavlanmış su	1,625 ml
%10 Amonyum Persülfat (APS) (taze hazırlanmış, 4 °C’de muhafaza edilmiş)	25 µl
TEMED (4 °C’de muhafaza edilmiş)	2,5 µl

Tablo 9. SDS-PAGE jellerinin hazırlanışı.

Protein örnekleri 95°C'de 5 dakika boyunca 4x SDS-PAGE yükleme tamponu (200mM Tris-HCl pH:6.8, %8 SDS, %0,4 bromophenol blue, %40 glycerol, %4 14,7 β-mercaptoethanol, %10 0,5 M EDTA) içerisinde denatüre edildi. Denatürasyon işlemini takiben örnekler hazırlanmış olan jellere yüklendi. Yükleme işlemi sonrasında 1x yürütme tamponu (25 µm Tris, 192 µm Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3.) içerisinde 120V’de 45 dakika süresince elektroforez işlemine tabi tutuldu.



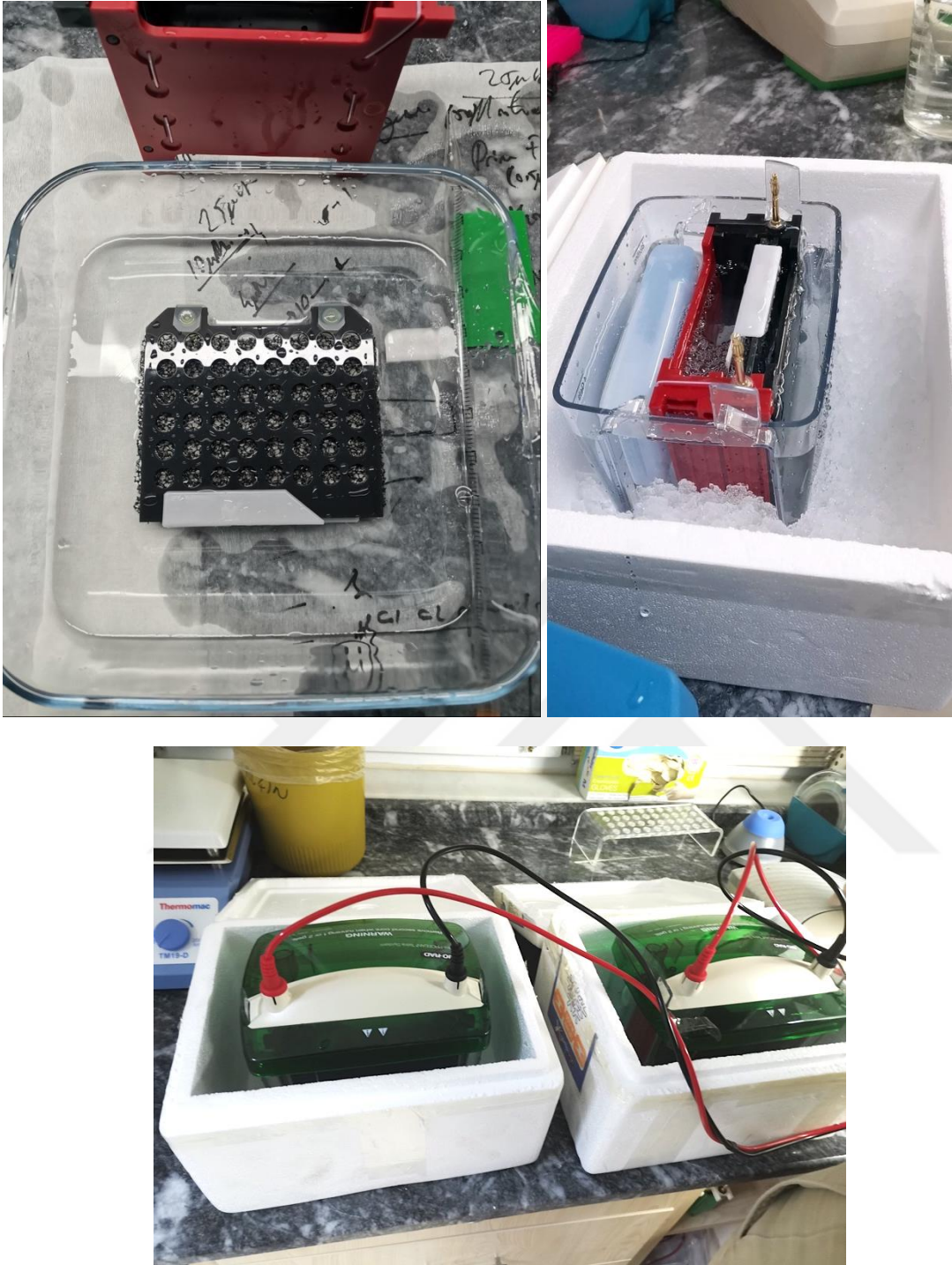
Resim 22. SDS-PAGE jeli ve izole edilen protein örneklerinin jele yüklenmesi.



Resim 23. SDS-PAGE jel elektroforezi.

3.10.2.3- Ayrıştırılan Proteinlerin Membrana Transferi

İmmünoiblotlama çalışmalarında kullanmak üzere SDS-PAGE ile ayrıştırılan protein örnekleri poliviniliden florür (PVDF) membrana (Bio-Rad Laboratories, Herkül, CA) transfer edildi. Bu amaçla 1X Transfer tamponu (5 μ m Tris, 192 μ m Glycine, 20% (v/v) methanol, pH ~8.3. içerisinde 20mA’de bir gece boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.



Resim 24. SDS-PAGE işlemini takiben jelde ayrıştırılan protein örneklerinin PVDF membrana transfer edilmesi

3.10.2.4- Membrana Transfer Edilen Protein Örneklerinin Görüntülenmesi

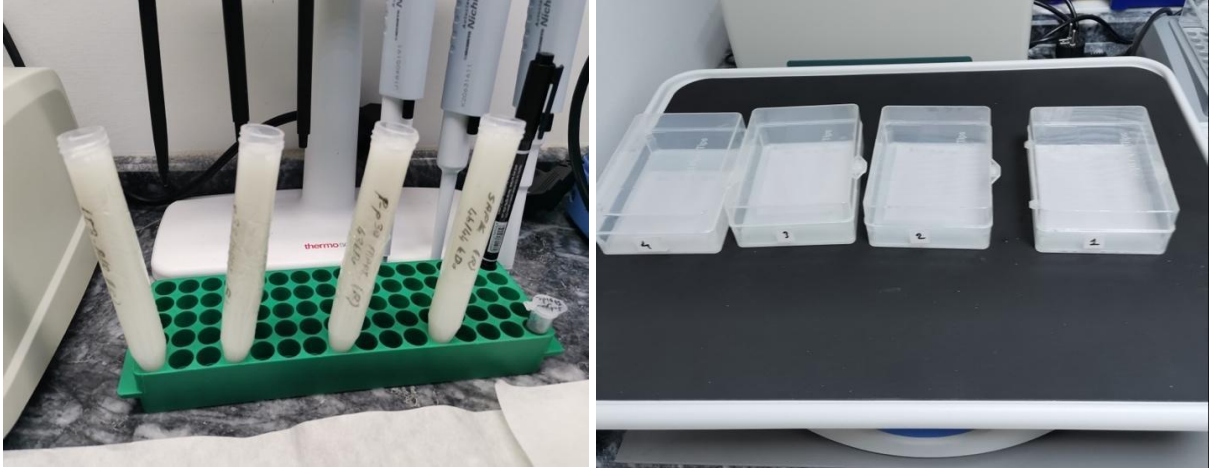
Transfer verimliliğini kontrol etmek amacıyla transfer işlemi sonrasında PVDF membranı %0,2'lik Ponceau-S-staining solüsyonu (SERVA Electrophoresis) ile boyandı.

Protein örneklerinin membrana transfer işleminin doğrulanması sonrasında immünoiblotlama çalışmaları takip edildi.

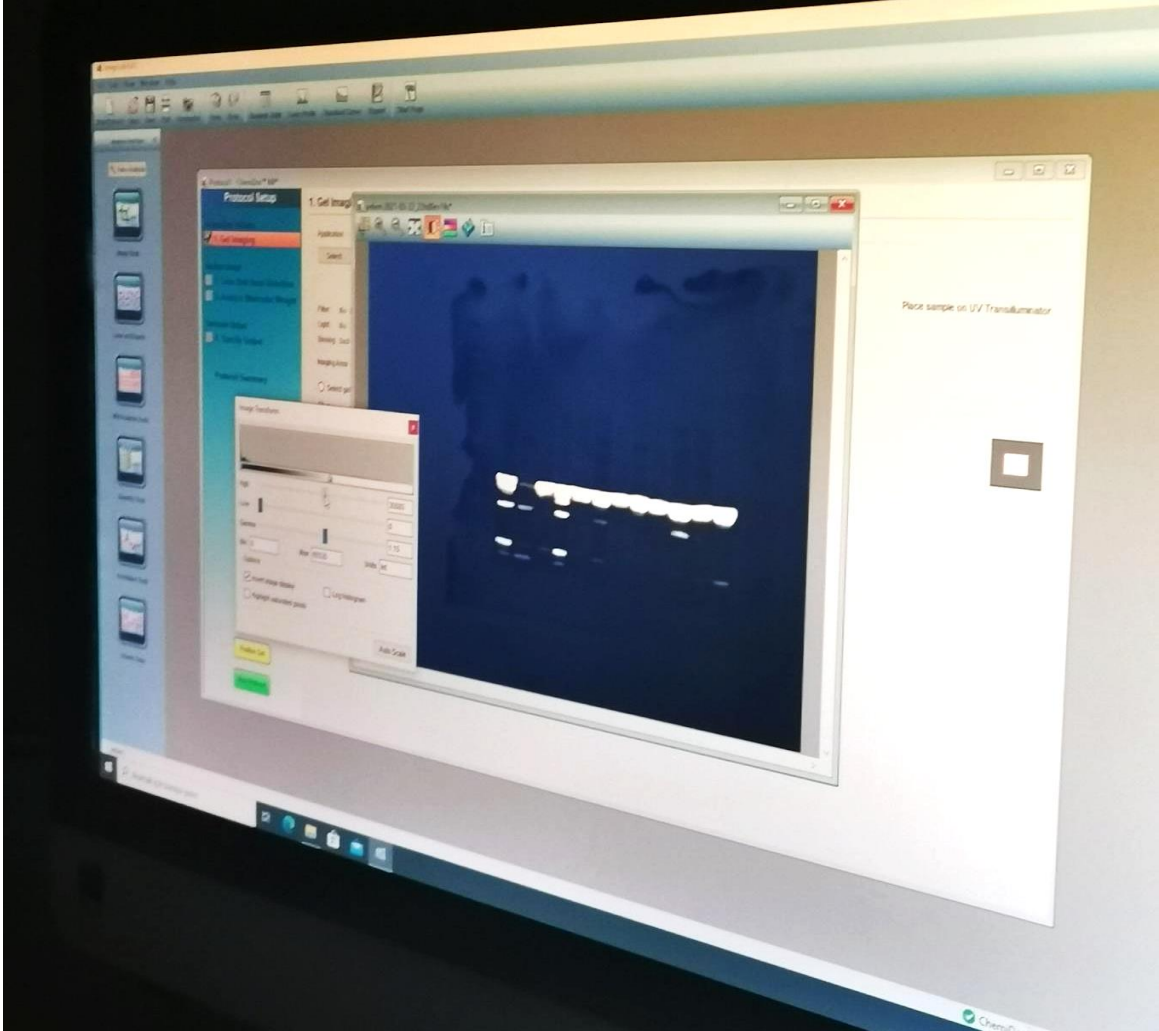
3.10.2.5- İmmünoiblotlama

PVDF membranın protein bağlanmayan bölümlerinin bloklanması için %5'lik yağsız süt tozu (42590.02; SERVA Electrophoresis) içeren bloklayıcı tamponu (1x yıkama tamponununun içerisinde %5 yağsız süt tozu bulunuyor) ile membran oda sıcaklığında 4 ° C'de 30 dakika boyunca muamele edildi. Hedef proteinlerin işaretlenmesi için PVDF membran Beclin-1 (Cell Signaling Technologies #3495, antikor dilüsyon oranı 1:1000), Atg5 (CST #12994, antikor dilüsyon oranı 1:1000), LC3-I/II (CST #12741, 1:2000), p62/SQSTM1 (CST #39749S, antikor dilüsyon oranı antikor dilüsyon oranı 1:1000) ve β -actin (Proteintech 66009-1-Ig, antikor dilüsyon oranı 1:10000) antikorları ile oda sıcaklığında 2 saat süresince muamele edildi. Süre sonunda bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması amacıyla PVDF membran 1x Yıkama tamponu ile oda sıcaklığında 20 dakika süresince orbital çalkalayıcıda yıkama işlemine tabi tutuldu. Takiben kullanılan primer antikorun konakçısına uygun olarak tercih edilen Horseradish Peroksidaz (HRP) konjuge ikincil antikor (Thermo Scientific dilüsyon oranı 1:3000) 2 saat süre ile oda sıcaklığında PVDF membrana uygulandı. Süre sonunda membran 1x yıkama tamponu (137 μ m sodium chloride, 2,7 μ m potassium chloride, 4,3 μ m disodium phosphate, 1,4 μ m monopotassium phosphate and 0.05% (v/v) Tween-20 (polysorbate 20)) ile yıkama işlemine tabi tutularak kemilüminesans görüntüleme sistemi (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Kanada) aracılığıyla ECL solüsyonu (BioRad) kullanılarak protein bantları görüntülendi.

SDS-PAGE işlemlerinde her bir kuyucuğa yüklenen örneklerdeki protein konsantrasyonunun eşitliğin doğrulanması için β -aktin seviyeleri kullanıldı. Protein bantları, İmage J yazılımı kullanılarak densitometrik analiz gerçekleştirildi (<http://imagej.nih.gov/ij/>).



Resim 25. Transfer işlemi sonrasında PVDF membranına aktarılan protein örneklerine primer antikor uygulanması.



Resim 26. İmmünoiblotlama sonrasında hedef proteinlerin kemilüminesans görüntüleme cihazı ile saptanması.

3.11- İstatistiksel Analiz

3.11.1- Radyografik Ölçümlerin İstatistik Analizi

Verilerin parametrik testlerin ön şartlarını sağlayıp sağlamadığı Levene testi ile kontrol edildi. Alan açısından elde edilen veriler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanıldı ($p=0,05$).

3.11.2- Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Verilerinin İstatistik Analizi

Histopatolojik, Gram boyama ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları ile elde edilen skor verilerinin analizinde tek yönlü varyans analizi ve grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde Duncan testi kullanıldı ($p=0,05$).

Grupların lezyon alanlarına ait verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı ($p=0,05$).

3.11.3- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve İmmunoblotlama Çalışma Verilerinin İstatistik Analizi

mRNA ve protein ifadelerindeki kat değişim verileri iki bağımsız örneklemlili t Testi ile analiz edildi ($p=0,05$).

4- BULGULAR

4.1- Radyografik Bulgular

Pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait radyografik değerlendirme sonucu elde edilen periapikal lezyon alanı bulguları tablo 10'da gösterildi. Selenyum grubunda periapikal lezyon alanı pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha küçüktü ($p<0,01$) (resim 29).

Tablo 10. Radyomikrografik incelemeler ile elde edilen pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait periapikal lezyon alanı ortalama değerleri (mm^2) $\pm$ standart hata.

Gruplar	Periapikal lezyon alanı (mm^2)
Pozitif kontrol (n= 18)	$11,00 \pm 1,10^a$
Selenyum (n=20)	$4,70 \pm 1,5^b$

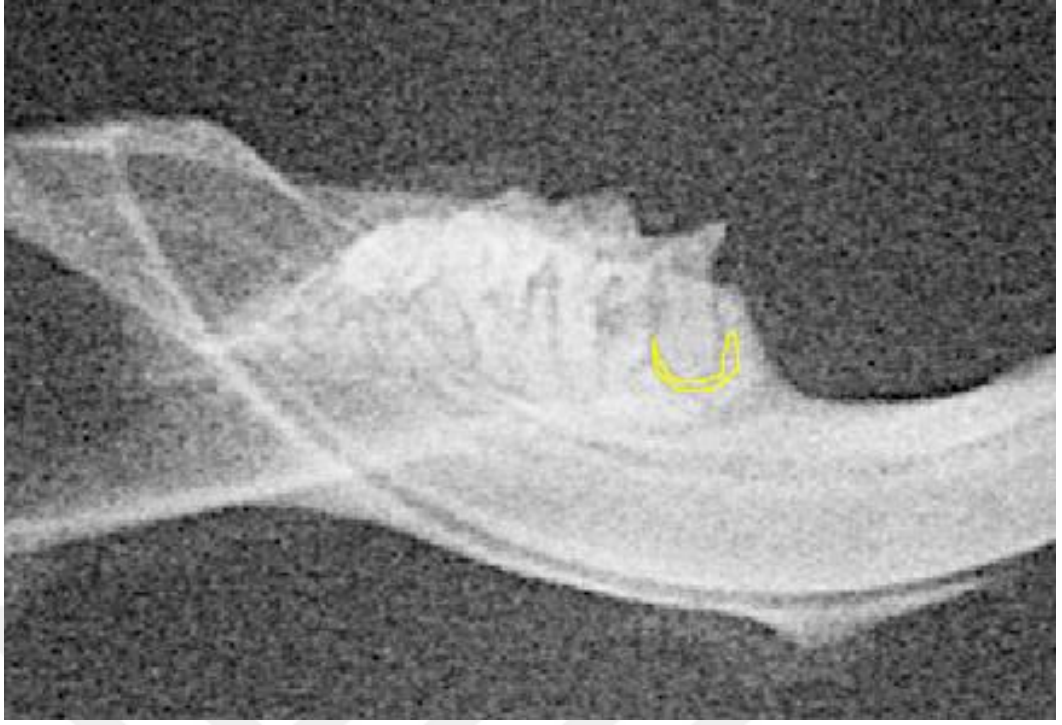
* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).



Resim 27. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Periapikal lezyon yok.



Resim 28. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (9,3 mm²).



Resim 29. Selenyum grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (4,5 mm²).

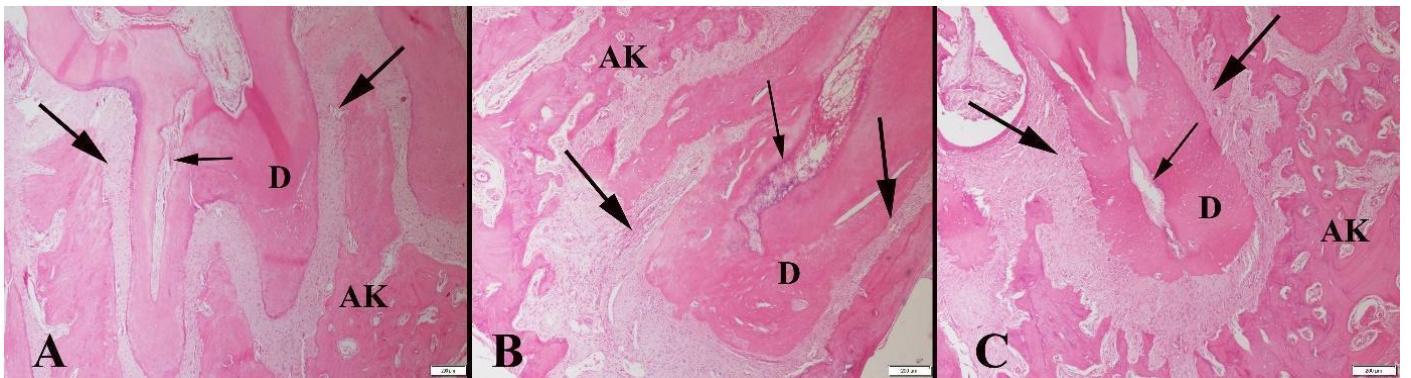
4.2- Histopatolojik Bulgular

Negatif kontrol grubundaki tüm ratlarda diş ve çevre dokuların sağlıklı olduğu görüldü ve tüm örnekler skorlamada 0 değerini aldı (resim 30). Pozitif kontrol ve selenyum gruplarında periapikal dokularda çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu ve mononükleer hücrelerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyonların varlığı dikkati çekti (resim 30, 31). Pozitif kontrol grubu örneklerinde pulpa damarlarında şiddetli hiperemi ve yoğun şekilde yangısal hücre infiltrasyonları ve nekrotik alanlar izlendi. Enflamasyon şiddeti karşılaştırıldığında, semi-kantitatif değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$). Selenyum grubu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı düzeyde daha düşük enflamasyon skor değerleri aldı (tablo 11).

Tablo 11: Grupların histopatoloji skorlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.

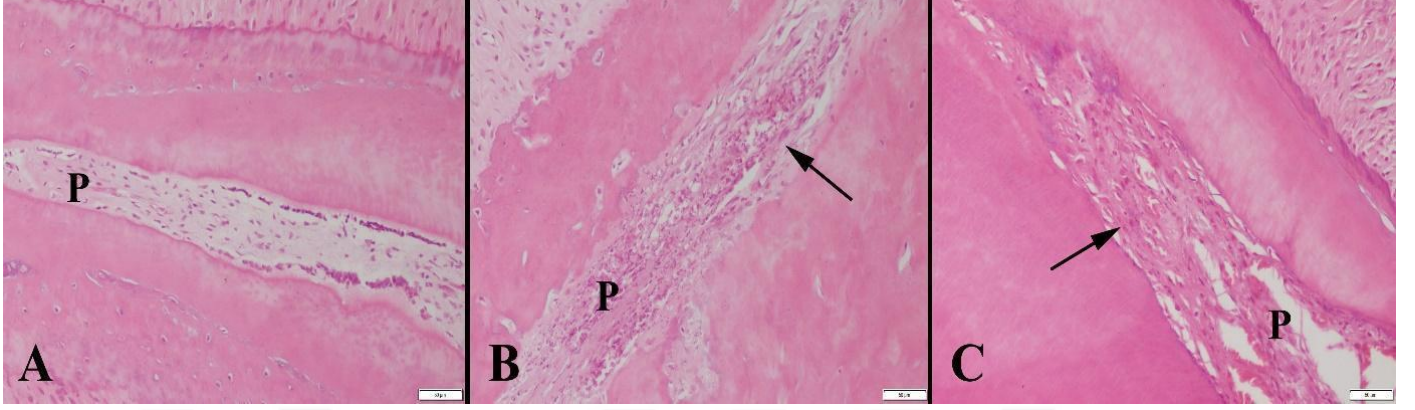
Gruplar	Enflamasyon skorları (313)
Negatif kontrol (n= 10)	0,00 $\pm$ 0,00 ^a
Pozitif kontrol (n= 9)	2,60 $\pm$ 0,51 ^b
Selenyum (n=10)	1,20 $\pm$ 0,42 ^c

* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$)



Resim 30. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların histopatolojik görünümü, sağlıklı periodontal ligament (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların histopatolojik görünümü (C) Selenyum grubundaki bir rata ait diş ve çevre dokuların

histopatolojik görünümü, D: dentin, AK: alveolar kemik, pulpa (ince oklar), periodontal ligament (kalın oklar), HE, Barlar=200µm.



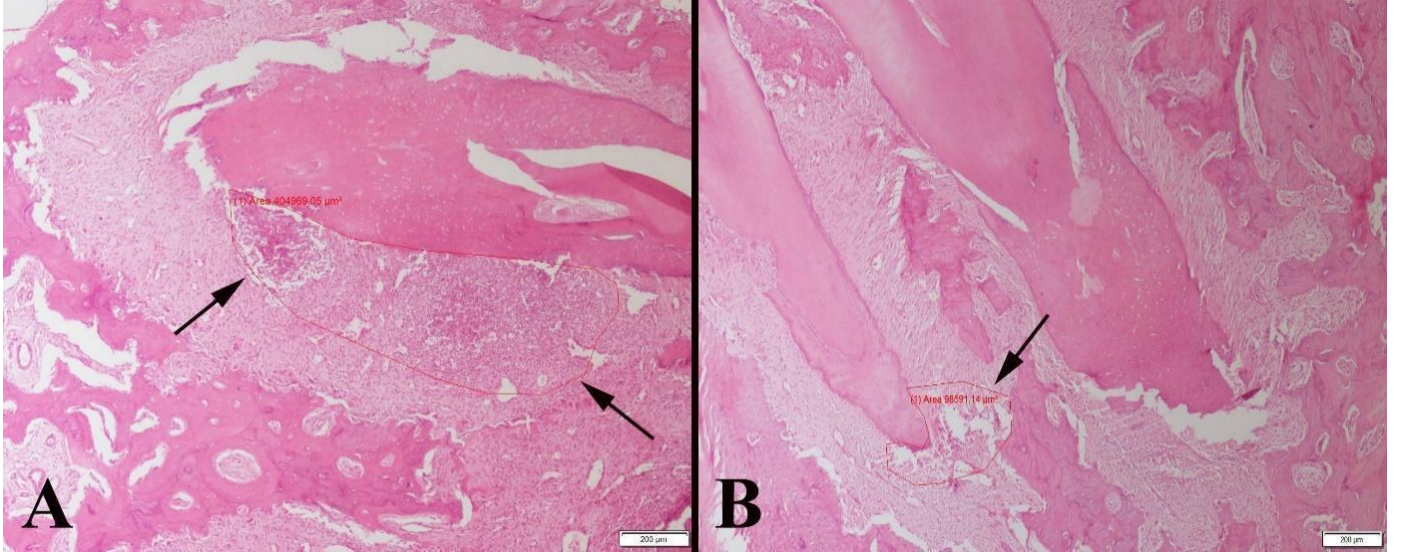
Resim 31. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait pulpa dokusunun histopatolojik görünümü, sağlıklı pulpa (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait pulpada yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, şiddetli pulpa enflamasyonu (C) Selenyum grubundaki bir rata ait pulpa dokusunun histopatolojik görünümü, azalmış yangısal reaksiyon ve hafif şiddette pulpa enflamasyonu, P: pulpa, HE, Barlar=50µm.

4.3- Histomorfometrik Bulgular

Pozitif kontrol ve selenyum gruplarında periapikal lezyon alanlarının histomorfometrik değerlendirilmesinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,01$) (tablo 12). Selenyum grubunda periapikal lezyon alanları pozitif kontrol grubuna göre daha küçüktü ($p<0,01$) (resim 32).

Tablo 12. Histomorfometrik analiz ile elde edilen gruplara ait periapikal lezyon alanı ortalama (mm^2) $\pm$ standart sapma değerleri.

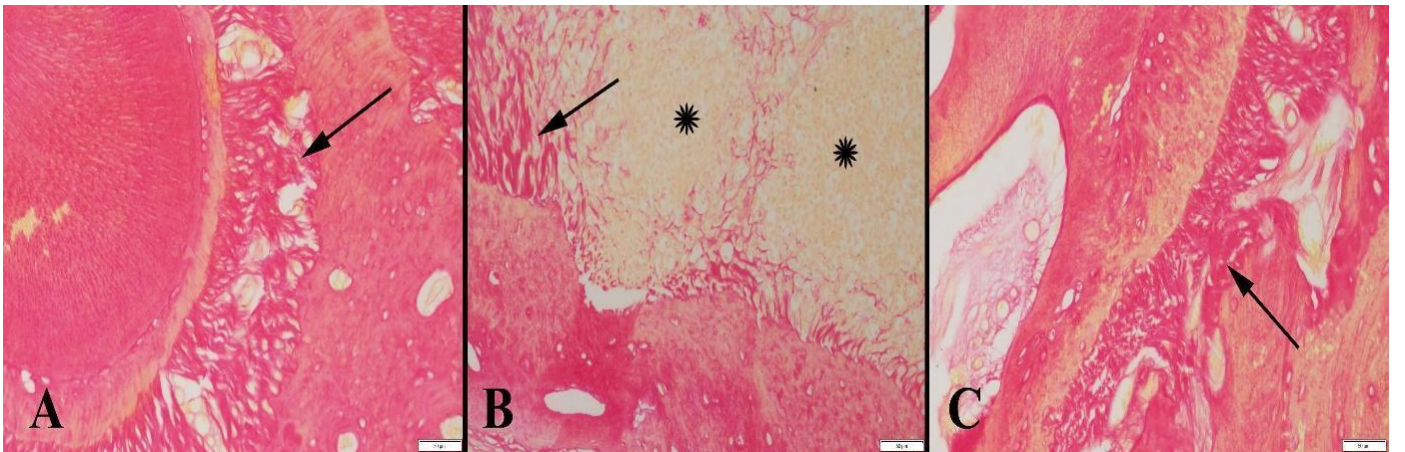
Gruplar	Periapikal lezyon alanı (mm^2)
Pozitif kontrol (n= 9)	$3,72\pm0,52^a$
Selenyum (n=10)	$0,97\pm0,05^b$



Resim 32. (A) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (4,04 mm²), (B) Selenyum grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (0,9 mm²), HE, Barlar=200µm.

4.4- Picro Sirius Red Boyama Bulguları

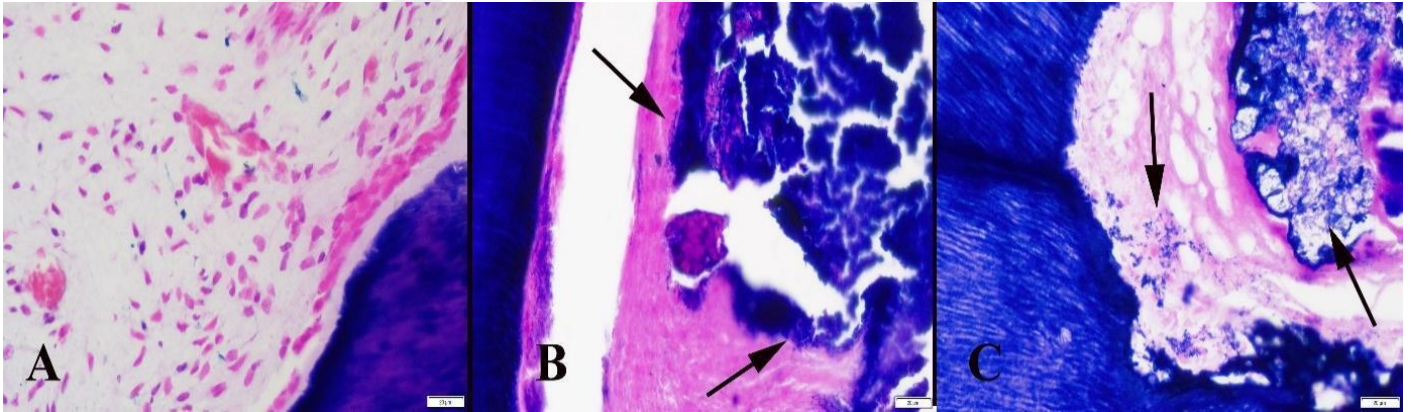
Periodontal ligamentin kollajen reaksiyonu Picro Sirius Red boyama ile değerlendirildiğinde negatif kontrol grubunda yoğun ve sağlam görünümde olduğu izlenen periodontal ligamentin, pozitif kontrol grubunda kollajen yoğunluğun belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi (Resim 33 A, B). Periapikal dokuda yoğun enflamatuvar reaksiyonun diş ile periodontal ligament arasındaki bağlantıyı önemli ölçüde zayıflattığı dikkati çekti. Selenyum grubu örneklerinde enflamatuvar reaksiyonun azalması yanı sıra periodontal ligament ve çevre bağ doku yapısının korunmuş olduğu saptandı (Resim 33 C).



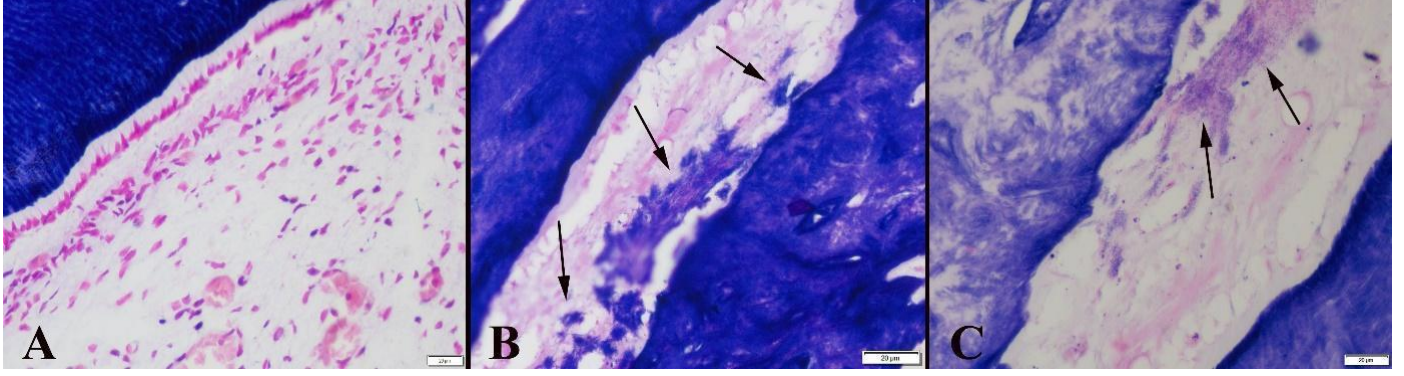
Resim 33. Periodontal ligament (oklar) kollajen miktarının görünümü. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait sağlıklı periodontal ligament ve koyu kırmızı renkte sağlam bağdoku, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait yoğun periodontal yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar) nedeniyle ligament kollajeninde azalma ve parçalanmalar, (C) Selenyum grubundaki bir rata ait periodontal ligament dokusunda hafif yangısal reaksiyon ve normal periodontal ligament kollajen görünümü, Picro Sirius Red Metodu, Barlar =50µm.

4.4. Gram Boyama Bulguları

Bakteri yerleşimlerinin ve yoğunluğunun değerlendirilmesinde negatif kontrol grubunda hiçbir örnekte kron ve kök pulpasında bakteriye rastlanmadı (resim 34 A, 35 A). Pozitif kontrol grubunda tüm kesitlerde, özellikle kron ve kök pulpası içerisinde yaygın şekilde bakteri kümeleri gözlemlendi (resim 34 B, 35 B). Bakterilerin çoğunluğunun Gram (+) kok oldukları dikkati çekti. Selenyum grubunda kromda ve kök içerisinde pozitif kontrol grubuna göre daha az yoğunlukta bakteri kümeleri gözlemlendi (resim 34 C, 35 C). Bakteri yerleşimi açısından pozitif kontrol grubu örneklerinde en yüksek skor değerleri ($4,10 \pm 0,73$) gözlenirken, selenyum grubu ($0,90 \pm 0,23$) ile arasında istatistiksel fark tespit edildi. ($p < 0,01$).



Resim 34. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, yoğun Gram (+) bakteri boyanması (oklar), (C) Selenyum grubundaki bir rata ait dişin kron bölgesinden alınan bir kesit, az sayıda Gram (+) bakteri kümeleri, Gram Boyama Metodu, Bar= 20µm.



Resim 35. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, yoğun Gram (+) bakteri boyanması (oklar), (C) Selenyum grubundaki bir rata ait dişin kök bölgesinden alınan bir kesit, az sayıda Gram (+) bakteri kümeleri, Gram Boyama Metodu, Bar= 20µm.

4.5- İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1- IL-6

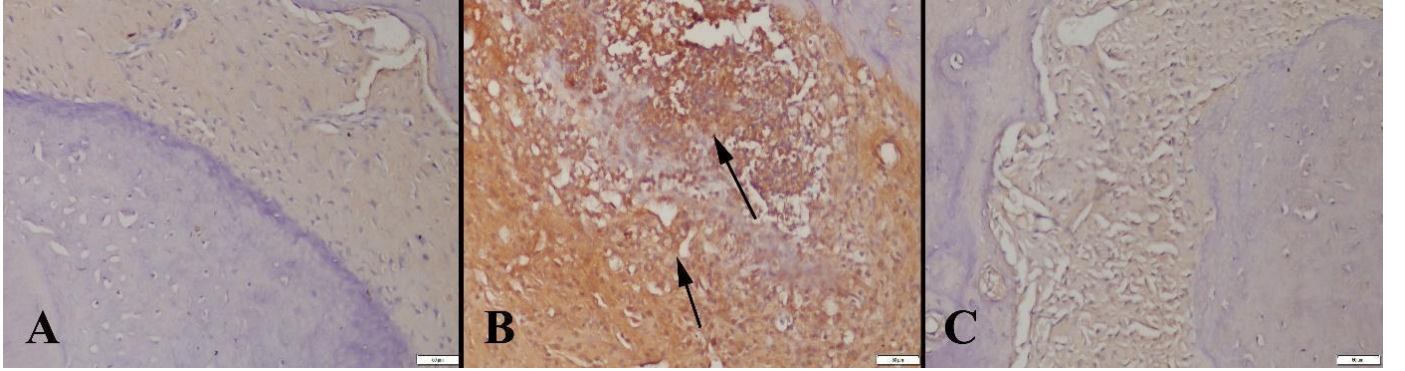
Gruplara ait IL-6 (+) hücrelerin ortalama immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 13’te verildi.

Negatif kontrol grubunda diş çevresindeki bağ doku ile pulpadaki bazı hücrelerde genellikle reaksiyon gözlenmezken bazı örneklerde az sayıda hücrede hafif şiddette pozitif immün reaksiyon gözlendi (resim 36 A). IL-6 (+) hücre yoğunluğu en fazla pozitif kontrol grubunda izlenirken selenyum grubunda IL-6 (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha az bulundu ($p<0,01$) (resim 36). Negatif kontrol ve selenyum grupları arasında IL-6 (+) hücre yoğunluğu açısından istatistik olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 13. IL-6 (+), HIF-1 (+), COX-2 (+) ve Kaspaz-3 (+) hücrelerin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.

Gruplar	IL-6	HIF-1	COX-2	Kaspaz-3
Negatif kontrol (n= 10)	0,12 $\pm$ 0,12 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^A	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,25 $\pm$ 0,16 ^x
Pozitif kontrol (n= 9)	2,50 $\pm$ 0,52 ^b	1,80 $\pm$ 0,78 ^B	2,80 $\pm$ 0,42 ^b	2,70 $\pm$ 0,48 ^y
Selenyum (n= 10)	0,3 $\pm$ 0,15 ^a	0,60 $\pm$ 0,51 ^C	1,40 $\pm$ 0,51 ^y	0,60 $\pm$ 0,51 ^x

* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,01).

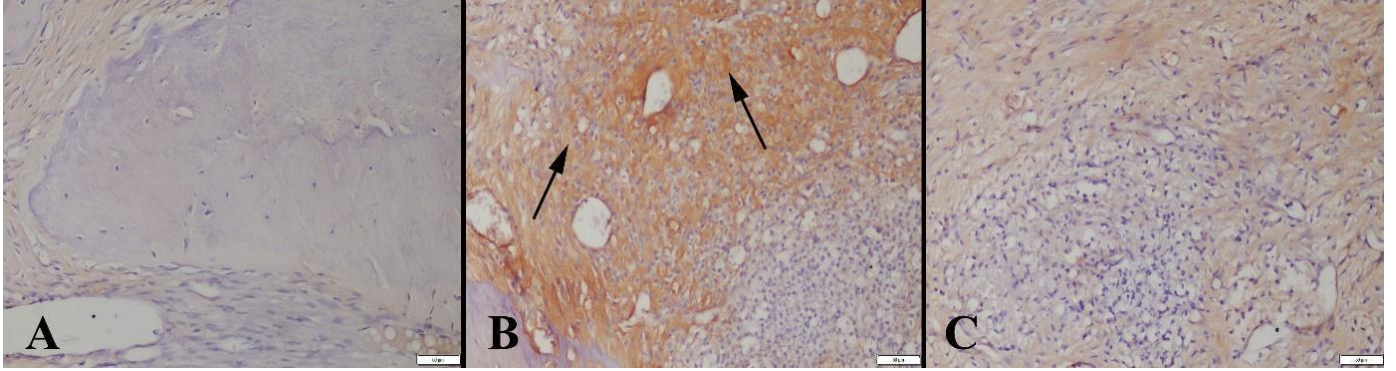


Resim 36. Periapikal bölgede IL-6 immunohistokimyasal boyama, (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

4.5.2- HIF-1

Gruplara ait HIF-1 (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 13'te verildi.

Gruplar arasında HIF-1 (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edildi (p<0,01). Negatif kontrol grubunda hiçbir örnekte immunopozitif reaksiyon izlenmezken, en yüksek HIF-1 (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubunda izlendi (p<0,01). Özellikle enflamasyonun şiddetli olduğu dokularda immunopozitif hücre yoğunluğunun fazla olması dikkati çekti (resim 37).

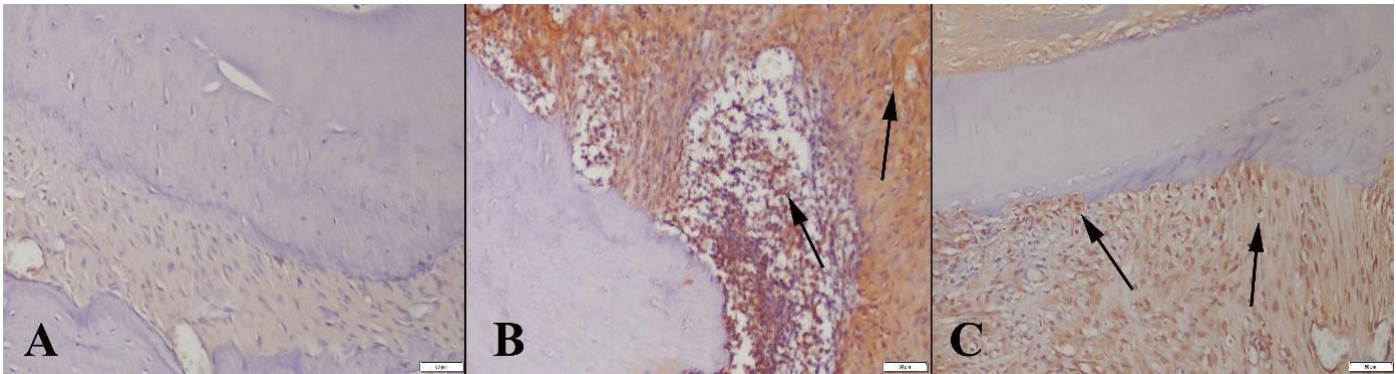


Resim 37. Periapikal bölgede HIF-1 immunohistokimyasal boyama, (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

4.5.3- COX-2

Gruplara ait COX-2 (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 13’te verildi.

Gruplar arasında COX-2 (+) hücre yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edildi ($p<0,01$). Negatif kontrol grubunda hiçbir örnekte pulpa ve periapikal dokuda immunpozitif reaksiyon izlenmezken, en yüksek COX-2 (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubunda izlendi ($p<0,01$). Pozitif kontrol grubunda özellikle enflamasyonun şiddetli olduğu periapikal dokuda tüm ratlarda enflamatuvar hücrelerde immün pozitif yoğunluğunun fazla olması dikkati çekti (resim 38 B). Selenyum grubunda sadece 3 rata ait örnekte orta şiddette, diğerlerinde hafif şiddette immün pozitif reaksiyon izlendi (resim 38 C).



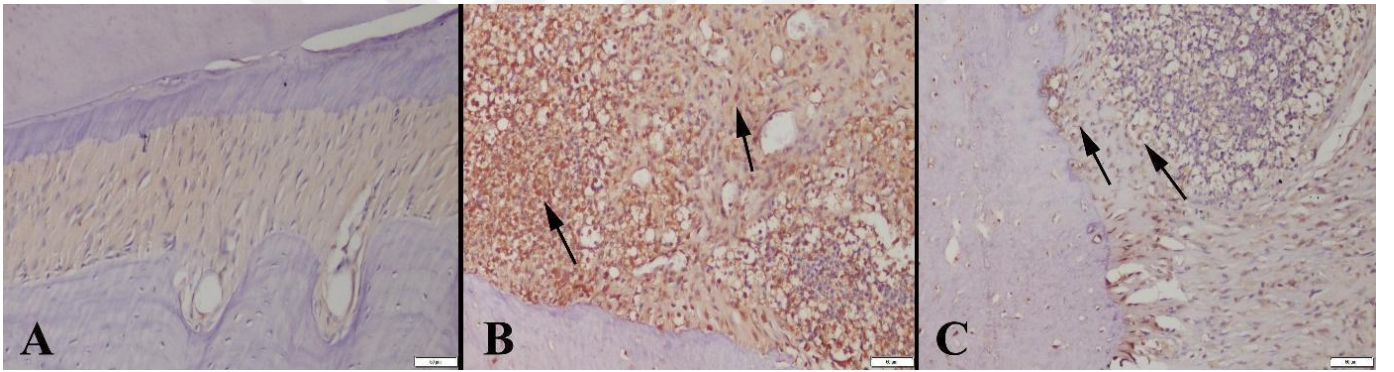
Resim 38. Periapikal bölgede COX-2 immünohistokimyasal boyama. (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta enflamatuvar

hücrelerde ve komşu hücrelerde şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, (oklar), Streptavidin Biyotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

4.5.4- Kaspaz-3

Gruplara ait Kaspaz-3 (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 13'te verildi.

En yüksek Kaspaz-3 (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubunda izlenirken ($p<0,01$), negatif kontrol ve selenyum grupları arasında istatistiksel fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Pozitif kontrol grubunda enflamatuvar hücrelerde immunpozitif yoğunluğunun fazla olması dikkati çekti (resim 39 B). Selenyum grubunda sadece 3 ratta ait örnekte orta şiddette, diğerlerinde hafif şiddette immunpozitif reaksiyon izlendi (resim 39 C).



Resim 39. Periapikal bölgede Kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama. (A) Negatif kontrol grubuna ait bir ratta negatif ekspresyon, (B) Pozitif kontrol grubuna ait bir ratta enflamatuvar hücrelerde ve komşu hücrelerde şiddetli immunoreaksiyon (oklar), (C) Selenyum grubuna ait bir ratta enflamatuvar reaksiyona rağmen az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon, (oklar), Streptavidin Biyotin Peroksidaz Metodu, Barlar =50µm.

4.6- Moleküler Yöntemlerle Sürdürülen Analiz Bulguları

4.6.1- Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qrt-PCR)

4.6.1.1- Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 Göreceli mRNA İfadesi Düzeyleri

Beclin-1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol grubunda en yüksek Beclin-1 ekspresyon seviyesi

izlenirken selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,03$) (Şekil 2).

ATG3 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG3 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,002$) (Şekil 2).

ATG5 ekspresyonu açısından negatif kontrol ve selenyum grupları açısından istatistiksel fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG5 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,04$) (Şekil 2).

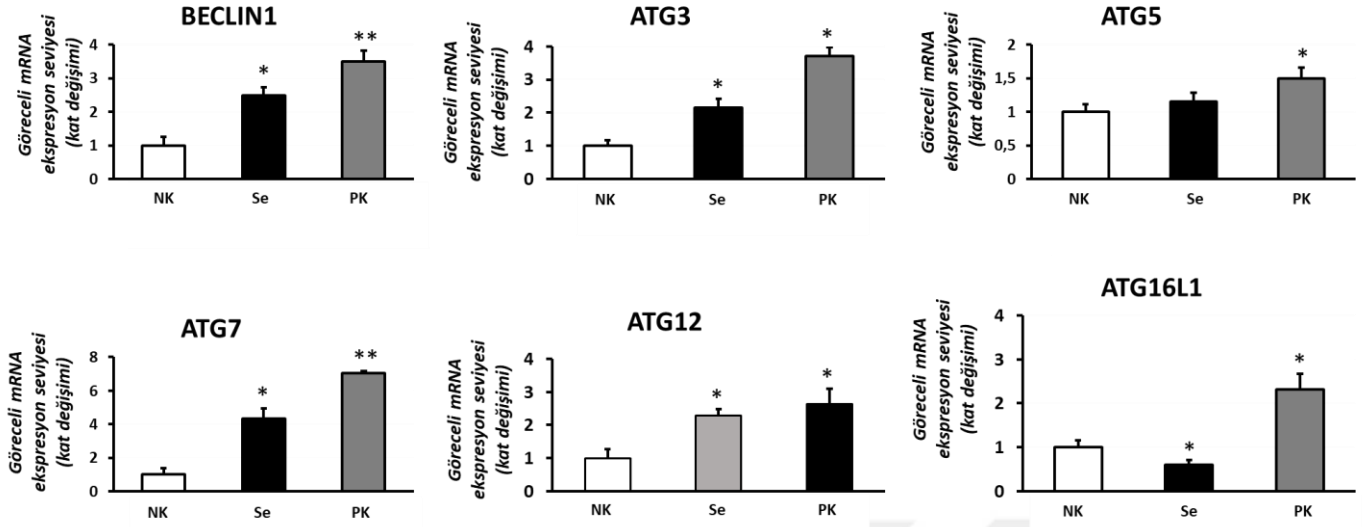
ATG7 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG7 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,03$) (Şekil 2).

ATG12 ekspresyonu açısından pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG12 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 14).

ATG16L1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 14). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG16L1 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif ve negatif kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi (sırasıyla $p=0,002$; $p=0,02$) (Şekil 2).

Gruplar	Beclin1	ATG3	ATG5	ATG7	ATG12	ATG16L1
Negatif kontrol (n= 10)	1,00±0,24	1,00±0,17	1,00±0,11	1±0,38	1,00±0,26	100±0,15
Pozitif kontrol (n= 9)	3,49±0,32	3,70±0,25	1,49±0,15	7,02±0,13	2,62±0,45	2,31±0,35
Selenyum (n= 10)	2,48±0,23	2,15±0,27	1,15±0,13	4,31±0,63	2,28±0,19	0,59±0,11

Tablo 14: qRT-PCR yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 göreceli mRNA ifadesi düzeyleri ve kat artışı cinsinden sunulması



Şekil 2: qRT-PCR yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16L1 göreceli mRNA ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemli t Testi ile analiz edildi ($p < 0,05$); * $< 0,05$; ** $< 0,001$.

4.6.2- İmmunoblotlama Çalışma Bulguları

4.6.2.1- Beclin1, ATG5, LC3II, LC3II/LC3I, fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK, p62/SQSTM1 Protein İfadesi Düzeyleri

Beclin-1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 15). Pozitif kontrol grubunda en yüksek Beclin-1 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p = 0,00123$) (Şekil 3).

ATG5 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 15). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG5 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p = 0,00371$) (Şekil 3).

LC3-II ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 15). Pozitif kontrol grubunda en yüksek LC3-II ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p = 0,00581$) (Şekil 3).

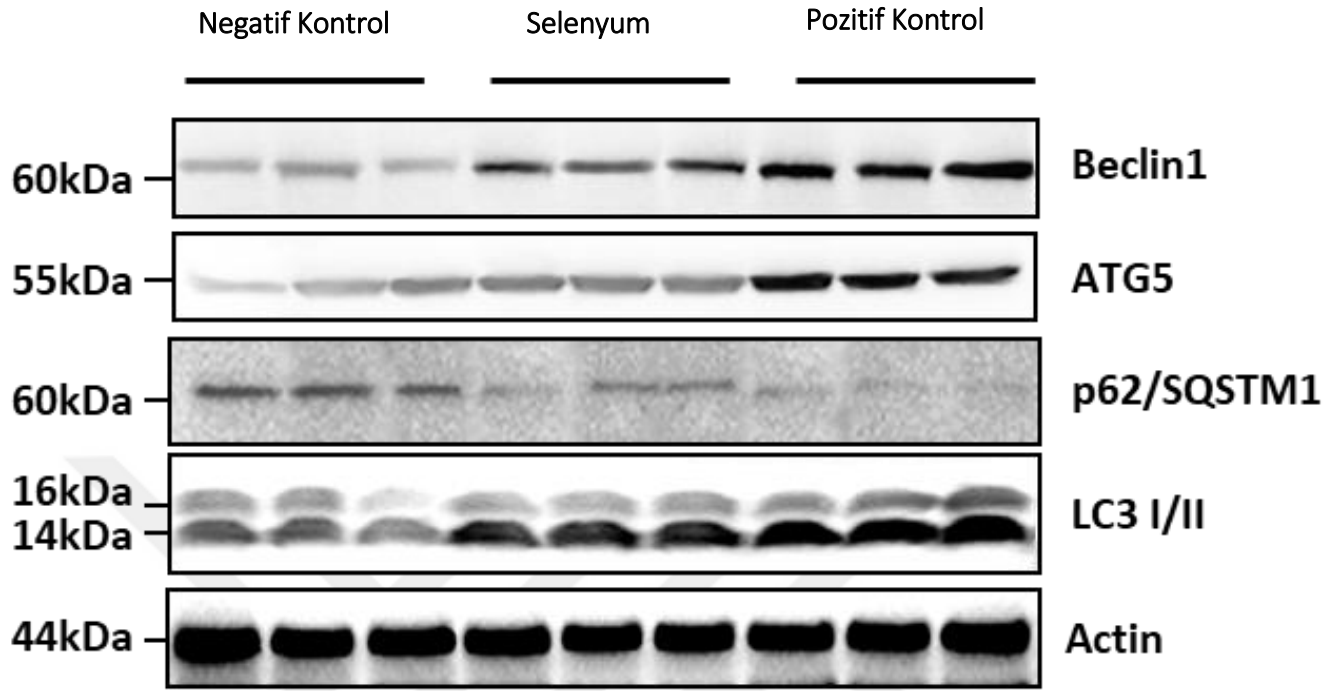
LC3-II/I ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 15). Selenyum grubunda en yüksek LC3-II/I ekspresyon seviyesi izlenirken, pozitif kontrol grubunda selenyum grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,03873$) (Şekil 3).

fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 15). Pozitif kontrol grubunda en yüksek fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,00753$) (Şekil 5).

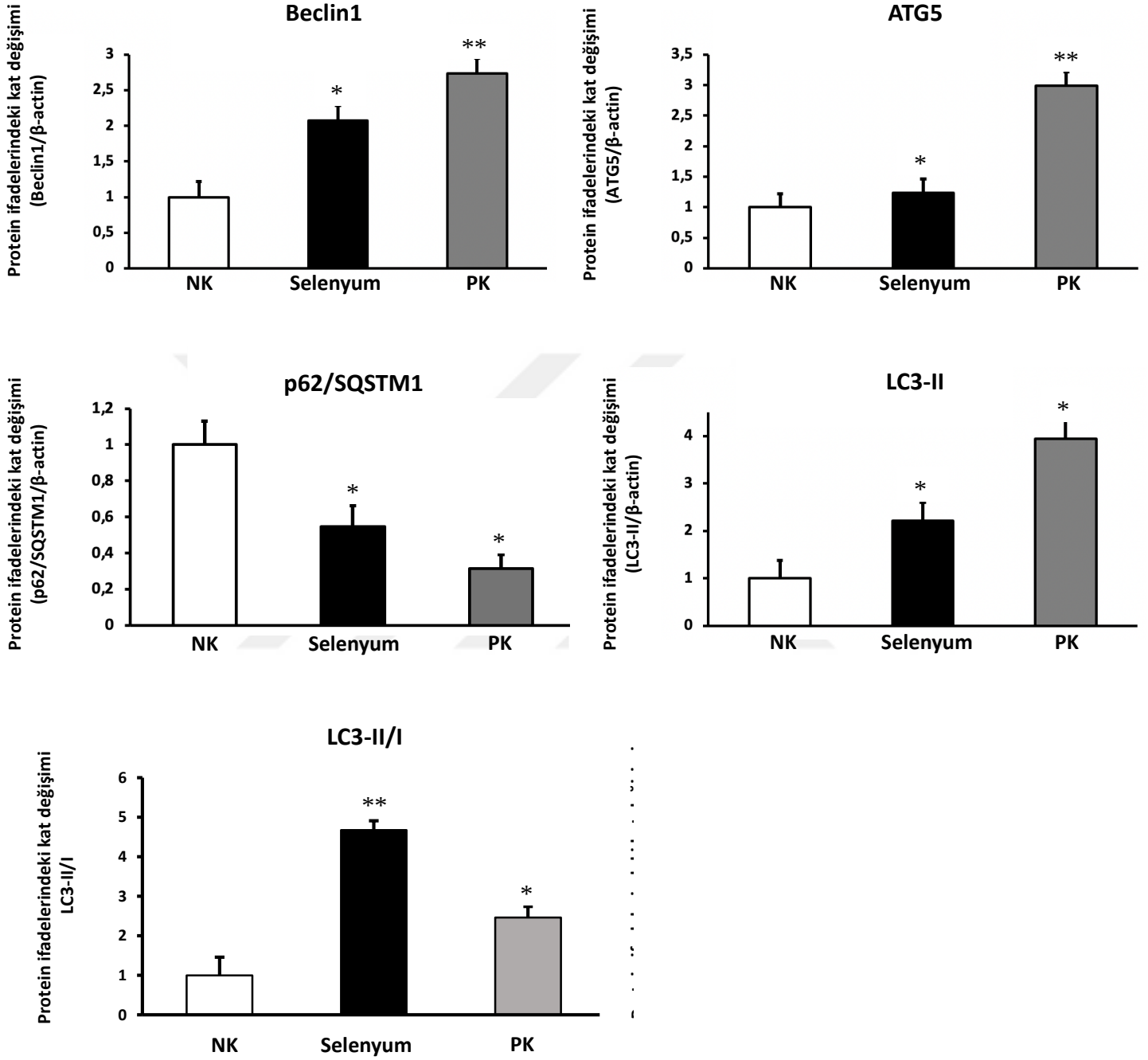
p62/SQSTM1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 15). Pozitif kontrol grubunda en düşük p62/SQSTM1 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde artma gözlemlendi ($p=0,04271$) (Şekil 3).

Gruplar	Beclin1	ATG5	LC3II	LC3II/LC3I	fosfo-p38MAPK/ p38 MAPK	p62/SQSTM1
Negatif kontrol (n= 10)	1,00±0,21	1,00±0,22	1,00±0,38	1±0,45	1,00±0,04	100±0,13
Pozitif kontrol (n= 9)	2,73±0,72	2,99±0,07	3,94±0,03	2,46±0,27	2,12±0,08	0,31±0,11
Selenyum (n= 10)	2,07±0,12	1,23±0,08	2,21±0,05	4,67±0,23	1,25±0,06	0,54±0,31

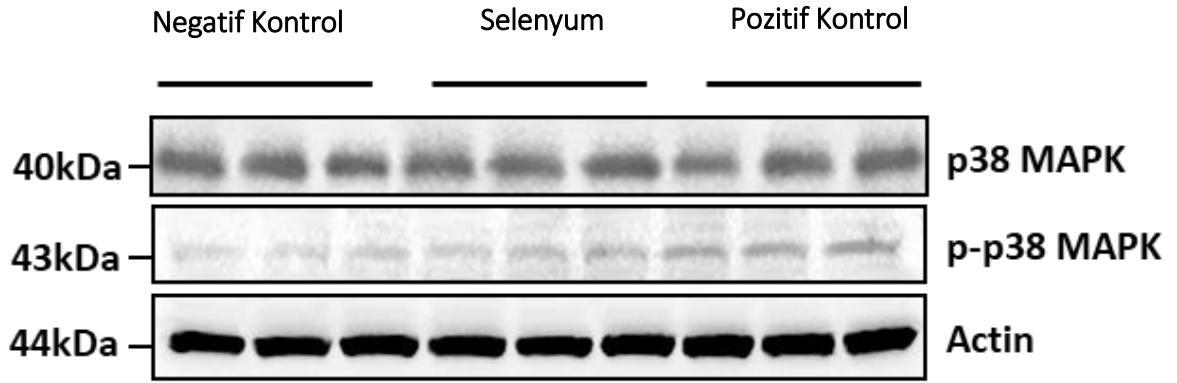
Tablo 15: İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG5, LC3II, LC3II/LC3I, Thr180/Tyr182 fosfo-p38MAPK/p38MAPK, p62/SQSTM1 protein ifadelerinin densitometrik analizi ve kat artışı cinsinden sunulması.



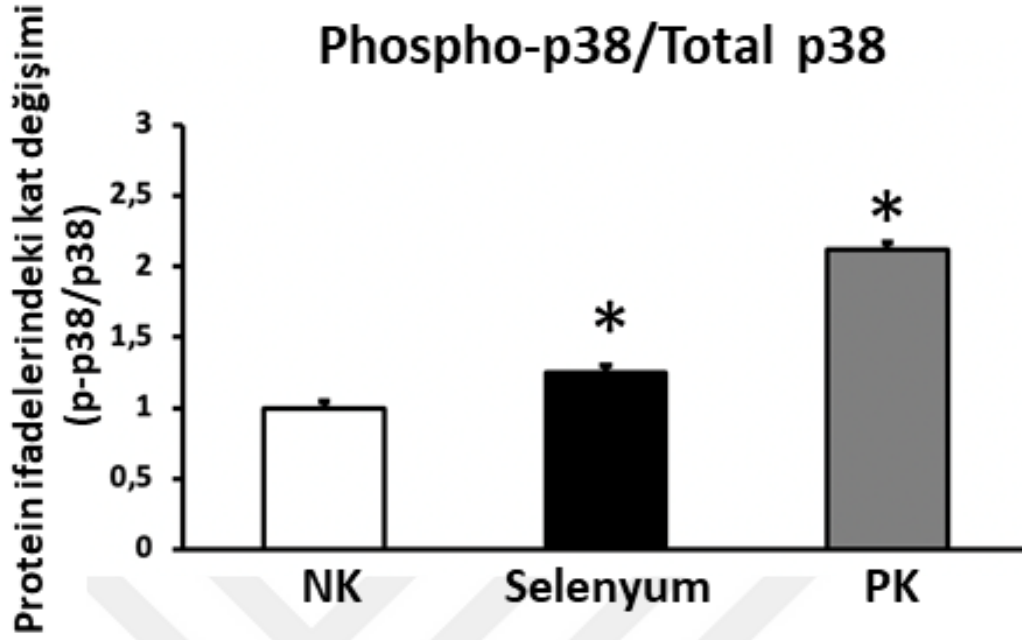
Şekil 3. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG5, LC3-II/I, p62/SQSTM1 protein bantlarına ilişkin görüntü. Yükleme kontrol proteini olarak Beta-actin kullanıldı.



Şekil 4. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Beclin1, ATG5, LC3II, LC-3II/I ve p62/SQSTM1 protein ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemli t Testi ile analiz edildi ($p < 0,05$); * $< 0,05$; ** $< 0,001$.



Şekil 5. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait p38 MAPK ve Thr180/Tyr182 p-p38 MAPK protein bantlarına ilişkin görüntü. Yükleme kontrol proteini olarak beta-actin kullanıldı.



şekil 6. İmmunoblotlama yöntemiyle negatif kontrol, pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait Thr180/Tyr182 fosfo-p38MAPK/p38MAPK, p62/SQSTM1protein ifadelerindeki kat değişim ve standart sapma değerleri. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırmalar iki bağımsız örneklemlili t Testi ile analiz edildi ($p < 0,05$); $* < 0,05$.

5- TARTIŞMA

Apikal periodontitis esas olarak pulpa dokusu ve kök kanallarındaki mikrobiyal enfeksiyona karşı konak immuno-enflamatuvar cevabın aktivasyonu sonucu meydana gelmektedir. Periapikal dokulardaki patolojik değişiklikler mikroorganizmanın kendisinden, toksinlerinden, zararlı metabolik artıklarından ve kök kanal sistemi içerisinde kalan pulpa dokusundan kaynaklanabilir. Enflamatuvar süreç öncelikle enfekte ve nekrotik pulpada başlasa da periapikal dokulara yayılarak çevre kemik dokuda rezorbsiyona neden olabilir.

Bu çalışmada, rat molar dişlerinde periapikal lezyon gelişiminde MAPK ve otofaji sinyal yolunu hedef alan moleküler mekanizma mRNA ve protein ifadesi düzeyinde ortaya konulmuştur. Periapikal lezyon oluşumu ile artan otofajik akış ve aktive olan p38 MAPK sinyal iletim süreçleri gösterilmiştir. Sistemik selenyum uygulamasının deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiş ve selenyumun periapikal dokuda enflamasyonu baskıladığı, kemik yıkımını azalttığı, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiş, hücresel düzeydeki MAPK ve otofaji sinyal yolunu baskıladığı ortaya konulmuştur.

Bu çalışma ve diğer periapikal lezyonların moleküler patogeneze ilişkin bilinmezleri aydınlatacak çalışmalar daha spesifik ve hedefe yönelik bir tedavi yaklaşımının uygulanmasını teşvik edecektir.

5.1- Çalışmada Kullanılan Ajanın Seçimi

Son yıllarda apikal periodontal enflamatuvar sürecin tam olarak aydınlatılması bakımından çok sayıda klinik ve deneysel çalışma yapılmakla birlikte; çalışmalarda özellikle periapikal lezyonların oluşumu, devamlılığı ve iyileşmesinde konak modülasyonunun önemine dikkat çekilmiştir. Konak modülasyonunu değiştirebileceği düşünülen lokal ve sistemik uygulamalar dikkat çekicidir.

Lokal uygulamalar arasında antihiperglisemik olan Metformin, anti-enflamatuvar olarak Rezolvin-D2 (303), antioksidan N-asetil sistein (NAC) (279) ve selenyum (273) sayılabilir. Ratlarda kanal içi metformin uygulanması periapikal lezyon ile ilişkili kemik rezorbsiyonunu azaltmakta, osteolitik aktiviteyi ve enflamasyonu baskılamakta, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azaltmaktadır (278).

İnflamasyonun çözülmesine yön veren moleküllerin keşfedilmesi ile bu sürecin sadece pasif olmadığı daha çok biyokimyasal işlemler ile düzenlenen aktif bir süreç olduğu anlaşılmıştır. Resolvinlerin sürece katılımı 2013 yılında anlaşıncı doku seviyesinde programlı bir çözülmeden bahsedilmektedir. Resolvinler enflamasyonun çözülme aşamasında endojen

olarak salgılanan yağ medyatörlerdir. Bu medyatörler akut enflamatuvar fazı sonlandırırken doku rejenerasyonunu doku iyileşmesini aktive ederler. N-asetil sistein glutatyon öncülü olup antioksidan mukolitik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Serbest oksijen radikallerini nötralize ederek oksidatif stresin etkisini azaltmaktadır. İnsanlarda kök kanal medikamenti olarak NAC kullanılması resolvin seviyesini arttırmıştır (279). Antioksidan savunma, hücre bölünmesi ve farklılaşması ve bağışıklığın sağlanması gibi birçok biyolojik aktivitede görev alan selenyumun tek başına veya kalsiyum hidroksitle birlikte kök kanal medikamenti olarak 15 günlük kullanımının enflamatuvar medyatörler üzerinde etkili olarak periapikal doku onarımını güçlendirebileceğini gösterilmiştir (273). Literatürde sistemik olarak kullanılan ajanları bifosfanat, seçici östrojen reseptör modülatörü, antihiperlipidemik, katepsin K inhibitörü ve antioksidanlar olarak sıralayabiliriz. Bifosfanat grubundan olan alendronat ve zoledronik asit uygulamasının periapikal kemik yıkımını ve osteoklast sayısını azalttığı bildirilmiştir (280, 281). Raloksifen menopoz sonrası osteopeni ve osteoporozu engellemek amacıyla kullanılan bir seçici östrojen reseptör modülatörüdür. Östrojen eksikliği kemik metabolizmasını değiştirmekte, osteoklast sayısını ve kemik yıkımını arttırmaktadır. Raloksifen özellikle osteoklast sayısını azaltarak periapikal kemik yıkımının şiddetini azaltmıştır (282).

Antienflamatuvar etkileri de ortaya konan Metformin tip 2 diyabet hastalarında kan glukoz konsantrasyonunu düşürmek için kullanılmaktadır. Ratlarda periapikal lezyon modelinde alveol kemik yıkımını, osteoklast sayısını, RANKL pozitif hücre sayısını azalttığı, OPG pozitif hücre sayısını arttırdığı gösterilmiştir (283).

Katepsin K osteoklastlar tarafından açığa çıkarılan proteinleri parçalayan bir enzimdir. Doku yıkımında rol almakta özellikle tip 1 kollajeni parçalamakla görevlidir. Diğer bir değişle osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kemik rezorbsiyonundan sorumludur. Literatürde Katepsin K inhibitorünün sadece osteoklastların değil osteoklastogenezde etkili proenflamatuvar sitokinleri ve sonuç olarak peripikal lezyon genişliğini azalttığı bildirilmiştir (284).

Antioksidan ajanlardan Tempol ve yeşil çay polifenolü olan epigallocatechin-3-gallate'ın ratlarda periapikal lezyon büyüklüğünü ve enflamasyonun şiddetini baskılamıştır (285, 286).

Sunulan bu çalışmada antioksidan sistemik selenyum uygulamasının periapikal lezyon üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Literatürde lipopolisakkarit (LPS) uygulanarak akut enflamatuvar cevabın indüklendiği rat çalışmalarında, serum selenyum konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür. Bu durum akut enflamasyon durumunda selenyum konsantrasyonunda

azalma olacağını ve idame edilmesi ihtiyacının doğacağını önermektedir (287). Güçlü bir antioksidan olan selenyumun reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre içi hasarın engellenmesinde ve hücre gelişiminin, canlılığının, genetik faktörlerin ve enzimlerin düzenlenmesinde hayati role sahip olduğu bilinmektedir (288).

Selenyum, mitokondri içindeki protein tiyol gruplarında değişimleri tetikleyerek sitokrom c'nin serbest kalmasına neden olarak mitokondriyal membran potansiyelinin kaybedilmesi ile serbest oksijen radikallerinin üretimini baskılamaktadır (289) .

Selenyum eksikliği kemik metabolizması bozukluğu ve osteopeni ile ilişkilendirilmiş ve selenyum düzeyinin kemik mineral yoğunluğunu etkilediği gösterilmiştir (290). Selenyum tedavisinin osteoblast benzeri hücre tiplerinde mitokondriyal oksidatif stresi azalttığı da gösterilmiştir (291).

Literatürde selenyumun hücreler üzerinde otofajik yolağı farklı şekillerde etkilediğine ilişkin veri paylaşılmaktadır. Bu verilerdeki en dikkat çekici şey ise selenyumun doku özgül olarak otofajik yolağın aktivasyonu veya baskılanması yolu ile farklı şekillerde etki göstermesidir. RAW264.7 makrofajları ile sürdürülen bir çalışmada *S. aureus* enfeksiyonuna karşı selenyum etkinliğini test edilmiştir. Elde edilen bulgular *S. aureus* enfeksiyonu sonrası zayıflayan otofajik etkinliğin selenyum uygulaması sonrası otofajik akıştaki inhibisyonun hafiflediğini göstermiştir. Ayrıca aynı çalışmada selenyum uygulaması sonrası MAPK fosforilasyonunun baskılanması yolu ile bu sinyal iletimi üzerinde de selenyumun baskılayıcı bir role sahip olduğu gösterilmiştir (292).

Bir başka çalışmada ise kurşun (Pb) zehirlenmesine karşı selenyum takviyesinin Pb zehirlenmesi etkilerini zayıflattığı, bu etkinliği Pb aracılı indüklenen oksidatif stres ve artan otofajik aktivitenin baskılanması yolu ile gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Tavuk testisleri üzerinde sürdürülen bu çalışmaya göre selenyumun otofaji üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu önerilmiştir (293). Benzer şekilde Wang ve ark. tavuk ovaryum hücrelerinde kadmiyum (Cd) aracılı oluşan doku hasarının selenyum uygulaması ile hafifletildiğini rapor etmiştir. Bu etkinin altında yatan mekanizma olarak Cd aracılı artan otofajik aktivitenin selenyum uygulaması sonrası otofajik yolağın inhibisyonu yolu ile gerçekleştiği önerilmiştir. mTOR otofajik yolağı negatif regüle eden önemli bir proteindir. Bu çalışmada selenyum uygulamasının mTOR düzeylerini arttırarak Cd aracılı artan otofajik aktiviteyi baskıladığı gösterilmiştir (294).

Sunulan bu çalışmada farklı doku ve patolojilerde farklı cevaplar veren selenyumun periapikal lezyon gelişiminde MAPK ve otofaji sinyal yolunu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

5.2- Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Seçilmesi

Yeni bir materyal, cihaz veya ilacın insan sağlığı üzerine etkilerinin bilinmediği durumlarda ve etik kaygılar nedeniyle insanlar üzerinde araştırmalara izin verilmediğinde hayvan testleri kullanılmaktadır (295). Hayvan çalışmaları, insana bağlı değişkenleri ortadan kaldırarak enfeksiyon, dezenfeksiyon, enflamasyon, nekroz, iyileşme, rejenerasyon ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili biyolojik ve moleküler mekanizmaların tam olarak ortaya konulmasında dental araştırmalarda özellikle endodonti alanında önemli bir yere sahiptir. Hayvan çalışmaları, insanlar için bilinmeyen sağlık riskleri olan yeni dental materyallerin, ilaçların, medikamentlerin, cihazların ve aletlerin güvenliğini ve etkinliğini test etmek için de gereklidir (296).

Apikal periodontitis, kök kanal sistemi içinde mikrobiyal enfeksiyonun varlığına bağlı olarak periapikal bölgede başlayan ve ilerleyen konakçı immün yanıtıdır (297). Apikal periodontitisin histopatolojisini, moleküler mekanizmasını ortaya koymak, yeni tedavi yöntemleri, teknikleri ve materyalleri geliştirebilmek bu tedavilerin güvenliğini, biyouyumluluğunu ve toksikolojisini doğrulamak amacıyla *ex vivo* çalışmalar yerine hayvan modellerinin kullanılması uygundur (296).

Endodontoloji’de kullanılan hayvan çalışmalarına ilişkin yayınlanan rehberde (2021), insanlarda oluşabilecek sağlık sorunlarını minimize etmek amacıyla yapılan hayvan çalışmalarının etik ve kanunsal uygunluğunun gözetilip hayvan refahını korumaya yönelik olması konusu gündeme gelmiştir (298). Sıçanlar ve farelerin dahil olduğu kemirgenler, endodontik araştırmalarda en yaygın kullanılan hayvan türleridir. Geçmişte köpekler, kediler, gelincikler, kobaylar, tavşanlar, koyunlar, domuzlar ve hatta insan olmayan primatların bulunduğu daha büyük hayvanlar hayvan testlerinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, toplumun evcil hayvan türleri üzerinde yapılan hayvan testlerine karşı çıkması nedeniyle büyük hayvanların kullanıldığı çalışmalar azalmış ve insan dışı primat araştırmalarına bazı yasaklar getirilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan testler pahalıdır ve ulusal hayvan refahı kurallarına uymak için kapsamlı zaman ve çaba gerektirmektedir (315). Ratlar, evrimsel düzeyleri diğer birçok deney hayvanından daha düşük olması, insan oral dokuları ve mikroflorasıyla benzer yapıda olması, hızlı ve kolay üreme özellikleri, laboratuvar bakımlarının kolay olması,

ekonomik açıdan uygun olması yönleriyle endodontik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan etiği ve refahı göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda evrimsel olarak düşük, diş manipülasyonuna ve periapikal lezyon oluşumuna en uygun canlılar olarak literatürdeki deneysel periapikal lezyon modeli çalışmalarında olduğu gibi (274, 299, 300, 301, 302, 303) ratlar kullanılmıştır.

Rat çenelerinde her dört kadranda birer kesici üçer azı olmak üzere toplam 16 adet diş bulunmaktadır. Literatürde periapikal lezyon modeli oluşturan çalışmalarda sıklıkla alt birinci büyük azı dişler tercih edilmektedir (283, 285, 299, 300). Bu çalışmada da alt birinci büyük azı dişler; azı dişlerin periapikal lezyon modeline uygun olması, histolojik kesitlerde incelenmesinin kolay olması gibi nedenlerle kullanılmıştır.

Alt azı dişlerinde çalışma zorluğu oluşturan dil ve yanak dokularının açılacak kaviteye anatomik olarak yakın olması, arka bölgede görüş açısı ve manipülasyon kısıtlılığı problemleri yeterli ışık ve büyütme altında, modifiye edilen dental presel ve el aletlerinin ekartör olarak kullanılması sayesinde aşılmıştır.

Literatürde periapikal lezyonların değerlendirildiği hayvan çalışmalarında benzer modeller kullanılmıştır. Birçok çalışmada azı dişlerin pulparları deney süresince ağız ortamına açık bırakılmış ve periapikal lezyon oluşumu gösterilmiştir (274, 299, 300, 301, 302, 303). Hayvan çalışmalarında periapikal lezyon oluşumu teşvik edilirken genellikle pulpaya herhangi bir uyaran verilmemiştir (274, 301, 302). Ancak bazı çalışmalarda ise açılan kavitelere çeşitli endodontik patojen bakteri karışımı (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*) yerleştirildikten sonra kaviteler ağız ortamına açık bırakılmıştır (304). Kaneko ve ark. ise sağ ve sol mandibular 1. azı dişlerine ait pulpalara 1 µL *Escherichia coli* lipopolisakkariti uygulayarak periapikal lezyon oluşumunu başlatmışlar, kaviteyi geçici dolgu materyali kullanarak restore etmişlerdir (305).

Yaptığımız ön çalışmada herhangi bir uyaran olmadan pulpa kavitelerin 21 gün boyunca ağız ortamına açık bırakılmasının periapikal lezyon oluşumunda yeterli olduğu görüldü. Ön çalışmadan elde edilen bulgular ve daha önce gerçekleştirilen çalışma (274) sonuçları göz önünde bulundurularak bu çalışmada da pozitif kontrol ve selenyum gruplarındaki ratların alt çene 1. büyük azı dişlerinin pulparları herhangi bir uyaran olmadan deney süresince ağız ortamına açık bırakılarak periapikal lezyon oluşumu sağlandı.

Ratlarda periapikal lezyon modeli çalışmalarında 7, 14, 21, 28, 30 ve 56 gün gibi farklı süreler kullanılmıştır. Ratlarda periapikal lezyonun 0-15 günlerdeki gelişiminin oldukça hızlı olduğu, daha sonraki dönemlerde yavaşlamaya başladığı bildirilmiştir (306).

Pulpa ağız ortamına açıldıktan sonra osteoklastların periapikal lezyon bölgesine ilk defa 2. günde geldiği; 14. günde ise bölgedeki osteoklast sayısının en yüksek seviyeye çıktığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmalarda periapikal bölgede enflamatuvar infiltrasyon ve kemik yıkımının 7-14 gün arasında görülmeye başlandığı; 0-20. günler arasında lezyon genişlemesi ve kemik yıkımının olduğu bildirilmiştir (307, 308). Sun ve ark., mandibular 1. azı dişlerinde pulpanın ağız ortamına açılması ile periapikal lezyon oluşumunu başlattıkları 28 günlük çalışmalarında histolojik analizlerde 0. günden 28. güne kadar lezyon bölgesindeki enflamatuvar infiltrasyonun aşamalı olarak arttığını göstermişlerdir. Her 7 günde bir yapılan sakrifikasyonlar sonucunda 21. ve 28. günler hariç periapikal lezyon alanı ve kemik kaybı arasında anlamlı farklılık görülmüştür. Periapikal lezyon boyutu açısından 21. ve 28. günlerde arasında farklılık görülmemiştir (309).

Ön çalışma sonrası histolojik değerlendirmeler 21 günlük deney süresinin periapikal lezyon oluşumu açısından yeterli olduğunu göstermiştir. Ancak; ratlardan alınan dokuların homojenize edilmesi ve sonrasında RNA izolasyonu ve total protein izolasyonları gerçekleştirilerek sırasıyla RT-PCR temelli gen ifadesi çalışmaları ve SDS-PAGE'yi takiben sürdürülen Western blotlama çalışmalarıyla protein ifadelerindeki değişimlerin inceleneceği çalışmalar için ön çalışma kapsamında elde edilen bulgular 21 günlük periapikal lezyon indüksiyonunun yetersiz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle deney süresinin literatürdeki bazı çalışmalarla (303, 305) benzer olacak şekilde 28 gün olmasına karar verilmiştir.

Literatürde periapikal alandaki kemik kaybının değerlendirilmesinde periapikal radyografiler (fosfor plak ve digital radyografi) (274, 305) ve mikro-CT (302, 303, 310, 311) sıklıkla tercih edilmektedir. Yakın tarihli bir derlemede (312) mikro-CT'nin yüksek çözünürlüklü görüntüler ile (313) periapikal lezyonların çok düzlemli (3 boyutlu) değerlendirilmesine olanak sağlaması gibi avantajları nedeniyle (314) küçük hayvan modellerine dayalı çalışmalar için önemli bir tanısal doğrulama yöntemi olarak kabul edilmiştir.

Ratlarda deneysel periapikal lezyon modelinin oluşturulduğu bu çalışmada, 28 gün sonunda pozitif kontrol ve selenyum gruplarında periapikal alanda oluşan kemik kaybı dijital radyografik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada alt çene 1. büyük azı dişlerin mezyal köklerindeki periapikal lezyonlara ait dijital görüntüler Image J (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) görüntü analiz programına aktararak, uzunluğu (mm) bilinen bir skala yardımı ile kalibrasyon yapılmış ve lezyon alanları literatürde dijital radyagrafinin kullanıldığı çalışmalara benzer şekilde (315) hesaplanmıştır.

Periapikal lezyonlar, kök kanal sisteminin mikrobiyal biyofilmle enfekte olması sonucu, vücut savunmasındaki dengenin bozulmasıyla beraber periapikal enflamasyon ve kemik yıkımı oluşmasıyla karakterizedir (316). Histopatolojide kantitatif sonuçlar elde etmek zor olsa da skorumla yöntemi kullanılmakta ve sonuçlar semi-kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca hücreler, bağ dokusu, kemik yıkım alanları, hiperemi, ödem veya apse varlığı yerinde incelenebilmektedir.

İmmünohistokimya, hücre veya doku antijenlerinin (amino asitler, proteinler ve bulaşıcı ajanlar) tespiti amacıyla kullanılmaktadır. Yöntemde spesifik antikorlar boyama yoluyla görselleştirilebilen doku bileşenlerini (antijenler) doğrulamak için kullanılır. Enflamasyon ve kemik rezorpsiyonunda yer alan birçok aracı ve ilgili hücre, immünohistokimya ile semi-kantitatif olarak tespit edilebilir ve hangi hücrelerle ilişkili olduğu incelenebilir (274, 317, 318).

Dokulardaki kollajen liflerini görselleştirmek için çeşitli histolojik veya histokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın kollajen boyama yöntemleri Masson trikrom, van Gieson, Herovici veya Picro Sirius Red boyalarıdır. Picro Sirius Red boyaması kollajenin çift kırılma özelliklerine dayanır. Picro Sirius Red, uzun çift kırılmalı bir moleküldür; kollajene bağlandığında, kollajen fibrillerine paralel olarak yönlenir, böylece doğal çift kırılmalarını büyük ölçüde artırır (319). Cooreia ve ark., enflamatuvar fibröz hiperplazi, piyojenik granülom, periapikal granülom ve radiküler kistlerden oluşan 48 örnekteki kollajen yoğunluğunu Picro Sirius Red boyama yaparak incelemişlerdir (320). Periapikal lezyonlar, periapikal enflamasyon ve kemik kaybıyla beraber periodontal ligament dokularında yıkımla karakterizedir (316). Çalışmamızda oluşturduğumuz periapikal lezyon modelindeki periyodontal ligamentin kollajen reaksiyonu Picro Sirius Red boyaması ile değerlendirilmiştir.

Gram boyama ile pulpa ve periapikal doku hastalıklarının esas etyolojik faktörü olan bakterilerin varlığı, kök kanalı ve periapikal lezyon içindeki konumu izlenebilmektedir (321). Günümüzde enflamatuvar lezyonlar gibi çeşitli patolojilerin altında yatan nedenlerin hücresel düzeyde araştırılması ve geliştirilecek yeni terapötik yaklaşımların hücresel odaklar üzerinden olası tedavi edici ve önleyici etkilerinin anlaşılması ve karakterize edilmesi bir gereklilik haline gelmiştir. Söz konusu patolojilerin oluşum ve gelişim süreçlerinin anlaşılabilmesi ve takibi amacıyla moleküler yaşam bilimlerine ilişkin yöntemlere sıklıkla başvurulmaktadır. Bu amaçla çalışmalarımızda apikal periodontitis gelişimine karşı selenyumun olası koruyucu etkisine bağlı olarak moleküler düzeydeki hücresel değişimlerin araştırılabilmesi amacıyla gen ve protein ifadesi düzeyindeki değişimlerin incelendiği çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmamızda da qRT-PCR ve western blotlama yöntemlerinden faydalanılmıştır. Özellikle qRT-PCR çalışmaları

hücrelerdeki gen ifadesi değişim profillerinin eş zamanlı olarak incelenebildiği hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek bir metottur. Bununla birlikte SDS-PAGE’i takiben sürdürülen Western blotlama yaklaşımı protein ifade düzeyindeki değişimlerin incelendiği güvenilirliği yüksek, hedef proteine özgül antikorlar ile işaretlemelerin yapıldığı ve görüntülendiği bir metodolojidir (322). Her iki yöntem de moleküler yaşam bilimleri alanındaki çalışmalarda bilim camiası tarafından altın standart olarak kabul gören yaklaşımlardır. Bu yöntemler, yüksek duyarlılığa sahip olması ve hücresel düzeydeki değişimlerin kantitatif olarak analiz edilebilmesine imkân sunması nedeniyle çalışmalarımızda tercih edilmiştir. Ayrıca söz konusu yöntemlerde internal kontroller eş zamanlı olarak değerlendirilebilmekte ve elde edilen sonuçların güvenilirliği uluslararası otoritelerce kabul görmektedir. Bu nedenle çalışmamızda enflamasyon gibi süreçlere yön veren otofaji ve MAPK sinyal iletim mekanizması üyelerinin gen ve protein ifadesindeki değişimleri, hassas bir şekilde ölçülebilmesi ve karşılaştırmalı olarak analiz edilebilmesi amacıyla qRT-PCR ve Western blotlama yöntemleri ile incelenmiştir.

5.3- Radyografik Bulguların Değerlendirilmesi

Literatürde selenyumun ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyon boyutları üzerine etkilerinin radyografik teknikler ile araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte alfa lipoik asit, Rezolvin D2, metformin, tempol gibi ajanların periapikal kemik yıkımındaki etkileri dikkat çekicidir.

Sarıtekin ve ark. (2019), antioksidan ve antirezoptif etkili bir ajan olan melatoninin sistemik olarak uygulanmasının kemik yıkımını azalttığını ve radyografik lezyon alanının melatonin verilmeyen gruba göre daha küçük olduğunu bildirilmişlerdir (274). Yine melatonin gibi antioksidan bir ajan olan Tempol’ün kardiyomiyopatili ratlarda periapikal lezyon alanında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (285).

Glutasyon peroksidazın yapısında bulunan selenyumun güçlü bir antioksidan olduğu bilinmekte ve intraperitoneal selenyum uygulamasının diyabetli ratlarda mandibula kemik yapısının daha sağlıklı görünmesi sağladığı bildirilmiştir (271). Sunulan bu çalışmada da Tempol ve melatonin gibi antioksidanlarda olduğu gibi selenyumun ratlarda deneysel periapikal lezyon modelinde radyografik kemik yıkımını azalttığı gösterilmiştir.

5.4- Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Periapikal lezyonların başlaması ve ilerlemesindeki hücresel ve moleküler etkenler iyi tanımlanmıştır (323). Periradiküler periodontitisin kök kanal sistemindeki patojenler ile konak immün hücrelerinin karşılaşmasından kaynaklandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (324). Pulpanın ağız ortamına açılması sonrası pulpa nekrozu ile karakterize periapikal yıkım, enflamatuvar hücrelerin ortamda birikmesi ve alveolar kemik rezorpsiyonu sunulan bu çalışmada olduğu gibi hayvan modeli kullanan diğer çalışmalarda da gösterilmiştir (274, 280, 281). Özellikle lenfosit ve nötrofil yoğunluğu dikkat çekmektedir (282).

Siddiqui ve ark. (2019) antienflamatuvar özelliği olduğu bilinen Rezolvin D2 uygulamasının ardından yaptıkları histolojik incelemelerde periapikal lezyonlarda enflamatuvar hücre infiltrasyonu, nötrofil, lenfosit ve monosit sayısının azaldığını göstermişlerdir (303).

Sarıtekin ve ark. nın (274) sistemik melatonin periapikal lezyonlardaki etkisini değerlendirdikleri çalışmada periapikal bölgedeki enflamasyon şiddetinin melatonin uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre daha az olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde pozitif kontrol grubunda pulpa damarlarında şiddetli hiperemi ve yoğun şekilde yangısal hücre infiltrasyonları, yoğun nekrotik alanlar ve periapikal dokuda şiddetli yangısal hücre infiltrasyonları izlendi. Sistemik selenyum uygulanan örneklerde ise enflamatuvar reaksiyon şiddetinin azaldığı görüldü.

5.5- Histomorfometrik Bulguların Değerlendirilmesi

Periapikal lezyonlarda meydana gelen kemik yıkım alanı histopatolojik kesitlerden elde edilen dijital görüntüler üzerinde histomorfometrik analizler ile değerlendirilebilmektedir.

Tanaka ve ark. nın, disintegrin, MMP-8 ve MMP-17 ifadelerinin rat modellerindeki periapikal lezyon gelişimine etkilerini inceledikleri çalışmalarında elde edilen histomorfometrik analiz bulguları, pulpa ekspozundan sonra 28. güne kadar periapikal lezyon boyutunun aşamalı olarak arttığını göstermiştir (325).

Wayama ve ark., ovariektomili ratlarda periapikal lezyon oluşumunu indükleyip sistemik zolendronik asit uygulamışlardır. Yapılan histomorfometrik analiz doğrultusunda zolendronik asit uygulanan ratlarda daha az kemik rezorpsiyonu olduğu bildirilmiştir (281).

Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği ve kemik rezorpsiyonunda görev aldığı bilinen Katepsin K enziminin sistemik olarak inhibitörünün verildiği rat çalışmasında yapılan histomorfometrik analizler sonucunda, Katepsin K inhibitörü verilen grupta periapikal lezyon boyutunun kontrol grubundan daha az olduğu gösterilmiştir (284).

Gomes-Filho ve ark., ovariektomili ratlarda periapikal lezyon oluşumunu indükleyip sistemik östrojen reseptör modülatörü olan Raloksifen uygulamışlardır. Bu çalışma ile östrojenin periapikal lezyonlardaki önemi ve eksikliğinde yerine konulması ihtiyacı araştırılmıştır. Yapılan histomorfometrik analiz doğrultusunda Raloksifen uygulanan ratlarda daha az periapikal kemik rezorpsiyonu olduğunu bildirmişlerdir (282).

Conti ve ark. (2020), aterosklerozis ve apikal periodontitis ilişkisini araştırdıkları rat çalışmasında indüklenmiş periapikal lezyon alanını histomorfometrik analizlerle değerlendirmişler ve aterosklerozlu ratlarda periapikal alanda artmış enflamatuvar reaksiyon ve kemik kaybını göstermişlerdir (326).

Lipooksijenazlar, lökotrienlerin aktivasyonunu sağlayan ve dolaylı olarak enflamatuvar medyatör sentezine sebep olan enzimlerdir. Paula-Silva ve ark. (2020), apikal periodontitis oluşumunu indükledikleri fare modelinde yapılan histomorfometrik analiz sonucunda 5-lipooksijenaz geni susturulan farelerde kemik kaybının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (327).

Sarıtekin ve ark., (2019) periapikal lezyon modeli oluşturdukları ratlarda sistemik melatonin uygulamasının antienflamatuvar ve antirezortif etkilerini incelemişlerdir. 21 gün ağız ortamına açık bırakılan alt 1. azı dişlerinin periapikal lezyon alanı histomorfometrik olarak ölçülmüştür (274).

Sunulan bu çalışmada 28 gün boyunca sistemik selenyum uygulanan grupta histomorfometrik olarak değerlendirilen periapikal lezyon alanı ($0,9 \text{ mm}^2$) pozitif kontrol grubundaki ($4,04 \text{ mm}^2$) lezyon alanından daha küçüktür. Sistemik selenyum uygulaması kemik yıkımını literatürdeki diğer sistemik ajanlar gibi azaltmıştır.

5.6- Picro-Sirius-Red Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi

Kollajen, periodontal dokuların ana hücre dışı protein bileşenidir ve enflamatuvar hasarlardan sonra kollajen üretimi, periodontal yara iyileşme süreci için büyük önem taşımaktadır (328). Antioksidan özellikleri bilinen C vitamini kollajen üretiminde önemli rol oynamaktadır. C vitamini diyeti ve yumuşak dokuların üretimi ile birlikte kemik matriksinin

oluşumu için de önemlidir. Alfa lipoik asit ve C vitamininin kombine verildiği rat çalışmasında osteoklastla indüklenen kemik rezorpsiyonunun ve bağ doku kaybının azaldığı gösterilmiştir (329).

in vitro çalışmalarda a-tokoferol ve selenyumun kombine halde uygulanmasının hem gingival fibroblastlarda hem de PDL fibrillerinde kollajen üretimini artırabileceği gösterilmiştir. Asman ve ark., ROS tarafından indüklenen kollajen yıkımına karşı selenyumun koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir (260). Periodontal hasar oluşumu indüklenen rat çalışmasında sistemik a-tokoferol ve selenyumun uygulamasının periodontal doku hasarını ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (330).

Literatürde periapikal lezyon modelinde kollajen yıkımını Picro-Sirius-Red boyaması yaparak değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada pozitif kontrol grubundaki ratlarda yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle PDL kollajenlerinde azalma ve parçalanmalar izlenmektedir. Selenyum grubunda belirgin şekilde azalmış yangısal reaksiyon ve normal periodontal ligament kollajen görünümü kaydedilmiştir.

5.7- Gram Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi

Literatürde selenyumun deneysel periapikal lezyon modelinde bakteri varlığı ve yerleşimine etkisini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak selenyum eksikliğinin, antikor üretimi dahil olmak üzere hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığın çeşitli bileşenlerini olumsuz etkilediği, konağın enfeksiyonlara karşı direncini azalttığı bilinmektedir. İnsanlarda düşük selenyum konsantrasyonları, azalan doğal immün hücre aktivitesi ve artan fırsatçı hastalık ile ilişkilendirilmiştir (331). Sistemik selenyum eksikliği olan farelerde immün sistemin baskılanmasıyla birlikte lenf nodları, karaciğer, dalak ve beyinde bakteriyel invazyonun kontrol grubu farelere göre daha fazla olduğu Wang ve ark. tarafından bildirilmiştir (332).

Literatürde konak savunma yanıtında önemli rolü olduğu bilinen myeloid farklılaşma primer cevap geni (MyD88) eksikliğinde farelerde kontrol grubunun aksine mikrobiyal enfeksiyonun periapikal bölge ve lezyona kadar uzandığı bildirilmiştir. Çalışmada iki grup arasında ortaya çıkan anlamlı farkın, MyD88 eksikliğinde konak direnci ve enfeksiyon ile savaş kabiliyetinin azalmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Yine sistemik melatonin uygulamasının ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlarda bakterinin koronal

bölgeden peripikal lezyona kadar olan yerleşim yerini ve yoğunluğunu konakçı lehine etkilediği gösterilmiştir (274).

Sunulan bu çalışmada da Gram boyama sonucu periapikal lezyon oluşturulan tüm gruplarda bütün örneklerde bakteri varlığı gözlenmiş ve genellikle kron ve kök içerisinde özellikle kronik endodontik enfeksiyonlarda baskın olan yoğun Gram + bakteri kümelerine rastlanmıştır (333). Pozitif kontrol grubunda tüm örneklerde kron ve kök pulpasında ve periapikal dokuda yaygın şekilde bakteri kümeleri dikkati çekerken, selenyum grubunda daha az yoğunlukta bakteri kümeleri izlenmiştir. Selenyum melatonine benzer şekilde konak savunma yanıtını değiştirmiştir.

5.8- IL-6 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi

IL-6, temel olarak mononükleer makrofajlar, T helper 2, B hücreleri, vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli kaynaklardan köken almaktadır (334). İnsan IL-6 geni, 5 ekzon ve 4 introndan oluşan yaklaşık 5 kb uzunluğunda olan kromozom 7'nin kısa kolunda bulunur. IL-6 molekülü, 26 kDa moleküler ağırlığa sahip, 184 amino asitten oluşan, hedef hücrelerin yüzeyindeki IL-6 reseptörünü tanıyarak ve ona bağlanarak çeşitli biyolojik etkilere aracılık eden bir glikoproteindir (335).

IL-6, Janus kinaz (JAK)-STAT, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve (PI3K)-protein kinaz B (Akt) yolunu aktive edebilir (336, 337). IL-6, immün yanıtlarda önemli rol oynayan bir sitokindir (338). IL-6 aktif mononükleer fagositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından mikrobiyal enfeksiyona ve IL-1 ile TNF gibi diğer sitokinlere yanıt olarak üretilmektedir. IL-6, antikor (ve otoantikor) üretimi, T hücrelerinin aktivasyonu, B hücresi farklılaşması, akut faz proteinlerin, hematopoez üretimi, vasküler geçirgenlik ile ilgili bir dizi biyolojik işlemi uyarabilir (339). IL-6, farklılaşma, hayatta kalma, apoptoz ve çoğalma ile ilgili hedef genleri aktive edebilir. Hem proenflamatuvar hem de anti-enflamatuvar sitokin olarak kabul edilen IL-6; enflamasyon sırasında, TNF- α ve IL-1 salgılandıktan sonra üretilir. IL-6 daha sonra TNF- α ve IL-1'in sekresyonunu inhibe eder (338). Pro-enflamatuvar sitokin olarak rolü, dolaşımdaki olgun nötrofillerin programlanmış hücre ölümüne müdahale etmesi ve aynı zamanda matür nötrofillerin sitotoksitesinin düzenlenmesinde rol oynamasıyla açıklanabilir (340). Baskın bir şekilde proenflamatuvar bir sitokin olan IL-6 ancak belirli koşullar altında, anti-enflamatuvar özelliklere sahip olabilir (341).

Tüm *in vitro* çalışmalar, IL-6'nın periapikal lezyonlarda görev aldığını ortaya koymaktadır (342). Periapikal lezyonlarda bulunan nötrofiller IL-6 üretmektedir. Periapikal lezyonlarda bulunan makrofajların da *in vitro* IL-6 üretebildiği gösterilmiştir. Bu veriler, primer endodontik içeriğin, endodontik hastalıklarda farklı klinik ve radyografik özelliklerin geliştirilmesine neden olan çeşitli sitokinlerin üretilmesi için makrofajları indükleyebileceğini göstermiştir. IL-6'nın aşırı üretimi, makrofaj hiper-reaktivitesine neden olmaktadır (343).

Bu çalışmada periapikal lezyonun indüklendiği pozitif kontrol grubunda yüksek IL-6 ekspresyonu izlenirken, sistemik selenyum uygulanan ve sağlıklı (negatif kontrol) grup örneklerinde çok düşüktür. Bu durum pulpanın ağız ortamına açılması ile pulpa ve periapikal dokuda histolojik olarak da gösterilen enflamasyon bulgularını desteklemektedir. Çalışmalar, periapikal lezyon boyutu ve IL-6 seviyesinin ilişkili olduğunu ve IL-6'nın osteoklast oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunu indüklediğini göstermiştir. Böylece kronik enflamatuvar lezyonlarda IL-6'nın kemik rezorpsiyonundaki rolü kanıtlanmıştır (343, 344, 345, 346). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sinerjik bir şekilde osteoklast farklılaşmasını uyarmaktadır (347) ve IL-6, TNF- α , IL-1 ve RANKL'in etkileşimi kemik rezorpsiyonunu artırabilir (348). Periapikal lezyon oluşumu sırasında, enfeksiyona cevaben gelişen IL-6 artışının, önceden var olan osteoklastları aktif hale getirmenin yanı sıra, hematopoetik progenitör hücrelerinden yeni osteoklastların oluşumunu da neden olabileceği bildirilmiştir (343, 349). Wu ve ark. (2017), ovariektomi sonrası alendronat tedavisinin osteoklast hücre sayısını etkilememesine rağmen IL-6 artışının osteoklast aktivitesini artırabileceğini iddia etmektedir (350).

Çalışmamızda TNF- α seviyesini azaltarak NF- κ B'yi inhibe ettiği (227) bilinen selenyumun sistemik olarak uygulanması periapikal dokuda enflamasyon şiddetini azaltmış, aynı zamanda IL-6 ekspresyon yoğunluğunu baskılamıştır. Bu sonuç selenyumun antienflamatuvar etkinliğini doğrulamaktadır. IL-6 seviyesinin baskılanması ile de periapikal kemik yıkımı radyolojik ve histomorfometrik olarak gösterildiği gibi azalmıştır. Çalışmada osteoklast sayısı değerlendirilmemiş olsa da IL-6 seviyesinin baskılanması ile osteoklast aktivitesinin azalmış olabileceği tahmin edilmektedir.

5.9- HIF-1 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi

Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), oksijen homeostazında görev yapan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Oksijen seviyesinin azaldığı hipoksik koşullar altında moleküler

seviyeden sistemik seviyelere kadar oksijen eksikliğinin giderilmesinde rol oynamaktadır (351, 352).

HIF-1, HIF-1 alfa ve betadan oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. Normal oksijen seviyesi altında (normoksi), HIF-1 α , prolil hidroksilaz domain enzimleri (PHD) tarafından translasyon sonrası hidroksillenir ve ardından proteazomal bozunmaya uğrar. Hipoksik koşullarda, HIF-1 α , PHD aracılı olarak bozunmayarak stabil kalır (353). HIF-1, yalnızca hipoksiste değil, aynı zamanda normoksiste de konakçı savunmasını sürdüren, bağışıklık yanıtında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür, NF- κ B'nin doğrudan hedef genidir. Ek olarak, HIF'i aktive eden hipoksik durumlar, NF- κ B alt birimlerinin çekirdeğe translokasyonunu sağlayarak enflamatuvar yanıtı neden olur. LPS ile uyarılan makrofajlarda, HIF-1'in NF- κ B'nin aktivasyonunu ve ardından proenflamatuvar sitokin üretimini normoksidedekine kıyasla hipoksiste daha fazla arttırdığı bilinmektedir (354). Kemik yıkımı, iyileşmesi ve fizyolojik kemik yeniden şekillenmesi süreçlerinin düzenlenmesinde etkinliği bilinen HIF-1 (355), potansiyel olarak nötrofilden türetilmiş vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) -C / -D / VEGF reseptörü (VEGFR) -2 / -3 sinyali içeren medyatörler aracılığıyla periapikal lezyonların gelişimine katılmaktadır (135, 356). Bununla birlikte, gen ekspresyonunu inceleyen bir çalışma, ratlarda indüklenen periapikal lezyon modelinde kök kanal tedavisinin ardından, HIF-1 α 'nın periapikal yara iyileşmesi sürecinde potansiyel rolü olduğunu bildirmiştir. HIF-1'in aktivasyonu kemik rejenerasyonunu hızlandırır, enflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltır ve yara iyileşmesini destekler (357-359).

Yu ve ark. şiddetli periodontitisli dişlerin pulpalarında odontoblastlarda, pulpa fibroblastlarında, vasküler endotelial hücrelerde ve enflamatuvar infiltrasyon hücrelerinde, sağlıklı diş pulpalarına kıyasla daha yüksek HIF-1 α seviyelerini bildirmişlerdir. HIF-1 α 'nın artan ekspresyonları, şiddetli periodontitise yanıt olarak diş pulpalarında hipoksinin meydana geldiğini göstermektedir. Bu sonuçlar pulpada hipoksik ortam varlığının şiddetli periodontitis ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır (360).

Periapikal mikrodolaşım, enflamasyon nedeniyle lokal olarak hasar gördüğünde, enflamatuvar hücrelerin hasar bölgesine toplanmasıyla periodontal dokularda çok sayıda O₂ tüketen enzim aktive olur ve bu durum hipoksiyle sonuçlanır (361). Hipoksiyle beraber, periodontal ligament hücrelerinde RANKL/OPG oranının artması alveolar kemik rezorpsiyonuna sebep olmaktadır. Bu bağlamda periodontal dokularda oksijenizasyonun bozulmasının, periodontitis gelişimini hızlandırdığı söylenebilir (362). Özellikle geniş periapikal lezyonlarda hipoksinin dev osteoklast oluşumunu ve rezorpsiyon aktivitesini teşvik

ettiği bildirilmiştir (363). Benzer şekilde, osteoklastik aktiviteyle ilişkili NFATc1, CTSK ve TRAP, hipoksik koşullar altında normal atmosferdekenden daha yüksek seviyede bulunmaktadır. Ayrıca hipoksi anjiyojenik-osteojenik eşleşmeyi ve osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu da etkilemektedir (364, 365).

Sunulan bu çalışmada periapikal lezyon oluşumu teşvik edilen tüm örneklerde HIF immunreaksiyonunun artmış olması kronik enflamasyonda hipoksi ve enflamasyonun sıklıkla aynı anda ortaya çıktığını kanıtlamaktadır (366). Endodontik enfeksiyon sürecinde, bakteri motiflerinin fagositlerin yüzeyindeki TLR'lere bağlanması, fagositozun başlamasına, humoral ve hücrel yanıtın indüklenmesine (sırasıyla lenfositler B ve T tarafından aracılık edilir), sitokinler ve MMP'ler ile enflamatuvar mediatörlerin sentezi ve bunun sonucunda ROS üretimine sebep olur. Hipoksik hücrelerde artan ROS öte yandan HIF-1 birikimini uyarır (367). Hücre içindeki ROS'ları azalttığı bilinen selenyumun bu çalışmada da sistemik olarak uygulanması HIF-1 seviyesini azaltmıştır.

5.10- COX-2 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi

Siklooksijenaz (COX)-2, araşidonik asitten prostaglandin ve tromboksan üretiminden sorumlu; enflamatuvar reaksiyonların ve kistik lezyonların büyümesinde ve yayılmasında önemli rol oynayan bir plazma membran enzimidir (368). İki COX izoformu tanımlanmıştır. COX-1, anjiyostanini korumak için çoğu trombositler, mide ve bağırsak gibi birçok dokuda üretilirken, normal koşullar altında mevcut olmayan COX-2, enflamasyon sırasında endotoksin veya sitokinler tarafından indüklenir (369).

Ratlarda deneysel periapikal lezyon modellerinde COX-2'nin hücre proliferasyonu ve adezyonu, immün denetim, apoptoz ve anjiyojenizde rol oynadığı gösterilmiştir (370). Bakteriyel enfeksiyon sırasında LPS kaynaklı kemik rezorpsiyonu için COX-2 aracılı PGE2 üretimi gereklidir. Bu mekanizma, RANK-RANKL etkileşiminden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Periapikal lezyonlarda artmış COX-2 ekspresyonu, periapikal granülomlarda MMP-1 ve IL-6 sentezi modülasyonunu değiştirerek kemik yıkımını artırabilir. Periapikal granülom ve kistlerde COX-2 seviyelerinin artması immün hücrelerin aktivasyonunu ve enflamatuvar yanıtı uyarabilir (371, 372).

Sunulan bu çalışmada periapikal lezyon oluşumu teşvik edilen tüm örneklerde COX-2 immunreaksiyonu artmıştır. Oksijen azlığı ile karakterize periapikal lezyonlarda HIF-1 yoluyla COX-2 ifade düzeyinin arttığı bilinmekte ve çalışma bulgularımız bu durumu destekler

niteliktedir (367). Hücre içindeki ROS'ları azalttığı bilinen selenyumun bu çalışmada da sistemik olarak uygulanması HIF-1 seviyesini azaltarak dolaylı olarak COX-2 seviyesinde de azalmaya neden olmuştur. COX-2 aracılığı ile araşidonik asitten üretilen prostaglandin, IL-6 sentezini indükleyebilir (373, 374). Gerçekten de COX-2 etkinliğini engellemek için meloksikam verilen ratlarda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, periapikal kemik kaybında %43'lük, IL-6 mRNA eksprese edici hücrelerin yüzdelerinde eşzamanlı azalma bildirilmiştir (370). Sunulan bu çalışmada da sistemik selenyum uygulaması birbiri ile direkt ilişkili olan IL-6, COX-2 ve HIF-1 ekspresyon şiddetini azaltmıştır.

5.11- Kaspaz-3 İçin İmmünohistokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi

Kaspazların CED-3 alt ailesinin bir üyesi olan Kaspaz-3 (CPP32, apopain), apoptoz sırasında parçalanan nükleer enzim poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) gibi birçok anahtar proteinin kısmi veya toplam proteolitik bölünmesinden sorumludur (375).

Kaspaz-3, memeli hücrelerinde apoptozun anahtar belirteci olarak tanımlanmakta ve ana ölüm kaspazı olarak bilinmektedir (376). Birçok hastalık patogenezinin büyük ölçüde bakteriler tarafından modüle edilen apoptozdan etkilendiği bilinmektedir (377). Apoptoz, enflamasyon regülasyonunda ve konakçı immün yanıtında çok önemli rol oynayan, yüksek düzeyde regüle edilmiş bir programlanmış hücre ölümü biçimidir (378, 379). Patojenleri veya yaralı hücreleri dokulardan elimine etmede kritik rolünün olması, apoptozun enflamatuvar süreçteki ve enflamasyonun çözülmesindeki önemini gösterir (378, 379).

Aktif kaspaz-3-pozitif enflamatuvar hücrelerin saptanması, apoptotik mekanizmaların muhtemelen devam etmekte olduğunun kanıtıdır. Aslında, aktif kaspaz-3 için pozitif olan hücrelerin varlığı, apoptoz aktivasyonunun ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (380, 381).

Hipoksi, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptozu içeren birçok farklı hücresel yanıt tipini indükleyen HIF-1 α seviyelerini arttırmaktadır (382). HIF-1 α , sitokrom c'nin mitokondriye salınmasını ve ardından kaspaz-3'ün aktivasyonunu teşvik edebilir (383). HIF-1 α birikimi ile Kaspaz-3 aktivasyonu arasında bir korelasyon olduğuna dair güçlü kanıtlar mevcuttur (384). Ayrıca, Kaspaz-3'ün RANKL ile indüklenen osteoklast farklılaşmasının erken safhasında uyarıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (385). Çalışmamızda da periapikal lezyon oluşumu teşvik edilen gruplarda HIF-1 ve Kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinin artmış olması literatürü desteklemektedir.

Çalışmamızda sistemik selenyum uygulanan örneklerde apoptotik marker olan Kaspaz-3 immünreaksiyonu azalmıştır. Selenyumun hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkisini açıklamak için önerilen karmaşık birkaç mekanizma vardır ve tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak selenyumun bu süreçlerde anahtar bir rol oynadığı kabul edilmiştir. Bu mekanizmalar protein kinaz sinyal iletiminde rol oynaması, kaspazların aktivasyonu, p53 fosforilasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile açıklanmaktadır (187, 188, 189, 386).

5.12- Otofajik Belirteçlerin RT-PCR ve Western Blot Bulgularının Değerlendirilmesi

Günümüzde periapikal lezyon gelişimi ve bu lezyonlara karşı geliştirilen önleyici ve tedavi edici yaklaşımların etki mekanizmalarını mekanistik olarak açıklayan bilimsel çalışmalar literatürde oldukça sınırlı bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmalarımız selenyumun periapikal lezyonlar üzerindeki olası etkileri incelemeye odaklanmıştır.

Enflamasyon ve programlanmış hücre ölümü dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal iletim yolu bakteriyel endotoksinler tarafından hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla algılanarak aktive edilmektedir (387). Hücrelerin maruz kaldığı bu sinyaller hücrelerdeki durağan fizyolojik homeostazisi bozmaktadır. Bakteriyel endotoksinler gibi uyaranlara karşı hücrelerden TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi proenflamatuvar sitokinler üretilerek salgılanır (388). Bu yol ile hücre hasara neden olabilen iltihaplanma ve daha da kötüsü apoptozis gibi hücre ölüm süreçleri tetiklenir ve çevre hücreleri de etkileyen doku düzeyinde karmaşık hücre yanıtı oluşur. Son çalışmalar, otofajik akışın hücrelerdeki iltihaplanma süreçlerinin yönetimi ile yakından ilişkili olduğunu vurgulamıştır (122, 389).

Otofaji, adaptif bağışıklığı ve ayrıca enflamatuvar hücre sitokinlerinin salgılanmasını düzenleyen iyi derecede korunmuş bir ökaryotik homeostatik yoldur (390, 391). Temelde otofaji sitoplazmik içeriğin otolizozom tarafından yutulması ve bozulması ile sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir (392). Bugün, otofajinin bağışıklık yanıtının düzenlenmesindeki rolü hala daha tartışmalıdır. Enflamasyonun başlatılması veya baskılanması, otofajik akış ile manipüle edilebilir (393). Bu nedenle otofajinin enflamasyon modellerindeki düzenleyici rolünü araştırmak için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Otofajik aktivitenin modülasyonu yoluyla selenyumun olası koruyucu ve tedavi edici rollerinin araştırıldığı bu çalışmada apikal periodontitis modeli oluşturulan sıçanlarda selenyum uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkileri değerlendirildi.

Tong ve ark., (2018) kemik iliği kaynaklı monosit/makrofaj hücre çalışmalarında osteoklastların kemik yüzeyine tutunduğu sınırın oluşturulması (rough border) ve lizozomal enzimlerin salgılanması için ATG5, ATG7, ATG4 β ve LC3 dahil olmak üzere otofajiyle ilişkili proteinlere ihtiyaç olduğunu göstermiştir (138). Sunulan bu çalışmada da periapikal lezyon oluşturulan gruplarda otofajik akış ile ilişkili üyelerin mRNA ifade düzeylerinde anlamlı düzeyde artış olduğu belirlenmiştir.

Bu karşın selenyum tedavisi, kritik bir otofajik regülatör proteini olan Beclin1, ATG8/LC3 lipidasyon işleminde E2 enzimi olarak görev alan ATG3, otofagozom öncülerinin sentezinin kritik bir bileşeni olan ATG5, E1 benzeri bir enzimatik aktiviteye sahip olan otofajik süreç ile ilişkili bir enzimi aktive eden ATG7, otofajinin erken basamakları için gerekli olan ve E3 benzeri enzimatik aktiviteye sahip olan ATG12 ve LC3'ün lipidasyonu için ATG5-ATG12 ile etkileşime geçen ATG16L1 gibi otofajik akışın farklı basamaklarında görev alan üyelerin mRNA ifade düzeylerini büyük ölçüde baskılamıştır (Şekil 2).

Otofaji hakkındaki artan bilgilerimiz otofajik akışın izlenmesinde gen ifadesi düzeyindeki çalışmaların hücresel düzeydeki otofajik inhibisyon ya da aktivasyona ilişkin yorum getirilmesinde yanıltıcı olabileceğini göstermektedir (394). Otofaji birden çok basamağın yer aldığı, seri şekilde ilerleyen ve her bir basamakta farklı protein komplekslerinin işlev gösterdiği karmaşık bir mekanizmadır (395). Otofaji ile seçici bir şekilde yıkıma uğrayan substrat moleküllerinin ve doğrudan otofajik akış ile ilişkili olarak post-translasyonel modifikasyon yolu ile değişime uğrayan proteinlerin düzeylerinin değerlendirilmesi, hücresel düzeydeki otofajik akış hakkında daha sağlıklı yorum yapılabilmesine olanak tanımaktadır (395). Bu amaçla çalışmalarımızda otofaji ile ilişkili proteinler olan Beclin1, ATG5, ubiquitin benzeri reseptör proteini p62/SQSTM1 ve otofagozom oluşumu için gerekli olduğu bilinen LC3-I/II dönüşümü immüno blotlama yöntemi ile incelenmiştir.

Hücresel düzeydeki otofajik aktivitenin izlenmesinde en sık başvurulanan yaklaşımlardan birisi ubiquitin benzeri reseptör proteini olan sequestosome 1 (SQSTM1) olarak da ifade edilen p62'nin düzeylerinin incelenmesidir (396). p62/SQSTM1 LC3'e doğrudan bağlanarak seçici olarak otofajik kargo ile yıkıma uğrayan ve otofajik aktiviteye bağlı olarak hücre içi düzeylerinin değiştiği bilinen bir substrat proteinidir (397, 398). Periapikal lezyon grubunda p62/SQSTM1'in endojen düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte periapikal lezyon grubunda Beclin1 ve ATG5 protein ifadesi düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum mRNA ifadesi düzeyinde sürdürülen çalışmalarla uyumlu şekilde otofajik akı ile ilişkili Beclin1

ve ATG5 proteinlerin düzeylerinin lezyon oluşumuna bağlı olarak artan ifade düzeyleri artmış otofajik aktiviteyi doğrulamıştır. Selenyum tedavisi ile birlikte p62/SQSTM1 protein birikimindeki artış ve buna paralel olarak ATG5 ve Beclin1 düzeylerindeki düşüş hücresel düzeydeki otofajik aktivitede baskılanma olduğunu ortaya koymaktadır.

Otofajik aktivitenin izlenmesinde en yaygın başvurulanan yöntemlerden bir diğeri de LC3-I'den LC3-II'ye dönüşümünün takip edilmesidir. Bu dönüşüm otofajik akı hakkında önemli bulgular ortaya koymaktadır (116). Mikrotübül ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3)'ün hücrede translasyonu sonrasında oluşan öncül formu, LC3-I oluşturmak üzere ATG4 ailesi proteinler tarafından C-terminal glisin rezidüsünden kesime uğramaktadır (116). LC3-I, izolasyon membranlarında ve otofagozomlarda lokalize olan LC3-II'yi oluşturmak üzere fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge edilir (116). Hücredeki LC3-II düzeyleri hücre içindeki otofagozomların ve otofaji ile ilgili yapıların sayısını yansıtmaktadır. Otofajik aktivitenin indüklenmesi hücre içindeki LC3-II düzeylerini arttırmaktadır. Ancak belirli bir zaman dilimindeki LC3-II düzeyleri otofajik aktivitenin tahminine yönelik doğrudan bir bilgi sunmamaktadır. Çünkü otofajik aktivasyon dışında otofagozomların lizozom aracılı bozunmasının inhibisyonu bu yol ile bozulan LC3-II yıkımında inhibisyona neden olacağından hücre içi LC3-II düzeylerinde artış gözlenmektedir (399). Bu nedenle LC3-I ve LC3-II düzeylerinin eş zamanlı olarak değerlendirilmesi ve endojen LC3-I düzeylerinin LC3-II düzeyleri ile oranlanması otofajik akının aktivitesine ilişkin olarak daha doğru bilgi sahibi olunması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca otofajik akışın incelenmesinde otofaji ile ilişkili çok sayıdaki parametrenin birlikte değerlendirilmesi daha makbul olarak görülmektedir.

İmmünooblotlama çalışmalarımızda periapikal lezyon oluşumu ile LC3-II düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir. Selenyum tedavisi ile lezyon grubuna kıyasla LC3-II düzeylerinde düşüş olduğu saptanmıştır. LC3-II/I düzeyleri ele alındığında ise lezyon gruplarında LC3-II/I düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı buna karşın selenyum tedavisi ile LC3-II/I düzeylerinin anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar p62/SQSTM1 sonuçları ile uyumlu olarak lezyon oluşumuna bağlı olarak hücrelerde otofajik aktivitede bir artış olduğunu, selenyum tedavisi ile birlikte otofajik akışın baskılandığını doğrulamıştır (Şekil 3).

Toplu olarak, bulgularımız perapikal lezyon oluşumuna bağlı olarak hücrelerde artan aktivitede seyreden otofaji üyelerinin selenyum tedavisine bağlı olarak gen ve protein ifadesi düzeyinde baskılandığını ve otofajik aktivitenin negatif olarak regüle edildiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar apikal periodontitis kaynaklı olarak gelişen ve ilerleyen periradiküler

dokuların enflamasyonuna bağı olarak gelişen bir otofajik yanıtın gözlemlendiğini düşündürmektedir. İnflamasyon sürecinde artan otofajik aktiviteyi işaret eden literatür bilgisi ile sonuçlarımızın uyumlu olduğu görülmektedir (400, 401). Konakçı tarafından aşırı enflamatuvar yanıt oluşmasını önlemek için otofajinin uyarılmasının gerekli olduğu bilinmektedir. ATG genlerindeki mutasyonlar ve otofajik fonksiyon kaybı, hücre içi patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara duyarlılığı arttırmaktadır (402). Lai ve ark. ratlarda periapikal lezyon modelinde otofaji ve apoptoz arasında negatif bir korelasyon olduğunu, otofajinin hücre koruyucu rol oynayarak osteoblast apoptozunu baskıladığını bildirmiştir (403). Ancak, aşırı otofajinin hücre ölümünü indüklediği ve otofaji inhibisyonunun, kaspaz-bağımsız makrofaj hücre ölümünü tehlikeye attığı da bilinmektedir (404).

Otofajinin tanımlanması, enfeksiyon ve enflamasyondaki potansiyel rolünün ortaya konulması nispeten daha yeni kavramlar olduğundan, diş hekimliği ve endodonti alanındaki potansiyel rolü halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Vital pulpa ve rejeneratif endodontik tedavilerde odontoblastik hücre farklılaşmasını, periapikal lezyonların tedavisinde osteoblastların farklılaşmasını ve mineralizasyonunu hedefleyen terapötik stratejilere otofajik hedef moleküllerin de dahil edilebileceği, inatçı periapikal lezyonların patogenezinin probakteriyel otofajik süreçlerin dahil olabileceğinin düşünülerek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik ileri çalışmaların planlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5.13- Total p38 MAPK ve Fosforile p38 MAPK Bulgularının Değerlendirilmesi

p38 MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal yolu, hücrelerin uyarılara karşı olarak hücresel yanıtlarını düzenleyen sinyal iletim mekanizmalarından birisidir. Dört ana alt gruptan biri olan MAP kinazlarının p38 grubu, sinyal iletiminde bir kavşak noktası görevi görür ve enflamasyonun da dahil olduğu sayısız biyolojik süreçte hayati bir rol oynar (405). p38 MAPK sinyalizasyonunun ozmotik şok, enflamatuvar sitokinler, LPS, ultraviyole ışık ve büyüme faktörleri gibi çeşitli hücresel uyarılara karşı aktive edilmektedir (405, 406, 407). p38 MAPK; MKK3, MKK6 ve SEK kinaz ailesi proteinleri aracılığıyla treonin 180 (Thr180) ve tirozin 182 (Tyr182) pozisyonundan fosforilasyon yolu ile aktive edilmektedir. Aktive olan p38 MAPK transkripsiyon faktörü olarak işlev gösteren downstream efektörlerini fosforile ederek aktivasyonlarına aracılık etmekte ve hedef genlerin ifadelerini indüklemektedir. Son çalışmalar p38 MAPK sinyal yolu ile otofajinin enflamasyon süreçlerinde bağlantılı olarak fonksiyon gösterebileceğini önermektedir. Ancak otofaji ile MAPK sinyal yolu arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır.

Çalışmalarımızda selenyum uygulamasının periapikal lezyonlar üzerindeki koruyucu etkisinin p38 MAPK ile ilişkisi araştırmak için total p38 MAPK ve fosforile p38 MAPK düzeylerini immünoblotlama çalışmaları ile inceledik. Beklendiği gibi periapikal lezyon oluşumuna bağlı olarak p38 MAPK fosforile formunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç histolojik ve immünohistokimyasal inceleme sonuçları ile tutarlı olarak lezyon oluşumuna bağlı gelişen enflamasyon sürecini doğrulamıştır. İlginç olarak periapikal lezyon geliştirilen gruplara selenyum uygulaması sonrasında Thr180/Tyr182 pozisyonundan fosforile p38 MAPK düzeylerinin lezyon grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılandığını gözlenmiştir (Şekil 5). Bu sonuç selenyum tedavisinin p38 MAPK'ın Thr180/Tyr182 pozisyonundan fosforilasyonunu baskılamak yoluyla enflamasyon sürecini negatif düzenlediğini önermektedir.

Günümüzde p38 MAPK sinyal yolu ile otofaji arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı kaynaklara göre p38 MAPK sinyali otofajiyi baskılarken, bazı araştırmalarda p38 MAPK aracılı indüklenen otofajinin koruyucu rolü olduğu öne sürülmüştür (408, 409). Hücrelerdeki karmaşık moleküler sinyal iletim ağları farklı uyaranlara karşı değişen hücresel yanıtlar sunabilmektedir. Ayrıca bu sinyal yollarının birbiriyle keşisen farklı kavşak noktaları olduğu bilinmektedir. Bu nedenle değişen patofizyolojik süreçlerle ilişkili olarak kanonik sinyal iletim süreçlerindeki değişimlerin karakterize edilmesi patofizyolojilerin altında yatan nedenlerin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkılar sağlayacaktır. Çalışmamızdan elde edilen bulgular; periapikal lezyonlarda artan otofajik akış ve aktive olan p38 MAPK sinyal iletim süreçlerini işaret etmektedir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

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

- 1- Antioksidan selenyumun periapikal dokuda kemik yıkımını azalttığı radyografik, histomorfometrik olarak ilk defa bu çalışma ile gösterildi. Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği ve selenyumun sistemik uygulandığı ratlarda 28. günün sonunda selenyum uygulanmayan ratlara göre periapikal lezyon alanının daha küçük olduğu radyografik ve histomorfometrik olarak tespit edildi.
- 2- Rat azı dişlerinde pulpayı içeren oklüzal kavitelerin ağız ortamına açılması sonucu 28. günde dişlerin periapikal dokularında yangısal hücre infiltrasyonu ile karakterize periapikal lezyonların varlığı histolojik olarak izlendi. Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği ve selenyumun sistemik uygulandığı ratlarda ise daha az sayıda yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi, enflamasyon skorlarının pozitif kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi. Bu sonuç selenyumun periapikal dokuda antienflamatuvar etkilerini göstermektedir.
- 3- Periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş pozitif kontrol grubundaki ratlarda yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle PDL kollajenlerinde azalma ve parçalanmalar izlendi. Sistemik selenyum uygulanan örneklerde belirgin şekilde azalmış yangısal reaksiyon ve normal periodontal ligament kollajen görünümü kaydedildi. Sistemik selenyum uygulaması kollajen yıkımını azaltmıştır.
- 4- Yirmi sekiz gün süre ile pulpayı içeren oklüzal kavitelerin ağız ortamına açık bırakıldığı tüm örneklerde kron ve kök kanal sistemi ve periapikal lezyon içerisinde yoğun miktarda gram (+) bakteri tespit edildi. Bu durum periapikal lezyon oluşumunda mikroorganizmaların rolünü göstermektedir.
- 5- Periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş ve sistemik selenyum uygulanan örneklerde pozitif kontrol grubuna göre krondan periapikal dokulara doğru bakteri penetrasyonunun daha az olduğu izlendi. Farklı dokularda mikroorganizmalara karşı konak doku direncini arttırdığı bilinen selenyumun diş ve çevre dokularında da mikroorganizma ilerleyişini engellediği bu çalışma ile gösterilmiştir.
- 6- Proenflamatuvar sitokin olan ve osteoklast aktivasyonu üzerine etkisinden dolayı potansiyel bir kemik yıkım medyatörü olduğu bilinen IL-6 periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş tüm örneklerde sağlıklı periapikal dokudan elde edilen örneklerle oranla daha yüksek seviyede bulundu. Bu IL-6'nın periradiküler lezyonların patogeneğinde önemli rol oynadığını desteklemektedir. Selenyum

uygulanen örneklerde IL-6 (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre daha az bulundu. IL-6'nın selenyum uygulaması ile baskılanması selenyumun antienflamatuar ve antirezortif etkilerini göstermektedir.

- 7- Kemik yıkımı, iyileşmesi ve fizyolojik kemik yeniden şekillenmesi süreçlerinin düzenlenmesinde etkinliği bilinen, hipoksik koşullar altında oksijen homeostazında görev yapan HIF-1 immunreaksiyonu periapikal lezyon oluşumu teşvik edilen tüm örneklerde arttı. Hücre içindeki ROS'ları azalttığı bilinen selenyumun bu çalışmada da sistemik olarak uygulanması HIF-1 seviyesini azaltmıştır.
- 8- Araşidonik asitten prostoglandin ve tromboksan üretilmesini sağlayan ayrıca deneysel periapikal lezyon modellerinde hücre proliferasyonu ve adezyonu, immün denetim, apoptoz ve anjiyojenezde rol oynadığı bilinen COX-2 immünreaksiyonu periapikal lezyon oluşumu teşvik edilen tüm örneklerde artmıştır. Sistemik selenyum uygulaması HIF-1, IL6 ile direkt ilişkili COX-2 ekspresyon şiddetini azaltmıştır.
- 9- Apoptoz, enflamasyon regülasyonunda ve konakçı immün yanıtında çok önemli rol oynayan, ana ölüm kaspazı olarak bilinen Kaspaz-3 immunreaksiyonu sistemik selenyum uygulanan örneklerde azaldı. Bu durum periapikal lezyonlarda apoptoz mekanizmasının selenyum uygulaması ile regüle edilebildiğini göstermektedir.
- 10- Bu çalışmada deneysel periapikal lezyonlarda enflamatuvar belirteç olarak kullanılan IL-6, HIF-1, COX-2 ve apoptotik marker Kaspaz-3'ün 28 gün yoğunlukları ve bunlara selenyumun etkisi değerlendirilmiştir. Bu düzenleyicilerin haftalar içindeki değişimlerinin değerlendirildiği kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.
- 11- Bu çalışmada total p38 MAPK ve fosforile p38 MAPK düzeylerini immüno blotlama çalışmaları ile değerlendirildi. Periapikal lezyon oluşumuna bağlı olarak p38 MAPK fosforile formunda artış olduğu gözlemlendi. Bu sonuç histolojik ve immünohistokimyasal inceleme sonuçları ile tutarlı olarak lezyon oluşumuna bağlı gelişen enflamasyon sürecini doğrulamaktadır. Sistemik selenyum uygulaması sonrasında fosforile p38 MAPK düzeyleri baskılandı. Bu durum sistemik selenyum uygulamasının periapikal lezyon patogenezinin p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden düzenlendiğini desteklemektedir.
- 12- Otofajik akışın gen ifadesi düzeyindeki analizler qRT-PCR, protein ifadesi düzeyindeki analizler Western blot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. qRT-PCR yöntemiyle değerlendirilen Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12 ve ATG16L1

ekspresyonları 28 gün sistemik selenyum uygulamasının ardından azaldı. Bu bulgular selenyum uygulamasının otofajik akışta gen düzeylerini otofajiyi azaltacak yönde etkilediğini göstermektedir.

13- Western blot yöntemiyle değerlendirilen Beclin1, ATG5, LC3II, LC3II/LC3I protein seviyelerinin sistemik selenyum uygulaması ardından azaldığı, p62/SQSTM1 ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular selenyum uygulamasının otofajik akışta rol oynayan markerların protein düzeylerini otofajiyi azaltacak yönde etkilediğini göstermektedir.

14- Toplu olarak, bulgularımız periapikal lezyon oluşumuna bağlı olarak hücrelerde artan aktivede seyreden otofaji üyelerinin selenyum tedavisine bağlı olarak gen ve protein ifadesi düzeyinde baskılandığını ve otofajik aktivitenin negatif olarak regüle edildiğini ortaya koymaktadır.

15- Periapikal lezyon patogenezinin ilişkin hücre içi mekanizmaların aydınlatılması ve terapötik araçların geliştirilmesi amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7- ÖZET

PERİAPİKAL LEZYONLARDA MİTOJENLER TARAFINDAN AKTİVE EDİLMİŞ PROTEİN KİNAZ (MAPK) YOLAĞI; SELENYUMUN ETKİLERİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, deneysel periapikal lezyon modelinde MAPK yolağı ve otofajik hücre aktivitesinin değerlendirilmesi ve antioksidan aktivitesi bilinen selenyumun olası etkilerinin ortaya konulmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 30 adet erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek rat rastgele pozitif kontrol, negatif kontrol ve selenyum grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Pozitif kontrol ve selenyum grubundaki ratlarda alt çene 1. azı dişlerinde periapikal lezyon oluşumu tetiklendi. Selenyum grubundaki ratlara deney süresince (28 gün) 0,1 mg/kg periton içine selenyum uygulanırken pozitif kontrol ve negatif kontrol grubundaki ratlara aynı dozda serum uygulaması gerçekleştirildi. Yirmi sekiz gün sonunda ratlar sakrifiye edildi. Periapikal lezyon alanı radyografik ve histomorfometrik, enflamasyon şiddeti histopatolojik olarak değerlendirildi. Mikroorganizmaların kök kanalı boyunca ve periapikal dokulardaki penetrasyonu Gram boyama ile belirlendi. Periodontal ligament kollajen yıkımı Picro Sirius Red boyama ile tespit edildi. Periapikal IL-6, HIF-1, COX-2 ve Kaspaz-3 ekspresyon yoğunluğu immunohistokimyasal analiz ile değerlendirildi. MAPK sinyal yolağı değerlendirmesinde p38 MAPK/fosfo-p38 MAPK protein ekspresyon düzeyi Western-blot yöntemi ile incelendi. Hücresel otofajik akışın değerlendirilmesinde LC3-II/I, Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16-L1 ifadeleri mRNA gen ekspresyon seviyesi gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile hücresel otofajik akışın değerlendirilmesinde Beclin-1, ATG5, LC3-II, LC3-II/I, p62/SQSTM1 ifadelerinin protein ekspresyon düzeyi WB yöntemleri ile değerlendirildi. Verilerin parametrik testlerin ön şartlarını sağlayıp sağlamadığı Levene testi ile kontrol edildi. Alan açısından elde edilen veriler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanıldı. Histopatolojik, Gram boyama ve immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları ile elde edilen skor verilerinin analizinde tek yönlü varyans analizi ve grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde Duncan testi kullanıldı. Grupların lezyon alanlarına ait verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanıldı. mRNA ve protein ifadelerindeki kat değişim verileri iki bağımsız örneklemli t Testi ile analiz edildi.

Bulgular: Pozitif kontrol ve selenyum grubuna ait radyografik değerlendirme sonucunda selenyum grubunda periapikal lezyon alanı pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha küçüktü ($p<0,01$). Histopatolojik değerlendirmelerde enflamasyon şiddeti karşılaştırıldığında, semi-kantitatif değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$). Selenyum grubunda periapikal lezyon alanları pozitif kontrol grubuna göre daha küçüktü ($p<0,01$). Periodontal ligamentin kollajen reaksiyonu Picro Sirius Red boyama ile değerlendirildiğinde selenyum grubu örneklerinde enflamatuvar reaksiyonun azalmasının yanı sıra periodontal ligament ve çevre bağ doku yapısının korunmuş olduğu saptandı. Gram boyama kullanılarak bakteri yerleşimi değerlendirildiğinde pozitif kontrol grubu örneklerinde en yüksek skor değerleri gözlenirken, selenyum grubu ile arasında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,01$). İmmunohistokimyasal analizde pozitif kontrol grubunda IL-6, HIF-1, COX-2 ve Kaspaz-3 ekspresyon düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunurken, HIF-1 ve COX-2 ekspresyon düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,01$). qRT-PCR yöntemi kullanılarak otofajik belirteç düzeyleri değerlendirildiğinde Beclin-1, ATG3, ATG7, ATG12 ve ATG16L1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG5 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi. ATG16L1 ekspresyonu açısından tüm grup karşılaştırmalarında istatistiksel fark tespit edildi ($p<0,05$). Pozitif kontrol grubunda en yüksek ATG16L1 ekspresyon seviyesi izlenirken, selenyum grubunda pozitif ve negatif kontrol gruplarına göre önemli düzeyde azalma gözlemlendi. Western blotlama yapılarak değerlendirilen Beclin1, ATG5, LC3-II, LC3-II/LC3-I, fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK, p62/SQSTM1 protein ifadesi düzey analizlerinde bütün gruplar arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,05$). Beclin1, ATG5, LC3-II, fosfo-p38 MAPK/p38 MAPK ifadelerinde pozitif kontrol gruplarında en yüksek ekspresyonlar izlenmiştir.

Sonuç: Ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlarda selenyumun antioksidan ve antienflamatuvar etkileri gösterilmiş; periapikal kemik yıkımını azalttığı görülmüştür. Ayrıca sistemik selenyum uygulaması periapikal lezyon patogenezinin p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden düzenlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte selenyum uygulamasının otofajik akışta rol oynayan markerların protein düzeylerini otofajiyi azaltacak yönde etkilediği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Periapikal lezyon, Selenyum, Otofaji, Mitojenler tarafından aktive edilmiş protein kinaz, Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon

MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) IN PERIAPICAL LESIONS; THE EFFECTS OF SELENIUM

Objective: The aim of this study is the evaluation of MAPK pathway and autophagic cell activity in the experimental periapical lesion model and the possible effects of the antioxidant activity of selenium.

Materials and Methods: In this study, 30 adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, positive control, negative control and selenium group. Periapical lesion was induced in mandibular first molars in the positive control and selenium groups. Rats in the selenium group were applied to intraperitoneal 0.1 mg/kg selenium during 28 days, the same dose of serum in the rats in the positive control and negative control group were performed. At the end of twenty-eight days, the rats were sacrificed. Periapical lesion area was examined radiographically and histomorphometrically; inflammation severity was evaluated histopathologically. The penetration of microorganisms along the root canal and periapical tissues were determined by Gram staining. Periodontal ligament collagen was detected by Picro Sirius Red staining. Periapical IL-6, HIF-1, COX-2 and Kaspaz-3 expression density was evaluated with immunohistochemical analysis. The MAPK signal pathway evaluation was examined by the p38 MAPK/phospho-p38 MAPK protein expression level using Western-blot method. In the evaluation of cellular autophagic expressions flow by the LC3-II/I, Beclin-1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12, ATG16-L1 mRNA gene expression level with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), in the evaluation of the cellular autophagic flow by Beclin-1, ATG5, LC3-II, LC3-II/I, p62/SQSTM1 expressions were evaluated by WB methods of protein expression levels. The mRNA gene expression level was evaluated with the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) with the evaluation of the cellular autophagic flow with Beclin-1, ATG5, LC3-II, LC3-II/I, p62/SQSTM1 protein expression level WB methods. The data was checked with the Levene test where the data provides the prerequisites of parametric tests. The data obtained in the field were evaluated with the analysis of variance (ANOVA) in the factorial order. Tukey test was used from multiple comparison methods in determining the difference between group averages. In the analysis of the score data obtained by histopathological, Gram staining and immunohistochemical evaluation results the Duncan test was used to determine the difference between the analysis and group averages of variance. One-way variance analysis was used to evaluate the data of the groups of the groups. The floor exchange in mRNA and protein statements were analyzed by two independent sampled t test.

Results: As a result of the radiographic evaluation of the positive control and the selenium group, the periapical lesion area in the selenium group was significantly smaller than the positive control group ($p < 0.01$). In histopathological evaluations, there was a statistically significant difference between the groups in semi-quantitative evaluation compared to the intensity of inflammation ($p < 0.01$). The selenium group took statistically significantly lower inflammation score values according to the positive control group. There was a statistically significant difference between the two groups in the histomorphometric evaluation of periapical lesion areas in positive control and selenium groups ($p < 0.01$). Periapical lesion areas in the selenium group were smaller than the positive control group ($p < 0.01$). When the collagen reaction of the periodontal ligament, the collagen reaction was evaluated with Picro Sirius Red staining, in addition to the reduction of the inflammatory reaction in the selenium group samples, as well as periodontal ligament and environmental bond tissue structure was preserved. When the bacterial layout was evaluated using Gram staining, the highest score values were observed in the positive control group samples, while the statistical difference was found between the selenium group ($p < 0.01$). In immunohistochemical analysis, IL-6, HIF-1, COX-2 and Kaspaz-3 expression levels in the positive control group are significantly higher than other groups, while HIF-1 and COX-2 expression levels were statistically significant differences between groups ($p < 0.01$). The statistical difference was found in all group comparisons of Beclin-1, ATG3, ATG7, ATG12 and ATG16L1 expression when the autophagic token levels are evaluated using the qRT-PCR method ($p < 0.05$). No statistical difference was detected in terms of negative control and selenium groups in terms of ATG5 expression ($p > 0.05$). In the positive control group, the highest ATG5 expression level was monitored, while the result of the positive control group was observed in the selenium group. The statistical difference was detected in all group comparisons in terms of ATG16L1 expression ($p < 0.05$). In the positive control group, the highest ATG16L1 expression level is monitored, while the selenium group was significantly reduced in the positive and negative control groups. The Western blotting was evaluated by beclin1, ATG5, LC3-II, LC3-II/LC3-I, phospho-p38 MAPK /p38 MAPK, p62/SQSTM1 protein expression level analysis was a significant difference between all groups ($p < 0.05$). Beclin1, ATG5, LC3II, phospho-p38 MAPK/p38 MAPK statements in positive control groups were monitored in the highest expression.

Conclusion: The antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium are shown in the experimental periapical lesion model and it has also been seen to reduce periapical bone

destruction. Selenium, which is known to increase antioxidant enzyme synthesis, is thought in periapical lesions that are experimentally generated in the rats showed anti-inflammatory effects also selenium has been seen to reduce periapical bone destruction. In addition, systemic selenium application has shown that the p38 MAPK pathogenesis of the periapical lesion pathogenesis is arranged over the p38 MAPK signal pathway. However, the selenium application has been shown to influence the protein levels of markers in the autophagic flow to reduce autophagy.

Key Words: Periapical lesion, Selenium, Autophagy, Mitogen activated protein kinase, the quantitative real-time polymerase chain reaction



KAYNAKLAR

1. Offermanns S, Simon MI. Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv.* 1996;27:177–98.
2. Yang S-H, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* 2013 Jan 15;513(1):1–13.
3. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Aug;16(8):461–72.
4. Hocking LJ, Whitehouse C, Helfrich MH. Autophagy: a new player in skeletal maintenance? *J Bone Miner Res.* 2012 Jul;27(7):1439–47.
5. Feng J-F, Lu L, Zeng P, Yang Y-H, Luo J, Yang Y-W, et al. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *Int J Clin Oncol.* 2012 Dec;17(6):575–83.
6. Christophersen OA, Haug A. Animal products, diseases and drugs: a plea for better integration between agricultural sciences, human nutrition and human pharmacology. *Lipids Health Dis.* 2011 Jan 20;10:16.
7. Sadeghian S, Kojouri GA, Mohebbi A. Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. *Biol Trace Elem Res.* 2012 Jun;146(3):302–8.
8. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340–9.
9. Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009 Nov 1;47(1):101–13.
10. Bhaskar SN. Oral surgery—oral pathology conference no. 17, Walter Reed Army Medical Center [Internet]. Vol. 21, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. 1966. p. 657–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(66\)90044-2](http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(66)90044-2)
11. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Nov 1;15(6):348–81.
12. Bracks IV, Armada L, Gonçalves LS, Pires FR. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J Endod.* 2014 Jan;40(1):63–8.
13. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998 Sep;31(5):311–25.
14. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status [Internet]. Vol. 22, Journal of Applied Oral Science. 2014. p. 336–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-775720140140>
15. Skudutyte-Rysstad R, Eriksen HM. Endodontic status amongst 35-year-old Oslo citizens and changes over a 30-year period [Internet]. Vol. 39, International Endodontic Journal. 2006. p. 637–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01129.x>
16. Georgopoulou MK, Spanaki-Voreadi AP, Pantazis N, Kontakiotis EG. Frequency and

- distribution of root filled teeth and apical periodontitis in a Greek population [Internet]. Vol. 38, *International Endodontic Journal*. 2005. p. 105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00907.x>
17. Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):712–35.
 18. Frisk F, Hakeberg M. A 24-year follow-up of root filled teeth and periapical health amongst middle aged and elderly women in Göteborg, Sweden. *Int Endod J*. 2005 Apr;38(4):246–54.
 19. Seerig LM, Nascimento GG, Peres MA, Horta BL, Demarco FF. Tooth loss in adults and income: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2015 Sep;43(9):1051–9.
 20. Georgiou AC, Crielaard W, Armenis I, de Vries R, van der Waal SV. Apical Periodontitis Is Associated with Elevated Concentrations of Inflammatory Mediators in Peripheral Blood: A Systematic Review and Meta-analysis [Internet]. Vol. 45, *Journal of Endodontics*. 2019. p. 1279–95.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2019.07.017>
 21. Gomes MS, Blattner TC, Filho MS, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis [Internet]. Vol. 39, *Journal of Endodontics*. 2013. p. 1205–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.06.014>
 22. Khalighinejad N, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A. Apical Periodontitis, a Predictor Variable for Preeclampsia: A Case-control Study [Internet]. Vol. 43, *Journal of Endodontics*. 2017. p. 1611–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.05.021>
 23. Palmieri B, Sblendorio V. Current Status of Measuring Oxidative Stress [Internet]. *Methods in Molecular Biology*. 2010. p. 3–17. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_1
 24. Rajagopal S, Kelly A. Shared Decision Making in Endodontics [Internet]. Vol. 9, *Primary Dental Journal*. 2020. p. 31–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/2050168420963303>
 25. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization [Internet]. Vol. 16, *Dental Traumatology*. 2000. p. 191–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-9657.2000.016005191.x>
 26. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review [Internet]. Vol. 39, *International Endodontic Journal*. 2006. p. 249–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>
 27. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives [Internet]. Vol. 94, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2002. p. 281–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1067/moe.2002.126163>
 28. Nogueira EF de C, de Carvalho NOGUEIRA EF, Farias EGF, Silva LB, dos SANTOS NETO AP, de Souza ANDRADE ES, et al. Analysis of the presence and location of mast cells in periapical cysts and periapical granulomas [Internet]. Vol. 64, *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*. 2016. p. 376–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1981-863720160003000023113>
 29. Andrade ALDL de, de Andrade ALDL, Nonaka CFW, Gordón-Núñez MA, de Almeida Freitas R, Galvão HC. Immunoexpression of Interleukin 17, Transforming Growth Factor β 1, and Forkhead Box P3 in Periapical Granulomas, Radicular Cysts, and Residual Radicular Cysts [Internet]. Vol. 39, *Journal of Endodontics*. 2013. p. 990–4. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.04.028>

30. Hren NI, Ihan Hren N, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts [Internet]. Vol. 54, Archives of Oral Biology. 2009. p. 156–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.09.014>
31. de Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, de Jesus SF, Vilela DN, Pereira CS, et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. J Endod. 2013 Apr;39(4):453–5.
32. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases [Internet]. Vol. 24, Oral Microbiology and Immunology. 2009. p. 25–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302x.2008.00469.x>
33. Francisconi CF, Vieira AE, Bigueti CC, Glowacki AJ, Trombone APF, Letra A, et al. Characterization of the Protective Role of Regulatory T Cells in Experimental Periapical Lesion Development and Their Chemoattraction Manipulation as a Therapeutic Tool [Internet]. Vol. 42, Journal of Endodontics. 2016. p. 120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.09.022>
34. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. Arch Oral Biol. 1999 Jan;44(1):55–66.
35. Čolić M, Lukić A, Vučević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M, et al. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines [Internet]. Vol. 51, Archives of Oral Biology. 2006. p. 1120–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.05.003>
36. Aranha AMF, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone APF, et al. Evidence Supporting a Protective Role for Th9 and Th22 Cytokines in Human and Experimental Periapical Lesions [Internet]. Vol. 39, Journal of Endodontics. 2013. p. 83–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.10.015>
37. Garlet GP, Horwat R, Ray HL, Garlet TP, Silveira EM, Campanelli AP, et al. Expression Analysis of Wound Healing Genes in Human Periapical Granulomas of Progressive and Stable Nature [Internet]. Vol. 38, Journal of Endodontics. 2012. p. 185–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.011>
38. Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, Kanamura N, Iwakura Y, Imanishi J, et al. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions [Internet]. Vol. 53, Microbiology and Immunology. 2009. p. 287–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00123.x>
39. Carrillo C, Penarrocha MA, Penarrocha M, Vera-Sempere F, Penarrocha-Oltra D. Immunohistochemical study of Langerhans cells in periapical lesions: correlation with inflammatory cell infiltration and epithelial cell proliferation [Internet]. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal. 2010. p. e335–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.4317/medoral.15.e335>
40. Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SAL, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. J Endod. 2010 Jun;36(6):995–9.
41. Santos LC, Ramos EAG, Gurgel CAS, de Santana EJB, dos Santos JN. Immunohistochemical detection of Langerhans cells in dental granulomas and radicular cysts [Internet]. Vol. 38, Journal

- of Molecular Histology. 2007. p. 201–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-007-9088-3>
42. Zhang J, Huang X, Lu B, Zhang C, Cai Z. Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? [Internet]. Vol. 20, Clinical Oral Investigations. 2016. p. 1617–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-015-1646-6>
 43. Jurisic V, Terzic T, Colic S, Jurisic M. The concentration of TNF-alpha correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. Oral Dis. 2008 Oct;14(7):600–5.
 44. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. Oral Microbiol Immunol. 2005 Oct;20(5):310–6.
 45. Koivisto T, Bowles WR, Rohrer M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9,723 cases. J Endod. 2012 Jun;38(6):729–32.
 46. Cavalla F, Reyes M, Vernal R, Alvarez C, Paredes R, García-Sesnich J, et al. High levels of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 in apical lesions of endodontic origin associated with mast cell infiltration. J Endod. 2013 Oct;39(10):1234–9.
 47. Fan R, Sun B, Zhang C-F, Lü Y-L, Xuan W, Wang Q-Q, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. Chin Med J . 2011 Jul;124(14):2162–6.
 48. Caviedesbucheli J, Munoz H, Azueroholguin M, Ulate E. Neuropeptides in Dental Pulp: The Silent Protagonists [Internet]. Vol. 34, Journal of Endodontics. 2008. p. 773–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.010>
 49. Konttinen YT, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling: State of the art [Internet]. Vol. 67, Acta Orthopaedica Scandinavica. 1996. p. 632–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/17453679608997772>
 50. Goodman SC, Letra A, Dorn S, Araujo-Pires AC, Vieira AE, Chaves de Souza L, et al. Expression of heat shock proteins in periapical granulomas. J Endod. 2014 Jun;40(6):830–6.
 51. Bambirra W, Maciel KF, Thebit MM, de Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection [Internet]. Vol. 41, Journal of Endodontics. 2015. p. 1085–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.002>
 52. Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL, Cardoso FP, Júnior GM, Totola AH, et al. The Role of iNOS and PHOX in Periapical Bone Resorption [Internet]. Vol. 90, Journal of Dental Research. 2011. p. 495–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510391792>
 53. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AOS, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide [Internet]. Vol. 42, Journal of Endodontics. 2016. p. 747–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.022>
 54. Yue J, Wang P, Hong Q, Liao Q, Yan L, Xu W, et al. MicroRNA-335-5p Plays Dual Roles in Periapical Lesions by Complex Regulation Pathways [Internet]. Vol. 43, Journal of Endodontics. 2017. p. 1323–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.018>
 55. Chan LT, Zhong S, Naqvi AR, Self-Fordham J, Nares S, Bair E, et al. MicroRNAs: new insights

- into the pathogenesis of endodontic periapical disease. *J Endod.* 2013 Dec;39(12):1498–503.
56. Setién-Olarra A, Marichalar-Mendia X, Bediaga NG, Aguirre-Echebarria P, Aguirre-Urizar JM, Mosqueda-Taylor A. MicroRNAs expression profile in solid and unicystic ameloblastomas. *PLoS One.* 2017 Oct 20;12(10):e0186841.
 57. Jakovljevic A, Andric M, Nikolic N, Coric V, Krezovic S, Carkic J, et al. Levels of oxidative stress biomarkers and bone resorption regulators in apical periodontitis lesions infected by Epstein-Barr virus. *Int Endod J.* 2018 Jun;51(6):593–604.
 58. Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. *Front Physiol.* 2017 Nov 1;8:869.
 59. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response [Internet]. Vol. 9, *Journal of Inflammation*. 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-9-8>
 60. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G Protein regulation of MAPK networks [Internet]. Vol. 26, *Oncogene*. 2007. p. 3122–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210407>
 61. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Mar;75(1):50–83.
 62. Morrison DK. MAP Kinase Pathways [Internet]. Vol. 4, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012. p. a011254–a011254. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
 63. Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress [Internet]. Vol. 206, *Journal of Experimental Biology*. 2003. p. 1107–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00220>
 64. Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins [Internet]. Vol. 31, *Cell*. 1982. p. 263–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90426-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(82)90426-3)
 65. Boulton T, Yancopoulos G, Gregory J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control [Internet]. Vol. 249, *Science*. 1990. p. 64–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2164259>
 66. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1992 Mar;12(3):915–27.
 67. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival [Internet]. Vol. 20, *Oncogene*. 2001. p. 2390–400. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204383>
 68. Fanger GR. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42 [Internet]. Vol. 16, *The EMBO Journal*. 1997. p. 4961–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.16.4961>
 69. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [Internet]. Vol. 429, *Biochemical Journal*. 2010. p. 403–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/bj20100323>
 70. Han J, Lee J, Bibbs L, Ulevitch R. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells [Internet]. Vol. 265, *Science*. 1994. p. 808–11. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1126/science.7914033>

71. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis [Internet]. Vol. 372, *Nature*. 1994. p. 739–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/372739a0>
72. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1358–75.
73. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain [Internet]. Vol. 7, *Genes & Development*. 1993. p. 2135–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.7.11.2135>
74. Bogoyevitch MA, Ngoei KRW, Zhao TT, Yeap YYC, Ng DCH. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges [Internet]. Vol. 1804, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010. p. 463–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.002>
75. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct Roles for JNK1 and JNK2 in Regulating JNK Activity and c-Jun-Dependent Cell Proliferation [Internet]. Vol. 15, *Molecular Cell*. 2004. p. 713–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.028>
76. Tournier C. Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway [Internet]. Vol. 288, *Science*. 2000. p. 870–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.288.5467.870>
77. English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and Differential Expression of Alternatively Spliced Forms [Internet]. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry*. 1995. p. 28897–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.48.28897>
78. Yan C, Luo H, Lee J-D, Abe J-I, Berk BC. Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains [Internet]. Vol. 276, *Journal of Biological Chemistry*. 2001. p. 10870–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m009286200>
79. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 1995 May 26;270(21):12665–9.
80. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipskind RA. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade [Internet]. Vol. 22, *Oncogene*. 2003. p. 5387–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206839>
81. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radzlejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF [Internet]. Vol. 65, *Cell*. 1991. p. 663–75. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90098-j](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(91)90098-j)
82. Turgeon B, Saba-El-Leil MK, Meloche S. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa [Internet]. Vol. 346, *Biochemical Journal*. 2000. p. 169. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3460169>
83. Zhu AX, Zhao Y, Moller DE, Flier JS. Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3 [Internet]. Vol. 14, *Molecular and Cellular Biology*. 1994. p. 8202–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.14.12.8202>

84. Julien C, Coulombe P, Meloche S. Nuclear Export of ERK3 by a CRM1-dependent Mechanism Regulates Its Inhibitory Action on Cell Cycle Progression [Internet]. Vol. 278, Journal of Biological Chemistry. 2003. p. 42615–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m302724200>
85. Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35511–9.
86. Klinger S, Turgeon B, Lévesque K, Wood GA, Aagaard-Tillery KM, Meloche S. Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 29;106(39):16710–5.
87. Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1301–12.
88. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions [Internet]. Vol. 1773, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007. p. 1376–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.001>
89. Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Pegg M, Morton S, Cohen P. Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8 [Internet]. Vol. 394, *Biochemical Journal*. 2006. p. 365–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/bj20051288>
90. Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):963–8.
91. Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, et al. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):798–802.
92. Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, et al. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev*. 2004 Apr 1;18(7):816–29.
93. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Sep;1813(9):1619–33.
94. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 9;101(10):3329–35.
95. Fernández-Veledo S, Vázquez-Carballo A, Vila-Bedmar R, Ceperuelo-Mallafré V, Vendrell J. Role of energy- and nutrient-sensing kinases AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in adipocyte differentiation. *IUBMB Life*. 2013 Jul;65(7):572–83.
96. Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, Kocic J, Harhaji-Trajkovic L, Bugarski D, et al. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*. 2013 Jan;52(1):524–31.
97. Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):843–6.

98. Chang S-W, Kim J-Y, Kim M-J, Kim G-H, Yi J-K, Lee D-W, et al. Combined effects of mineral trioxide aggregate and human placental extract on rat pulp tissue and growth, differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells [Internet]. Vol. 74, *Acta Odontologica Scandinavica*. 2016. p. 298–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/00016357.2015.1120882>
99. Woo S-M, Hwang Y-C, Lim H-S, Choi N-K, Kim S-H, Kim W-J, et al. Effect of nifedipine on the differentiation of human dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):801–5.
100. Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):215–20.
101. Cho K-W, Cai J, Kim H-Y, Hosoya A, Ohshima H, Choi K-Y, et al. ERK activation is involved in tooth development via FGF10 signaling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Dec 15;312(8):901–11.
102. Lee M-J, Cai J, Kwak S-W, Cho S-W, Harada H, Jung H-S. MAPK mediates Hsp25 signaling in incisor development [Internet]. Vol. 131, *Histochemistry and Cell Biology*. 2009. p. 593–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-009-0568-2>
103. Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M. NaF Activates MAPKs and Induces Apoptosis in Odontoblast-like Cells [Internet]. Vol. 88, *Journal of Dental Research*. 2009. p. 461–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034509334771>
104. Xu X, Han J, Ito Y, Bringas P, Deng C, Chai Y. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK Are Functionally Redundant in Mediating TGF- β /BMP Signaling during Tooth and Palate Development [Internet]. Vol. 15, *Developmental Cell*. 2008. p. 322–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.004>
105. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation [Internet]. Vol. 23, *Oncogene*. 2004. p. 2838–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207556>
106. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):280–93.
107. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Dec;9(12):1004–10.
108. Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol*. 2015 Jan;25(1):37–45.
109. Panda PK, Mukhopadhyay S, Das DN, Sinha N, Naik PP, Bhutia SK. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Mar;39:43–55.
110. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Jan 31;2018:8023821.
111. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):124–31.
112. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy [Internet]. Vol. 36, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. p. 2420–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.010>
113. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off [Internet]. Vol. 21, *Trends in*

- Endocrinology & Metabolism. 2010. p. 142–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.003>
114. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating [Internet]. Vol. 12, *Cell Death & Differentiation*. 2005. p. 1542–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>
 115. Sun K, Deng W, Zhang S, Cai N, Jiao S, Song J, et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci*. 2013 Sep 9;3(1):35.
 116. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation [Internet]. Vol. 27, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011. p. 107–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
 117. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [Internet]. Vol. 13, *Nature Cell Biology*. 2011. p. 132–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>
 118. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes [Internet]. Vol. 186, *Journal of Cell Biology*. 2009. p. 773–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200907014>
 119. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [Internet]. Vol. 61, *Essays in Biochemistry*. 2017. p. 609–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20170035>
 120. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018 Aug;104:485–95.
 121. Mostowy S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture [Internet]. Vol. 15, *Cellular Microbiology*. 2013. p. 395–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12063>
 122. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):722–37.
 123. Sholl J, Rattan SIS. *Explaining Health Across the Sciences*. Springer Nature; 2020. 555 p.
 124. Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 Regulate Lysine 63-Linked Ubiquitination of Beclin-1 to Control TLR4-Induced Autophagy [Internet]. Vol. 3, *Science Signaling*. 2010. p. ra42–ra42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2000751>
 125. Dowling SD, Macian F. Autophagy and T cell metabolism [Internet]. Vol. 419, *Cancer Letters*. 2018. p. 20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.033>
 126. K O, Onnureddy K, Ravinder, Onteru SK, Singh D. IGF-1 attenuates LPS induced pro-inflammatory cytokines expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) granulosa cells [Internet]. Vol. 64, *Molecular Immunology*. 2015. p. 136–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.11.008>
 127. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome [Internet]. Vol. 12, *Nature Immunology*. 2011. p. 222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1980>
 128. Liu J, Wang X, Zheng M, Luan Q. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* promotes autophagy of human gingival fibroblasts through the PI3K/Akt/mTOR signaling

- pathway. *Life Sci.* 2018 Oct 15;211:133–9.
129. Park MH, Jeong SY, Na HS, Chung J. *Porphyromonas gingivalis* induces autophagy in THP-1-derived macrophages. *Mol Oral Microbiol.* 2017 Feb;32(1):48–59.
 130. Lee K, Roberts JS, Choi CH, Atanasova KR, Yilmaz Ö. *Porphyromonas gingivalis* traffics into endoplasmic reticulum-rich-autophagosomes for successful survival in human gingival epithelial cells [Internet]. Vol. 9, *Virulence*. 2018. p. 845–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2018.1454171>
 131. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):389–93.
 132. Hagio-Izaki K, Yasunaga M, Yamaguchi M, Kajiya H, Morita H, Yoneda M, et al. Lipopolysaccharide induces bacterial autophagy in epithelial keratinocytes of the gingival sulcus [Internet]. Vol. 19, *BMC Cell Biology*. 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12860-018-0168-x>
 133. Choumar A, Tarhuni A, Lettéron P, Reyl-Desmars F, Dauhoo N, Damasse J, et al. Lipopolysaccharide-induced mitochondrial DNA depletion. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Dec 1;15(11):2837–54.
 134. Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MDC, Gonzalez-Alonso A, Alfonsi S, et al. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. *BMC Med.* 2012 Oct 17;10:122.
 135. Huang HY, Wang WC, Lin PY, Huang CP, Chen CY, Chen YK. The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions. *Int Endod J.* 2018 Feb;51 Suppl 2:e125–45.
 136. Tek M, Metin M, Sener I, Bereket C, Tokac M, Kazancioglu HO, et al. The predominant bacteria isolated from radicular cysts [Internet]. Vol. 9, *Head & Face Medicine*. 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1746-160x-9-25>
 137. Zhao Y, Chen G, Zhang W, Xu N, Zhu J-Y, Jia J, et al. Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway [Internet]. Vol. 227, *Journal of Cellular Physiology*. 2012. p. 639–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22768>
 138. Tong X, Gu J, Song R, Wang D, Sun Z, Sui C, et al. Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *J Cell Biochem [Internet]*. 2018 Sep 6; Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27468>
 139. Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Al-Sahlanee R, Cros C, Topi M, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis [Internet]. Vol. 10, *Autophagy*. 2014. p. 1965–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.36182>
 140. Zahm AM, Bohensky J, Adams CS, Shapiro IM, Srinivas V. Bone Cell Autophagy Is Regulated by Environmental Factors [Internet]. Vol. 194, *Cells Tissues Organs*. 2011. p. 274–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000324647>
 141. Yang J-W, Zhu L-X, Yuan G-H, Chen Y-X, Zhang L, Zhang L, et al. Autophagy appears during the development of the mouse lower first molar [Internet]. Vol. 139, *Histochemistry and Cell Biology*. 2013. p. 109–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-012-1016-2>
 142. Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic Activity and Aging in Human Odontoblasts [Internet]. Vol. 90, *Journal of Dental Research*. 2011. p. 523–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510393347>

143. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRP α signalling pathway [Internet]. Vol. 19, Trends in Cell Biology. 2009. p. 72–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.001>
144. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis [Internet]. Vol. 138, Cell. 2009. p. 271–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>
145. Wang HS, Pei F, Chen Z, Zhang L. Increased Apoptosis of Inflamed Odontoblasts Is Associated with CD47 Loss [Internet]. Vol. 95, Journal of Dental Research. 2016. p. 697–703. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034516633639>
146. Qi S, Qian J, Chen F, Zhou P, Yue J, Tang F, et al. Expression of autophagy- associated proteins in rat dental irreversible pulpitis [Internet]. Molecular Medicine Reports. 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2019.9944>
147. Pei F, Wang HS, Chen Z, Zhang L. Autophagy regulates odontoblast differentiation by suppressing NF- κ B activation in an inflammatory environment [Internet]. Vol. 7, Cell Death & Disease. 2016. p. e2122–e2122. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.397>
148. Duan J, Yu Y, Yu Y, Li Y, Huang P, Zhou X, et al. Silica nanoparticles enhance autophagic activity, disturb endothelial cell homeostasis and impair angiogenesis [Internet]. Vol. 11, Particle and Fibre Toxicology. 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12989-014-0050-8>
149. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Glickman R, Schneider K, Rothstein S, Cooper J, et al. Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. Biol Trace Elem Res. 2000 Feb;73(2):97–111.
150. Oldfield JE. The two faces of selenium. J Nutr. 1987 Dec;117(12):2002–8.
151. Singh RB, Mori H, Kummerow FA. Macro and trace mineral metabolism in coronary heart disease. Trace Elem Med. 1992;9(3):144–56.
152. Mertz W, Morris ER, Smith JC Jr, Udomkesmalee E, Fields M, Levander OA, et al. Trace elements in the elderly. Metabolism, requirements, and recommendations for intakes. Human nutrition: a comprehensive treatise (USA) [Internet]. 1989; Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9005827>
153. Diplock AT. Trace elements in human health with special reference to selenium. Am J Clin Nutr. 1987 May;45(5 Suppl):1313–22.
154. Baltaci AK, Mogulkoc R, Akil M, Bicer M. Review - Selenium - Its metabolism and relation to exercise. Pak J Pharm Sci. 2016 Sep;29(5):1719–25.
155. Schwarz K, Foltz CM. SELENIUM AS AN INTEGRAL PART OF FACTOR 3 AGAINST DIETARY NECROTIC LIVER DEGENERATION [Internet]. Vol. 79, Journal of the American Chemical Society. 1957. p. 3292–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ja01569a087>
156. Henderleiter J, Trapp C, Atkins P, Jones L. Solutions Manual for Chemistry: Molecules Matter and Change. Macmillan; 1999.
157. Neve J, Vertongen F, Molle L. 6 Selenium deficiency [Internet]. Vol. 14, Clinics in Endocrinology and Metabolism. 1985. p. 629–56. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-595x\(85\)80010-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-595x(85)80010-4)
158. Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Van Vlaslaer V, Deelstra H. Comparison of the serum

- selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data [Internet]. Vol. 18, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2004. p. 99–112. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2004.04.004>
159. Kok FJ, Hofman A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Selenium and cardiovascular disease. *Int J Epidemiol.* 1985 Jun;14(2):335.
 160. Orak H, Yanardag R. Selenium content of milk and milk products of Turkey. *CHIMICA ACTA TURCICA-ISTANBUL-*. 1996;24:239–44.
 161. Yanardağ R, Orak H. Selenium content of milk and milk products of Turkey. II. *Biol Trace Elem Res.* 1999 Apr;68(1):79–95.
 162. Akkuş İ, Şekeroğlu R, Üner A, Aköz M, Kurt E. Selenyum: Dağılışı, metabolizması ve fizyopatolojisi. *SÜ Tıp Fak Dergisi.* 1991;4:547–545.
 163. Anderson RA. TRACE ELEMENTS AND CARDIOVASCULAR DISEASES [Internet]. Vol. 59, *Acta Pharmacologica et Toxicologica.* 2009. p. 317–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0773.1986.tb02771.x>
 164. Beslenme HÜ, Bölümü D. Türkiye’ye özgü beslenme rehberi. TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Beslenme ve Fiziksel Aktiviteler Daire Başkanlığı. 2004;57–60.
 165. Tüber TB. Türkiye Beslenme Rehberi. Ankara; 2015.
 166. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet.* 2012 Mar 31;379(9822):1256–68.
 167. Combs GF, Watts JC, Jackson MI, Johnson LK, Zeng H, Scheett AJ, et al. Determinants of selenium status in healthy adults [Internet]. Vol. 10, *Nutrition Journal.* 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-10-75>
 168. Gudmundsdottir EY, Gunnarsdottir I, Thorlacius A, Reykdal O, Gunnlaugsdottir H, Thorsdottir I, et al. Blood selenium levels and contribution of food groups to selenium intake in adolescent girls in Iceland. *Food Nutr Res [Internet].* 2012 Aug 31;56. Available from: <http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v56i0.18476>
 169. Fayet F, Flood V, Petocz P, Samman S. Avoidance of meat and poultry decreases intakes of omega-3 fatty acids, vitamin B12, selenium and zinc in young women [Internet]. Vol. 27, *Journal of Human Nutrition and Dietetics.* 2014. p. 135–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jhn.12092>
 170. Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake [Internet]. Vol. 100, *British Journal of Nutrition.* 2008. p. 254–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114508939830>
 171. Giray B, Hincal F. Selenium status in Turkey. *J Radioanal Nucl Chem.* 2004 Mar 1;259(3):447–51.
 172. Mueller AS, Mueller K, Wolf NM, Pallauf J. Selenium and diabetes: an enigma? *Free Radic Res.* 2009;43(11):1029–59.
 173. Kumpulainen J. Selenium: Requirement and Supplementation [Internet]. Vol. 78, *Acta Paediatrica.* 1989. p. 114–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.1989.tb11221.x>
 174. Robberecht H, Deelstra H. Factors influencing blood selenium concentration values: a

- literature review. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1994 Dec;8(3-4):129–43.
175. Ciliberto G, Arcone R, Wagner EF, Rüther U. Inducible and tissue-specific expression of human C-reactive protein in transgenic mice. *EMBO J.* 1987 Dec 20;6(13):4017–22.
 176. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Apr 1;16(7):705–43.
 177. Levander OA. Selenium [Internet]. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition.* 1986. p. 209–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-092469-4.50007-8>
 178. Orak DDE, Anardag RX, Orak DDH. Selenyum ve Kalp Hastalıkları ile ilişkisi [Internet]. 2000 [cited 2021 Sep 15]. Available from: https://jag.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=tkd&plng=eng&un=TKDA-70671
 179. Moore JA, Noiva R, Wells IC. Selenium concentrations in plasma of patients with arteriographically defined coronary atherosclerosis. *Clin Chem.* 1984 Jul;30(7):1171–3.
 180. Stromberg H-E, Agren MS. Topical zinc oxide treatment improves arterial and venous leg ulcers [Internet]. Vol. 111, *British Journal of Dermatology.* 1984. p. 461–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1984.tb06610.x>
 181. Vivoli G, Vinceti M, Bergomi M, Cann CI, Moore LL, Rothman KJ. RISK OF SPONTANEOUS ABORTION AMONG WOMEN EXPOSED TO ENVIRONMENTAL LEAD POLLUTION [Internet]. Vol. 9, *Epidemiology.* 1998. p. S47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00001648-199807001-00103>
 182. Combs G. Chemopreventive Agents Selenium [Internet]. Vol. 79, *Pharmacology & Therapeutics.* 1998. p. 179–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00014-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00014-x)
 183. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health [Internet]. Vol. 9, *Antioxidants & Redox Signaling.* 2007. p. 775–806. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2007.1528>
 184. Lu J, Holmgren A. Selenoproteins [Internet]. Vol. 284, *Journal of Biological Chemistry.* 2009. p. 723–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r800045200>
 185. Zeng H, Combs GF. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion [Internet]. Vol. 19, *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2008. p. 1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.02.005>
 186. Brozmanová J, Mániková D, Vlčková V, Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer [Internet]. Vol. 84, *Archives of Toxicology.* 2010. p. 919–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-010-0595-8>
 187. Cole-Ezea P, Swan D, Shanley D, Hesketh J. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells [Internet]. Vol. 53, *Free Radical Biology and Medicine.* 2012. p. 488–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.029>
 188. Sanmartin C, Plano D, Font M, Palop JA. Kinase Regulation by Sulfur and Selenium Containing Compounds [Internet]. Vol. 11, *Current Cancer Drug Targets.* 2011. p. 496–523. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/156800911795538093>
 189. Wu M, Kang MM, Schoene NW, Cheng W-H. Selenium Compounds Activate Early Barriers

- of Tumorigenesis [Internet]. Vol. 285, Journal of Biological Chemistry. 2010. p. 12055–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.088781>
190. Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review [Internet]. Vol. 84, Archives of Toxicology. 2010. p. 337–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-009-0505-0>
 191. Mustafa;DURAK A. SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ [Internet]. Vol. 48, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 1995. p. 1. Available from: http://dx.doi.org/10.1501/tipfak_00000000463
 192. Dolder C, Nelson M, Deyo Z. Paliperidone for schizophrenia [Internet]. Vol. 65, American Journal of Health-System Pharmacy. 2008. p. 403–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.2146/ajhp070261>
 193. Bendich A. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids institute of medicine washington, DC: National Academy Press, 2000 ISBN: 0-309-06935-1 [Internet]. Vol. 17, Nutrition. 2001. p. 364. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(00\)00596-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00596-7)
 194. Kane J, Canas F, Kramer M, Ford L, Gassmannmayer C, Lim P, et al. Treatment of schizophrenia with paliperidone extended-release tablets: A 6-week placebo-controlled trial☆ [Internet]. Vol. 90, Schizophrenia Research. 2007. p. 147–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2006.09.012>
 195. Davis CD. Selenium Supplementation and Cancer Prevention [Internet]. Vol. 1, Current Nutrition Reports. 2012. p. 16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13668-011-0003-x>
 196. Higuchi A, Inoue H, Kawakita T, Ogishima T, Tsubota K. Selenium compound protects corneal epithelium against oxidative stress. PLoS One. 2012 Sep 25;7(9):e45612.
 197. Stadtman TC. Selenium Biochemistry [Internet]. Vol. 59, Annual Review of Biochemistry. 1990. p. 111–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.000551>
 198. Čejková J, Ardan T, Šimonová Z, Čejka Č, Malec J, Jirsová K, et al. Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome) [Internet]. Vol. 17, Nitric Oxide. 2007. p. 10–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2007.04.006>
 199. Sarada SKS, Himadri P, Ruma D, Sharma SK, Pauline T, Mrinalini. Selenium protects the hypoxia induced apoptosis in neuroblastoma cells through upregulation of Bcl-2 [Internet]. Vol. 1209, Brain Research. 2008. p. 29–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.041>
 200. Yakubov E, Buchfelder M, Eyüpoglu IY, Savaskan NE. Selenium Action in Neuro-Oncology [Internet]. Vol. 161, Biological Trace Element Research. 2014. p. 246–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-014-0111-8>
 201. Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds [Internet]. Vol. 364, Nature. 1993. p. 626–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/364626a0>
 202. Pons DG, Moran C, Alorda-Clara M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. Micronutrients Selenomethionine and Selenocysteine Modulate the Redox Status of MCF-7 Breast Cancer Cells [Internet]. Vol. 12, Nutrients. 2020. p. 865. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12030865>

203. Mathews SM, Spallholz JE, Grimson MJ, Dubielzig RR, Gray T, Reid TW. Prevention of bacterial colonization of contact lenses with covalently attached selenium and effects on the rabbit cornea. *Cornea*. 2006 Aug;25(7):806–14.
204. Tran PL, Lowry N, Campbell T, Reid TW, Webster DR, Tobin E, et al. An Organoselenium Compound Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilms on Hemodialysis Catheters *In Vivo* [Internet]. Vol. 56, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. p. 972–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.05680-11>
205. Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction [Internet]. *Current Topics in Cellular Regulation*. 2001. p. 1–30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0070-2137\(01\)80001-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0070-2137(01)80001-7)
206. Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects [Internet]. Vol. 26, *Molecular Aspects of Medicine*. 2005. p. 256–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.004>
207. Forootanfar H, Adeli-Sardou M, Nikkhoo M, Mehrabani M, Amir-Heidari B, Shahverdi AR, et al. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide [Internet]. Vol. 28, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2014. p. 75–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.07.005>
208. Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects [Internet]. Vol. 100, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. p. 2555–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7300-7>
209. Björnstedt M, Fernandes AP. Selenium in the prevention of human cancers [Internet]. Vol. 1, *EPMA Journal*. 2010. p. 389–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13167-010-0033-2>
210. Zhuo H, Smith AH, Steinmaus C. Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 May;13(5):771–8.
211. Amaral AFS, Cantor KP, Silverman DT, Malats N. Selenium and Bladder Cancer Risk: a Meta-analysis [Internet]. Vol. 19, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010. p. 2407–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-10-0544>
212. Peters U, Takata Y. Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer [Internet]. Vol. 52, *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008. p. 1261–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200800103>
213. Yu M-W, Horng I-S, Hsu K-H, Chiang Y-C, Liaw YF, Chen C-J. Plasma Selenium Levels and Risk of Hepatocellular Carcinoma among Men with Chronic Hepatitis Virus Infection [Internet]. Vol. 150, *American Journal of Epidemiology*. 1999. p. 367–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010016>
214. Wei W-Q, Abnet CC, Qiao Y-L, Dawsey SM, Dong Z-W, Sun X-D, et al. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr*. 2004 Jan;79(1):80–5.
215. Glatte E, Thomassen Y, Thoresen SØ, Haldorsen T, Lund-Larsen PG, Theodorsen L, et al. Prediagnostic Serum Selenium in a Case-Control Study of Thyroid Cancer [Internet]. Vol. 18, *International Journal of Epidemiology*. 1989. p. 45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ije/18.1.45>
216. Zeng H, Botnen JH, Briske-Anderson M. Deoxycholic Acid and Selenium Metabolite Methylselenol Exert Common and Distinct Effects on Cell Cycle, Apoptosis, and MAP Kinase

- Pathway in HCT116 Human Colon Cancer Cells [Internet]. Vol. 62, Nutrition and Cancer. 2009. p. 85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01635580903191551>
217. Fang W, Han A, Bi X, Xiong B, Yang W. Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1 and suppression of β -catenin signaling [Internet]. Vol. 127, International Journal of Cancer. 2010. p. 32–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25029>
 218. Zeng H, Briske-Anderson M, Wu M, Moyer MP. Methylselenol, a Selenium Metabolite, Plays Common and Different Roles in Cancerous Colon HCT116 Cell and Noncancerous NCM460 Colon Cell Proliferation [Internet]. Vol. 64, Nutrition and Cancer. 2012. p. 128–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2012.630555>
 219. Lobb R, Jacobson G, Cursons R, Jameson M. The Interaction of Selenium with Chemotherapy and Radiation on Normal and Malignant Human Mononuclear Blood Cells [Internet]. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. 2018. p. 3167. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19103167>
 220. Lee YJU, Kim JIE, Kwak MH, Go J, Yang SY, Kwon HS, et al. Selenium treatment significantly inhibits tumor necrosis factor- α -induced cell death and tau hyperphosphorylation in neuroblastoma cells [Internet]. Vol. 10, Molecular Medicine Reports. 2014. p. 1869–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.2442>
 221. Misra S, Niyogi S. Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress [Internet]. Vol. 23, Toxicology in Vitro. 2009. p. 1249–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.031>
 222. Hill KE, Xia Y, Åkesson B, Boeglin ME, Burk RF. Selenoprotein P Concentration in Plasma is an Index of Selenium Status in Selenium-Deficient and Selenium-Supplemented Chinese Subjects [Internet]. Vol. 126, The Journal of Nutrition. 1996. p. 138–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/126.1.138>
 223. Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, Williams S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders [Internet]. Vol. 70, The American Journal of Clinical Nutrition. 1999. p. 896–903. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/70.5.896>
 224. Holinka J, Pilz M, Kubista B, Presterl E, Windhager R. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth [Internet]. Vol. 95-B, The Bone & Joint Journal. 2013. p. 678–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620x.95b5.31216>
 225. Gaur S, Agnihotri R. Trace Mineral Micronutrients and Chronic Periodontitis—a Review [Internet]. Vol. 176, Biological Trace Element Research. 2017. p. 225–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0832-y>
 226. Vunta H, Belda BJ, Arner RJ, Channa Reddy C, Vanden Heuvel JP, Sandeep Prabhu K. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages [Internet]. Vol. 52, Molecular Nutrition & Food Research. 2008. p. 1316–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700346>
 227. Duntas LH. Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanisms [Internet]. Vol. 41, Hormone and Metabolic Research. 2009. p. 443–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1220724>
 228. Wang J, Zhang Y, Yuan Y, Yue T. Immunomodulatory of selenium nano-particles decorated by sulfated *Ganoderma lucidum* polysaccharides [Internet]. Vol. 68, Food and Chemical

- Toxicology. 2014. p. 183–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.003>
229. Low D, Hamood A, Reid T, Mosley T, Tran P, Song L, et al. Attachment of selenium to a reverse osmosis membrane to inhibit biofilm formation of *S. aureus* [Internet]. Vol. 378, Journal of Membrane Science. 2011. p. 171–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2011.04.041>
 230. Aribi M, Meziane W, Habi S, Boulatika Y, Marchandin H, Aymeric J-L. Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner [Internet]. Vol. 10, PLOS ONE. 2015. p. e0135515. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>
 231. Cihalova K, Chudobova D, Michalek P, Moulick A, Guran R, Kopel P, et al. *Staphylococcus aureus* and MRSA Growth and Biofilm Formation after Treatment with Antibiotics and SeNPs. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 16;16(10):24656–72.
 232. Mosolygó T, Kincses A, Csonka A, Tönki ÁS, Witek K, Sanmartín C, et al. Selenocompounds as Novel Antibacterial Agents and Bacterial Efflux Pump Inhibitors. *Molecules* [Internet]. 2019 Apr 16;24(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24081487>
 233. Webster TJ, Tran. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth [Internet]. *International Journal of Nanomedicine*. 2011. p. 1553. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s21729>
 234. Tran PA, Webster TJ. Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices. *Nanotechnology*. 2013 Apr 19;24(15):155101.
 235. Wang Q, Webster TJ. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Dec;100(12):3205–10.
 236. Rayman MP. The importance of selenium to human health [Internet]. Vol. 356, *The Lancet*. 2000. p. 233–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02490-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02490-9)
 237. Broome CS, McArdle F, Kyle JAM, Andrews F, Lowe NM, Anthony Hart C, et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status [Internet]. Vol. 80, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. p. 154–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/80.1.154>
 238. Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium Deficiency and Viral Infection [Internet]. Vol. 133, *The Journal of Nutrition*. 2003. p. 1463S – 1467S. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/133.5.1463s>
 239. Lei C, Niu X, Wei J, Zhu J, Zhu Y. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy [Internet]. Vol. 399, *Clinica Chimica Acta*. 2009. p. 102–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2008.09.025>
 240. Drain PK, Baeten JM, Overbaugh J, Wener MH, Bankson DD, Lavreys L, et al. Low serum albumin and the acute phase response predict low serum selenium in HIV-1 infected women [Internet]. Vol. 6, *BMC Infectious Diseases*. 2006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-85>
 241. Roy M, Kiremidjian-Schumacher L, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium and human immune cell functions: I. Effect on lymphocyte proliferation and interleukin 2 receptor expression [Internet]. Vol. 46, *Biological Trace Element Research*. 1994. p. 183–183. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02790078>
 242. Moghaddam A, Heller RA, Sun Q, Seelig J, Cherkezov A, Seibert L, et al. Selenium

- Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients* [Internet]. 2020 Jul 16;12(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12072098>
243. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals [Internet]. Vol. 1790, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009. p. 1441–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.026>
 244. Schweizer U, Ulrich Schweizer, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison [Internet]. Vol. 45, *Brain Research Reviews*. 2004. p. 164–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.03.004>
 245. Ashrafi MR, Shabanian R, Abbaskhanian A, Nasirian A, Ghofrani M, Mohammadi M, et al. Selenium and Intractable Epilepsy: Is There Any Correlation? [Internet]. Vol. 36, *Pediatric Neurology*. 2007. p. 25–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.001>
 246. Amiri M, Farzin L, Moassesi ME, Sajadi F. Serum Trace Element Levels in Febrile Convulsion [Internet]. Vol. 135, *Biological Trace Element Research*. 2010. p. 38–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-009-8487-6>
 247. Mahyar A, Ayazi P, Fallahi M, Javadi A. Correlation Between Serum Selenium Level and Febrile Seizures [Internet]. Vol. 43, *Pediatric Neurology*. 2010. p. 331–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2010.05.024>
 248. Ursini F. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation [Internet]. Vol. 285, *Science*. 1999. p. 1393–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.285.5432.1393>
 249. Hawkes WC, Kelley DS, Taylor PC. The Effects of Dietary Selenium on the Immune System in Healthy Men [Internet]. Vol. 81, *Biological Trace Element Research*. 2001. p. 189–213. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/bter:81:3:189>
 250. Rayman MP. Selenium and Adverse Health Conditions of Human Pregnancy [Internet]. *Selenium*. 2011. p. 531–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1025-6_42
 251. Schomburg L, Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health [Internet]. Vol. 52, *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008. p. 1235–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200700465>
 252. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, et al. Selenium and the Course of Mild Graves' Orbitopathy [Internet]. Vol. 364, *New England Journal of Medicine*. 2011. p. 1920–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1012985>
 253. Rayman MP, Stranges S, Griffin BA, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Effect of Supplementation With High-Selenium Yeast on Plasma Lipids [Internet]. Vol. 154, *Annals of Internal Medicine*. 2011. p. 656. Available from: <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-154-10-201105170-00005>
 254. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis [Internet]. Vol. 84, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006. p. 762–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/84.4.762>
 255. Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann PR. Dietary Selenium Modulates Activation and Differentiation of CD4 T Cells in Mice through a Mechanism Involving Cellular Free Thiols [Internet]. Vol. 140, *The Journal of Nutrition*. 2010. p. 1155–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.120725>
 256. Wood SM, Beckham C, Yosioka A, Darban H, Watson RR. β -Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans [Internet]. Vol. 2, *Integrative*

- Medicine. 2000. p. 85–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1096-2190\(00\)00009-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1096-2190(00)00009-3)
257. Carlson BA, Yoo M-H, Shrimali RK, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL, et al. Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function [Internet]. Vol. 69, Proceedings of the Nutrition Society. 2010. p. 300–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/s002966511000176x>
 258. Liu W, Golshan NH, Deng X, Hickey DJ, Zeimer K, Li H, et al. Selenium nanoparticles incorporated into titania nanotubes inhibit bacterial growth and macrophage proliferation [Internet]. Vol. 8, Nanoscale. 2016. p. 15783–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c6nr04461a>
 259. Nizam N, Discioglu F, Saygun I, Bal V, Avcu F, Ozkan CK, et al. The effect of α -tocopherol and selenium on human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 2014 Apr;85(4):636–44.
 260. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium [Internet]. Vol. 21, Journal of Clinical Periodontology. 1994. p. 45–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.1994.tb00275.x>
 261. Qataya PO, Elsayed NM, Elguindy NM, Hafiz MA, Samy WM. Selenium: A sole treatment for erosive oral lichen planus (Randomized controlled clinical trial) [Internet]. Vol. 26, Oral Diseases. 2020. p. 789–804. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/odi.13285>
 262. Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review [Internet]. Vol. 89, The American Journal of Clinical Nutrition. 2009. p. 2025S – 2039S. Available from: <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27230f>
 263. Davis TZ, Zane Davis T, Hall JO. Selenium [Internet]. Reproductive and Developmental Toxicology. 2011. p. 461–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-382032-7.10036-0>
 264. Thomas B, Ramesh A, Suresh S, Prasad BR. A comparative evaluation of antioxidant enzymes and selenium in the serum of periodontitis patients with diabetes mellitus type 2. *Contemp Clin Dent*. 2013 Apr;4(2):176–80.
 265. Patel M, Shakir Q, Shetty A. Interrelationship between chronic periodontitis and anemia: A 6-month follow-up study [Internet]. Vol. 18, Journal of Indian Society of Periodontology. 2014. p. 19. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/0972-124x.128194>
 266. Méplan C. Selenium and chronic diseases: a nutritional genomics perspective. *Nutrients*. 2015 May 15;7(5):3621–51.
 267. Allen EM, Matthews JB, O' Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis [Internet]. Vol. 38, Journal of Clinical Periodontology. 2011. p. 894–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2011.01764.x>
 268. Tran P, Hamood A, Mosley T, Gray T, Jarvis C, Webster D, et al. Organo-Selenium-containing Dental Sealant Inhibits Bacterial Biofilm [Internet]. Vol. 92, Journal of Dental Research. 2013. p. 461–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0022034513482141>
 269. Amaechi BT, Kasundra H, Okoye LO, Tran PL, Reid TW. Comparative Efficacy in Preventing Plaque Formation around Pit and Fissure Sealants: A Clinical Trial. *J Contemp Dent Pract*. 2019 May 1;20(5):531–6.

270. Espaladori MC, Maciel KF, de BRITO LCN, Kawai T, Vieira LQ, Sobrinho APR. Experimental furcal perforation treated with mineral trioxide aggregate plus selenium: immune response [Internet]. Vol. 32, Brazilian Oral Research. 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0103>
271. Delilbasi C, Demiralp S, Turan B. Effects of selenium on the structure of the mandible in experimental diabetics [Internet]. Vol. 44, Journal of Oral Science. 2002. p. 85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.2334/josnurd.44.85>
272. Høl PJ, Vamnes JS, Gjerdet NR, Eide R, Isrenn R. Dental Amalgam and Selenium in Blood [Internet]. Vol. 87, Environmental Research. 2001. p. 141–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2001.4308>
273. Espaladori MC, Diniz JMB, de Brito LCN, Tavares WLF, Kawai T, Vieira LQ, et al. Selenium intracanal dressing: effects on the periapical immune response. Clin Oral Investig. 2021 May;25(5):2951–8.
274. Saritekin E, Üreyen Kaya B, Aşçı H, Özmen Ö. Anti-inflammatory and antiresorptive functions of melatonin on experimentally induced periapical lesions. Int Endod J. 2019 Oct;52(10):1466–78.
275. Zhang C, Yang L, Peng B. Critical role of NFATc1 in periapical lesions. Int Endod J. 2010 Feb;43(2):109–14.
276. Nossa PM, Guenka LC, Couto LB, da-Cruz-Perez DE. Effects of the serjania erecta and zeyheria montana ethanol extracts in experimental pulpitis in rats: A histological study [Internet]. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal. 2013. p. e337–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.4317/medoral.18470>
277. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. J Endod. 2008 Jan;34(1):31–8.
278. Wang H-W, Lai EH-H, Yang C-N, Lin S-K, Hong C-Y, Yang H, et al. Intracanal Metformin Promotes Healing of Apical Periodontitis via Suppressing Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Monocyte Recruitment. J Endod. 2020 Jan;46(1):65–73.
279. Corazza BJM, Martinho FC, Khoury RD, Toia CC, Orozco EIF, Prado RF, et al. Clinical influence of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on the levels of resolvins E1 and D2 in apical periodontitis. Int Endod J. 2021 Jan;54(1):61–73.
280. Xiong H, Wei L, Hu Y, Zhang C, Peng B. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. Int Endod J. 2010 Jun;43(6):485–91.
281. Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, et al. Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. J Endod. 2015 Dec;41(12):2002–7.
282. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RCM, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PCT, et al. Effect of Raloxifene on Periapical Lesions in Ovariectomized Rats [Internet]. Vol. 41, Journal of Endodontics. 2015. p. 671–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.027>
283. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. J Endod. 2012 Jul;38(7):943–7.

284. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1474–9.
285. Brilhante Wolle CF, de Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Endod.* 2012 Feb;38(2):191–5.
286. Lee Y-L, Hong C-Y, Kok S-H, Hou K-L, Lin Y-T, Chen M-H, et al. An Extract of Green Tea, Epigallocatechin-3-Gallate, Reduces Periapical Lesions by Inhibiting Cysteine-rich 61 Expression in Osteoblasts [Internet]. Vol. 35, *Journal of Endodontics*. 2009. p. 206–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.015>
287. Ciliberto G, Arcone R, Wagner EF, Rüther U. Inducible and tissue-specific expression of human C-reactive protein in transgenic mice [Internet]. Vol. 6, *The EMBO Journal*. 1987. p. 4017–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02745.x>
288. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoproteins and Protection against Oxidative Stress: Selenoprotein N as a Novel Player at the Crossroads of Redox Signaling and Calcium Homeostasis [Internet]. Vol. 12, *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. p. 893–904. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2890>
289. Dai J, Liu H, Zhou J, Huang K. Selenoprotein R Protects Human Lens Epithelial Cells against D-Galactose-Induced Apoptosis by Regulating Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 10;17(2):231.
290. Moreno-Reyes R, Egrise D, Nève J, Pasteels J-L, Schoutens A. Selenium Deficiency-Induced Growth Retardation Is Associated with an Impaired Bone Metabolism and Osteopenia [Internet]. Vol. 16, *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001. p. 1556–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.8.1556>
291. Yazıcı T, Koçer G, Nazıroğlu M, Övey İS, Öz A. Zoledronic Acid, Bevacizumab and Dexamethasone-Induced Apoptosis, Mitochondrial Oxidative Stress, and Calcium Signaling Are Decreased in Human Osteoblast-Like Cell Line by Selenium Treatment. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Aug;184(2):358–68.
292. Zang H, Qian S, Li J, Zhou Y, Zhu Q, Cui L, et al. The effect of selenium on the autophagy of macrophage infected by *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 83, *International Immunopharmacology*. 2020. p. 106406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106406>
293. Huang H, Wang Y, An Y, Jiao W, Xu Y, Han Q, et al. Selenium alleviates oxidative stress and autophagy in lead-treated chicken testes [Internet]. Vol. 131, *Theriogenology*. 2019. p. 146–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.015>
294. Wang S, Xu Z, Yin H, Min Y, Li S. Alleviation Mechanisms of Selenium on Cadmium-Spiked in Chicken Ovarian Tissue: Perspectives from Autophagy and Energy Metabolism [Internet]. Vol. 186, *Biological Trace Element Research*. 2018. p. 521–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-018-1341-y>
295. Henderson VC, Kimmelman J, Fergusson D, Grimshaw JM, Hackam DG. Threats to Validity in the Design and Conduct of Preclinical Efficacy Studies: A Systematic Review of Guidelines for In Vivo Animal Experiments [Internet]. Vol. 10, *PLoS Medicine*. 2013. p. e1001489. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001489>
296. Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JAP, Priya E, et al.

- Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology: a development protocol. *Int Endod J.* 2019 Sep;52(9):1290–6.
297. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings [Internet]. Vol. 36, *Journal of Endodontics*. 2010. p. 1277–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>
 298. Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JAP, Priya E, et al. PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: explanation and elaboration. *Int Endod J.* 2021 Jun;54(6):858–86.
 299. França TRT de, de França TRT, de Moraes Ramos-Perez FM, dos Anjos Pontual A, de Castro JFL, Bonan PRF, et al. Effects of Zoledronic Acid in Experimental Periapical Lesions in Rats: An Imaging and Histological Analysis [Internet]. Vol. 28, *Brazilian Dental Journal*. 2017. p. 566–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201601558>
 300. Aksoy U, Savtekin G, Şehirli AÖ, Kermeoğlu F, Kalender A, Özkayalar H, et al. Effects of alpha-lipoic acid therapy on experimentally induced apical periodontitis: a biochemical, histopathological and micro-CT analysis. *Int Endod J.* 2019 Sep;52(9):1317–26.
 301. Gomes ESB, Farias LC, Silveira LH, Jesus CÍ de, Rocha RG da, Ramos GV, et al. Conditioned fear stress increases bone resorption in apical periodontitis lesions in Wistar male rats. *Arch Oral Biol.* 2019 Jan;97:35–41.
 302. Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, et al. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod.* 2018 May;44(5):780–5.
 303. Siddiqui YD, Omori K, Ito T, Yamashiro K, Nakamura S, Okamoto K, et al. Resolvin D2 Induces Resolution of Periapical Inflammation and Promotes Healing of Periapical Lesions in Rat Periapical Periodontitis. *Front Immunol.* 2019 Feb 26;10:307.
 304. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):244–50.
 305. Kaneko T, Myo Zaw SY, Sueyama Y, Katsube K-I, Kaneko R, Nör JE, et al. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Prevents the Development of Experimental Periapical Lesions. *J Endod.* 2019 Feb;45(2):168–73.
 306. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct;78(4):494–502.
 307. Yang L, Zhang C, Peng B. Immunolocalization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in rat periapical lesions. *J Endod.* 2009 Jun;35(6):834–7.
 308. Lin S, Hong C, Chang H, Chiang C, Chen C, Jeng J, et al. Immunolocalization of Macrophages and Transforming Growth Factor-β1 in Induced Rat Periapical Lesions [Internet]. Vol. 26, *Journal of Endodontics*. 2000. p. 335–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00004770-200006000-00007>
 309. Sun Z, Wang L, Peng B. Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3β and phosphorylated GSK3β (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions [Internet]. Vol. 47, *International Endodontic Journal*. 2014. p. 1107–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12258>
 310. Villa-Machado PA, Restrepo-Patiño DM, Calvo-Trejos JP, Restrepo-Restrepo FA, Tobón-

- Arroyave SI, Provenzano JC, et al. Cone-beam Computed Tomographic and Micro-computed Tomographic Evaluations of the Root Apexes of Teeth with Posttreatment Apical Periodontitis. *J Endod* [Internet]. 2020 Jul 16; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2020.07.009>
311. Siqueira JF Jr, Antunes HS, Pérez AR, Alves FRF, Mdala I, Silva EJNL, et al. The Apical Root Canal System of Teeth with Posttreatment Apical Periodontitis: Correlating Microbiologic, Tomographic, and Histopathologic Findings. *J Endod*. 2020 Sep;46(9):1195–203.
 312. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2017 Apr;50(4):352–66.
 313. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In Vivo Respiratory-Gated Micro-CT Imaging in Small-Animal Oncology Models [Internet]. Vol. 3, Molecular Imaging. 2004. p. 153535002004031. Available from: <http://dx.doi.org/10.1162/15353500200403184>
 314. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):56–62.
 315. Teixeira RC, Rubira CMF, Assis GF, Lauris JRP, Cestari TM, Rubira-Bullen IRF. Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats [Internet]. Vol. 19, Journal of Applied Oral Science. 2011. p. 500–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-77572011005000020>
 316. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions [Internet]. Vol. 103, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2007. p. 707–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.11.036>
 317. Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis [Internet]. Vol. 87, Journal of Periodontology. 2016. p. e82–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2016.150541>
 318. Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL, Cardoso FP, Júnior GM, Totola AH, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res*. 2011 Apr;90(4):495–500.
 319. Rittié L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:395–407.
 320. Correia KV, Gonzalez AC, Viena CS, Wanderley FG, DE Almeida Reis SR, Medrado AR. Mast cells and its relation to collagen and VEGF in oral inflammatory lesions. *Minerva Stomatol*. 2016 Jun;65(3):144–51.
 321. Ahmed GM, El-Baz AA, Hashem AAR, Shalaan AK. Expression levels of matrix metalloproteinase-9 and gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod*. 2013 Apr;39(4):444–8.
 322. Aslim HP, Bulut O. Western Blot [Internet]. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.31797/vetbio.799660>
 323. Howait M, Albassam A, Yamada C, Sasaki H, Bahammam L, Azuma MM, et al. Elevated Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammatory Bone Resorption Induced in a Mouse Model of Periradicular Periodontitis [Internet]. Vol. 202, The Journal of Immunology. 2019. p. 2035–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1801161>
 324. Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg PA. Nonsurgical Root Canal Therapy of Large Cyst-like

- Inflammatory Periapical Lesions and Inflammatory Apical Cysts [Internet]. Vol. 35, Journal of Endodontics. 2009. p. 607–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.02.012>
325. Tanaka T, Ozeki N, Kawai R, Imaizumi I, Nakata K, Nakamura H. Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase-8 and -17 in development of rat periradicular lesion. *J Endod*. 2013 May;39(5):638–42.
 326. Conti LC, Segura-Egea JJ, Cardoso CBM, Benetti F, Azuma MM, Oliveira PHC, et al. Relationship between apical periodontitis and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. *Int Endod J*. 2020 Oct;53(10):1387–97.
 327. Paula-Silva FWG, Arnez MFM, Petean IBF, Almeida-Junior LA, da Silva RAB, da Silva LAB, et al. Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2020 Apr;112:104670.
 328. Krámer GM, Fillios LC, Bowler EC. Ascorbic acid treatment on early collagen production and wound healing in the guinea pig. *J Periodontol*. 1979 Apr;50(4):189–92.
 329. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu IM. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. *J Periodontol*. 2013 May;84(5):666–74.
 330. Bas N, Kayar NA, Baba ZF, Avunduk MC, Haliloğlu S, Alptekin NÖ. Systemic treatment with alpha-tocopherol and/or sodium selenite decreases the progression of experimental periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2021 May;25(5):2677–88.
 331. Kirwale S, Pooladanda V, Thatikonda S, Murugappan S, Khurana A, Godugu C. Selenium nanoparticles induce autophagy mediated cell death in human keratinocytes. *Nanomedicine* . 2019 Aug;14(15):1991–2010.
 332. Wang C, Wang H, Luo J, Hu Y, Wei L, Duan M, et al. Selenium deficiency impairs host innate immune response and induces susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *BMC Immunol*. 2009 Oct 24;10:55.
 333. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3599–606.
 334. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1403–15.
 335. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system [Internet]. Vol. 70, Cytokine. 2014. p. 11–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.024>
 336. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition [Internet]. Vol. 34, Current Opinion in Immunology. 2015. p. 75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2015.02.008>
 337. Akbari M, Hassan-Zadeh V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. *Inflammopharmacology*. 2018 Jun;26(3):685–98.
 338. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990 Jan 1;75(1):40–7.
 339. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 18, European

- Journal of Immunology. 1988. p. 1797–802. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830181122>
340. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992 Oct 15;80(8):2012–20.
 341. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Jun;17(6):395–412.
 342. Euler GJ, Miller GA, Hutter JW, D'Alessandro MM. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues [Internet]. Vol. 24, *Journal of Endodontics*. 1998. p. 480–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399\(98\)80051-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0099-2399(98)80051-4)
 343. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):740–5.
 344. Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jul;92(1):83–8.
 345. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses against possible causative bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod*. 1998 Dec;24(12):817–21.
 346. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*. 2009 Aug;38(7):605–11.
 347. Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, Greenfield EM. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Sep;283(3):C679–87.
 348. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):49–60.
 349. Mei L-X, Jiang Y, Zhao C-H, Liu Z, Zhang P. [Relationships between periapical lesion and IL-1, TNF-alpha gene expression in rat]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Sep;38(5):345–7.
 350. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017 Mar 9;41(4):1360–9.
 351. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis [Internet]. Vol. 8, *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998. p. 588–94. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80016-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80016-6)
 352. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in Wound Healing? More than a Nutrient [Internet]. Vol. 28, *World Journal of Surgery*. 2004. p. 294–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00268-003-7400-2>
 353. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 α by the Ubiquitin-Proteasome Pathway [Internet]. Vol. 274, *Journal of Biological Chemistry*. 1999. p. 6519–25. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.10.6519>

354. Görlach A, Bonello S. The cross-talk between NF- κ B and HIF-1: further evidence for a significant liaison [Internet]. Vol. 413, *Biochemical Journal*. 2008. p. 571–571. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/bj4130571>
355. Wan C, Shao J, Gilbert SR, Riddle RC, Long F, Johnson RS, et al. Role of HIF-1 α in skeletal development [Internet]. Vol. 1192, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010. p. 322–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x>
356. Ilan Rotstein DDS, John I. Ingle DDS. *Ingle's Endodontics*. PMPH USA; 2019. 1326 p.
357. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15;105(2):686–91.
358. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, et al. The Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalylglycine Is Protective in a Murine Model of Colitis [Internet]. Vol. 134, *Gastroenterology*. 2008. p. 156–65.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.012>
359. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, et al. Stabilization of HIF-1 is critical to improve wound healing in diabetic mice [Internet]. Vol. 105, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. p. 19426–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0805230105>
360. Yu X, Jiang H, Cheng G, Shang W, Zhang S. High levels of HIF-1 α in hypoxic dental pulps associated with teeth with severe periodontitis [Internet]. Vol. 51, *Journal of Molecular Histology*. 2020. p. 265–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-020-09878-5>
361. Colgan SP, Campbell EL, Kominsky DJ. Hypoxia and Mucosal Inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2016 May 23;11:77–100.
362. Yu X-J, Xiao C-J, Du Y-M, Liu S, Du Y, Li S. Effect of hypoxia on the expression of RANKL/OPG in human periodontal ligament cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Oct 1;8(10):12929–35.
363. Muzylak M, Price JS, Horton MA. Hypoxia induces giant osteoclast formation and extensive bone resorption in the cat. *Calcif Tissue Int*. 2006 Nov;79(5):301–9.
364. Knowles HJ, Cleton-Jansen A-M, Korsching E, Athanasou NA. Hypoxia-inducible factor regulates osteoclast-mediated bone resorption: role of angiopoietin-like 4. *FASEB J*. 2010 Dec;24(12):4648–59.
365. Knowles HJ. Hypoxia-Induced Fibroblast Growth Factor 11 Stimulates Osteoclast-Mediated Resorption of Bone [Internet]. Vol. 100, *Calcified Tissue International*. 2017. p. 382–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-016-0228-1>
366. Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle*. 2005 Feb;4(2):256–8.
367. Ma N, Nagy MA. HIF-1 is the Commander of Gateways to Cancer [Internet]. Vol. 03, *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000054>
368. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation [Internet]. Vol. 31, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011. p. 986–1000. Available from:

369. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2046–50.
370. Lin S-K, Kok S-H, Kuo MY-P, Wang T-J, Wang J-T, Yeh FT-C, et al. Sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6, and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats [Internet]. Vol. 110, *European Journal of Oral Sciences*. 2002. p. 246–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0447.2002.11227.x>
371. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2012 Jan 1;2(4):e1.
372. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases [Internet]. Vol. 20, *Oral Microbiology and Immunology*. 2005. p. 310–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302x.2005.00232.x>
373. Clohisy JC, Connolly TJ, Bergman KD, Quinn CO, Partridge NC. Prostanoid-induced expression of matrix metalloproteinase-1 messenger ribonucleic acid in rat osteosarcoma cells [Internet]. Vol. 135, *Endocrinology*. 1994. p. 1447–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.135.4.7925106>
374. Millet I, McCarthy TL, Vignery A. Regulation of Interleukin-6 Production by Prostaglandin E2 in Fetal Rat Osteoblasts: Role of Protein Kinase A Signaling Pathway [Internet]. Vol. 13, *Journal of Bone and Mineral Research*. 1998. p. 1092–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.7.1092>
375. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):30761–4.
376. Bantel H, Beikler T, Flemmig TF, Schulze-Osthoff K. Caspase activation is involved in chronic periodontitis [Internet]. Vol. 579, *FEBS Letters*. 2005. p. 5559–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.020>
377. Chen Y, Zychlinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens [Internet]. Vol. 17, *Microbial Pathogenesis*. 1994. p. 203–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.1994.1066>
378. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis [Internet]. Vol. 93, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. p. 2239–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.6.2239>
379. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research [Internet]. Vol. 94, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. p. 12736–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.24.12736>
380. Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA. The role of the p53 protein in the apoptotic response [Internet]. *The Role of Apoptosis in Development, Tissue Homeostasis and Malignancy*. 1995. p. 41–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-0553-8_8
381. Marshman E, Ottewill PD, Potten CS, Watson AJ. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol*. 2001 Oct;195(3):285–92.
382. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol*

Chem. 1995 Jan 20;270(3):1230–7.

383. Cho S-J, Teng I-F, Zhang M, Yin T, Jung Y-S, Zhang J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha is regulated by RBM38, a RNA-binding protein and a p53 family target, via mRNA translation [Internet]. Vol. 6, *Oncotarget*. 2015. p. 305–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2786>
384. Casely-Hayford MA, Nicholas SA, Sumbayev VV. Azinomycin epoxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and caspase 3 in a HIF-1 α -independent manner in human leukaemia myeloid macrophages [Internet]. Vol. 602, *European Journal of Pharmacology*. 2009. p. 262–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.001>
385. Szymczyk KH, Freeman TA, Adams CS, Srinivas V, Steinbeck MJ. Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation [Internet]. Vol. 209, *Journal of Cellular Physiology*. 2006. p. 836–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20770>
386. Zeng H. Selenium as an Essential Micronutrient: Roles in Cell Cycle and Apoptosis [Internet]. Vol. 14, *Molecules*. 2009. p. 1263–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14031263>
387. Kell DB, Pretorius E. On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death. *Integr Biol* . 2015 Nov;7(11):1339–77.
388. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential Expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-8 in Human Monocytes in Response to Lipopolysaccharides from Different Microbes [Internet]. Vol. 74, *Journal of Dental Research*. 1995. p. 1057–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/00220345950740040501>
389. Matsuzawa-Ishimoto Y, Hwang S, Cadwell K. Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:73–101.
390. Cotzomi-Ortega I, Aguilar-Alonso P, Reyes-Leyva J, Maycotte P. Autophagy and Its Role in Protein Secretion: Implications for Cancer Therapy [Internet]. Vol. 2018, *Mediators of Inflammation*. 2018. p. 1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/4231591>
391. Jiang G-M, Tan Y, Wang H, Peng L, Chen H-T, Meng X-J, et al. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer*. 2019 Jan 24;18(1):17.
392. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Jun;19(6):349–64.
393. Deretic V, Klionsky DJ. Autophagy and inflammation: A special review issue. *Autophagy*. 2018 Jan 29;14(2):179–80.
394. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1101–11.
395. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Aug 28;18(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091865>
396. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181–97.
397. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1

- forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005 Nov 21;171(4):603–14.
398. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):24131–45.
 399. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720–8.
 400. Zhao L, Li H, Wang Y, Zheng A, Cao L, Liu J. Autophagy Deficiency Leads to Impaired Antioxidant Defense via p62-FOXO1/3 Axis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Dec 17;2019:2526314.
 401. Watanabe T, Nagase K, Chosa M, Tobinai K. Schwann cell autophagy induced by SAHA, 17-AAG, or clonazepam can reduce bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Br J Cancer.* 2010 Nov 9;103(10):1580–7.
 402. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):323–35.
 403. Lai EH-H, Hong C-Y, Kok S-H, Hou K-L, Chao L-H, Lin L-D, et al. Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):757–63.
 404. Xu T, Nicolson S, Denton D, Kumar S. Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2015 Nov;22(11):1792–802.
 405. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins [Internet]. Vol. 78, *Cell*. 1994. p. 1027–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90277-1](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90277-1)
 406. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):1039–49.
 407. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994 Aug 5;265(5173):808–11.
 408. de la Cruz-Morcillo MA, Valero MLL, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, et al. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene.* 2012 Mar 1;31(9):1073–85.
 409. Shen T, Miao Y, Ding C, Fan W, Liu S, Lv Y, et al. Activation of the p38/MAPK pathway regulates autophagy in response to the CYPOR-dependent oxidative stress induced by zearalenone in porcine intestinal epithelial cells. *Food Chem Toxicol.* 2019 Sep;131:110527.