



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI



**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
APİKAL PERİODONTİTİS ÜZERİNDE STEMREGEN®
KONAK MODÜLASYON TERAPİSİNİN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ
Dt. Fatma GÖNÜLLÜ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Sinan OCAK

ELAZIĞ
2022

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Filiz Acun KAYA

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Dr. Öğr. Üyesi M. Sinan OCAK
Endodonti Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi M. Sinan OCAK _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özkan ADIGÜZEL _____

Dr. Öğr. Üyesi M. Sinan OCAK _____

Dr. Öğr. Üyesi Faruk ÖZTEKİN _____



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Fatma GÖNÜLLÜ

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Sinan OCAK

Danışman

Endodonti Anabilim Dalı

ELAĞIĞ
2022

İTHAF

Annem ve babama...



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması aşamasında bana yardımcı olan, yol gösteren değerli hocam ve danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Sinan OCAK'a, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Faruk ÖZTEKİN'e, daima engin fikirlerine başvurduğum değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuba GÖK'e, bilgi ve tecrübeleriyle rehberlik eden değerli hocam Doç. Dr. Serkan DÜNDAR'a, yardımlarını esirgmeden katkılarını sunan Dr. Öğr. Üyesi Alihan BOZOĞLAN'a, değerli katkıları için Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a, Fırat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Kliniği asistanlarına, hemşirelerine, personellerine ve bölümümüzün sevgili sekreterine ve tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmamda ve tezimin düzenlenmesinde yardımcı olan Arş. Gör. Güzide ÇANKAYA ve Arş. Gör. Nurgül TEMİZKAN ÇAKAR'a ve her soruma özveriyle cevap veren Uzm. Dt. Cansu ERHAN'a,

Yaşamımda maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan kıymetli dostlarım Büşra SEVİM, Sümeyye YILDIZ, Rukiye ARIKAN, Elife Tuğçe ÜDÜRGÜCÜ, Kübra SOYLU, Emine ŞANLITÜRK KAYAN ve Raziye SELÇİK'e,

Her şeyden önemlisi ne kadar uzakta olurlarsa olsunlar varlıklarını daima yanıbaşımnda hissettiğim ve üzerimdeki emeklerini kelimelere sığdıramayacağım ailem; duruşundan güç aldığım canım babama, şefkatli dayanağım biricik anneme, güvenli birer liman olarak her koşulda sığınabildiğim ve mütemadiyen yüzümü güldüren abilerime,

Ve bu süreci nihayete erdirdiğim için kendime

Teşekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	II
ETİK BEYAN.....	III
İTHAF	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO LİSTESİ	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
RESİM LİSTESİ	X
KISALTMALAR	XI
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Genel Bilgiler	8
3.1.1. Apikal Periodontitis.....	8
3.1.1.1. Apikal Periodontitisin Etiyolojisi	9
3.1.1.2. Klinik Özellikleri	10
3.1.1.2.1. Semptomatik (Akut) Apikal Periodontitis	10
3.1.1.2.2. Asemptomatik (Kronik) Apikal Periodontitis.....	10
3.1.1.3. Apikal Periodontitisin Patogenezi ve İmmun Yanıt	10
3.1.1.3.1. Hücre Biyolojisi	11
3.1.1.3.2. Periapikal Hastalığın Oluşmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü.....	16
3.1.1.3.3. Enflamatuvar Mediatörler	19
3.1.1.3.3.1. Sitokinler	22
3.1.1.3.3.1.1. RANK/RANKL/OPG Sistemi.....	24
3.1.2. Alveolar Kemik	27
3.1.2.1. Kemik Hücreleri	27
3.1.2.1.1. Osteoblastlar.....	28
3.1.2.1.2. Osteoklastlar.....	28
3.1.2.1.3. Osteositler	29
3.1.2.1.4. Osteoprogenitör Kök Hücreler.....	30

3.1.3. Kök Hücreler	31
3.1.4. Stemregen®	33
3.1.4.1. Mavi-Yeşil Alg (Aphanizomenon flos-aquae-AFA)	33
3.1.4.2. Kır İğdesi (Hippophae Rhamnoides)	34
3.1.4.3. Kabarcıklı Alg (Fucus Vesiculosus).....	34
3.1.4.4. Panax Notoginseng	35
3.1.4.5. Aloe Macroclada.....	36
3.1.4.6. Transfer Faktörü (Kolostrum).....	36
3.1.4.7. Beta Glukan	37
3.1.4.8. Piper nigrum (Karabiber).....	38
4. GEREÇ VE YÖNTEM	39
4.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Düzenek	39
4.2. Apikal Periodontis İndüksiyonu	40
4.3. Hayvanların Beslenmesi	41
4.4. Kan Örneği Elde Edilmesi ve Sakrifikasyon	42
4.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	43
4.6. Biyokimyasal Analiz	43
4.7. Histopatolojik Analiz.....	43
4.8. İmmünohistokimyasal Analiz.....	45
4.9. İstatistiksel İncelemeler	45
5. BULGULAR.....	46
5.1. Biyokimyasal Bulgular	46
5.2. Histolojik Bulgular	47
5.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	54
6. TARTIŞMA	59
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
8. KAYNAKLAR	75
9. EKLER.....	92
10. ÖZGEÇMİŞ.....	94

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Grupların biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırılması.....	46
Tablo 2. Grupların osteoblastik aktiviteye göre karşılaştırılması.....	48
Tablo 3. Grupların osteoklastik aktiviteye göre karşılaştırılması.....	49
Tablo 4. Grupların inflamasyona göre karşılaştırılması	50
Tablo 5. Grupların fibrozise göre karşılaştırılması.....	52
Tablo 6. Grupların apseye göre karşılaştırılması.....	53
Tablo 7. Grupların OPG'ye göre karşılaştırılması	55
Tablo 8. Grupların RANKL'ye göre karşılaştırılması.....	56
Tablo 9. Grupların TRAP'a göre karşılaştırılması	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Osteoklastogenez ve osteoblastogenez stratejileri.....	29
Şekil 2. Osteoblast transformasyonu sırasında preosteoblastlar ve osteositler arasındaki geçiş hücre tiplerini ve intramembranöz ossifikasyonun ikinci fazı sırasında birbirleriyle ilişkilerini gösteren diyagram.	30
Şekil 3. Grupların osteoblastik aktiviteye göre karşılaştırılması	48
Şekil 4. Grupların osteoklastik aktiviteye göre karşılaştırılması	49
Şekil 5. Grupların inflamasyona göre karşılaştırılması.....	51
Şekil 6. Grupların fibrozise göre karşılaştırılması	52
Şekil 7. Grupların apseye göre karşılaştırılması	54
Şekil 8. Grupların OPG'ye göre karşılaştırılması	55
Şekil 9. Grupların RANKL'ye göre karşılaştırılması	57
Şekil 10. Grupların TRAP'a göre karşılaştırılması.....	58

RESİM LİSTESİ

Resim 1	a) Koronal pulpa ekspozu oluşturulması b) koronal pulpa açıklığının kontrol edilmesi	41
Resim 2	a) Stemregen® takviye edici gıda b)SF ile çözündürülmüş Stemregen®	41
Resim 3	a) Çalışmada kullanılan hassas tartı b) Vorteks cihazı ile karışımın hazırlanması c) Stemregen®'in gavaj yolu ile uygulanması	42
Resim 4	NF 200 santrifüj cihazı	43
Resim 5	a) Negatif kontrol grubu H&E boyama b) Pozitif kontrol grubu c) Stem grubu oklar; yeşil; osteoblast, turuncu;osteoklast, mavi; inflamasyon, sarı; apse, siyah;fibrozis.....	47
Resim 6	a) Hafif yoğunlukta osteoblastik aktivite, H&E (x400) b)orta yoğunlukta osteoblastik aktivite H&E (X400)	47
Resim 7	Hafif yoğunlukta osteoklastik aktivite b) Orta yoğunlukta osteoklastik aktivite H&E (x400)	48
Resim 9	a) hafif düzeyde fibrozis b) orta düzeyde fibrozis c) şiddetli düzeyde fibrozis H&E boyama (x400)	51
Resim 10	a) hafif yoğunlukta apse b) orta yoğunlukta apse H&E boyama(x400).	53
Resim 11	OPG (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)	54
Resim 12	RANKL (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)	55
Resim 13	TRAP (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)	57

KISALTMALAR

AFA	: Mavi yeşil alg (Aphanizomenon flos-aquae)
ALP	: Alkalen Fosfataz
AP	: Apikal periodontitis
C3	: kompleman 3
Ca	: Kalsiyum
CCR	: kemokin reseptörleri
CSF	: Klasik Koloni Uyarıcı Faktör
CTX	: C-terminal telopeptidi
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi
GCSF	: Granülosit koloni stimüle edici faktör
GM-CSF	: Granülosit/makrofaj
HKH	: Hematopoietik kök hücrelerden
HPH	: Hematopoietik progenitör hücre
IFN-γ	: interferon gama
IL	: İnterlökin
IL-1 α	: İnterlökin 1 Alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
KHF	: Kök Hücre Faktör (Stem Cell Factor)
KMKH	: Kemik iliği Mezenkimal Kök Hücreleri (Bone Mesenchymal Stem Cell)
MHC	: Majör histo-uyumluluk kompleksi
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre (Mesenchymal Stem Cell)
MMP	: Matriks metalloproteinazlarla
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa β
NK	: Natural killer
OPG	: Osteoprotegerin
OS	: Oksidatif stres
P	: Fosfor
PGG β-glukan	: Poli-(1,6)-beta-D-glukopiranosil-(1,3)-beta-D-glukopiranoz beta Glukan

PMN	: Polimorfonükleer lökositlerdir
PNS	: Panax notoginseng saponinleri
PRR	: Patern tanımlama reseptörleri (Pattern Recognition Receptors)
RANK	: Nükleer Faktör Kappa β Reseptör Aktivatörü (Receptor activator of nuclear factor kappa-B)
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa β Reseptör Aktivatörü Ligandı (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)
RES	: Retikülo-endotelyal sistemin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDF-1α	: Stromal hücre kaynaklı faktör-1 α
TC	: Sitotoksik/ sitolitik T hücresi (T cytotoxic)
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TH	: T helper
TLR	: Toll-like reseptörlere
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TRAP	: Tartarat dirençli asit fosfataz
TS	: Baskılayıcı T hücreleri (T süpresör hücreler)
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. ÖZET

Bu çalışmanın amacı ratlarda rutin beslenmeye ek olarak Stemregen® besin takviyesi ile sağlanan konak modülasyon terapisinin apikal periodontitise bağlı inflamasyon/rezorpsiyon süreçlerine etkisini değerlendirmektir. Çalışmamızda ratlar; Negatif Kontrol grubu (n=7), Pozitif Kontrol grubu (n=10), Stemregen® (Stem) grubu (n=10) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Pozitif kontrol ve Stem gruplarında apikal periodontitis oluşumu indüklemek amacıyla çalışmanın 0.günü deneklerin alt sağ birinci azı dişlerinde pulpa ekspozu oluşturuldu. Deneyin 30.gününde ratların tamamı kurban edildi. Alınan kan örneklerinin biyokimyasal analizlerinde, serum fosfor (P), kalsiyum (Ca) ve alkalen fosfataz (ALP) değerlendirildi. Doku örneklerinin histopatolojik analizlerinde, osteoblastik aktivite, osteoklastik aktivite, inflamasyon, fibrozis ve apse yoğunlukları; immunohistokimyasal analizlerinde ise reseptör aktivatör faktör kappa B (NF-kB) ligandı (RANKL), tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP) ve osteoprotegerin (OPG) konsantrasyonları değerlendirildi. İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) 22 paket programı ile yapıldı.

Pozitif kontrol grubunun P değeri negatif kontrol grubu ve Stem grubundan anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,001$). Gruplar arasında serum ALP ve Ca düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p>0,05$). Negatif kontrol grubunun osteoblastik aktivitesi Stem ve pozitif kontrol gruplarından anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,005$). Pozitif kontrol grubunun osteoklastik aktivitesinin negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,032$). Pozitif kontrol grubunun inflamasyon düzeyi Stem ve negatif kontrol gruplarından anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Fibrozis için

gruplar karşılaştırıldığında negatif kontrol grubunda fibrozis görülme oranı, Stem ve pozitif kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p<0,001$). Apse oluşumu, Stem ve negatif kontrol gruplarında pozitif kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$). Gruplar OPG düzeyleri açısından ele alındığında, negatif kontrol grubunun OPG seviyeleri pozitif kontrol ve Stem gruplarından istatistiksel olarak düşük bulundu ($p=0,005$). Pozitif kontrol grubunun RANKL konsantrasyonu negatif kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek görüldü ($p=0,032$). Gruplar arasında TRAP (+) hücre düzeyleri açısından anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,071$).

Bu çalışmanın bulgularına dayanarak Stemregen® takviyesi ile apikal periodontitiste enflamasyonun ve kemik yıkımının baskılanabileceği ve Stemregen®'in daha hızlı bir apikal onarım sürecini destekleyebileceği ifade edilebilir. Bununla birlikte bu alanda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Apikal periodontitis, Stemregen®, konak modülasyonu, rat

2.ABSTRACT

EFFECTS OF STEMREGEN® AS HOST MODULATION THERAPY ON EXPERIMENTALLY INDUCED APICAL PERIODONTITIS IN RATS

The aim of this study was to evaluate the effect of host modulation therapy provided with Stemregen® nutritional supplement in addition to routine nutrition on inflammation/resorption processes due to apical periodontitis in rats. In our study, rats; They were divided into 3 groups: Negative Control group (n=7), Positive Control group (n=10), Stemregen® (Stem) group (n=10). In order to induce apical periodontitis formation in the positive control and Stem groups, pulp exposure was created in the lower right first molars of the subjects on the 0th day of the study. All rats were sacrificed on the 30th day of the experiment. Serum phosphorus (P), calcium (Ca) and alkaline phosphatase (ALP) were evaluated in the biochemical analyzes of blood samples. In the histopathological analysis of tissue samples, osteoblastic activity, osteoclastic activity, inflammation, fibrosis and abscess densities; Concentrations of receptor activator factor kappa B (NF- κ B) ligand (RANKL), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and osteoprotegerin (OPG) were evaluated in immunohistochemical analyzes. Statistical analyzes were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) 22 package program.

The P value of the positive control group was significantly lower than that of the negative control group and Stem group ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference between the groups in terms of serum ALP and Ca levels ($p > 0.05$). The osteoblastic activity of the negative control group was found to be significantly lower than that of the Stem and positive control groups ($p = 0.005$). The

osteoclastic activity of the positive control group was found to be statistically higher than the negative control group ($p=0.032$). The inflammation level of the positive control group was found to be significantly higher than that of the Stem and negative control groups ($p<0.001$). When the groups were compared for fibrosis, the incidence of fibrosis in the negative control group was found to be statistically significantly lower than in the Stem and positive control groups ($p<0.001$). Abscess formation was found to be significantly lower in the stem and negative control groups than in the positive control group ($p<0.001$). When the groups were evaluated in terms of OPG levels, the OPG levels of the negative control group were found to be statistically lower than those of the positive control and Stem groups ($p=0.005$). The RANKL concentration of the positive control group was significantly higher than the negative control group ($p=0.032$). There was no significant difference between the groups in terms of TRAP (+) cell levels ($p=0.071$).

Based on the findings of this study, it can be stated that inflammation and bone destruction in apical periodontitis can be suppressed with Stemregen® supplementation, and Stemregen® can support a faster apical repair process. However, extensive studies are needed in this area.

Keywords: Apical periodontitis, Stemregen®, Host modulation, Rat

3. GİRİŞ

Apikal periodontitis (AP), diş kökünün apikal kısmını çevreleyen dokuları etkileyen ve öncelikle kök kanalını enfekte eden mikroorganizmaların neden olduğu inflamatuvar bir hastalıktır. Endodontik enfeksiyona yanıt olarak, konak hücreler inflamatuvar sitokinler salgılar ve osteoklastlar gibi kemik rezorpsiyonu ile ilişkili hücreleri aktive ederek çevre kemiğin demineralizasyonuna yol açar (1). Anti-inflamatuvar sitokinler hastalığın ilerleyişine karşı koyma ve yıkımı azaltma yönünde işlev görürken; pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi) doku yıkımına sebep olmaktadır (2). Enfekte olmuş kök kanallarından kaynaklanan kronik bakteriyel irritasyon periapikal patolijinin oluşmasına ve ilerlemesine yol açmaktadır. Periapikal doku değişikliklerine, bakteriyel yüklemeyi takiben antijene özgü immünolojik yanıtlar da dahil konakçı savunma reaksiyonları neden olur. Periapikal bir lezyonun oluşumu sırasında immünolojik tepkiler eksojen antijenik maddelerin invazyonunu ortadan kaldırmak için aktif olarak işlev görebilir (3). Konak yanıtının önemi, hastalığın patogenezinin öneminden daha kritiktir. Konak modülasyon tedavisinin (konak yanıtı modülasyonu) amacı, pro-inflamatuvar mediatörler ve yıkıcı enzimler ile anti-inflamatuvar mediatörler ve enzim inhibitörleri arasındaki dengeyi sağlamaktır (2). Bu yaklaşımın arkasındaki mantık, doğal savunma mekanizmalarını destekleyerek konağa enfeksiyöz ajanlarla mücadelesinde yardımcı olmak veya inflamatuvar sistemlerin gidişatını değiştirerek konağın tepkisini modifiye etmektir. Enfeksiyona karşı diğer silahlarla karşılaştırıldığında, konak yanıtı modülasyonu potansiyel olarak daha az yan etkiye sahiptir, invaziv değildir ve karmaşık uygulama yöntemleri gerektirmez (4). Konak cevabı modülasyonu için kök hücre temelli tedaviler, anti-inflamatuvar ajanlar, büyüme/farklılaşma faktörleri ve lazerlerin

sistemik veya lokal uygulamaları kullanılabilmektedir (5). Kemik iliği kök hücreleri mobilize edildikten sonra doku onarımı sürecine katılabilir ve lokal inflamasyonu modüle ederek genel sağlık bakımını destekler. Kök hücre; kendi kendine çoğalabilen ve ayrıca çeşitli hücre türlerinden herhangi birine (kan hücreleri, deri hücreleri, sinir hücreleri vb.) dönüşebilen farklılaşmamış hücredir. Her biri farklı fenotiplere sahip çok sayıda kök hücre türü vardır. Pluripotansiyel kök hücreler, hematopoietik ve hematopoietik olmayan soylara farklılaşma kapasitesine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) hematopoietik değildir ve pankreas adacıklarında osteoblastlar, kondrositler, nöronlar, kas hücreleri, adipositler ve insülin ekspresyen hücreler dahil olmak üzere kendi kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma kapasitesine sahiptir. Mezenkimal hücrelerin ayrıca, immün hücre infiltrasyonunu azaltma ve inflamasyonu modüle etme yetenekleri dahil olmak üzere benzersiz immünomodülatör özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir (6). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (KMKH) immünomodülatör özellikleri, in vivo anti-enflamatuar etkilere dönüşür ve çok sayıda hayvan çalışması, eksojen olarak uygulanan KMKH'nin enflamasyonu hafiflettiğini ve yaralı dokunun yenilenmesini kolaylaştırdığını göstermiştir (7-9). Onarım ihtiyacı olan yerleri arayan kök hücrelerin göçü, sağlıklı dokunun devam eden normal bakımı ve gençleştirilmesiyle ilgili süreçlerin yanı sıra yaralı dokunun spesifik onarımı ve iyileştirilmesi için çok önemlidir. Doğal kök hücre mobilizatörleri, gerçek doku onarım sürecini destekleyerek ve iltihabı azaltarak genel sağlığı iyileştirmek ve iyileşme sürecini hızlandırmak için etkili araçlar olabilir (6).

Stemregen®, mavi-yeşil alg (Aphanizomenon flos-aquae-AFA), kır iğdesi (Hippophae rhamnoides), kabarcıklı alg (Fucus Vesiculous), Panax Notoginseng,

Aloe Macroclada, transfer faktörü ve beta glukandan oluşan kök hücre göçü sağlayan takviye edici bir gıdadır. Mavi yeşil alg (AFA), tüketiminin dolaşımdaki kök hücrelerin sayısını önemli ölçüde artırdığı bilinmektedir (10). Kır ığdesi doğal bir antioksidan olmasının yanında plazma lipid peroksidasyonunu, sitotoksiteyi, DNA hasarını önlemektedir ve kök hücre mobilizatörü olarak da görev yapmaktadır (6). Kabarcıklı Alg (Fucus Vesiculosus) iki bileşen içerir; phlorotanninler (Floroglusinol) ve fucoidan. Oral fucoidan uygulanmasıyla kemik iliği nişinden periferik kana hematopoietik progenitor kök hücreleri mobilize ettiği gösterilmiştir (11). Fucoidanın nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği ve proinflatuar sitokin seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (12). Panax Notoginseng'in kemik iliğinden kök hücre faktör üretimini uyardığı ve adezyon moleküllerinin kemik iliği mezenkimal kök hücreler üzerindeki adezyon etkilerini azaltarak mezenkimal kök hücrelerin plazmaya mobilizasyonunu teşvik ettiği saptanmıştır. KHF'ler, mobilizasyonun en güçlü ajanlarından biri olarak kabul edilir ve daha fazla kök hücreyi plazmaya yönlendirebilir ve kök hücre göçüne, birikmesine ve çoğalmasına büyük ölçüde katkıda bulunabilir (13). Aloe macroclada Madagaskar'a özgü bir Aloe Vera'dır. Aloe macroclada kullanımından sonraki 2 saat içinde kök hücre sayısında 53%'e varan ve 3 saatten uzun süren önemli bir artış sağladığı bildirilmiştir (14). Transfer faktörü (kolostrum), bağırsakla ilişkili miyeloid bağışıklık hücrelerini uyarma mekanizmalarının bir parçası olarak kök hücre salımını aktive eden kemik iliğine sinyaller gönderme, kök hücre hareketliliğini artırma özelliklerinin yanısıra kök hücre ile ilişkili sitokinlerin (IL-6 ve GCSF) ve büyüme faktörü VEGF'nin üretimini uyandırabilir (15). Poli-(1,6)-beta-D-glukopiranosil-(1,3)-beta-D-glukopiranoz beta glukon (PGG β -glukan), çözünebilir mayadan türetilmiş bir polisakkarittir. PGG β -

glukanın 24-48 saatlik pik zamanla hematopoietik progenitör hücre (HPH) mobilizasyonu sağladığı kanıtlanmıştır. PGG β -glukan kaynaklı HPH mobilizasyonu kompleman 3 (C3) aktivasyonu veya proinflamatuvar sitokin salgılanmasından bağımsızdır, ancak plazmada stromal hücre kaynaklı faktör-1 α (SDF- 1 α), seviyelerini arttırmaktadır (16). Stemregen®, agrobakterium fermantasyonu ile üretilen ve β -glukanın en güçlü formu olan %85 (1 $\rightarrow$ 3) -b-D-glikoz bağlarından oluşan β -glukan içerir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda normal diyetek ek gıda takviyesi ile apikal periodontitise bağılı inflamasyon/rezorpsiyon süreçleri incelendi ve konak modölatörü olarak Stemregen® takviyesi kullanıldı.

Bu çalışmanın amacı ratlarda rutin beslenmeye (ad libitum) ek olarak Stemregen® besin takviyesi ile sağlanan konak modölasyon terapisi ile apikal periodontitis sonucu ortaya çıkan inflamasyon/rezorpsiyon arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir. Besin takviyesiyle elde edilen konak modölasyonunun apikal periodontitis ile ortaya çıkan inflamasyon/rezorpsiyon süreçlerine etkisi olmayacağı bu çalışmanın sıfır hipotezi olarak belirlendi.

3.1. Genel Bilgiler

3.1.1. Apikal Periodontitis

Apikal periodontitis (AP), mikrobiyal faktörler ve konakçı immün yanıtı arasındaki etkileşimden kaynaklanan periradiküler dokuların iltihaplanması ve yıkımı ile karakterize edilen kök kanal enfeksiyonunun bir sonucudur (17). Apikal periodontitis çenelerde dişlerle ilgili en sık görölen iltihabi lezyondur. Kök kanalındaki enfeksiyonun durumuna bağılı olarak akut veya kronik inflamatuvar reaksiyon gelişebilir. AP'de kemik yıkımına hem mikrobiyal enfeksiyon hem de savunma reaksiyonunun bir parçası olarak immün yanıt neden olur (18, 19).

Histolojik olarak apikal periodontitis; apse, granülom veya radiküler kist olarak sınıflandırılır. Periapikal apse, akut enfeksiyona yanıt olarak hücresel dinamiklerdeki değişimler sonucu gelişen iltihabi bir oluşumu yansıtırken, periapikal granülomlar; inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve iyi gelişmiş fibröz kapsül içeren granülasyon dokusundan oluşur (20).

3.1.1.1. Apikal Periodontitisin Etiyolojisi

Bakteriler ve bakteriyel ürünler apikal periodontitis oluşumunda en önemli faktörlerdir (21, 22). Diş pulpalarının oral kaviteye açık bırakılmasıyla oluşan periapikal ve pulpal değişikliklerin incelendiği bir çalışmada ratlardan alınan radyografilerde normal oral floralı ratlarda radyolüsent alanlar izlenmesine rağmen steril ratlarda apikal periodontitisin oluşmadığı gözlenmiştir (23). İnsanlarda kültür yöntemleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda travma geçirmiş, bakteri kontaminasyonu olmayan, kuru ve sağlam ve nekrotik pulpalı dişlerden alınan radyografilerde periradiküler dokularda kemik yıkımının olmadığı görülürken bakteri kontaminasyonu mevcut ve yine nekrotik pulpalı, sağlam kuru dişlerde ise periapikal kemik yıkımının meydana geldiği gösterilmiştir (24). Apikal periodontitis etyolojisindeki temel unsurun endodontik enfeksiyon kaynaklı mikroorganizmaların olduğu ortaya konmuştur (24).

Apikal periodontitis etyolojisinde kimyasal ürünler, yabancı cisimler ve mekanik irritasyon mikroorganizmalar haricindeki dış faktörler olarak inflamatuvar mediatörler, konağın metabolik ürünleri ve sitokinler ise iç faktörler olarak bildirilmiştir (25).

3.1.1.2. Klinik Özellikleri

3.1.1.2.1. Semptomatik (Akut) Apikal Periodontitis

Apikal periodonsiyumda gelişen enflamasyona dayalı, hiperaleji ve ağrı eşiğinin düşmesiyle birlikte palpasyon ve perküsyonda ağrı ile seyreden klinik tablodur. İlgili diş devital olabileceği gibi vital de olabilmektedir. Radyografide periodontal aralıkta genişleme izlenirken çoğunlukla apikal alanda kemik yıkımı izlenmez (26).

3.1.1.2.2. Asemptomatik (Kronik) Apikal Periodontitis

Pulpal enflamasyonun etkisiyle apikal bölgede kemik yıkımı görülen, radyografide ilgili diş lamina durasının kesintiye uğradığı durumdan periradiküler bölgede radyolüsent alanlara kadar ilerleyebilen, enflamatuvar uyarana adapte olmuş konak savunması ile klinik olarak belirti vermeyen bir hastalıktır (27).

3.1.1.3. Apikal Periodontitisin Patogenezi ve İmmün Yanıt

Vücudun diğer doku yaralanmalarında vermiş olduğu bağ dokusu yanıtı periradiküler doku yaralanmalarına verdiği cevapla benzerlik göstermektedir. Enflamatuvar süreç, periradiküler bölgeye ulaşan mikroorganizmalar, mikroorganizma metabolik ürünleri ve toksinleriyle başlatılabilir. İmmün sistem hücreleri olan dentritik hücreler, fagositler ve B lenfositler üzerlerindeki reseptörlerle (toll-like reseptör, patern tanımlama reseptörleri (PRR: Pattern Recognition Receptors)) patojenleri tanıyarak bağışıklık sistem reaksiyonlarını başlatırlar. Başlatan olayın yoğunluğuna ve süresine bağlı olarak, inflamatuvar lezyon, akut veya kronik bir karakter geliştirebilir (28-32).

Damarlarda artmış permeabilite ve vazodilatasyon enflamasyonun ilk bulgularındandır. Vasküler değişiklikler dokunun bölgedeki makrofaj ve bağ doku hücreleri aracılığıyla irritana verdiği ilk reaksiyonlarla birlikte meydana gelir. Sıcaklık ve kızarıklık, vazodilatasyon ve kanla dolan kapiller yataklarla beraber enflamasyonun temel bulgularını oluşturur. Kapiller geçirgenliğin artmasıyla damar duvarına yaklaşan lökositlerin enflamatuvar dokuya geçişi kolaylaşır (33, 34).

Makrofajlar, gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkaritleri tanıyarak aktive olurlar. Enflamasyona cevap olarak üretilen proenflamatuvar sitokinler endotel hücrelerinin adezyon molekülü salınımını artırır bu da lökositlerin damar duvarına yapışarak dokulara göç etmesine neden olur. Bölgeye ilk gelen hücreler polimorfonükleer lökositlerdir (PMN) (35). PMN'ler bakteri fagositozunun yanında prostoglandin ve lökotrienleri salgılayarak enflamatuvar bölgeye makrofaj ve nötrofillerin çekilmesini artırır. Makrofajlar osteoklastik kemik yıkımını uyarır ve vasküler cevabı artıran proenflamatuvar mediatörler salgılar (IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi) (36). Bu reaksiyonlar özgün olmayan doğal bağışıklık yanıtı olarak meydana gelirken kök kanal sisteminden gelen bakteri ve yan ürünlerinin kaynağı devam ettiği için kazanılmış spesifik immün yanıt sürekli enfeksiyona dahil olur. Patojene yeniden maruz kalındığında daha etkili bir yanıt ortaya koyan ve patojene özgün olarak ortaya çıkan kazanılmış bağışıklık, doğal bağışıklığın yeterli olmadığı devam eden ağır enfeksiyonlara karşı gelişmektedir (29).

3.1.1.3.1. Hücre Biyolojisi

Kazanılmış bağışıklığın morfolojik olarak benzer özellikteki hücreleri B ve T lenfositler apikal periodontitis oluşumunda etkin rol alırlar. Mikroskobik olarak da

ayırt edilemeyen bu hücreler yüzey reseptörü düzeyinde monoklonal anikorlarla fenotiplenerek başkalaşım kümesi numarası (CD) ile tanımlanırlar (28, 37).

Kemik iliğinde üretilen T lenfositler ardından timusa geçerler, burada bölünerek çoğalır ve antijen yanıtları için farklılaşırlar. T hücreleri; yardımcı T hücreleri (T helper: TH), sitotoksik T hücreleri (T cytotoxic (sitolitik): TC) düzenleyici T hücreleri (T regulator hücreler: Treg) ve baskılayıcı T hücreleri (T süpresör hücreler: TS) ve şeklinde fonksiyonlarına göre alt sınıflara ayrılır (38, 39). CD4-pozitif (CD4+) T lenfositler T helper/inducer (Th) adını alırlar. Hücrel bağışıklık bakteriyel antijenlerle aktive edilen CD4+ T lenfositlerle ilişkilidir. Sitokin ekspresyon modellerine göre, CD4+ T hücreleri ayrıca IL-2 salgılayan T helper1 (Th1) hücrelerine ve IL-4 ve IL-5 üreten interferon gama (IFN- γ) ve Th2 hücrelerine ayrılabilir (40). T helper hücrelerinin sitokin eksprese eden üç alt popülasyonu vardır; Th1, Th2 ve Th17. İnterferon gama (IFN- γ) klasik yoldan makrofaj aktivasyonu sağlar ve Th1 hücreleri tarafından üretilir. Th2 hücreleri alternatif yoldan makrofaj aktivasyonu sağlar ve IL-13, IL-4 ve IL-5 üretirler. Th17 hücreleri kemokinleri üretirler. Kemokinler, enflamasyon bölgesine monosit göçünden sorumludur (37, 39, 41). CD4-pozitif T lenfositleri, antijen sunan hücrelerin yüzeyinde sunulan sınıf II majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri ile bağlantılı olarak antijenlere yanıt verir ve immünoglobulin üretiminin yanı sıra sitolitik T lenfosit yanıtları için yardıma aracılık edebilir (42). CD8-pozitif (CD8+) T lenfositleri, MHC sınıf I kısıtlı hücrelerdir ve antijen-MHC kompleksi ile stimülasyon üzerine sitotoksik hale gelirler (43). Ek olarak, belirli baskılayıcı işlevler, CD8+ T lenfositleri tarafından yürütülür (44). CD4/CD8 oranı, sırasıyla otoimmün hastalıklar, immün yetmezlik durumları, maligniteler ve inflamatuvar

lezyonlarda yer alan T-lenfosit popölasyonunun net düzenleyici dengesini karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmıştır (45, 46). Sıçanlarda indüklenmiş periapikal lezyonlar üzerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, erken ve kronik periapikal lezyonların farklı bir T-lenfosit alt kümesi bileşimine sahip olduğunu, CD4+ T hücrelerinin lezyon gelişiminin erken fazında baskın olduğunu ve ardından CD8+ olduğunda kronik fazda kademeli düşüşlerinin olduğunu göstermiştir. T hücreleri, T helper alt popölasyonundan biraz daha fazladır (3, 47). CD4+ T lenfositler ayrıca B lenfositlerin plazma hücrelerine farklılaşmasında da rol oynarlar (48).

B lenfositler kemik iliğinde üretilir ve olgunlaşır. T lenfositlerde antijen yanıtı direkt hücrenin kendisi tarafından oluşturulurken B lenfositlerde ise hücreden salgılanan antikorlar tarafından oluşturulur. B lenfositler, doğrudan antikor üretiminden sorumlu hücrelerdir. Antijenlerden ve Th2 hücrelerden alınan sinyallerle bazı B hücreleri plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretimini ve salınımını sağlamaktadır (29).

Yabancı hücreler, tümör hücreleri, ve enfekte hücreler doğal öldürücü hücreler (Natural killer: NK) tarafından tanınarak öldürülür (29). Bağışıklık sisteminin spesifik olmayan ve antijene özgü dalları arasındaki bağlantıyı temsil eden bu hücrelerin, apikal periodontitis lezyonlarında düşük yüzdelerde mevcut oldukları gösterilmiştir (32, 49).

Apikal periodontitis oluşumunda etkin hücrelerden biri de makrofajlardır (21). Kronik apikal periodontitiste makrofajların mevcudiyeti, koruyucu yanıtların yanı sıra lezyonun gelişimi ve inflamatuvar reaksiyonların devam etmesi açısından önemlidir, ancak inflamatuvar hücresel infiltrat içindeki frekanslarının %4 ila %50'nin

üzerinde geniş aralıklar arasında dağıldığı rapor edilmiştir (50, 51). Sıçan molar pulpasının ekspoz edilip açık bırakılarak oral mikrobiyotaya maruz kalmasıyla indüklenen deneysel periapikal granülomlarda, en erken olaylardan birinin periapikal dokuya yoğun makrofaj girişi olduğu bulunmuştur (3). Bu bulgu, konağın, etkilenen pulpa odasından periapikal boşluğa doğru ilerleyen zararlı uyaranları ortadan kaldırmak için fagositler tarafından oluşturulan ilk yerel savunma hattını hızla kurduğunu gösterir. Normal periodontal ligamentteki bu hücrelerin azlığı ve hücre yüzeyi belirteçleri, sınıf II MHC antijenlerinin ekspresyonu ile karakterize edilen eksüdatif makrofajların hem sıçan hem de insan periapikal lezyonlarında baskın makrofaj alt popülasyonu olduğunu gösterir. Eksüdatif makrofajlar, ardından diğer infiltre edici inflamatuvar hücreler, çoklu kemotaktik uyaranlarla toplanır (32).

Savunma hattına alınan makrofajlar, istilacı mikroorganizmalar ve ürünleri ile karşılaştıklarında aktif hale gelirler (52). Makrofajların aktivasyonu alternatif ve klasik yol üzerinden iki farklı şekilde gerçekleşir. Klasik yoldan aktivasyon T lenfosit kaynaklı IFN- γ , vücut antijenleri veya yabancı antijenler ve mikroorganizma endotoksinleri tarafından uyarılarak meydana gelir. Böylece klasik yoldan aktive olan makrofajlar, serbest radikaller, nitrojen ve lizozomal enzimler üreterek fagositozu gerçekleştirirken proenflamatuvar sitokinler ve enflamatuvar mediatörlerle de irritana karşı konak cevabını artırır. Makrofaj aktivasyonunun alternatif yoldan işlemesi ise IFN- γ haricindeki sitokinlerle sağlanır. Alternatif yolla aktive olan makrofajlar öldürme efektör mekanizmalarından çok doku onarımında işlev görürler. Aktive makrofajlar antijen sunarak kazanılmış immün cevaba katkıda bulunurlar (27, 29, 41).

Apikal periodontitis lezyonlarında dentritik hücrelerin bulunduğu ortaya konmuştur. Kemik iliği kaynaklı bağışıklık sistemi hücreleri olan bu hücreler T lenfositlerine antijen sunumundan sorumludur ve protein yapıdaki antijenlere karşı kazanılmış bağışıklığın başlatılmasına neden olurlar (37). Dendritik hücreler hem inflamasyonun hem de adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde ve mikrobiyal patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynar (53, 54). AP'de bulunan dendritik hücrelerin bir alt kümesi olan Langerhans hücreleri ile epitelyal proliferatif potansiyele sahip T hücrelerinin kemotaksisi arasında güçlü bir ilişki görünmektedir (55).

Osteoklastlar, çok çekirdekli hücreler olup kemik yıkımından sorumludurlar. Osteoklast öncüllerinin kemik iliğindeki makrofaj-monosit hücrelerinden diferensiasyonu ile oluşur. Granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), osteoprotegerin (OPG), nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ligandının reseptör aktivatörü “RANK ligand” (RANKL), prostaglandinler, TNF, IL-1, IL-6, bradikinin, trombin gibi pek çok mediatör ve büyüme faktörü bu diferansiasyonda etkindir. Osteoklast progenitör hücreleri ve osteoklastlar üzerinde reseptör aktivatör nükleer faktör Kappa B (RANK) bulunur. RANKL ve OPG, osteoblastlarca sentezlenen, osteoklast diferansiasyonu ve aktivasyonunda görevli temel sitokinlerdir. Osteoklast öncüllerinin farklılaşması, RANKL'ın RANK'a bağlanmasıyla gerçekleşir ve böylece çok çekirdekli, kemik rezorbsiyonundan sorumlu olgun osteoklast hücreleri meydana gelir. Fakat RANKL'a OPG bağlanırsa RANKL'ın RANK'a bağlanmasına engel olur ve osteoklast farklılaşması gerçekleşmez böylece kemik yıkımına engel olunur (56). Patolojik kemik yıkımı ve fizyolojik osteoklast oluşumunda RANKL-RANK uyarımı önemlidir (57).

Enflamatuvar periapikal lezyonu bulunan çekilmiş dişler incelendiğinde dişlerin %52'sinde malessez epitel artıklarının patolojik olarak arttığı gözlenmiştir. Malessez epitel artıkları, Hertwing epitel kınının kök gelişimi sırasında morfolojik disintegrasyonu ile oluşan bozulmadan kalmış epitel hücrelerdir. Bu hücrelerin bahsedilen patolojik çoğalmasına enflamatuvar yanıtta rol oynayan büyüme faktörleri ve sitokinlerin yol açtığı düşünülmektedir (56).

3.1.1.3.2. Periapikal Hastalığın Oluşmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü

Bağışıklık sistemi, interaktif bir lenfoid organlar, hücreler, humoral faktörler ve sitokinler ağıdır (58). Bir antijen konak sisteme saldırdığında, bağışıklık sisteminin iki farklı, ancak birbiriyle ilişkili dalı aktif olur; spesifik olmayan/doğuştan gelen ve spesifik/adaptif bağışıklık tepkisi. Bu sistemlerin her ikisi de konağın yabancı maddeleri kendisine tanımasını ve bunları etkisiz hale getirmesini, yok etmesini veya metabolize etmesini sağlayan belirli fizyolojik mekanizmalara sahiptir. Doğal bağışıklık, antijenlere karşı korumanın en erken gelişimini temsil eder. Adaptif bağışıklığın yine humoral ve hücre aracılı olmak üzere iki dalı vardır. Hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkların bağımsız olarak çalışmadığına dikkat edilmelidir. Dahası, bağışıklık tepkilerinin çoğu, bağışıklık sisteminin hem humoral hem de hücre aracılı bağışıklık dallarının aktivitesini ve işbirliğini içerir (59).

Apikal periodontitis esasen mikrobiyal etiyolojinin inflamatuvar bir hastalığıdır. Kök kanal sistemi içindeki mikrobiyal yerleşim, organizasyon ve virülans faktörlerinin bilinmesi hastalık sürecini anlamak için önemlidir. Apikal periodontitis ile ilişkili mantarlar, arkealar ve virüsler bulunmasına rağmen, bakteriler ana mikrobiyal etiyolojik ajanlardır. Spesifik durumlarda,

mikroorganizmalar savunma bariyerini aşabilir ve hatta ekstra-radiküler enfeksiyon oluşturabilir (21, 60). Mikroorganizmalar doğrudan doku hasarına neden olabilir ve enzimler, ekzotoksinler ve metabolik son ürünlerini salgılayarak immünolojik yanıtı modüle edebilir. Farklı virülans faktörleriyle kök kanal enfeksiyonundaki varyasyona bağlı olarak, apikal periodontitise neden olan immünolojik yanıt zamanla değişecektir (20). Kök kanalı enfeksiyonundan gelen mikrobiyal antijenler, periapikal dokuda hem spesifik hem de spesifik olmayan immün yanıtları uyarabilir (61, 62).

Çalışmalar, makrofajların, mast hücrelerinin, T hücrelerinin, nötrofillerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve RANK/RANKL/OPG sisteminin apikal periodontitis oluşumuna katıldığını göstermiştir (63-65). Çeşitli inflamatuvar uyarıların büyük miktarı ve etkileşimleri, hastalığın durumunu ve ilerlemesini etkileyebilir ve değiştirebilir (66, 67).

Apikal periodontitiste inflamatuvar hücrelerin farklı alt popülasyonları tarif edilmiştir. Nötrofiller ve mikroorganizmalarla etkileşimleri, akut fazda ilk savunma hattı olarak doku hasarına ve kemotaksiye neden olan apikal periodontitisin ilerlemesi için özellikle önemlidir. Mast hücreleri ve makrofajlar, kronik apikal periodontitisin inflamatuvar infiltratının önemli bileşenleri ile ilişkilidir. Bu hücrelerin periapikal kistlerdeki dağılımı üzerine yapılan bir araştırma, mast hücrelerinin vazoaktif mediatörler gibi çeşitli inflamatuvar maddeleri degranüle etme ve üretme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Aktive edilmiş mast hücreleri, hücre dışı ortamda önceden oluşturulmuş birkaç maddeyi (histamin, serotonin, heparin ve proteazlar) degranüle eder ve serbest bırakır (64, 68). Bu moleküllere ek olarak, aktive edilmiş mast hücreleri trombosit aktive edici faktör, kemotaktik ajanlar ve

interlökin-1 α (IL-1 α), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN- γ), makrofaj koloni uyarıcı faktör, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar sitokinler gibi yeni vazoaktif araçları sentezleyebilir. Bu hücreler aynı zamanda triptaz ve kimaz gibi bağ dokusunun bozunmasıyla ilişkili maddeler olan önemli bir proteolitik enzim kaynağıdır. Mast hücreleri, degranülasyon ve çeşitli maddelerin üretim kapasiteleri nedeniyle, inflamatuvar olaylar, kemik rezorpsiyonu ve bağışıklık sistemindeki diğer hücrelerle etkileşim ile doğrudan ilişkilidir (68-70).

Makrofajlar ise çözünür IL-1 α , TNF- α , IL-6, TGF- β ve prostaglandinleri salgılayarak bu lezyonların gelişimi ve onarımı üzerinde etkili olan pro- ve anti-inflamatuvar maddeler üretme yeteneğine sahiptir. Bu sitokinler, osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu, kollajen üretimi ve neovaskülarizasyon yoluyla inflamatuvar süreçlerin başlatılmasında ve düzenlenmesinde rol oynar (64, 71).

Apikal periodontitiste T hücreleri bol miktarda bulunur, ancak bu hücrelerin aktivasyonu ve işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Birkaç düzenleyici devre, T hücreleri tarafından aktive edilir ve sadece bağışıklık sistemini değil, aynı zamanda diğer hücreler, ağız epitel ve ağız bakterileri ile etkileşimi de etkiler. T helper/yardımcı 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) hücre yanıtları, apikal periodontitis bağlamında makrofajların aktivatörü ve kemik rezorpsiyonunun ana araçları olabilen IL-1 ekspresyonunu modüle eder. Kistler ve granülomlar arasında benzer bir Th1/Th2 oranı ile granülomlarda kistlere kıyasla daha büyük bir aktive T hücresi popülasyonu bulunmuştur (72, 73).

Bazı çalışmalara göre, Th1 ve Th2 yanıt kalıpları aynı anda ortaya çıkar. Th1 immün yanıtının hem lezyon progresyonunda hem de kemik yıkımında rol oynadığına inanılırken, Th2'nin lezyon gelişiminin daha ileri aşamalarında meydana gelen onarım sürecinde önemli olan immünosupresif mekanizmaları içerdiğine inanılmaktadır (72, 73). Bu, Th1 sitokinlerinin yokluğunun lezyon gelişimini önemli ölçüde değiştirmede, ancak Th2 sitokinlerinin eksikliğinin lezyon boyutunda bir artışa neden olduğu deneysel modellerde gösterilmiştir (74). Bununla birlikte, son bulgular, geleneksel Th1 ve Th2 hatlarından farklı bir sitokin olan IL-17'nin varlığı ile karakterize edilen bir paterni göstermektedir (72). Esas olarak T hücrelerinin aracılık ettiği lezyonlarda Th1 cevabının baskın olduğunu bildiren çalışmalar vardır, halbuki B hücreleri ve/veya plazma hücrelerinin aracılık ettiği lezyonlar bir Th2 yanıtı sergiler (62).

T-yardımcı hücrelerin (örneğin Th9, Th17 ve Th22) yeni alt kümeleri, bunların prototipik sitokinleri IL-9 ve IL-22 de dahil olmak üzere 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. Aranha ve arkadaşları, inaktif granülomlarda IL-9'un aşırı ekspresyonunu ve lezyonlarda TNF- α , IFN- γ ve IL-17 ile negatif korelasyon gösterdi (75). IL-17 nakavt farelerin deneysel apikal periodontitis gelişimine dirençli olduğu bulunmuştur, bu da Th17 hücrelerinin ve onların sitokin üretiminin inflammatuar süreçteki rolünü gösterir (76).

3.1.1.3.3. Enflamatuar Mediatörler

Dolaşım sisteminden, inflammatuar hücrelerden ve hasarlı dokudan çeşitli kimyasal mediatörler, inflammatuar yanıtı aktif olarak katkıda bulunur (77).

Enflamasyon indükleyicileri, birçok doku ve organın işlevselliğini değiştiren çok sayıda enflamatuvar mediyatörlerin üretimini tetikler, bu da enflamatuvar yolun efektörlerini değiştirir. Bu inflamatuvar mediatörlerin birçoğunun vasküler sistem ve lökositlerin toplanması üzerinde ortak etkileri vardır. Bu mediatörler, plazma proteinlerinden türetilbilir veya hücreler tarafından salgılanabilir (78, 79). Hücrel mediatörler, özelleşmiş lökositler (özellikle dokuda yerleşik makrofajlar ve mast hücreleri) veya lokal dokularda bulunan hücreler tarafından üretilir. Bazı mediatörler (histamin ve serotonin gibi) önceden oluşturulur ve mast hücrelerinin, bazofillerin ve trombositlerin granüllerinde depolanır. Diğerleri önceden oluşturulur ve plazmada inaktif öncüller olarak dolaşır. Bu mediatörlerin plazma konsantrasyonu, akut faz yanıtı sırasında hepatositler tarafından öncüllerin artan salgılanmasının bir sonucu olarak belirgin şekilde artabilir. Diğer mediatörler, inflamasyon indükleyicileri tarafından uygun uyarıya yanıt olarak doğrudan üretilir (80). İnflamatuvar mediatörler biyokimyasal özelliklerine göre yedi gruba ayrılabilir: vazoaktif aminler, vazoaktif peptitler, kompleman bileşenlerinin fragmanları, lipid mediatörler, sitokinler, kemokinler ve proteolitik enzimler (78, 79).

Kemokinler, lökositlerin ve selektinlerin göçü ve aktivasyonu ile ilişkili, inflamatuvar hücrelerin farklı inflamatuvar hücrelerde damar duvarlarına yapışmasını hesaba katan küçük bir protein ailesini (8-10kD) temsil eder (81). Periapikal lezyonlarda kemokin reseptörlerinin (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR3) ekspresyonu gösterilmiştir (63). Bu reseptörler, monosit ve nötrofillerin yanı sıra Th1 ve Th2 hücrelerinde de bulunur, Th1 hücreleri ağırlıklı olarak kemokin reseptörleri CCR5 ve CXCR3'ü eksprese eder, Th2 hücreleri esas olarak CCR4 ve CCR3'ü eksprese eder ve monosit/makrofajlar CCR2 ve CCR5'i eksprese eder (72).

Endodontik enfeksiyon sürecinde, bakteri ürünlerinin fagositlerin yüzeyindeki Toll-like reseptörlere (TLR) bağlanması, fagositozun başlamasına, humoral ve hücrel yanıtların indüklenmesine (sırasıyla B ve T lenfositler tarafından aracılık edilir), reaktif oksijen türleri (ROS) sentezine ve bunun sonucunda sitokinler ve matriks metalloproteinazlarla (MMP) inflamatuvar mediatörlerin üretimine yol açar. ROS ile ilgili belirteçlerin artan ekspresyonu hem lokal hem de sistemik seviyelerde periapikal periodontitisin patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (82, 83).

Reaktif oksijen türleri, çarpıştıkları diğer molekülleri dönüştürebilen kararsız, son derece reaktif moleküllerdir. ROS, proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin ve nükleik asitlerin etkilendiği bir durum olan oksidatif stres (yani oksidan anti-oksidan ajanlar arasındaki bir dengesizlik) sırasında büyük miktarda üretilir (82). ROS üretimi, endodontik lezyonlar durumunda kemik rezorpsiyonunun yakından katılımıyla patojen istilasına karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (82-84).

Oksidatif stres ortamında kemik metabolizmasının düzenlenmesi de değişir. Yakın tarihli bir çalışmada, Jakovljević ve ark. periapikal periodontitisin sağlıklı dokuya kıyasla 8-hidroksideoksi guanozin (8-OHdG), okside glutatyon (GSSG) ve kemik rezorpsiyon düzenleyicileri (RANKL ve OPG) gibi oksidatif stres belirteçlerinin artan seviyeleri ile karakterize olduğunu, bunun lezyonlarda yaygın kemik rezorpsiyon sürecini açıklayabilecek bir faktör olduğunu öne sürmüştür (83).

Nitrik oksit (NO) ayrıca apikal periodontitiste yer alan önemli bir inflamatuvar aracıdır. NO, topluca NO sentazları (NOS) olarak bilinen bir enzim ailesi aracılığıyla birkaç hücre tarafından üretilen, her yerde bulunan bir serbest radikaldir (85). NO, IL-1'in neden olduğu kemik rezorpsiyonu için esastır, NFkB aktivasyonu yoluyla osteoklastogenezi uyarır ve osteoklastın hayatta kalmasına katkıda bulunur.

Çalışmalar NO'nun apikal periodontitis patogenezi sırasında IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin düzeylerini modüle ettiğini göstermiştir (86-88).

Cintra ve ark. apikal periodontitisli sıçanlarda TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-23 ve NO'nun serum seviyelerini bir veya birden fazla dişle ilgili olarak değerlendirdi. Bulgular, birden fazla diş içeren apikal periodontitisli sıçanlarda IL-6, IL-17, IL-23 ve TNF- α serum seviyelerinde bir artış olduğunu gösterdi. Öte yandan, bir diş veya birden fazla diş içeren apikal periodontitisli sıçanlarda serum NO seviyeleri azaldı. Apikal periodontitisli sıçanlarda proinflamatuvar sitokinlerin serum seviyelerindeki artış, endodontik enfeksiyonların sistemik sağlığı olumsuz etkilediği hipotezini desteklemektedir (86).

3.1.1.3.3.1. Sitokinler

Pulpal ve endodontik ortamın bakteriyel enfeksiyonu tarafından tetiklenen periapikal lezyonlar, lokal konak yanıtının bir sonucu olarak kök apeksini çevreleyen mineralize dokuların yok edilmesi ile karakterize edilir. Bu bağlamda, sitokinler, periapikal mikroçevre içinde inflamatuvar bağışıklık tepkilerinin modülasyonunda önemli bir rol oynar ve bu nedenle lezyonların sonucunun kritik belirleyicileridir (67, 89).

Sitokinler, mikrobiyal ajanlara ve lökositlerin toplanması yoluyla diğer yaralanmalara yanıt olarak hücreler tarafından yaralı dokulara salgılanan proteinlerdir. Prostaglandinlerle birlikte sitokinler, osteoblastların aktivasyonu ve farklılaşması, fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonu, kollajen üretimi ve neovaskülarizasyon yoluyla inflamatuvar süreçlerin başlatılmasına ve düzenlenmesine katılır (66).

IL-17 ve TGF- β , apikal periodontitiste bulunan ve esas olarak sırasıyla Th17 hücreleri ve düzenleyici T hücreleri “regulatory T-cells” (Treg) tarafından salgılanan iki önemli sitokindir. Bu sitokinlerin zıt etkileri vardır, fakat karşılıklı inhibisyonları bulunmaz. TGF- β güçlü bir immün modüle edici sitokin olsa da IL-17, IL-8 üretimini uyararak inflamatuvar süreci yeniden etkinleştirebilir (20). Bu da kronik apikal periodontitisin yeniden akutlaşmasının daha yüksek IL-17 seviyeleri ve artan lökosit infiltrasyonu ile yakından ilişkili olduğu anlamına gelir (71, 81).

Fistüllü ve karışık inflamatuvar infiltrat sergileyen hastalarda daha yüksek IL-17 seviyeleri gözlenmiştir, bu durum inflamatuvar yanıtın alevlenmesini teşvik eder ve nötrofil sayısını ve kemik rezorpsiyonunu artırır (61, 81). IL-17, nötrofilleri çeker ve apikal periodontitiste mevcut olan kemik rezorpsiyonunda yer alan osteoklastları aktive ederek RANKL üretimini indükler (64).

Yüksek TGF- β seviyeleri, AP'nin çözülmesi için önemli olabilir, çünkü bu faktör sadece kemik rezorpsiyonunu inhibe etmekle kalmaz ve kollajen sentezini, neovaskülarizasyonu ve fibroblastların proliferasyonunu uyararak doku yeniden şekillenmesini ve onarımını teşvik eder aynı zamanda Treg ve Th17'nin farklılaşmasında da rol oynar. Bu nedenle, TGF- β , inflamatuvar reaksiyonu sınırlamak için Treg'leri indükleyerek ve toplayarak immün yanıtı baskılayıcı bir moda yönlendirirken, düşük sayıda Treg, inflamatuvar süreci uyarmak için immün yanıtı Th17'ye yönlendirir (71).

IL-6, periapikal kistlerde ana kaynaklar makrofajlar olmak üzere, kemiğin yeniden modellenmesinde ve immün hücrelerin ve osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşmasında önemli bir sitokindir. Apikal periodontitiste yüksek IL-6 seviyeleri semptomatik ve aktif lezyonlarla ilişkili görünmektedir (90, 91). Kisti çevreleyen

dokulardaki makrofaj miktarı ile yüksek TNF- α ekspresyonu arasında bir ilişki de belirlendi, bu da bu sitokinin üretimi ile kistlerdeki doku vaskülarizasyonu arasında ve ayrıca anjiyogenez ve inflamasyon arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (92).

Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), monositler, makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilen ve patojenler, endotoksinler veya ilgili maddeler tarafından indüklenen bir sitokindir. TNF- α , kemik metabolizmasında anahtar rol oynayabilir. Doğrudan osteoklastogenezde yer alan hücreler, osteoklast öncü hücreleri, osteoblastlar veya stromal hücreler olan makrofajları içerir. Bu hücreler, osteoklastogenez indüklemek için RANKL'ı eksprese eder ve RANKL salgılayan T hücreleri, inflamasyon sırasında osteoklastogenez teşvik eder. Ayrıca, TNF- α , osteoklast kaynaklı kemik yıkımının yanı sıra osteoblast farklılaşması ve apoptozun inhibisyonuna neden olur (93).

İnterlökin-1 β (IL-1 β), enfeksiyon ve yaralanmaya karşı konak-savunma tepkileri için çok önemli olan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. Aynı zamanda 11 IL-1 ailesi üyesi arasında en iyi karakterize edilen ve en çok çalışılanıdır (94). IL-1 β , osteoklastogenezis stimülasyonunu RANKL üretimini artırmasıyla gerçekleştirir (95).

3.1.1.3.3.1.1. RANK/RANKL/OPG Sistemi

RANK/RANKL/OPG sistemi, osteoklastların farklılaşması ve aktivitesi üzerinde etkili olan önemli bir kemik metabolizması düzenleyicisidir. RANK, tümör nekroz faktörü reseptör ailesinin bir üyesi olan bir transmembran proteindir ve esas olarak makrofajlar, pre-osteoklastik mononükleer hücreler, T ve B lenfositler, dendritik hücreler ve fibroblastlar tarafından eksprese edilir (96, 97). RANKL

ekspresyonu, enflamatuvar durumlarda bağışıklık sistemi hücrelerince yapılırken normal kemik yapım-yıkımında osteoblastlar tarafından yapılır. Ayrıca RANKL, IL-11, paratiroid hormon ve D3 vitamini tarafından da eksprese edilerek kemik yapım-yıkım sürecine katılabilir (98). RANKL, TNF- α 'ya benzer bir sitokindir ve bir RANK ve OPG ligandı olarak görev yapar. RANK'ın RANKL tarafından aktivasyonu, TNF ile ilişkili reseptörlerle etkileşimi, NF-kB ve protein c-Fos'un aktivasyonu ile sonuçlanır, bunların tümü, spesifik genlerin artan ekspresyonu yoluyla osteoklastların olgunlaşması ile ilgilidir. Osteoklast öncü hücrelerinin yüzeyindeki RANKL ve reseptörü RANK arasındaki etkileşim, tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP), katepsin K ve kalsitonin reseptörü gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin ve genlerin aktivasyonuna ve ekspresyonuna yol açan bir dizi sinyal olayını aktive eder. Osteoklastların farklılaşması kemik rezorpsiyon kapasitesi için gereklidir (99-101). Öte yandan, yine osteoklastlar tarafından üretilen OPG çözünür reseptörü, RANKL'a bağlanarak osteoklastik farklılaşma ve aktivasyonu önler ve RANK/RANKL etkileşimini bloke eder, böylece osteoklastogenezi yani kemik rezorpsiyonunu azaltır (102-104).

Yüksek RANKL seviyeleri, osteoklastik aktivitede bir artış ile ilişkilendirilmiştir, bu durum kemik rezorpsiyonunu desteklerken, daha yüksek OPG seviyeleri osteoklastların hayatta kalması üzerinde inhibitör bir etki uygulayarak kemik rezorpsiyon kapasitesini azaltır (74, 105). İmmunohistokimyasal yöntemlerle osteoklastların TRAP (+) ve RANKL (+) boyanma sonucu kemik yıkım alanındaki mevcudiyeti, miktarı ve pozisyonu incelenirken osteoblastların OPG (+) boyama ile boyanarak kemik yıkım alanındaki mevcudiyeti, miktarı ve pozisyonu incelenebilmektedir (106-108). Apikal periodontitis örneklerinin sağlıklı dokularda

bulunan seviyelere göre daha yüksek RANKL (+), TRAP (+) ve OPG (+) hücre seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (20).

Ek olarak, RANKL/OPG ekspresyonunun semptomatik ve asemptomatik apikal periodontitis arasında önemli ölçüde farklı olmadığı gözlemlendi, ancak semptomatik apikal periodontitiste bakteri sayısı ile OPG seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulundu (109, 110). Santos ve arkadaşları radiküler kistlerde ve periapikal granülomlarda RANKL, OPG, IL-33, katepsin K ve TNF- α 'nın katılımını araştırdı ve bu moleküllerin bağ dokusu hücrelerinde (radiküler kist kapsülü) daha yüksek bir immün ekspresyonu olduğunu gösterdi. RANKL, OPG, IL-33, katepsin K ve TNF- α 'nın osteolitik aktiviteyi uyardığını gösterir. Bununla birlikte, radiküler kistlerden farklı olarak, periapikal granülomlarda OPG seviyelerinin RANKL ve katepsin K'ya kıyasla oldukça düşük olduğu bulunmuştur, bu da OPG'nin RANK'a bağlanmasını önleyerek RANKL ile rekabet ettiği ve böylece osteolitik aktiviteyi engellediği için bu lezyonların daha stabil olduğunu gösterir (111).

Periradiküler kistlerde RANK, RANKL ve OPG ekspresyonunun ve dağılımının analiz edildiği bir çalışmada ve mikst inflamatuvar infiltrata kıyasla kronik inflamatuvar infiltrat varlığında bağ dokusunda daha yüksek RANK ve RANKL ekspresyonları bulunmuştur (112). Kronik apikal periodontitiste RANKL ve OPG ekspresyonları ile inflamatuvar infiltrat arasındaki olası ilişki araştırıldığında RANKL ekspresyonunun, lenfositler (T ve B hücreleri) ve makrofajlar içeren kronik inflamatuvar infiltratta arttığı gösterilmiştir (113). Bu bulgular, fibroblastlar ve T ve B lenfositleri gibi osteoblastlardan ziyade diğer hücrelerin daha fazla miktarda RANKL eksprese etmesi gerçeğiyle desteklenmektedir (112, 113).

Kemik metabolizmasında RANK/RANKL/OPG sistemi önemli rol oynar. Kemik yıkımının yorumlanmasında ve kemik hastalıklarının tanısında OPG ve RANKL seviyeleri aydınlatıcı bilgi verir (98, 114).

3.1.2. Alveolar Kemik

Alveolar kemik, dişleri çevreleyen çenenin bir parçasını oluşturur. Oklüzal kuvveti dişlerden çeneye ileterek ve dağıtarak dişler için en önemli destek dokusu görevi görür. Kemik bir kez oluştuktan sonra, yeniden şekillenme olarak bilinen ve kemiğin yaşam boyunca dönüştüğü bir süreçten geçer (115). Alveolar kemik hem periodontal sistem hem de iskelet sistemindeki en dinamik dokudur. Alveolar kemiğin yeniden şekillenmesi sadece lokal faktörlerle (diş sürme, oklüzyon fonksiyonu, diş kaybı ve ortodontik diş hareketi) değil, aynı zamanda seks hormonları ve beslenme gibi sistemik faktörlerle de ilgilidir. Periodontitis kaynaklı alveolar kemik kaybı, diş kaybının en yaygın nedenidir (116).

Alveolar kemik, sement, periodontal ligamentler ve alveolar kemiği içeren periodontal kompleksi oluşturan odontothea'dan gelişir. Alveolar kemik (odontothea), mezoderme ait aksiyal ve apendiküler iskeletin kemiğinden farklı olan nöroektodermden kaynaklanan nöral krest hücrelerinden elde edilir (116).

3.1.2.1. Kemik Hücreleri

Kemik, normal iskelet yapısının ve fonksiyonunun korunması için önemli olan sürekli bir yeniden şekillenme durumundadır. Kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde birçok hücre türü ve faktör rol oynar (117). Kemiğin temel çok hücreli birimi osteositler, osteoklastlar ve osteoblastlardan oluşur. Birimin aktivitesi mekanik kuvvetler, kemik hücresi döngüsü, hormonlar (örneğin paratiroid hormonu

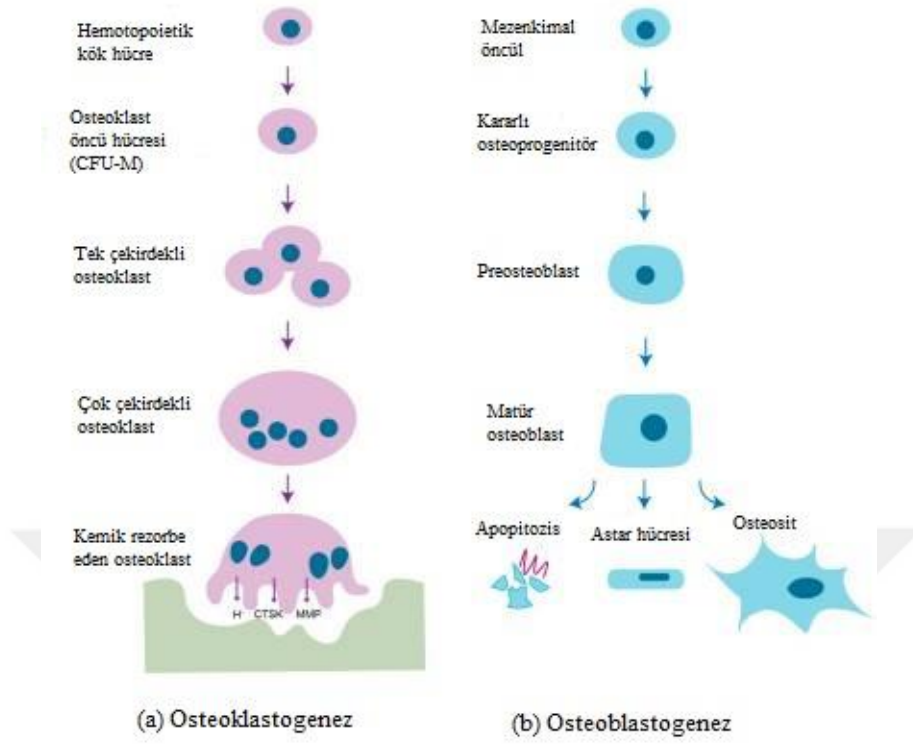
(PTH), büyüme hormonu (GH)), sitokinler ve lokal faktörler tarafından düzenlenir (118).

3.1.2.1.1. Osteoblastlar

Kemikteki toplam yerleşik hücrelerin %4-6'sını oluşturan osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerden elde edilir ve yaygın olarak kemik oluşturma işlevleriyle bilinirler, böylece osteoklast ve osteositlerle yakın bir iletişim yoluyla gerçekleştirilen sağlıklı bir kemik kitlesinin elde edilmesinde ve korunmasında çok önemli bir rol oynarlar (119, 120). Kemik oluşturma evresinin sonunda, osteoblastlar dört farklı durumdan birine sahip olabilir: osteositler olarak kemiğe gömülürler, inaktif osteoblastlara dönüşürler, programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) uğrarlar veya bazı durumlarda kondroid ya da kondroid kemiği biriktiren hücrelere farklılaşırlar (121).

3.1.2.1.2. Osteoklastlar

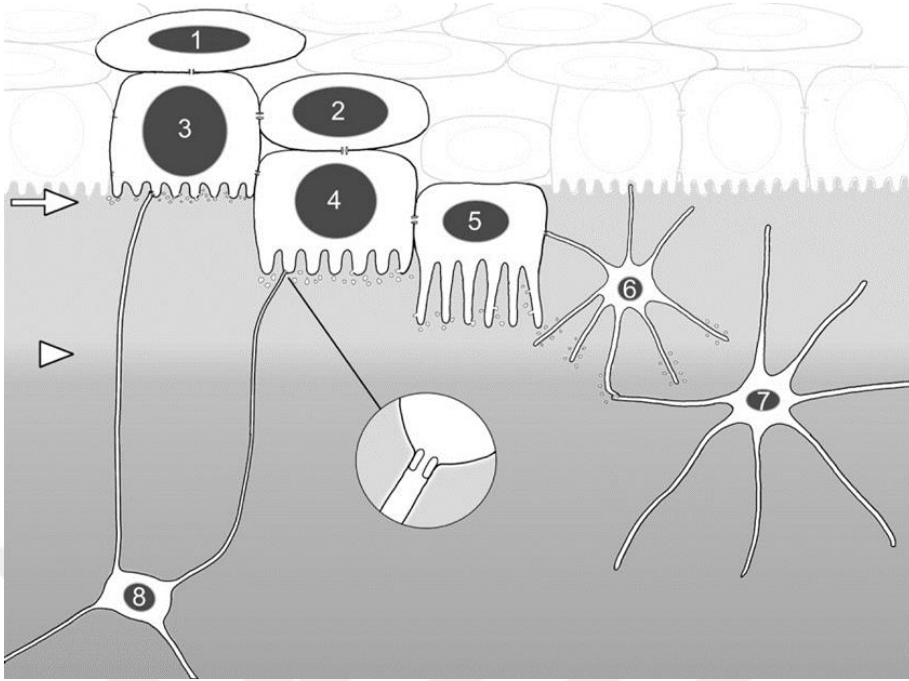
Osteoklastlar, hematopoietik kök hücrelerden (HKH) türetilen dokuya özgü makrofajlardır. Kemik rezorbe edici hücreler olan osteoklastlar, hematopoietik kök hücrelerden köken alırlar ve kemik rezorpsiyonu sırasında kolajen ve diğer matris proteinlerini çözen katepsin K gibi asit ve proteolitik enzimlerin salgılanması yoluyla kemik yapısını bozarlar (121).



Şekil 1. Osteoklastogenez ve osteoblastogenez stratejileri. (121)

3.1.2.1.3. Osteositler

Osteositler, kemik oluşumu sırasında mineralize olmayan matris (osteoid) ile çevrelenen eski osteoblastlardır; yetişkin kemik hücresi popülasyonunun %90-95'ini oluştururlar. Osteositler birbirleriyle ve kemik yüzeyindeki hücrelerle, kemik matrisindeki kanaliküllerden geçen bir hücre uzantıları ağı aracılığıyla iletişim kurar. Böylece kemik hücreleri, preosteoblasttan olgun osteosite kadar kemik oluşumunun tüm aşamalarında hücrelerin bağlı kaldığı fonksiyonel bir ağ oluşturur (122).



Diyagram ölçekli değildir. Preosteoblast (1) tabakası, çoğalan hücrelerden oluşur. Doğrudan iletişim için tüm hücreler arasında boşluk bağlantıları mevcuttur. Genişleme, bir osteositin hücre süreci ile gömülü bir osteoblast arasındaki boşluk birleşimini gösterir. Ok, osteoid birikimi önünü gösterir; ok ucu mineralizasyon cephesini gösterir. Dönüşüm işlemi sırasında, hücresel organeller azalır ve toplam hücre gövdesi hacmi önemli ölçüde azalır. 1. preosteoblast, 2. preosteoblastik osteoblast, 3. osteoblast, 4. osteoblastik osteosit (Tip I preosteosit), 5. osteoid-osteosit (Tip II preosteosit), 6. Tip III preosteosit, 7. genç osteosit, 8. yaşlı osteosit. Tim Fedak tarafından çizilen diyagram. (122)

Şekil 2. Osteoblast transformasyonu sırasında preosteoblastlar ve osteositler arasındaki geçiş hücre tiplerini ve intramembranöz ossifikasyonun ikinci fazı sırasında (yani, transformasyon meydana geldiğinde) birbirleriyle ilişkilerini gösteren diyagram.

3.1.2.1.4. Osteoprogenitör Kök Hücreler

Mezenşimal hücrelerden türeyen osteoprogenitör hücreler, diferansiasyona uğramamış pluripotent kök hücrelerdir (123). Osteoprogenitör hücreler, kemik oluşturan yüzeylerde yeni kemik matrisi sentezleyen osteoblastları, kemik yapısını destekleyen kemik matrisi içindeki osteositleri ve hareketsiz kemiğin yüzeyini kaplayan koruyucu astar hücrelerini oluşturur ve korur (124).

Kemik kusurlarının onarımı, birbiriyle örtüşen üç aşama ile karakterize edilir: kan pıhtılarının oluşumu, kemik oluşumu ve kemiğin yeniden şekillenmesi. İkinci

aşamada, osteoprogenitör hücreler yara bölgesine göç eder, çoğalır ve lokal büyüme faktörlerini, hücre dışı matrisi ayıran ve mineralizasyonu indükleyen osteoblastlara farklılaşır. Bu nedenle dokunun yenilenmesi, bu öncü hücrelerin mevcudiyetine ve bu hücreleri toplamak ve uyarmak için gerekli uyaranların varlığına bağlıdır (125).

3.1.3. Kök Hücreler

Kök hücreler, bir organizmanın tüm yaşamı boyunca bölünebilen, çoğalabilen ve çeşitli hücrelere (kan hücreleri, deri hücreleri, sinir hücreleri vb.) farklılaşabilen özelleşmemiş olgunlaşmamış hücrelerdir (126). Memelilerin erken embriyonik gelişimi sırasında iki farklı hücre tipi vardır: üstün gelişme potansiyeli barındıran ve bütünü oluşturabilen totipotent hücreler ve embriyonik ve ekstraembriyonik dokular dahil olmak üzere konseptus ve organların çoğundan oluşan embriyonik soylara katkıda bulunabilen pluripotent hücreler. Morula aşamasından önceki blastomer, totipotent olarak kabul edilir ve yavaş yavaş totipotensi kaybeder ve embriyonun ilk soy spesifikasyonu sırasında pluripotense dönüşür (127).

Her biri farklı fenotiplere sahip çok sayıda kök hücre türü vardır. Pluripotansiyel kök hücreler, hematopoietik ve hematopoietik olmayan soylara farklılaşma kapasitesine sahiptir. MKH'ler (multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak da bilinir) hematopoietik değildir ve pankreas adacıklarında osteoblastlar, kondrositler, nöronlar, kas hücreleri, adipositler ve insülin eksprese eden hücreler dahil olmak üzere kendi kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma kapasitesine sahiptir. MKH'lerin ayrıca, immün hücre infiltrasyonunu azaltma ve inflamasyonu modüle etme yetenekleri dahil olmak üzere benzersiz immünomodülatör özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir. İnflamasyonun çözülmesi, yaraların ve hasarlı dokunun başarılı bir şekilde iyileşmesi için gereklidir ve kronik inflamasyon, kötü

iyileşme sonuçlarına yol açabilir. MKH'lerin yaralardaki enflamatuar yanıtı modüle etme yeteneği, hem enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunda bir azalma hem de interlökin IL-1 ve tümör nekroz faktörü TNF-alfa gibi proenflamatuar sitokinlerde bir azalmayı içerir (6). MKH, yağ dokusu, iskelet kası, sinovyum, dalak, timus, kan, akciğer, fetal kan ve amniyotik sıvı dahil olmak üzere birçok dokudan izole edilmiştir (128-130). En erişilebilir ve açık ara en iyi karakterize edilen MKH kaynağı kemik iliğidir ve bugün MKH hakkında bildiklerimizin çoğu kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (KMKH) ile ilgili çalışmalara dayanmaktadır. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör özellikleri, in vivo anti-enflamatuar etkilere dönüşür ve çok sayıda hayvan çalışması, eksojen olarak uygulanan KMKH'nin enflamasyonu hafiflettiğini ve yaralı dokunun yenilenmesini kolaylaştırdığını göstermiştir (7-9).

Dolaşımdaki kök hücreler hücre onarımı için kritik bir öneme sahiptir (131). Kemik iliği kök hücreleri mobilize edildikten sonra dolaşıma geçerek doku onarımı sürecine katılabilir ve lokal inflamasyonu modüle ederek genel sağlık bakımını destekler (6). KMKH'ler, osteoblastlara farklılaşma yetenekleri nedeniyle kemik onarımını kolaylaştırmak için de kullanılan pluripotent hücrelerdir (132).

Kök hücrelerin mobilizasyonu karmaşıktır ancak iki temel özelliği içerir:

1. L-selektin yoluyla kök hücrelerin kemik iliğine yapışmasına müdahale ve
2. CXCR4 kemokin reseptörü aracılığıyla SDF-1'e kemotaktik yanıtın azalması (10).

Klasik Koloni Uyarıcı Faktör (CSF), Interleukin-8 (IL-8) ve plerixafor (bir CXCR4 antagonisti = AMD3100) kök hücre mobilizatörleridir. Birçoğu hastalarda ishal, bulantı, ağrı ve tromboz gibi yan etkilere sahip olmasına rağmen birkaç kök

hücre mobilizatörü tanımlanmıştır. Bununla birlikte bitkilerden elde edilen aktiflerin, olumsuz yan etki olmaksızın kök hücrelerin kemik iliğinden salınmasını tetikleyebildiği bilinmektedir (131).

Onarım ihtiyacı olan yerleri arayan kök hücrelerin göçü, sağlıklı dokunun devam eden normal bakımı ve gençleştirilmesiyle ilgili süreçlerin yanı sıra yaralı dokunun spesifik onarımı ve iyileştirilmesi için çok önemlidir. Doğal kök hücre mobilizatörleri, gerçek doku onarım sürecini destekleyerek ve iltihabı azaltarak genel sağlığı iyileştirmek ve iyileşme sürecini hızlandırmak için etkili araçlar olabilir (6).

3.1.4. Stemregen®

Stemregen® her bir kapsülünde (715 mg); 150 mg Aphanizomenon flos-aquae ekstresi (AFA), 250 mg Hippophae Rhamnoides ekstresi (%30 Proantosiyanidinler), 125 mg Fucus Vesiculosus (%20 Phlorotannins), 62,5 mg Panax Notoginseng ekstresi (%10 notoginsenosides), 50 mg Aloe Macroclada, 25 mg transfer faktörü ve 50 mg 1→3 beta glukan toz (%85) ve 2,5 mg piper nigrum ekstresinden oluşan kök hücre göçü sağlayan takviye edici gıdadır.

3.1.4.1. Mavi-Yeşil Alg (Aphanizomenon flos-aquae-AFA)

Mavi-yeşil algler Klamath algleri olarak da adlandırılan Aphanizomenon flos aquae (AFA), Yukarı Klamath Gölü'nde (Oregon, ABD) büyüyen Cyanobacteria filumuna ait tek hücreli prokaryotik bir mikroorganizmadır. AFA, özellikle zengin beslenme profili nedeniyle “süper gıda” olarak kabul edilir. Aslında, mükemmel bir protein, çoklu doymamış yağ asitleri, mineraller, steroller, karotenoidler ve fikosiyaninler kaynağıdır, hepsi antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser özellikleri ile iyi bilinen maddelerdir (133). AFA'nın belirli bir L-selektin blokörü

içerdiği görülmüştür. L-Selectin, kemik iliği ortamında kök hücrelerin korunmasında kritik bir rol oynar. L-Selectin'in bloke edilmesi, kök hücrelerin kemik iliğinden orta derecede mobilizasyonuna yol açar (10). AFA ekstresi kullanılarak kök hücre mobilizasyonunun şiddetli kardiyomiyopati, felç, diyabet, romatoid artrit, böbrek yetmezliği ve parkinson hastalığı vakalarını iyileştirdiği belgelenmiştir (6).

3.1.4.2. Kır İğdesi (Hippophae Rhamnoides)

Kır iğdesi diğer bir adıyla yabani iğde (Hippophae Rhamnoides), Kuzey Batı Avrupa ve Orta Asya'nın soğuk ve kurak bölgelerine özgü, dikenli, nitrojen sabitleyen yaprak döken bir çalıdır (134). Kır iğdesinin doğal antioksidan özellikler sergilemesinin yanında plazma lipid peroksidasyonunu, sitotoksiteyi ve hatta DNA hasarını önlediği bildirilmiştir (135). Kır iğdesi iyi bir mineral, özellikle kalsiyum, fosfor, demir ve potasyumun yanı sıra C, B1, B2, E, A ve K vitaminleri kaynağıdır (136). Kır iğdesinin dolaşımdaki kök hücre sayısına etkisi araştırılmış; kök hücre mobilizasyonunu destekleme ve dolaşımdaki kök hücre sayısını artırma yeteneği belgelenmiştir. Kır iğdesi kullanımı ile harekete geçen kemik iliği kök hücreleri, doku onarımı sürecine katılabilir ve genel sağlık durumu desteklenerek lokal inflamasyon modüle edilebilir (6).

3.1.4.3. Kabarcıklı Alg (Fucus Vesiculosus)

Kahverengi deniz yosunlarından (alg) olan Fucus vesiculosus, biyolojik olarak aktif metabolitlerin zengin kaynaklarıdır: amino asitler, fukoksantin ve diğer karotenoidler, klorofiller, fukoidan, çoklu doymamış yağ asitleri ve polifenoller vb. Deniz yosunu özlerinin antioksidan etkileri hem in vitro hem de in vivo olarak doğrulanmıştır (137, 138). Epidemiyolojik gözlemler, deniz yosunları ile diyet

takviyesinin oksidatif stres ile ilişkili çok sayıda hastalık riskini azalttığına dair kanıt sağlar (139).

Fukoidanlar, biyokütleyi çevresel streslerden korumak için kahverengi deniz yosunları tarafından üretilen hücre duvarı polisakkaritleri olarak tanımlanmaktadır. Ekstrakte edildiğinde, bu bileşikler, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir. Fukoidan zengin ekstratından üretilen tüm fraksiyonların, yüksek konsantrasyonlarda analiz edildiğinde hem gram pozitif hem de negatif bakterilerin bakteri üremesini engelleyebildiği gösterilmiştir. Fukoidanların antikanser etki mekanizması, bağışıklık sistemi yolları, oksidatif stres ve kök hücre mobilizasyonu yoluyla gerçekleşir (140).

3.1.4.4. Panax Notoginseng

Panax notoginseng, Çin'in güneybatısında 400 yıldan fazla bir süredir yetiştirilen iyi bilinen geleneksel Çin şifalı bitkisidir. Kapsamlı farmakolojik çalışmalar, P. notoginseng ve aktif bileşenlerinin kan sistemi, kardiyovasküler sistem, beyin, damar sistemi, sinir sistemi, metabolizma ve bağışıklık düzenlemesi üzerinde birçok etkisi olduğunu göstermiştir; bunların spesifik etkileri arasında antiaritmi, antiserebral iskemi, antiplatelet agregasyonu ve tromboz, antioksidasyon, antitümör, antiateroskleroz, hemodinamiği iyileştirme ve kan lipidini düzenleme yer alır (141-143).

Panax notoginseng'in başlıca biyoaktif bileşenleri, genellikle Panax notoginseng saponinleri (PNS) olarak adlandırılan dammaran tipi triterpen saponinlerdir (132). PNS'nin kemik iliğinden kök hücre faktörleri (KHF) üretimini uyardığı ve KMKH'ler üzerindeki adezyon moleküllerinin yapışma etkilerini azaltarak KMKH'lerin plazmaya mobilizasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Kök

hücre faktörleri, mobilizasyonun en güçlü ajanlarından biri olarak kabul edilir ve daha fazla kök hücreyi plazmaya yönlendirebilir ve kök hücre göçüne, birikmesine ve çoğalmasına büyük ölçüde katkıda bulunabilir (13).

3.1.4.5. Aloe Macroclada

Madagaskar'a özgü bir Aloe Vera türü olan Aloe Macroclada'nın kullanımından sonraki 2 saat içinde kök hücre sayısının 53%'e kadar artabildiği ve 3 saatten uzun sürdüğü gösterilmiştir (14).

3.1.4.6. Transfer Faktörü (Kolostrum)

Kolostrum, emzirmenin ilk iki ila dört günü boyunca meme bezi tarafından salgılanan ve anne tarafından bebeğe aktarılan pasif bağışıklığın kaynağıdır. Bu, salgı IgA'nın ana kaynağıdır ve gastrointestinal enfeksiyonlara karşı koruma sağlar (144). Kolostrumun proteinler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler ve mineraller içeren besleyici bileşimi, modern zamanlar için eski bir gıda olarak kullanılmasını desteklemektedir ve bu nedenle mükemmel bir nutrasötik olarak kabul edilebilir (145). İnsan ve sığır kolostrumları, birçok benzerliğe sahiptir ve sığır kolostrumu fazla miktarlarda elde edilebilmesi yönünden de daha ulaşılabilir (146).

Kolostrum, doğrudan kan dolaşımına emildikten sonra kemik iliği kök hücre nişinin aktivasyonunu destekleyebilen önceden oluşturulmuş büyüme faktörleri ve sitokinler içerir. Ayrıca, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonu yoluyla dolaylı olarak kök hücre nişini uyarabilen başka proteinler de içerir. Sığır kolostrumunun IL-6 ve GCSF'nin yanı sıra büyüme faktörü (VEGF) üretimini uyarabildiği ve oral takviyeyi takiben in vitro ve in vivo kök hücre aktivitesini indüklediği açıkça gösterilmiştir (147-149). Büyükbaş kolostrum sütü

ile diyet takviyesinin geniş kapsamlı bağışıklık modülasyonu sağlayabileceği gösterilmiştir (15).

3.1.4.7. Beta Glukan

β -glukanlar, maya, mantar ve bazı bakteriler dahil olmak üzere birçok organizmanın hücre duvarlarında bulunan karbonhidrat polimerleridir. β -glukanların yara iyileşme sürecini modüle etme ve farelerde yara izini azaltma yetenekleri rapor edilmiştir (150).

Mayadan türetilen β -glukanlar β (1,3)-glukozun uzun polimerleridir ve omurga glukoz birimlerinin %3-6'sı bir β (1,6) dalına sahiptir. Mayadan türetilen birçok β -glukanın, antitümör etkinliği ve hematopoezin uyarılması dahil olmak üzere in vivo önemli biyoaktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (151). Poli-(1,6)-beta-D-glukopiranosil-(1,3)-beta-D-glukopiranoz (PGG) beta glukan, çözünebilir mayadan türetilmiş bir polisakkarittir. PGG β -glukanın 24-48 saatlik pik zamanla hematopoietik progenitör hücre mobilizasyonu sağladığı kanıtlanmıştır. PGG β -glukan kaynaklı hematopoietik progenitör hücre mobilizasyonunun proinflamatuvar sitokin salgılanmasından veya kompleman 3 (C3) aktivasyonundan bağımsız olduğu ancak matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) salgılamasına bağlı olduğu gösterildi. PGG β -glukanın hem hematopoietik hem de hematopoietik olmayan hücrelerin MMP-9 salgılamasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. MMP- 9'un kemik iliği eritroid hücrelerinden, makrofajlardan ve epitel hücrelerinden salınması, mobilizasyon için benzersiz ve daha önce tanımlanmamış bir mekanizma sağlar (16). Stemregen®, agrobakterium fermantasyonu ile üretilen ve β -glukanın en güçlü formu olan %85 (1 $\rightarrow$ 3) -b-D-glikoz bağlarından oluşan β -glukan içerir.

3.1.4.8. Piper nigrum (Karabiber)

Karabiber biyolojik olarak Piper nigrum olarak bilinir ve ana aktif kimyasal bileşen olarak Piperine içerir. Piperin, biberin antimikrobiyal özellik sergilediği ana bileşendir. Aynı zamanda antifungal özellik sergileyerek C. Albicans ve Aspergillus büyümesini engeller. Piper serbest radikal süpürücü olarak hareket edebilir ve TNF- α seviyesini düşürür. Modern araştırmalar biber ve piperinin bitkisel ilaçlar ve diğer ilaçlar için biyoyararlanım artırıcı olarak, dejeneratif bozuklukların önlenmesi için kemoproventatifler ve antioksidanlar olarak kullanımına odaklanmıştır (152-154). Piperin ve ilaçlarla yapılan klinik çalışmaların sonuçları, oral olarak uygulanan piperinin hem doğal olarak türetilen hem de sentetik ilaçların klerensini azaltarak serum ilaç seviyelerini önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir (155-157).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın etik kurul onayı 2021/05 nosu ile Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alındı ve çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından DHF.21.05 proje nosu ile desteklendi. Deneysel aşamalar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde, analiz aşamaları Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

4.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Düzenek

Çalışmada kullanılan 27 adet 0.5-1 yaş aralığında Spraque Dawley erkek ratlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edildi. Tüm ratların bakımı deney süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde, 22-24°C ortam koşullarında, yem ve suya serbest ulaşabildikleri ve özel havalandırma sistemi bulunan odalarda yapıldı. Denekler rastgele 3 gruba ayrıldı.

1. Negatif Kontrol Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklerin dişleri herhangi bir işleme tabi tutulmadı. 30 günlük düzenek sonunda deneklerden kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi ve sağ mandibular kemikleri alındı.

2. Pozitif Kontrol Grubu (n=10): Bu gruptaki deneklerde çalışmanın 0.günü alt sağ birinci azı dişlerinde apikal periodontitis oluşumu indüklemek amacıyla pulpa ekspozu oluşturuldu. Apikal periodontitis indüksiyonu sonrası 30 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. 30 günlük düzenek sonunda deneklerden kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi ve sağ mandibular kemikleri alındı.

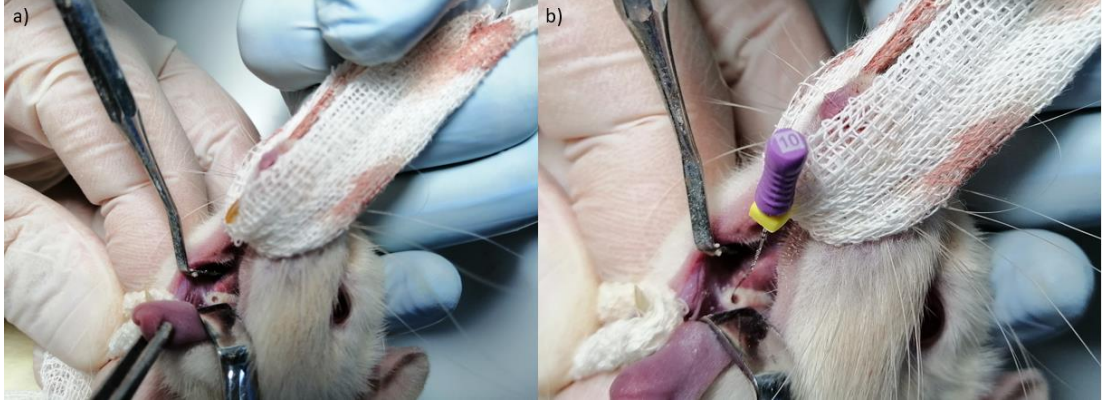
3. Stemregen® (Stem) Grubu (n=10): Bu gruptaki deneklerde çalışmanın 0.günü alt sağ birinci azı dişlerinde apikal periodontitis oluşumu indüklemek

amacıyla pulpa ekspozu oluşturuldu. Apikal periodontitis indüksiyonu sonrası 30 gün boyunca her gün 300mg/kg Stemregen® serum fizyolojikte çözdürölerek oral gavaj yoluyla uygulandı. 30 günlük düzenek sonunda deneklerden kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi ve sağ mandibular kemikleri alındı.

Deneyin 30 günü boyunca hayvanların sağlık durumları (davranış, deri ve saç değişiklikleri, yiyecek ve su tüketimi, idrar ve dışkılama) günlük olarak kontrol edildi.

4.2. Apikal Periodontis İndüksiyonu

Pozitif kontrol ve Stemregen® gruplarındaki tüm ratların anestezisi kas içine enjekte edilen ketamin (5 mg/kg) ve ksilazin (45 mg/kg) ile sağlandı. Parmak sıkıştırma testi ile anestezi derinliği kontrol edildi. Ratların sağ mandibular birinci azı dişlerinde, taşınabilir bir düzenek kullanılarak 0.5 mm çapında küresel karbür frez (Jet Karbür ¼; Kavo Kerr Grubu, Orange, CA, ABD) ile oklüzal yüzeyden koronal pulpa ekspoz edildi. Hazırlanan kavite ile koronal pulpa açıklığı 10 numaralı K (Dega-Videya, Guangdong, Çin) eğe ile kontrol edilerek düzensiz hale getirildi. Apikal periodontitis indüksiyonu için oklüzal kaviteler ötenazi olana kadar ağız boşluğına açık bırakıldı.



Resim 1 a) Koronal pulpa ekspozu oluşturulması b) koronal pulpa açıklığının kontrol edilmesi

4.3. Hayvanların Beslenmesi

Kapsüllerde toz karışım halde bulunan Stemregen® (Biomics™, ABD) 300mg/kg oranında hassas terazide tartıldı ve deney tüpüne aktarıldı. Serum fizyolojikle sulandırılarak vorteks cihazı ile çözünene kadar karıştırıldı. Bu karışım Stemregen® grubundaki deneklere günde bir kez olacak şekilde 30 gün boyunca oral gavaj yoluyla uygulandı.



Resim 2. a) Stemregen® takviye edici gıda b)SF ile çözdürülmüş Stemregen®



Resim 3 a) Çalışmada kullanılan hassas tartı b) Vorteks cihazı ile karışımın hazırlanması
c) Stemregen®'in gavaj yolu ile uygulanması

4.4. Kan Örneği Elde Edilmesi ve Sakrifikasyon

DeneySEL düzeneğin 30'uncu gününde 45mg/kg ketamin hidroklorid ve 5mg/kg ksilazinin intramuskuler enjeksiyonu ile deneklerin anestezisi sağlandı. Ratların intrakardiyak kanları 10cc'lik enjektörlerle alındı ve kan örnekleri pıhtı aktivatörü bulunduran vakumlu tüplere aktarıldı. 10 dakika boyunca 3000 devirde santrifüj edilen kan örneklerinin serumları eppendorflara alındı ve -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.



Resim 4. NF 200 santrifüj cihazı

4.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için sakrifiye edilmiş deneklerin kafatasının cilt ve ciltaltı diseksiyonu yapılarak mandibular kemikleri alındı ve örnekler %10'luk formaldehit içerisinde bırakıldı.

4.6. Biyokimyasal Analiz

Deneklerin serum örneklerinin biyokimyasal analizleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı. Serum örneklerinden fosfor (P), kalsiyum (Ca), alkalen fosfataz (ALP), değerlerine otoanalizör cihazında (Advia 2400 Siemens) bakıldı.

4.7. Histopatolojik Analiz

Alınan dokular %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra dekalsifiye edici ajan (OSTEOFAS 1, BIOGNOST® Zagreb, Hırvatistan) ile 48 saat süresince muamele edildi. Örnekler rutin takip işleminden sonra parafin bloklara gömülüp 4

µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler etüvde 58°C de deparafinize edildikten sonra ksilol ve alkolde bekletildi, ardından suda yıkanarak boyama işlemine geçildi. Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama tekniği kullanılarak boyanan kesitler ışık mikroskobu (Olympus, B53, Japan) altında incelenerek fotoğraflandı.

Enflamatuvar profilin analizi ve sağ birinci mandibular moların periapikal bölgesinin durumunu kontrol etmek için hematoksilen-eozin boyalı kesitlerde, inflamasyon, osteoklastik ve osteoblastik aktivite, fibrozis ve abse yoğunlukları 0-3 arasında semikantitatif olarak değerlendirildi ve skorlandı (86, 158-160).

Osteoblast hücrelerinin skorlaması: skor=0 (osteoblast hücresi yok), skor=1 (osteoblastlar hafif yoğunlukta), skor=2 (osteoblastlar orta yoğunlukta), skor=3 (osteoblastlar yoğun olarak görülmekte).

Osteoklast hücrelerinin skorlaması: skor=0 (osteoklast hücresi yok), skor=1 (osteoklastlar hafif yoğunlukta), skor=2 (osteoklastlar orta yoğunlukta), skor=3 (osteoklastlar yoğun olarak görülmekte).

İnflamasyon: skor=0 (inflamatuvar hücre, yok), skor=1 (hafif yoğunlukta inflamatuvar hücre), skor=2 (orta yoğunlukta inflamatuvar hücre) ve skor=3 (şiddetli yoğunlukta inflamatuvar hücre).

Fibrozis skorlaması: skor=0 (yok), skor=1 (hafif yoğunlukta), skor=2 (orta yoğunlukta), skor=3 (şiddetli yoğunlukta).

Abse skorlaması: skor=0 (yok), skor=1 (hafif yoğunlukta), skor=2 (orta yoğunlukta), skor=3 (şiddetli yoğunlukta).

4.8. İmmünohistokimyasal Analiz

Parafinden arındırılmış doku kesitleri Ventana XT otomatik boyama cihazında 1/200 seyreltilmiş primer antikolar OPG (Anti-OPG/Osteoprotegerin Antibody sc-390518, Santa Cruz Biotechnology, Oregon, USA), RANKL (RANKL (G-1): sc-377079, Santa Cruz Biotechnology, Oregon, USA) ve TRAP (TRAcP (9C5) Mouse Monoclonal Antibody, Cell Marque TM Tissue Diagnostics, USA) ile boyandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Olympus, BX53-Japonya) ile incelendi. İncelemede görülen osteoblast ve osteoklast yoğunluğu esas alınarak skorlama yapıldı. Yoğunluk 0: yok, +1: hafif, +2: orta, +3: şiddetli yoğunlukta olacak şekilde semi-kantitatif skorlandı (158, 161).

4.9. İstatistiksel İncelemeler

Analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) 22 paket programında değerlendirilmiştir. Çalışmada tanımlayıcı veriler kategorik verilerde n, % değerleri, sürekli verilerde ise ortalama±standart sapma değerleri ile gösterilmiştir. Kategorik değişkenlerin birbirleri ile karşılaştırılmasında Kikare analizi yapılmıştır. Ölçümsel verilerin normallik analizi Shapiro Wilk analizi ile yapılmıştır. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında One Way ANOVA testi uygulanmıştır. Post Hoc analiz için de Tukey testi seçilmiştir. Analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

Çalışmaya Stem grubundan 10, pozitif kontrol grubunda 10 ve negatif kontrol grubundan 7 olmak üzere toplam 27 denek dâhil edilmiştir.

5.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmaya dahil edilen stem grubu örneklerinin ALP ortalaması $229,3 \pm 60,6$ olarak, pozitif kontrol grubunun $212,3 \pm 49,1$ olarak ve negatif kontrol grubunun ise $210,4 \pm 49,0$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında ALP açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,709$).

Örneklerin Ca analizinde; Stem grubunun Ca ortalaması $10,5 \pm 0,3$ olarak, pozitif kontrol grubunun $10,4 \pm 0,4$ olarak ve negatif kontrol grubunun ise $10,7 \pm 0,2$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında Ca açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,147$).

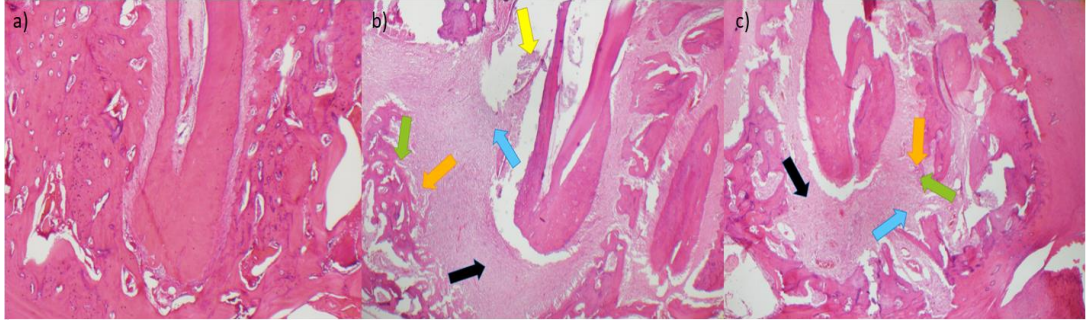
Biyokimyasal analiz sonuçlarında Fosfor; Stem grubunun P ortalaması $7,7 \pm 0,4$ olarak, pozitif kontrol grubunun $6,9 \pm 0,3$ olarak ve negatif kontrol grubunun ise $7,6 \pm 0,5$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında P açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 1). Bu farklılığın pozitif kontrol ile diğer iki grup arasındaki farktan kaynaklandığı ve pozitif kontrol grubunun P değerinin diğerlerinden anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi

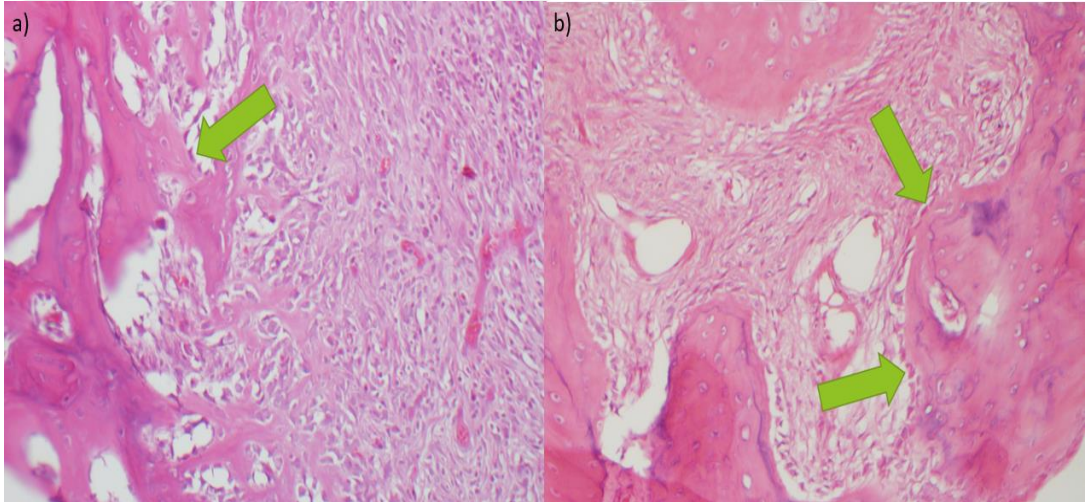
	Stem	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	p*
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
ALP (U/L)	$229,3 \pm 60,6$	$212,3 \pm 49,1$	$210,4 \pm 49,0$	0,709
Ca (mg/dL)	$10,5 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,4$	$10,7 \pm 0,2$	0,147
P (mg/dL)	$7,7 \pm 0,4^a$	$6,9 \pm 0,3^b$	$7,6 \pm 0,5^a$	<0,001

*One Way ANOVA testi uygulanmıştır. a,b,c: Farklılığın kaynaklandığı grup

5.2. Histolojik Bulgular



Resim 5. a) Negatif kontrol grubu H&E boyama b) Pozitif kontrol grubu c) Stem grubu oklar; yeşil; osteoblast, turuncu; osteoklast, mavi; inflamasyon, sarı; apse, siyah; fibrozis



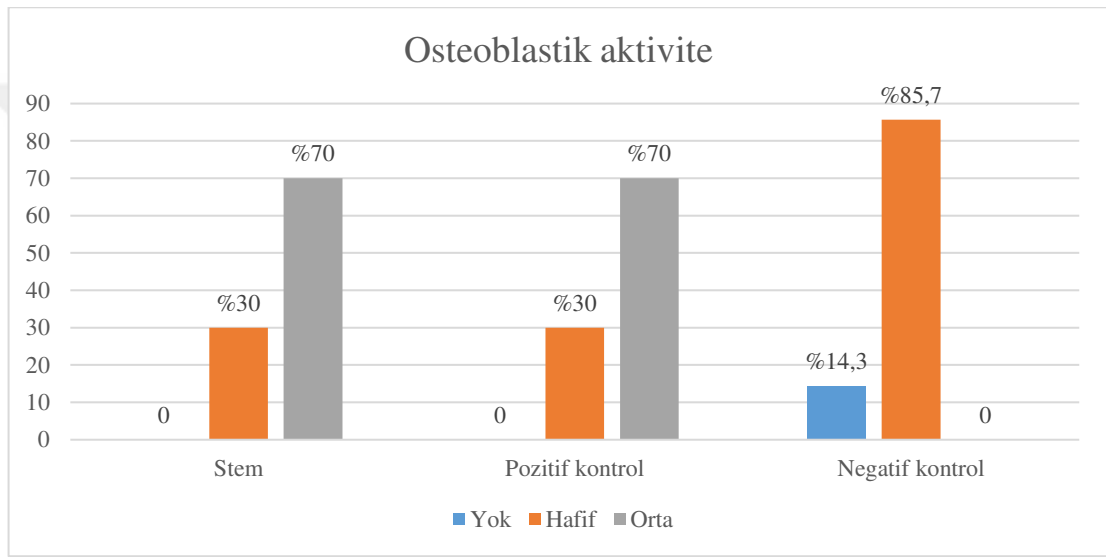
Resim 6. a) Hafif yoğunlukta osteoblastik aktivite, H&E (x400) b) orta yoğunlukta osteoblastik aktivite, H&E (X400)

Gruplar osteoblastik aktiviteye göre incelendiğinde; stem grubunun %30'u hafif ve %70'i orta olarak, pozitif kontrol grubunun %30'u hafif, %70'i orta olarak ve negatif kontrol grubunun ise %14,3'ü yok, %85,7'si ise hafif olarak görülmüştür. Bu durumda negatif kontrol grubunun osteoblastik aktivitesinin daha hafif olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,008$). Gruplar arasında osteoblastik aktivite ortalaması açısından anlamlı farklılık vardır ($p=0,005$). Bu farklılık negatif kontrol ile stem ve pozitif kontrol grupları arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 2, Şekil 3).

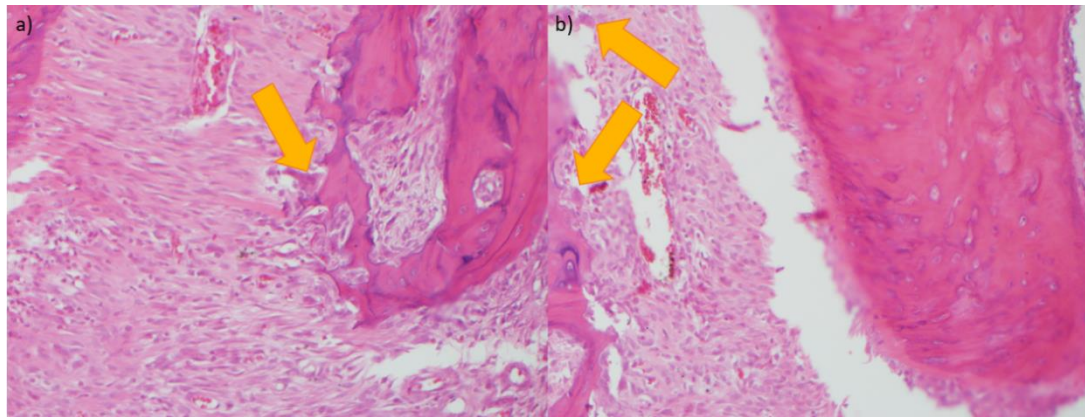
Tablo 2. Grupların osteoblastik aktiviteye göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Osteoblastik aktivite	Yok	0	0	0	0	1	14,3	0,008*
	Hafif	3	30,0	3	30,0	6	85,7	
	Orta	7	70,0	7	70,0	0	0	
Median		2 ^a		2 ^a		1 ^b		0,005**
Ortalama		1,7 ^a		1,7 ^a		0,9 ^b		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 3. Grupların osteoblastik aktiviteye göre karşılaştırılması



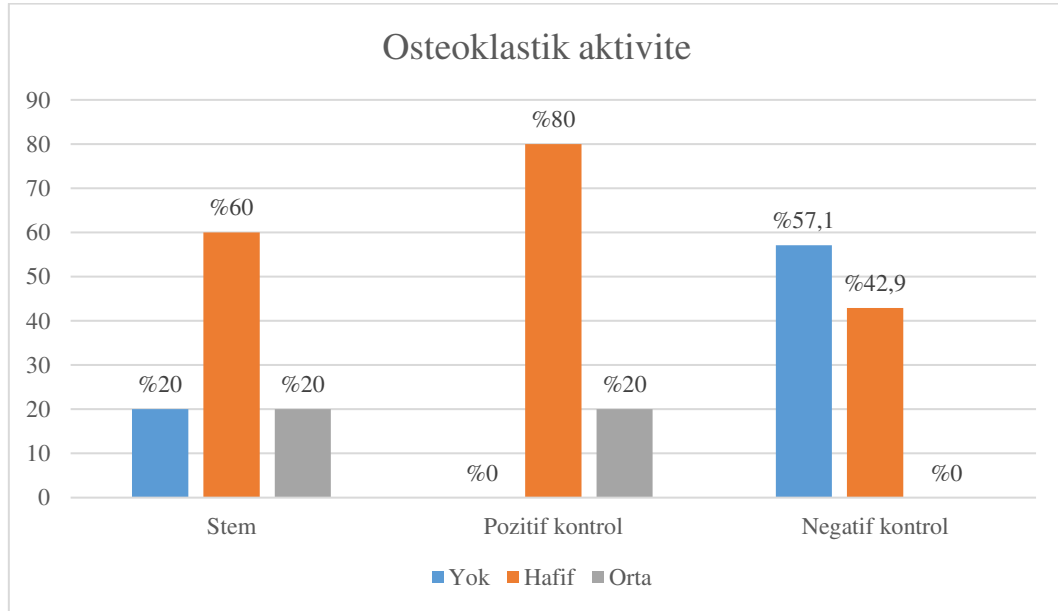
Resim 7 Hafif yoğunlukta osteoklastik aktivite b) Orta yoğunlukta osteoklastik aktivite
H&E (x400)

Gruplar osteoklastik aktiviteye göre incelendiğinde; stem grubunun %20'si yok, %60'ı hafif ve %20'si orta olarak, pozitif kontrol grubunun %80'i hafif, %20'si orta olarak ve negatif kontrol grubunun ise %57,1'i yok, %42,9'u ise hafif olarak görülmüştür. Gruplar arasında osteoklastik aktivite açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0,074). Gruplar arasında osteoklastik aktivite ortalaması açısından anlamlı farklılık vardır (p=0,032). Bu farklılık sadece pozitif kontrol ile negatif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 3, Şekil 4).

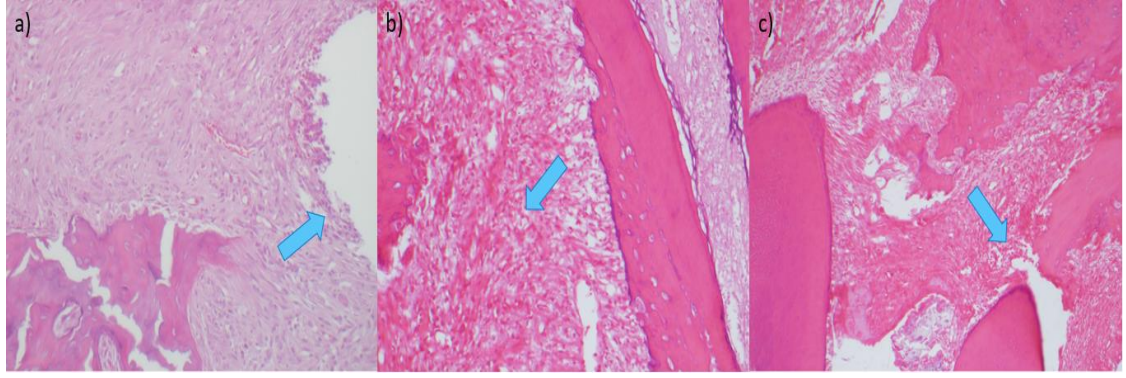
Tablo 3. Grupların osteoklastik aktiviteye göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Ostaoklastik aktivite	Yok	2	20,0	0	0	4	57,1	0,074*
	Hafif	6	60,0	8	80,0	3	42,9	
	Orta	2	20,0	2	20,0	0	0	
Median		1 ^{a,b}		1 ^a		0 ^b		0,032**
Ortalama		1,0 ^{a,b}		1,2 ^a		0,4 ^b		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 4. Grupların osteoklastik aktiviteye göre karşılaştırılması



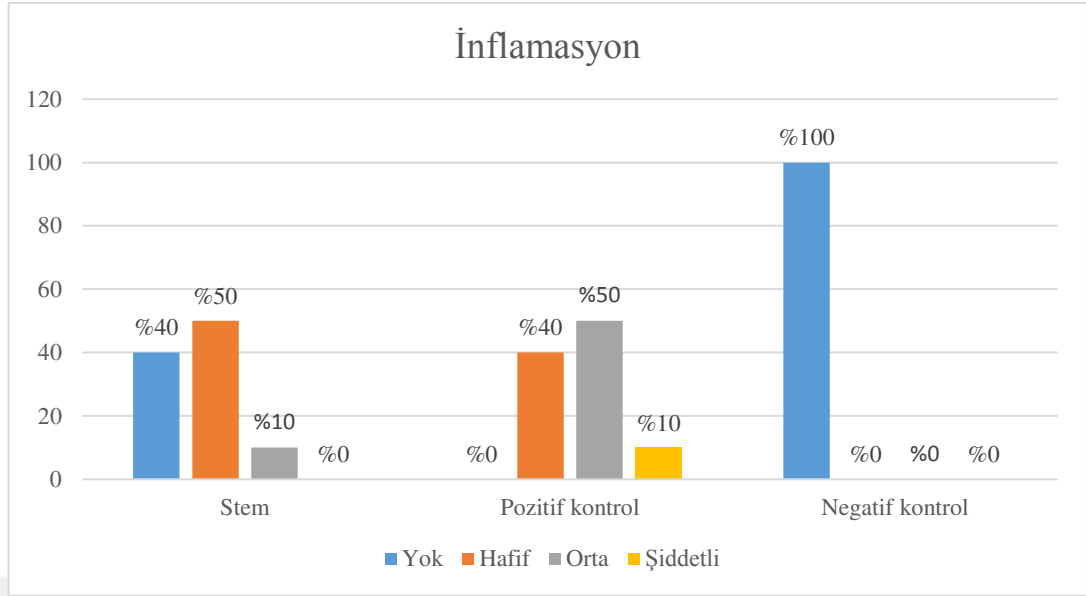
Resim 8 a) Hafif derecede inflamasyonun histolojik görünümü b) Orta derecede inflamasyonun histolojik görünümü c) Şiddetli inflamasyonun histolojik görünümü H&E (x400)

Stem grubunun %40'ında inflamasyon yok iken %50'sinde hafif, %10'unda orta inflamasyon görülmüştür. Pozitif kontrol grubunda bulunanların %40'ında hafif, %50'sinde orta ve %10'unda ise şiddetli inflamasyon görülmüştür. Negatif kontrol grubunda bulunanların hiçbirinde inflamasyon görülmemiştir. Gruplar arasında inflamasyon ve inflamasyon ortalaması açısından anlamlı farklılık vardır ($p<0,001$). Bu farklılık pozitif kontrol ile stem ve negatif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 4, Şekil 5).

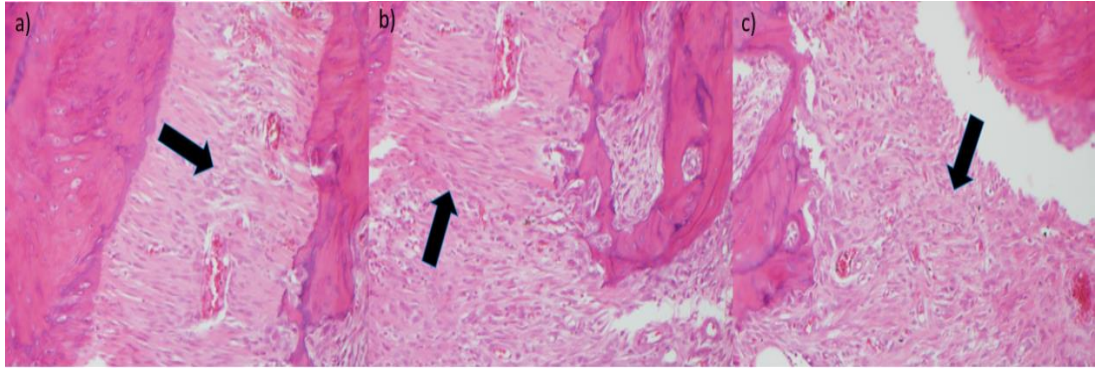
Tablo 4. Grupların inflamasyona göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
İnflamasyon	Yok	4	40,0	0	0	7	100,0	<0,001*
	Hafif	5	50,0	4	40,0	0	0	
	Orta	1	10,0	5	50,0	0	0	
	Şiddetli	0	0	1	10,0	0	0	
Median		1 ^a		2 ^b		0 ^a		<0,001**
Ortalama		0,7 ^a		1,7 ^b		0 ^a		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 5. Grupların inflamasyona göre karşılaştırılması



Resim 9 a) hafif düzeyde fibrozis b) orta düzeyde fibrozis c) şiddetli düzeyde fibrozis
H&E boyama (x400)

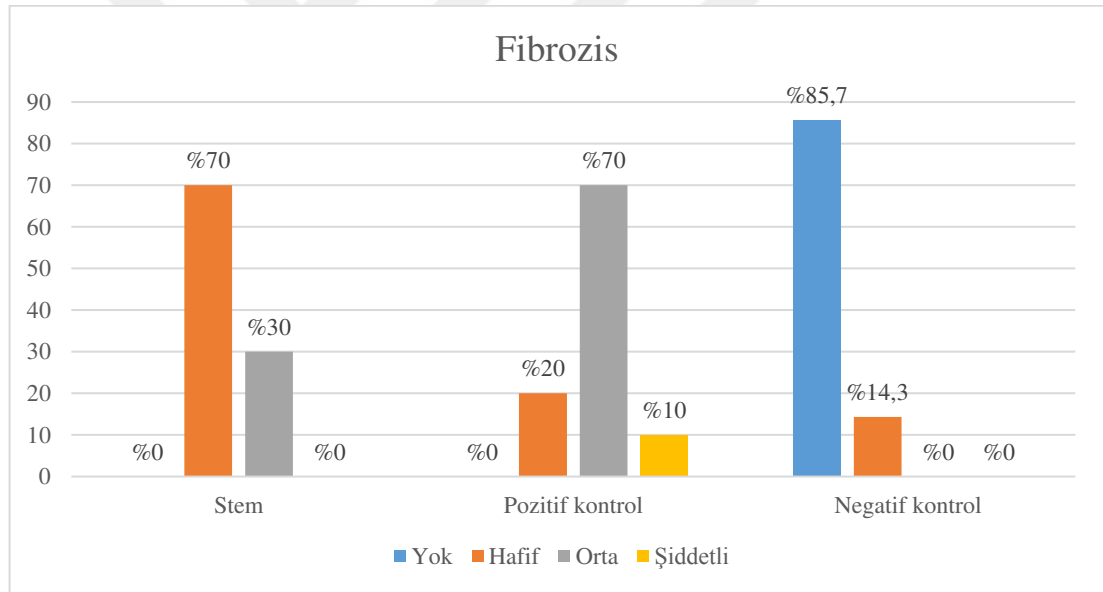
Negatif kontrol grubunda bulunanların %85,7'sinde fibrozis görülmemiş iken %14,3'ünde hafif derecede fibrozis görülmüştür. Pozitif kontrol grubunda bulunanların %20'sinde hafif, %70'sinde orta ve %10'unda ise şiddetli fibrozis görülmüştür. Stem grubunun %70'sinde hafif, %30'unda orta derecede fibrozis görülmüştür. Gruplar arasında fibrozis ve fibrozis ortalaması açısından anlamlı

farklılık vardır ($p<0,001$). Bu farklılık negatif kontrol ile stem ve pozitif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 5, Şekil 6).

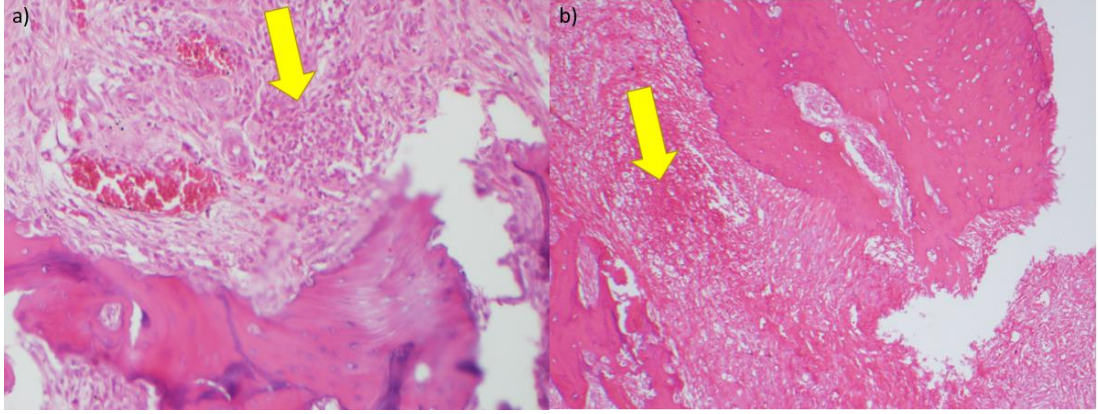
Tablo 5. Grupların fibrozise göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		p *
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Fibrozis	Yok	0	0	0	0	6	85,7	<0,001
	Hafif	7	70,0	2	20,0	1	14,3	
	Orta	3	30,0	7	70,0	0	0	
	Şiddetli	0	0	1	10,0	0	0	
Median		1 ^a		2 ^a		0 ^b		<0,001**
Ortalama		1,3 ^a		1,9 ^a		0,1 ^b		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 6. Grupların fibrozise göre karşılaştırılması



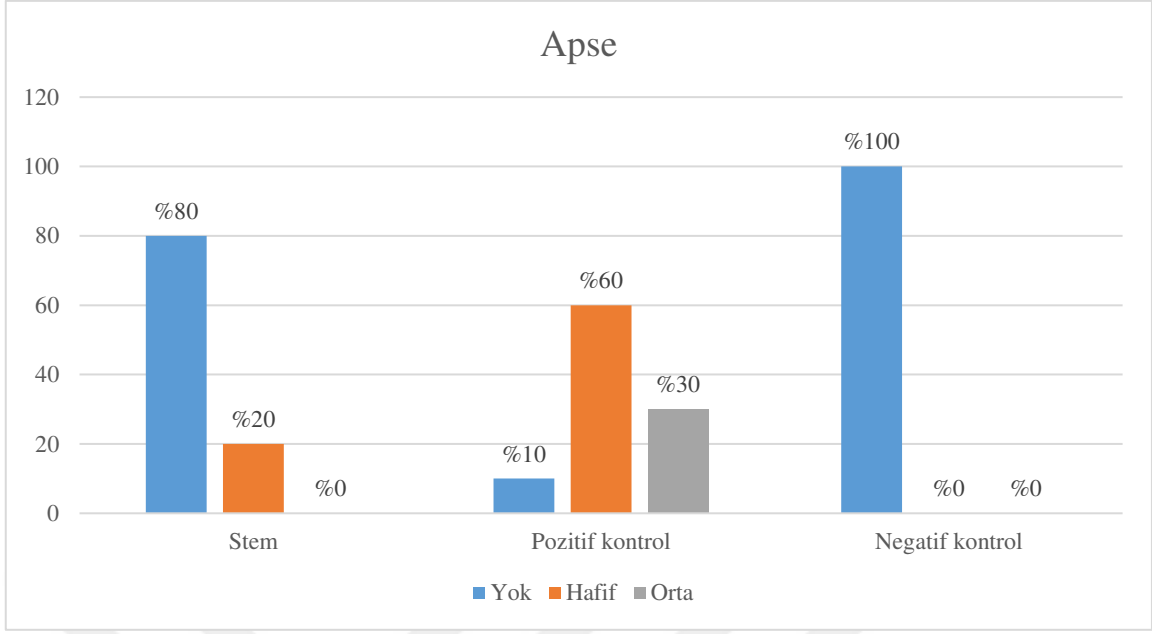
Resim 10 a) hafif yoğunlukta apse b) orta yoğunlukta apse H&E boyama (x400)

Pozitif kontrol grubunda bulunanların %10'unda hafif, %60'ında orta ve %30'unda ise şiddetli apse görülmüştür. Stem grubunun %80'inde apse yok iken %20'sinde hafif apse görülmüştür. Negatif kontrol grubunda bulunan örneklerde apse görülmemiştir. Bununla beraber gruplar arasında apse oluşumu ve apse oluşumuna ait ortalamalar açısından anlamlı farklılık vardır ($p < 0,001$). Bu farklılık pozitif kontrol ile stem ve negatif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 6, Şekil 7).

Tablo 6. Grupların apseye göre karşılaştırılması

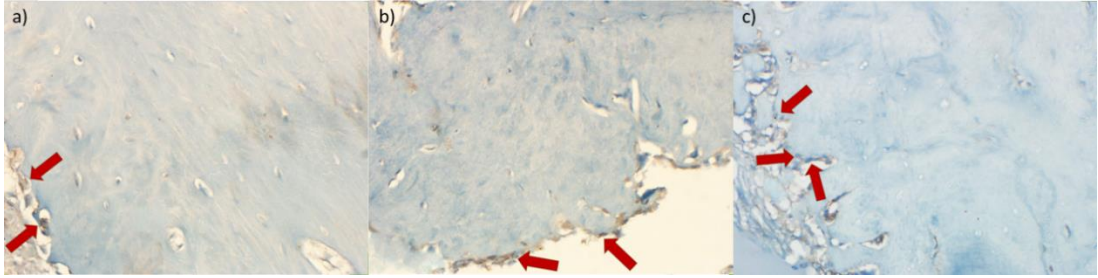
		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		p*
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Apse	Yok	8	80,0	1	10,0	7	100,0	<0,001
	Hafif	2	20,0	6	60,0	0	0	
	Orta	0	0	3	30,0	0	0	
Median		0 ^a		1 ^b		0 ^a		<0,001**
Ortalama		2 ^a		1,2 ^b		0 ^a		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 7. Grupların apseye göre karşılaştırılması

5.3. İmmünohistokimyasal Bulgular



Resim 11. OPG (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)

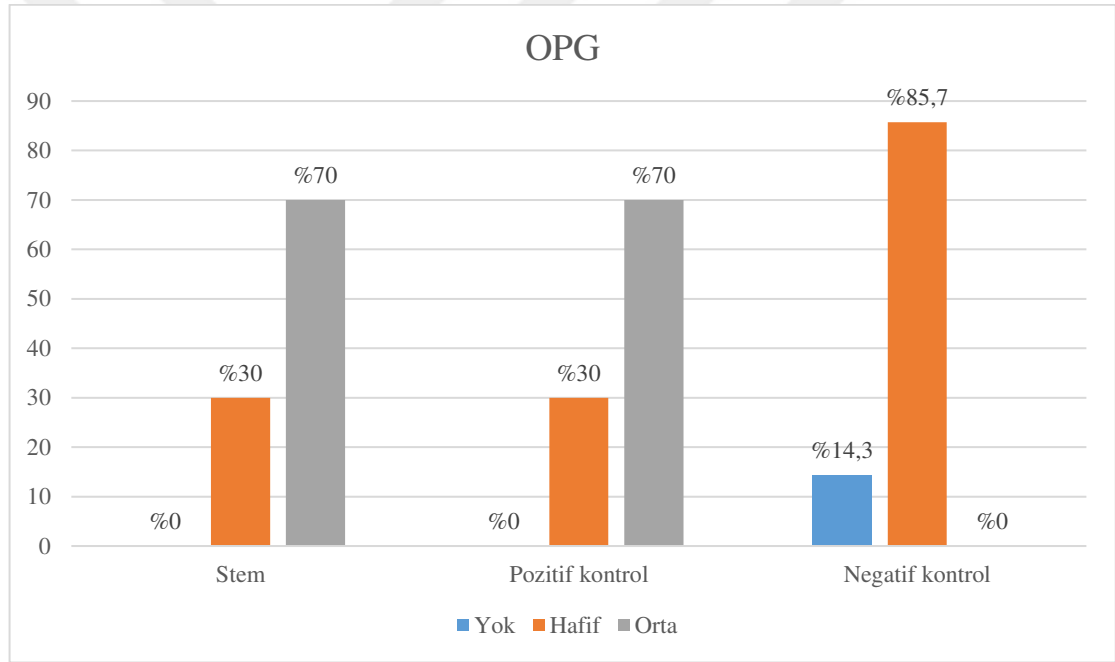
Pozitif kontrol grubunun %30'unda OPG (+) hücreler hafif iken %70'inde orta olarak görülmüştür. Negatif kontrol grubunun %14,3'ünde OPG (+) hücreler yok iken, %85,7'sinde hafif düzeyde görülmüştür. Stem grubunun %30'unda OPG (+) hücreler hafif yoğunlukta iken %70'inde orta yoğunlukta görülmüştür. Gruplar arasında OPG boyanma açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,008$). Gruplar arasında OPG boyanma ortalaması açısından anlamlı farklılık vardır ($p=0,005$). Bu

farklılık negatif kontrol ile stem ve pozitif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 7, Şekil 8).

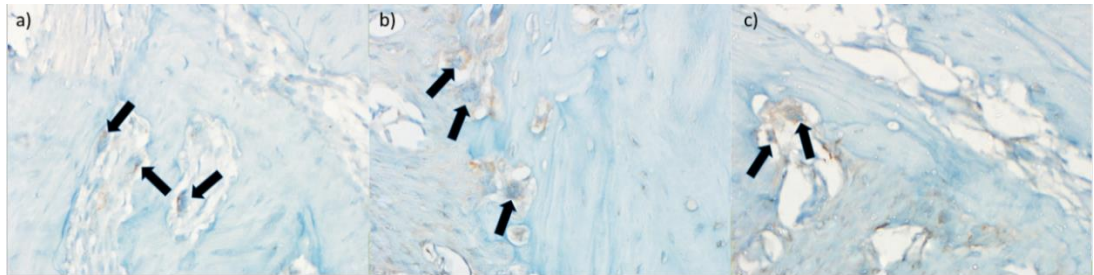
Tablo 7. Grupların OPG'ye göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
OPG	Yok	0	0	0	0	1	14,3	0,008*
	Hafif	3	30,0	3	30,0	6	85,7	
	Orta	7	70,0	7	70,0	0	0	
Median		2,0 ^a		2,0 ^a		1,0 ^b		0,005**
Ortalama		1,7 ^a		1,7 ^a		0,9 ^b		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 8. Grupların OPG'ye göre karşılaştırılması



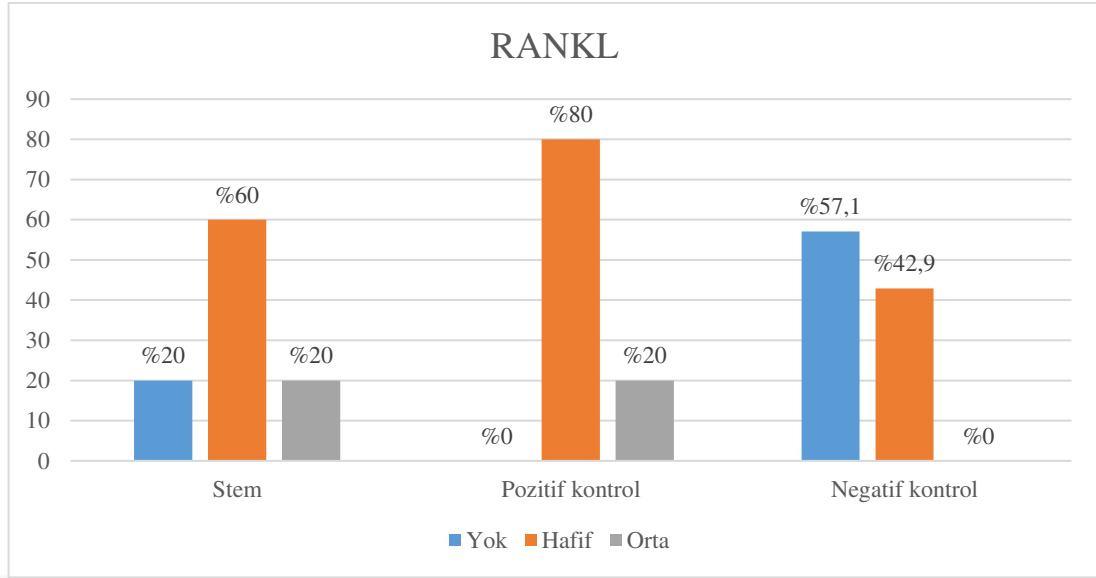
Resim 12. RANKL (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)

Stem grubunun %20'sinde RANKL (+) hücreler yok iken %60'ında hafif %20'sinde orta düzeyde görülmüştür. Pozitif kontrol grubunun %80'inde RANKL (+) hücreler hafif yoğunlukta iken %20'sinde orta olarak görülmüştür. Negatif kontrol grubunun %57,1'inde RANKL (+) hücreler yok iken, %42,9'unda hafif olarak görülmüştür. Gruplar arasında RANKL boyanma açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0,074). Gruplar arasında RANKL boyanma ortalaması açısından anlamlı farklılık vardır (p=0,032). Bu farklılık sadece pozitif kontrol ile negatif kontrol arasındaki farktan kaynaklanmıştır (Tablo 8, Şekil 9).

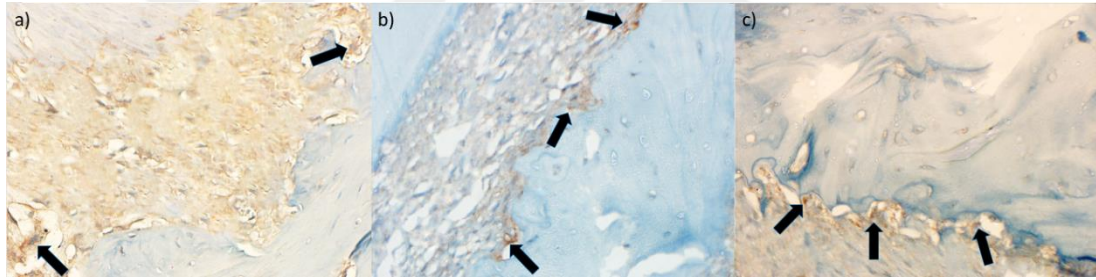
Tablo 8. Grupların RANKL'ye göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
RANKL	Yok	2	20,0	0	0	4	57,1	0,074*
	Hafif	6	60,0	8	80,0	3	42,9	
	Orta	2	20,0	2	20,0	0	0	
Median		1,0 ^{a,b}		1,0 ^a		0 ^b		0,032**
Ortalama		1,0 ^{a,b}		1,2 ^a		0,4 ^b		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır. ^{a,b,c}Farklılığın kaynaklandığı grup



Şekil 9. Grupların RANKL'ye göre karşılaştırılması



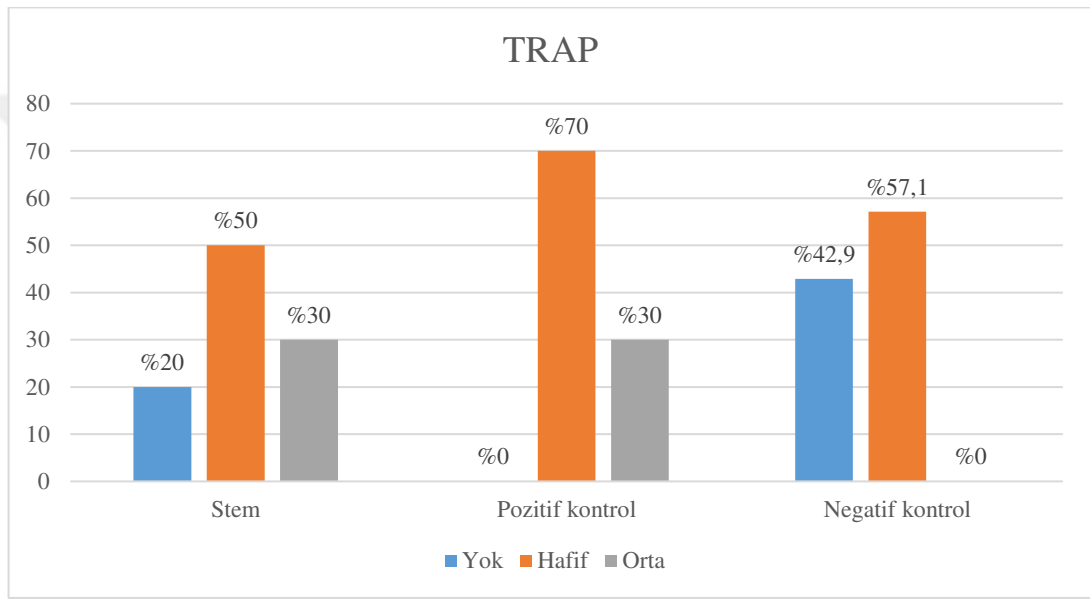
Resim 13. TRAP (+) hücreler a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) Stem Grubu (x400)

Negatif kontrol grubunun %42,9'unda TRAP (+) hücreler yok iken, %57,1'inde hafif olarak görülmüştür. Stem grubunun %20'sinde TRAP (+) hücreler yok iken %50'sinde hafif %30'unda orta olarak görülmüştür. Pozitif kontrol grubunun %70'inde TRAP (+) hücreler hafif yoğunlukta iken %30'unda orta olarak görülmüştür. Gruplar arasında TRAP boyanma yoğunluğu açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,173$). Gruplar arasında TRAP boyanma ortalaması açısından anlamlı farklılık yoktur ($p=0,071$). (Tablo 9, Şekil 10).

Tablo 9. Grupların TRAP’a göre karşılaştırılması

		Stem		Pozitif Kontrol		Negatif Kontrol		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
TRAP	Yok	2	20,0	0	0	3	42,9	0,173*
	Hafif	5	50,0	7	70,0	4	57,1	
	Orta	3	30,0	3	30,0	0	0	
Median		1,0		1,0		1,0		0,071**
Ortalama		1,1		1,3		0,6		

*Kikare analizi, **Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır.



Şekil 10. Grupların TRAP’a göre karşılaştırılması

6. TARTIŞMA

Bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu kronik apikal periodontitis, çenelerde en sık görülen diş hastalığıdır ve periapikal doku yıkımı, alveolar kemik rezorpsiyonu ve inflamatuvar granülasyon dokusu oluşumu ile kendini gösterir (162). Apikal periodontitis etyolojisinde kimyasal ürünler, yabancı cisimler ve mekanik irritasyon mikroorganizmalar haricindeki dış faktörler olarak inflamatuvar mediatörler, konağın metabolik ürünleri ve sitokinler ise iç faktörler olarak bildirilmiştir (25). Apikal periodontitis etyolojisindeki temel unsurun endodontik enfeksiyon kaynaklı mikroorganizmalar olduğu ortaya konmuştur (24). Pulpal enflamasyonun uzamasıyla periapikal dokuların fizyolojisinde, inflamatuvar mediatörler aracılığıyla ortaya çıkan bir değişim başlar. Çeşitli sitokinlerin etkisiyle aktifleşen ve farklılaşan osteoklastlar kemik yıkımına neden olur (163).

Kemik, zararlı olabilecek pro-inflamatuvar uyaranlara (travma, enfeksiyon vb.) maruz kaldığında, diğer doku ve organ sistemlerinde olduğu gibi, doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından düzenlenen aynı biyolojik süreçler, lokal onarım ve kemik iyileşmesini etkilemek için ortaya çıkar (164). Bu olaylar, uyaranla doğrudan yüzleşen monosit-makrofaj-osteoklast soyunun hücreleri arasında devam eden iletişimi gerektirir. Böylece makrofaj dönüşüm süreci boyunca sitokinlerin, kemokinlerin ve mezenkimal kök hücre-osteoblast soyunun hücrelerinin hedeflenmesini ve anjiyogenezi destekleyen diğer faktörlerin salınımı yoluyla onarım başlatılır (165, 166). Ek olarak, mezenkimal kökenli hücreler, proinflamatuvar aktivitelerin çözülmesini ve normal dokunun yeniden oluşturulmasını teşvik etmek için inflamatuvar hücreleri modüle eder (164).

Periapikal bölge içindeki iltihaplanma, antijeni nötralize etmek için ortaya çıkar. Kemik rezorpsiyonu da bu inflamatuvar yanıt tarafından uyarılır ve daha sonra enfeksiyonu sekestre etmek için bir bariyer halinde organize edilen bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu için alan açılır. Kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumu, osteoklastların, osteoblastların ve osteositlerin aktivitesini içeren süreçlerdir; sistemik ve yerel koşullardan etkilenirler. Bununla birlikte, apikal periodontitis sırasında kemik hemostazı bozulur ve bu da artan kemik rezorpsiyonu oranlarını destekler (164, 167).

RANKL, normal olarak osteoblastlar ve osteositler tarafından ve patolojik olarak lenfositler tarafından eksprese edilen bir TNF süper ailesi hücre yüzeyi sitokinidir (168). RANKL, osteoklast öncülleri ve dendritik hücreler üzerinde bulunan RANK'a bağlanır. RANK aktivasyonu, osteoklast sağkalımını destekler (168, 169). B hücreleri, dendritik hücreler, MKH'ler ve osteoblastlar tarafından üretilen çözünür bir tuzak reseptör olan osteoprotegerin (OPG), RANKL ile yarışmalı bağlanma yoluyla bu etkileri bloke edebilir (97, 169). Bu nedenle, RANKL/OPG oranı osteoklast aktivitesinde önemli bir belirleyicidir (170). Kemik zedelenmesi üzerine makrofajlar, ek inflamatuvar hücreleri toplamak, neovaskülarizasyonu teşvik etmek, MKH göçünü ve farklılaşmasını yönlendirmek ve yeniden şekillenmeye aracılık etmek için çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerini serbest bırakır (166, 171, 172).

Periapikal hastalıklarda kemik yıkımında çeşitli inflamatuvar medyatörler ve hücrel mekanizmalar rol oynamaktadır. Kemik yapım ve yıkımı; kemik alkalen fosfataz, total ALP, kemik sialoprotein, osteokalsin, osteonektin, hidroksiprolin, tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP), pridinolin, N-terminal telopeptid, Tip I

kollajenin C-terminal telopeptidi (CTX), deoksiprinidolin gibi belirteçlerle gösterilir (173).

Alkalen fosfataz, pirofosfatı hidrolize ederek yeni sentezlenen osteoid dokuya hidroksiapatit kristallerinin yerleşmesini sağlamaktadır (174). Alkalen fosfataz, kemik metabolizması için en yaygın kullanılan belirteçtir ve kemik oluşumunun ve osteoblast aktivitesinin kapsamını yansıtabilir (175). Kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) ise, kemik büyümesi ve mineralizasyonunun düzenleyicileridir (176).

Marending ve ark. spesifik olmayan bağışıklık sisteminin bütünlüğünün, endodontik başlangıç tedavisi ve tekrar tedavi sonucu için önemli bir öngörücü olduğunu bildirdi (177). Ng ve ark. ayrıca spesifik olmayan bağışıklık sisteminin periapikal dokuların iyileşmesi üzerindeki etkisini de gösterdi (178). Bu nedenle, sistemik sağlık, dental pulpa ve periapikal iyileşmenin onarıcı yanıtını etkileyerek şu iki ana endodontik değişkeni etkileyebilir: Apikal periodontitis prevalansı ve kök kanal tedavisi sıklığı (179).

Endodontik tedavinin amacı apikal periodontitisi tedavi etmek veya önlemektir. Kök kanalındaki mikrobiyotayı azaltmak ve yeniden enfeksiyonunu önlemek klinik başarıya yol açabiliyorsa, o zaman konakçı faktörlerin, hastalığın ciddiyetini belirlemede ve belirli bir hastanın tedaviye nasıl yanıt verdiğini belirlemede kritik bir rolü olmalıdır (28). İmmün sistemin rolü, AP'nin gecikmiş veya bozulmuş rezolüsyonu, bağışıklığı baskılanmış hastaların, diyabetik hastaların tedaviye yanıtı ve AP'nin klinik belirtilerinin ciddiyet derecesinde yansıtılabilir (180). Çalışmalar, bağışıklığı baskılanmış hayvanlarda periapikal enfeksiyonun yayılması ve daha büyük periapikal lezyonların gelişimi için daha yüksek bir risk eğilimi olduğunu göstermiştir (181, 182). Ayrıca, konak yanıtı açısından, periapikal

lezyonların gecikmiş veya bozulmuş çözünürlüğü, AP'nin ilk nedeni ortadan kaldırıldıktan sonra sürekli kemik rezorbe edici sitokin üretimi ile makrofajların kalıcı aktivasyon durumuna bağlanmıştır (183). Başlangıç periapikal durumunun ve kök kanal tedavisinin teknik kalitesinin endodontik başarı üzerindeki öneminin yanında bu çalışmalardan elde edilen en önemli sonuç, nonspesifik immün sistemin endodontik tedavinin etkinliği üzerindeki kesin etkisidir (184).

Konak modülasyon tedavisi, konak yanıtının yıkıcı yönlerini değiştirerek veya down-regulasyon yaparak doku yıkımını azaltmayı ve koruyucu veya rejeneratif yanıtları yeniden düzenlemeyi amaçlayan bir tedavi konseptidir (185).

Bazı fonksiyonel gıda türlerinin, kök hücre nişlerini aktive eden ve ayrıca oksidatif stres ve inflamasyona karşı koyan bağışıklık hücre yollarını uyarma yetenekleri aracılığıyla vücudun yenilenme kapasitesini artırabileceği hipotezini destekleyen kanıtlar vardır (186-190). Munoz ve ark., çeşitli bitki özleri içeren besin takviyesi uygulanmasından sonra modifiye gingival indeks ve gingival kanama indeksi ve periodontal cep derinliğinde azalma elde etmişlerdir (191). Bu bulgulara dayanarak; AFA, Hippophae Rhamnoides, Fucus Vesiculosus, Panax Notoginseng, Aloe Macroclada, Piper Nigrum ekstratları, beta glukan, ve kolostrum içeren bir karışımı (Stemregen®), apikal periodontitisle gelişen inflamatuvar reaksiyonları ve alveolar kemik rezorpsiyonunu engellemeye yardımcı olabilecek ve hastalığın iyileşmesine katkıda bulunabilecek; tüm bu olası etkilerinin yanında medikal ilaçlara kıyasla yan etki riskinin düşük olmasıyla da avantajlı bir ajan adayı olarak çalışmamızda değerlendirdik.

Aphanizomenon flos aquae, karoten, beta-karoten, klorofiller, fikosiyaninler, fikoeritrinler ve önemli antioksidan, anti-inflamatuvar ve antiproliferatif özelliklere

sahip polifenoller gibi çok çeşitli mineraller ve pigmentler içerir (192-194). AFA hem in vivo hem de in vitro modellerde antioksidan ve serbest radikal temizleme özellikleri gösteren zengin bir fikosiyanin kaynağıdır; bu özellikleriyle doğal ve güçlü bir anti-inflamatuar olarak kabul edilir (195-197). Diş hekimliği alanında De Caro ve ark. çalışmalarını, oksidatif stres (OS) ile ilişkili ağız hastalıklarının tedavisine yönelik AFA içeren solventlerin ağız boşluğunda topikal uygulama için yararlı olan biyomekanik ve yapışkan özellikleri optimize etmek ve AFA'nın biyoyararlanımını desteklemek için tasarlamış fakat AFA'nın ağız hastalıklarının iyileşmesi üzerindeki etkisiyle alakalı bir analiz yapmamışlardır (198). Endodonti literatüründe AFA ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Kır iğdesi (*Hippophae Rhamnoides*) iyi bir mineral, özellikle kalsiyum, fosfor, demir ve potasyumun yanı sıra C, B1, B2, E, A ve K vitaminleri kaynağıdır (136). *Hippophae Rhamnoides*'in çeşitli hastalıklara karşı etkili olduğu bilinmesine rağmen, diş hekimliğinde etkinliği ile ilgili sadece birkaç çalışma yapılmıştır (199-201). Le Bell ve ark. *Hippophae Rhamnoides* yağının Sjögren sendromlu hastaların ağız mukozası üzerindeki etkileri incelemek için bir pilot çalışma yapmışlardır (199). Wang ise *Hippophae Rhamnoides* yağı ve kimotripsinin, çocuklarda ülseratif stomatit tedavisinde etkili olduğunu bildirmiştir (200). Pentelescu ve ark. takviye edici gıda olarak *Hippophae Rhamnoides* kullandıkları bir klinik çalışma ile *Hippophae Rhamnoides*'in periodontitis tedavisinde lokal tedavi edici araçlarla birlikte yardımcı olabileceğini belirtmişler ve vücudun genel bağışıklık yanıtında diş eti hastalığı olan hastalara destek sağladığını, iyileşmeyi desteklediğini ve vücudun tepkiselliğini geliştirdiğini öne sürmüşlerdir (201).

Kahverengi deniz yosunlarından *Fucus vesiculosus*, fukoidan, amino asitler, fukoksantin ve diğer karotenoidler, klorofiller, çoklu doymamış yağ asitleri ve polifenollerce zengindir. Fukoidanlar, kahverengi alglerden ekstrakte edilen sülfatlanmış polisakkaritler olarak kemik oluşumu ve damarlanma ve kök hücre alımı süreçlerini modüle etme potansiyeline sahiptir (202, 203). Fukoidanlar antimikrobiyal ve antikanser özellikleri dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir (139, 140). Bahsedilen tüm bu biyolojik süreçler, çeşitli farklı dokular veya hastalıklar için temel bir rol oynar ve fonksiyonel kemik dokusunun korunması ve kemik rejenerasyonunun ve onarımının güçlendirilmesinden kemik tedavisine kadar kemik sağlığındaki uygulamalar için özellikle ilgi çekicidir (202). *Fucus vesiculosus*tan ekstrakte edilen fukoidan ile yapılan diş hekimliği araştırmaları fukoidanın antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan etkinliğinin kanıtı üzerinedir (204-206).

Çin'in güneybatısında 400 yıldan fazla bir süredir yetiştirilen geleneksel Çin şifalı bitkisi *Panax notoginseng* üzerine yapılan kapsamlı farmakolojik çalışmalar, *P. notoginseng* ve aktif bileşenlerinin dolaşım sistemi, kardiyovasküler sistem, beyin, damar sistemi, sinir sistemi, metabolizma ve bağışıklık düzenlemesi üzerinde birçok etkisi olduğunu göstermiştir (141, 143). *Panax notoginseng*, makrofajların LPS kaynaklı aktivasyonunu inhibe eder ve in vitro anti-inflamatuar ve immünosupresif özelliklere sahiptir (207, 208). Ek olarak, *Panax notoginseng* saponinleri, osteogenez ile ilişkili genleri hedefleyerek kemik iliği stromal hücrelerinin osteogenezini destekleyebilir (209). *Panax notoginseng*'den elde edilen özütün, LPS ile uyarılan tartarat dirençli asit fosfataz pozitif çok çekirdekli hücrelerin (TRAP (+) hücreler) yani osteoklastların oluşumunu ve rezorbe edici aktivitelerini engelleyebildiği

bildirilmiştir (210). P. notoginseng ekstraktının periodontal yumuşak doku üzerindeki etkilerini inceleyen bir araştırmanın sonuçları Panax notoginseng'in, periodontal hastalıklarda meydana gelen kemik yıkımı ve inflamatuvar süreçler üzerinde osteoklast oluşumunu inhibe etme ve PDL hücrelerinin proliferasyonunu artırma gibi terapötik etkileri olduğunu göstermiştir (211).

Stemregen® içeriğinde ekstras olarak kullanılan bitkilerden Aloe Macroclada'nın kullanımından sonraki 2 saat içinde dolaşımdaki kök hücre sayısının 53%'e kadar artabildiği ve kök hücrelerin dolaşıma katılmasının genel bağışıklığa katkıda bulunduğu gösterilmiştir (14).

Kolostrum, doğrudan kan dolaşımına emildikten sonra kemik iliği kök hücre nişinin aktivasyonunu destekleyebilen önceden oluşturulmuş büyüme faktörleri ve sitokinler içerir (147-149). Büyükbaş kolostrum sütü ile diyet takviyesinin geniş kapsamlı bağışıklık modülasyonu sağlayabileceği ayrıca doku onarımında ve bağışıklığı arttırmada kullanımının hem güvenli hem de etkili olduğu bildirilmiştir (15, 212, 213). Çalışmalar, diş macunu, jel ve gargara şeklinde farklı kolostrum içeren hijyen ürünlerinin primer Sjögren sendromlu ve oral liken planuslu hastalarda oral mukozal lezyonları tedavi etmedeki ve semptomlarını hafifletmedeki etkinliğini ortaya koymuştur (214, 215).

β -glukanların, bağışıklık uyarıcı, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antitümöral, hepatoprotektif, kolesterol düşürücü ve ayrıca antifibrotik, antidiyabetik ve hipoglisemik aktivite gibi biyoaktif ve tıbbi özellikler sergilemesinin yanında yara iyileşme sürecini modüle etme ve farelerde yara izini azaltma yetenekleri rapor edilmiştir (216-220). β -glukanların koruyucu etkisi, makrofaj aktivasyonu, t-hücreleri stimülasyonu, retikulo-endotelial sistemin (RES) stimülasyonu, doğal öldürücü (NK)

hücrelerin aktivasyonu, klasik ve alternatif kompleman yolları aktivasyonu ve artan antikor üretimi dahil olmak üzere bir dizi farklı bağışıklık yolunun katılımı nedeniyle spesifik olmayan immünomodülasyon olarak tanımlanmıştır (221). Diş hekimliğinde oral  -glukan uygulaması ile tedavinin periodontal hastalığı olan diyabetik sıçanlarda alveolar kemik kaybını azalttığı ve kan şekeri düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (222). Benzer bir başka çalışmanın sunu ları  -glukan alımının, periodontal hastalıklı diyabetik hayvanlarda sistemik inflamatuvar profili azalttığını, alveolar kemik kaybını önlediğini ve  -hücre fonksiyonunu iyileştirdiğini ortaya koymuştur (223).

Piper nigrumun immün sistemi uyarıcı etkisi olduğu ve doğal antioksidan olarak kullanılabileceği çalışmalarla desteklenmiştir (224-226). Bir hayvan modelinde Piper nigrum bitkilerinde bulunan piperin alveolar kemik kaybını geciktirdiği gösterilmiştir (227). Piper nigrum'un Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus ve Streptococcus faecalis'e karşı iyi antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (228-232). Kalaiselvam ve ark. Piper nigrumun endodontik enfeksiyonlarda rol oynayan E. faecalis'e karşı antibakteriyel etkinliği olduğunu bildirmişlerdir (233). Said ve ark. piper nigrum uçucu yağının endodontik enfeksiyonlarda yer alan virülent bakterilere karşı antibakteriyel etkisini araştırmışlar ve piper nigrumun E. faecalis kültürüne karşı potansiyel antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (234). Diş hekimliği ve endodonti literatüründe Stemregen® ile ilgili çalışma mevcut değildir. Stemregen® içeriğindeki ekstratların özellikle apikal periodontitis tedavisinde faydalı olabileceği açık değildir.

Apikal periodontitis ile ilgili çeşitli hayvan deneylerinin uygulanmasıyla, bir apikal periodontitis modelinin hızlı ve başarılı bir şekilde oluşturulması önemli bir

araştırma yöntemidir (235). Ratlarda apikal periodontitis gelişimi, insan iyileşme sürecini yeniden üreterek, periapikal dokuların histolojik incelemesine ve numunelerin standardizasyonuna olanak tanır. İnsanlarda enfekte kanallardan alınan örnekler, rat çalışmalarında açıklanan sonuçlara benzer şekilde, apikal periodontitis kronik evrelerinde anaerobik bakterilerin prevalansını göstermiştir (236-238). Bu bulguların yanında kolay üremeleri ve bakımları, düşük maliyetleri ve daha hızlı biyolojik tepkileri de (239, 240) temel alınarak çalışmamızda apikal periodontitis modelinin oluşturulmasında ratlar tercih edildi.

Apikal periodontitis indüklenen çalışmalarda birbirine benzer metodlar uygulanmıştır. Çeşitli endodontik patojenlerin açılan kavitelere uygulandıktan sonra oral kaviteye açık bırakıldığı çalışmaların (75, 241, 242) yanısıra dişlerin pulpalari ekspoz edilerek deney süresi boyunca herhangi bir uyaran uygulanmadan ve restorasyon yapılmadan oral kaviteye açık bırakıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (243-247). Bu çalışmalarla birlikte Paula-Silva ve ark.nın çalışmasının (248) metodolojisi ve sonuçları da göz önüne alınarak çalışmamızda LPS veya patojen inokulasyonu yapılmadan koroner açıklıkla oral kontaminasyon metodu tercih edildi.

Çeşitli çalışmalarda periapikal lezyonun meydana gelişi ve ulaştığı ebatlar 7, 14, 21, 28, 35 ve 42 gün gibi farklı sürelerde araştırılmış ve kıyaslanmıştır (106, 107, 249). Lui ve ark., 0-28 günler arasında lezyon genişliğinin arttığını ve sonrasında boyutlarının anlamlı şekilde değişmediğini bildirmiştir (106). Tani-Ishii ve ark. 30 günlük apikal periodontitis indüksiyonundan sonra hastalığın kronik evresinin gözlemlendiğini ve bu aşamada, sistemik veya lokal analizleri etkileyebilecek sistemik ve lokal akut enfeksiyon belirtilerinin mevcut olmadığını bildirmişlerdir (238). AP indüksiyonunda otuz gün, o sırada gelişimin plato aşamasına ulaşıldığından,

inflatuar sürecin büyüklüğünü ve yaralanmadan kaynaklanan kemik rezorbsiyonunu değerlendirmek için yeterli bir süre olarak kabul edilir (250-252). Bu çalışmada, apikal periodontitisin meydana geliş süresiyle alakalı bir değerlendirme yapılması hedeflenmediği ve kronik apikal periodontitis gelişimi için yeterince uzun olduğu çeşitli çalışmalarla desteklendiğinden 30 günlük deney periyodu seçildi (86, 251, 253, 254).

Ratlarda oral gavaj yoluyla uygulama modeli, bir su kaynağındaki serbest mevcudiyetten farklı olarak, hayvan tarafından yutulacak bileşik miktarının kesin kontrolüne izin verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır (255, 256). Stemregen®'in gavaj yoluyla verilmesi bu çalışmada da tercih edilen yöntemdi. Uygulama şekli, tedavi sonuçlarını etkileyebilecek bir faktördür. Literatürde Stemregen®'in herhangi bir şekilde uygulandığı rat çalışması mevcut olmadığından literatüre bu bağlamda ilk kez çalışmamızın sonuçları katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda ratlara uygulanacak doz; Stemregen®'in içeriğindeki bazı özütleri içermesi ve Stemregen® gibi kök hücre mobilizatörü olması özellikleriyle Stemregen®'e benzeyen StemEnhance'nin takviye edici gıda olarak farelere uygulandığı çalışmanın metodolojisindeki gibi belirlendi ve insanlara verilen dozun 10 katı olan 300 mg/kg Stemregen® uygulandı (257).

Cosme-Silva ve ark. probiyotiklerin apikal periodontitis üzerindeki etkilerini incelediklerinde biyokimyasal parametrelere bakmışlar ve probiyotik alan gruplarda plazma alkalın fosfataz seviyelerini/aktivitesini daha yüksek bulurken kalsiyum ve fosfor seviyelerini tüm gruplarda benzer seviyelerde bulmuşlardır (254). Bizim çalışmamızda Stem grubunun ALP değeri ortalaması pozitif kontrol ve negatif kontrol gruplarından matematiksel olarak daha yüksekti fakat gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,709$). Çalışmamızda plazma kalsiyum konsantrasyonu Cosme-Silva ve ark.nın bildirdikleri sonuçlar ile paralel olarak tüm gruplarda benzerdi ve gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0,147$). Çalışmamızda pozitif kontrol grubunun P değeri Stem ve negatif kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$).

Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemede skorelama tekniğinden yararlanılarak sonuçlar semi-kantitatif olarak yorumlanabilmektedir. Kemik yıkım alanları, hücreler, bağ dokusu, ödem, hiperemi veya apse varlığı ve aynı şekilde enflamasyon ve kemik yıkımında rol alan medyatörlerin pek çoğu semikantitatif olarak tespit edilerek hangi hücrelerle ilişkili olduğu gözlemlenmektedir (246, 258). Çalışmamızda, histopatolojik incelemenin ve immünohistokimyasal yöntemle TRAP, RANKL ve OPG boyamanın avantajları dikkate alınarak osteoblastik aktivite, osteoklastik aktivite, inflamasyon, fibrozis ve apse oluşumu değerlendirildi.

Literatürde apikal periodontitis modellerinde farklı ajanların kemik yıkımı üzerine etkilerini histopatolojik olarak değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Dal-Fabbro ve ark. oral gavaj yoluyla aşırı kafein uygulama protokolü olan ve olmayan sıçanlarda apikal periodontitis gelişimini değerlendirdikleri çalışmalarında kafeinin sıçanlarda periapikal kemik rezorpsiyon hacmini şiddetlendirebildiğini ve apikal periodontitisten kaynaklanan inflamatuvar modeli değiştirdiğini bildirmişlerdir (259). Cosme-Silva ve ark. probiyotiklerin çoklu suş formülünün oral gavaj uygulamasının ratlarda indüklenen apikal periodontitis gelişimini etkileyip etkilemediğini araştırdıklarında probiyotik kompleksin, apikal periodontitiste inflamasyonu ve kemik rezorpsiyonunu modüle ettiğini bulmuşlardır (260). Bu çalışmada histopatolojik olarak abse ve inflamasyon düzeyleri karşılaştırıldığında, pozitif

kontrol grubunun inflamasyon derecesi Stem grubundan ve negatif kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Stem grubunun inflamatuvar infiltrat ve abse formasyonunun, pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olması içerdiği bitki ekstralarının antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir.

Gatej ve ark. probiyotiklerin alveolar kemik kaybına etkisini incelediklerinde periodontitis oluşturulan kontrol grubunun sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha fazla inflamatuvar hücre infiltratı ve osteoklastik skor sergilediğini; bununla birlikte probiyotiklerle tedavi edilen tüm hayvanların, sağlıklı kontrollerle benzer inflamatuvar ve osteoklastik skorlara sahip olduğunu göstermişlerdir (261). Çalışmamızın histopatolojik incelemesinde pozitif kontrol grubunun osteoklast skorlamasının negatif kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu; Stem grubunun osteoklast skorlamasının ise pozitif kontrol grubuna göre matematiksel anlamda daha düşük olduğu fakat iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi. Ek olarak çalışmamızda negatif kontrol grubunun osteoblastik aktivitesi Stem ve pozitif kontrol gruplarından anlamlı derecede düşük bulundu. Pozitif kontrol grubunun osteoblastik aktivitesi ile Stem grubu arasında istatistiksel olarak fark görülmedi.

Çalışmamızda negatif kontrol grubunun fibrozis düzeyi pozitif kontrol ve Stem gruplarından istatistiksel olarak düşük bulundu. Stem grubunun fibrozis oluşumu pozitif kontrol grubuna göre matematiksel anlamda daha düşük izlenirken iki grup arasında anlamlı farklılık görülmedi. Stem grubundaki bu fark; Stemregen®'in dolaşımdaki kök hücre sayısını artırması ve böylece konağın

başıklık yanıtını güçlendirerek iyileşme sürecini etkilemesinden kaynaklanıyor olabilir.

Dal-Fabbro ve ark. aşırı kafein uygulamasının apikal periodontitis üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında periapikal alanda RANKL ekspresyonunda kafein grubunda belirgin bir artış tespit ederken OPG ekspresyonunda da artış gözlemlenmesine rağmen bu farkın anlamlı olmadığını bulmuşlar ve RANKL-OPG yolu RANKL'a doğru kaydığından, daha fazla kemik rezorbe edici hücre oluştuğunu; bunun TRAP (+) hücreler ile doğrulandığını bildirmişlerdir (259). Liu ve ark.nın çalışmasında, düşük konsantrasyonda kafeinin RANKL'ı artırdığını ve osteoblast öncü hücrelerinde OPG ekspresyonunu azalttığını göstererek in vivo olarak kafeinin, ratlarda osteoklastogenezi artırdığını ve kemik mineral yoğunluğunu azalttığını bildirmişlerdir (262). Metforminin apikal periodontitiste, RANKL/OPG oranını düşürdüğü, osteoklastların sayısını ve kemik rezorbsiyon alanlarını azaltarak periapikal lezyonları inhibe ettiği öne sürülmüştür (246). Cosme-Silva ve ark. apikal periodontitiste probiyotik diyet takviyesinin etkilerini araştırarak diyet takviyesi uygulanmamış deneysel apikal periodontitisli grubun, probiyotik takviyesi alan gruba göre daha yoğun RANKL düzeyi gösterdiğini, OPG düzeyinin her iki grupta da benzer olduğunu ve TRAP (+) hücrelerin probiyotik grubunda daha düşük çıktığını bildirmişlerdir (260). Çalışmamızda sağlıklı negatif kontrol grubu örneklerinde RANKL (+) hücre yoğunluğunun, apikal periodontitisli pozitif kontrol grubu örneklerinden istatistiksel olarak daha az olduğu bulundu. Stem grubunun RANKL (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubundan matematiksel olarak daha azdı. RANKL ekspresyonu immunohistokimyasal olarak TRAP (+) hücre düzeyleri ile doğrulandı. Çalışmamızda Stem grubunun TRAP (+) hücre yoğunluğu ile pozitif

kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu ancak Stem grubunun TRAP (+) hücreleri pozitif kontrol grubundan sayısal olarak azdı. Negatif kontrol grubunun OPG düzeyi apikal periodontitisin indüklendiği gruplardan anlamlı derecede düşük izlenirken hastalık oluşturulan grupların OPG düzeyleri arasında fark yoktu. OPG seviyelerinin sabit olmasına rağmen pozitif kontrol grubunda RANKL ekspresyonunun Stem grubundan matematiksel anlamda fazla olması RANKL/OPG oranının Stemregen takviyesiyle osteogenezis lehine değiştirebileceğini düşündürmektedir.



7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde, Stemregen®'in periapikal hastalıklarda osteoklastik aktiviteyi azaltabileceğini ve kemik yapımını destekleyebileceğini belirten araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışma, Stemregen®'in ratlarda deneysel apikal periodontitise etkilerinin incelendiği ilk araştırma olarak periapikal hastalığın yıkım miktarını azaltmak ve tedavi sonrası iyileşme sürecini ortaya koymak adına gelecekteki konak modülasyon prosedürleri için potansiyel bir temel sağlar.

Araştırmamızda Stemregen® içeriğindeki; antioksidan, antiinflamatuvar özelliklerinin yanında kök hücrelerin dolaşıma katılmasıyla genel bağışıklığı artırarak iyileşmeyi hızlandırabilecek, osteoklastların farklılaşmasına öncülük eden mediatörleri ve böylece osteoklast aktivitesini baskılayabilecek bitki özütlerinin kullanılmasının apikal periodontitise birlikte gerçekleşen kemik yıkımını azaltabileceği düşüncesinden yola çıkılmış ve apikal periodontitis indüklenmiş ratlarda bu ajanları içeren bir gıda takviyesi uygulanarak periapikal bölgede enflamasyonun baskılandığı, kemik yıkımının azaldığı histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır. Bu hayvan modelinin sonuçlarına dayanarak;

1- Stemregen® takviyesi uygulanarak periapikal bölgede enflamasyonun ve kemik yıkımının baskılanmasının mümkün olduğu,

2- Stemregen®, apikal periodontitiste RANKL/OPG oranını değiştirerek osteoklastların sayısını azaltarak kemik rezorpsiyonu ve periapikal hastalığın ilerlemesini yavaşlatabileceği sonucuna varıldı.

Stemregen®'in apikal periodontitis üzerine terapötik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmamızda umut verici sonuçlar elde edildi. Stemregen® apikal

inflamasyonun şiddetini azaltarak daha hızlı bir apikal onarım sürecini destekledi. Bu etki, Stemregen®'in içeriğindeki bitki ekstralarının; radikal süpürücü, antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri ve kök hücre mobilizasyonunu artırma yetenekleriyle ilişkilendirilebilir. Stemregen® içeriğindeki ekstraların çeşitliliği, ayrı ve/veya birlikte kullanımı, karışımdaki oranları, kullanılan doz, sıklık, deneysel model ve ratların bağışıklık tepkisini modüle etme yeteneklerinin insanlardan farklı olması gibi sınırlamalar nedeniyle çalışmamızda elde edilen bulguların insanlara uyarlanabilmesi ve klinik olarak değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



8.KAYNAKLAR

1. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2009;1.
2. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162-72.
3. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endodontic.* 1996;22(6):311-6.
4. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2006;40:144-63.
5. Hakkı S. Periodontal tedavide konak modülasyonu amaçlı lokal uygulamalar. *Türkiye Klinikleri J Periodontol-Special Topics.* 2015;1(3):52-8.
6. Drapeau C, Benson KF, Jensen GS. Rapid and selective mobilization of specific stem cell types after consumption of a polyphenol-rich extract from sea buckthorn berries (*Hippophae*) in healthy human subjects. *Clin Interv Agin.* 2019;14:253-63.
7. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Exp Opin Biol Therapy.* 2008;8(5):569-81.
8. Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & lymphoma.* 2005;46(11):1531-44.
9. Väänänen HK. Mesenchymal stem cells. *Ann Med* 2005;37(7):469-79.
10. Jensen GS, Hart AN, Zaske LA, Drapeau C, Gupta N, Schaeffer DJ, et al. Mobilization of human CD34+ CD133+ and CD34+ CD133(-) stem cells in vivo by consumption of an extract from *Aphanizomenon flos-aquae*-related to modulation of CXCR4 expression by an L-selectin ligand? *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions.* 2007;8(3):189-202.
11. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Experimental Hematol* 2007;35(6):989-94.
12. Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS. Therapies from Fucoidan: An Update. *Marine Drugs.* 2015;13(9):5920-46.
13. Zhang JS, Zhang BX, Du MM, Wang XY, Li W. Chinese preparation Xuesaitong promotes the mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral infarction. *Neural Regener Res* 2016;11(2):292-7.
14. Drapeau C, Benson KF, James J, Jensen GS. *Aloe macroclada* from Madagascar triggers transient bone marrow stem cell mobilization. *J Stem Cell Res Ther.* 2015;5(287):2.
15. Webster, Gill A, Lehrke P. Development of a combined bovine colostrum and immune-stimulatory carbohydrate nutraceutical for enhancement of endogenous stem cell activity. *Open Nutraceuticals J.* 2013;6(1).
16. Cramer DE, Wagner S, Li B, Liu J, Hansen R, Reca R, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells by yeast-derived beta-glucan requires activation of matrix metalloproteinase-9. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2008;26(5):1231-40.

17. Gomes B, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Brazilian oral research*. 2018;32(suppl 1):e69.
18. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects Of Surgical Exposures Of Dental Pulp In Germ-Free And Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1965;20:340-9.
19. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dental Res* 1981;89(6):475-84.
20. Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand* 2019;77(3):173-80.
21. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006;39(4):249-81.
22. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 1979;25(2):685-93.
23. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1965;20(3):340-9.
24. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps: Umeå University; 1976.
25. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Dental Traumatology*. 1990;6(3):89-96.
26. Khan AA. The Puzzle of Orofacial Pain 2007. 75-90 p.
27. Hargreaves KM, Cohen S, Berman LH. Cohen's pathways of the pulp: Mosby Elsevier; 2011.
28. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2004;15(6):348-81.
29. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins basic pathology e-book: Elsevier Health Sciences; 2017.
30. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Natur Rev Immunol* 2001;1(2):135-45.
31. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
32. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(3):139-50.
33. Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Ann Rev Biomed Engineering* 2006;8:93-131.
34. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Med Cell Long*. 2016;2016:5276130.

35. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. 2007;219(1):88-102.
36. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin n Periodont*. 1994;19-27.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book: Elsevier Health Sciences; 2014.
38. van Oosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Resp J*. 2005;26(5):918-32.
39. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *Netherl J Med*. 2006;64(1):4-9.
40. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;7:145-73.
41. Janeway CA. J., Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. Immunobiology: the immune system in health disease. 2001.
42. Croft M, Swain SL. B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J Immunol* 1991;147(11):3679-89.
43. Nabholz M, MacDonald HR. Cytolytic T lymphocytes. *Annual Rev Immunol*. 1983;1:273-306.
44. Benacerraf B, Germain RN. A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression. *Scand J Immunol* 1981;13(1):1-10.
45. Duke O, Panayi GS, Janossy G, Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin Exper Immunol*. 1982;49(1):22-30.
46. Kong YC. T-cell balance in organ targets. *Immunol Today*. 1983;4(11):304-5.
47. Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989;68(5):830-4.
48. Bishop GA, Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2001;13(3):278-85.
49. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2003;36(7):464-71.
50. Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J*. 1993;26(2):131-6.
51. Bergenholtz G, Lekholm U, Liljenberg B, Lindhe J. Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, And Oral Pathology*. 1983;55(3):295-301.
52. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endodontic* 1992;18(5):216-27.

53. Lee BA, Lee HS, Jung YS, Kim SW, Lee YW, Chang SH, et al. The effects of a novel botanical agent on lipopolysaccharide-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodon* 2013;84(8):1221-9.
54. Granucci F, Foti M, Ricciardi- Castagnoli P. Dendritic cell biology. *J Advances in immunology*. 2005;88:193-233.
55. Carrillo C, Peñarrocha M, Peñarrocha M, Vera F, Peñarrocha D. Immunohistochemical study of Langerhans cells in periapical lesions: correlation with inflammatory cell infiltration and epithelial cell proliferation. *Medicina Oral, Patolog Oral Y Cirugia Bucal*. 2010;15(2):e335-9.
56. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endodontics*. 1996;81(1):93-102.
57. Yasuda H. [Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)]. *Clin Calc*. 2006;16(6):964-70.
58. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357(9270):1777-89.
59. Tomar N, De RK. A brief outline of the immune system. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1184:3-12.
60. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endodont & Dent Traumatol* 2000;16(5):191-6.
61. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009;47(1):101-13.
62. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44(1):55-66.
63. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W, Jr., Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(5):310-6.
64. Bracks IV, Armada L, Gonçalves LS, Pires FR. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. *J Endodontic*. 2014;40(1):63-8.
65. 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, Endodont*. 2001;92(1):83-8.
66. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AM, 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. *J Appl Oral Sci FOB*. 2014;22(4):336-46.
67. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res* 2010;89(12):1349-63.
68. de Oliveira Rodini C, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endodontics*. 2004;97(1):59-63.

69. Drazić R, Sopta J, Minić AJ. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010;39(3):257-62.
70. de Noronha Santos Netto J, Pires FR, da Fonseca EC, Silva LE, de Queiroz Chaves Lourenço S. Evaluation of mast cells in periapical cysts, dentigerous cysts, and keratocystic odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 2012;41(8):630-6.
71. Andrade AL, Nonaka CF, Gordón-Núñez MA, Freitas Rde A, Galvão HC. Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *J Endodontic*. 2013;39(8):990-4.
72. Ihan Hren N, Ihan A. T lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Archives Oral Biol* 2009;54(2):156-61.
73. 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 Endodontic*. 2013;39(4):453-5.
74. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(1):25-31.
75. Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP, et al. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *J Endodontic*. 2013;39(1):83-7.
76. 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. *Microbiol Immunol* 2009;53(5):287-94.
77. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*. 2018;11(5):627-35.
78. Majno G, Joris I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology: Oxford University Press; 2004.
79. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic pathology. J Philadelphia. 1997;5:25-40.
80. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
81. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endodontic* 2010;36(6):995-9.
82. Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. *Frontiers in physiology*. 2017;8:869.
83. 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;51(6):593-604.
84. 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. *J Inflammation* 2012;9(1):8.

85. Silva MJ, Sousa LM, Lara VP, Cardoso FP, Júnior GM, Totola AH, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res* 2011;90(4):495-500.
86. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *J Endodontic*. 2016;42(5):747-51.
87. van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7993-8.
88. Lee SK, Huang H, Lee SW, Kim KH, Kim KK, Kim HM, et al. Involvement of iNOS-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival by TNF-alpha. *Exper Cell Res* 2004;298(2):359-68.
89. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3.
90. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aus Endodontic J* 2015;41(2):72-7.
91. 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? *Clin Oral Invest* 2016;20(7):1617-24.
92. 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 Diseases*. 2008;14(7):600-5.
93. Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kohara H, Yoshimatsu M, Takano-Yamamoto T. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Developmental Immunol* 2013;2013:181849.
94. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011;22(4):189-95.
95. Nakamura I, Jimi E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitamins and Hormones*. 2006;74:357-70.
96. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-42.
97. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
98. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:55-69.
99. Wang R, Luo H, Yang D, Yu B, Guo J, Shao L, et al. Osteoblast *Jmjd3* regulates osteoclastogenesis via EphB4 and RANKL signalling. *Oral Diseases*. 2022.

100. Jules J, Zhang P, Ashley JW, Wei S, Shi Z, Liu J, et al. Molecular basis of requirement of receptor activator of nuclear factor κ B signaling for interleukin 1-mediated osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(19):15728-38.
101. Son A, Kang N, Oh SY, Kim KW, Muallem S, Yang YM, et al. Homer2 and Homer3 modulate RANKL-induced NFATc1 signaling in osteoclastogenesis and bone metabolism. *J Endocrinol* 2019;242(3):241-9.
102. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Mol Med* 2006;12(1):17-25.
103. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophysics* 2008;473(2):139-46.
104. Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J*. 2013;46(2):99-111.
105. de Moraes M, de Lucena HF, de Azevedo PR, Queiroz LM, Costa Ade L. Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts. *Archives Oral Biol* 2011;56(11):1256-63.
106. Liu L, Wang L, Wu Y, Peng B. The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions. *Arc Oral Biol* 2014;59(5):492-9.
107. Zhang R, Huang S, Wang L, Peng B. Histochemical localization of Dickkopf-1 in induced rat periapical lesions. *J Endodontic* 2014;40(9):1394-9.
108. da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endodontic* 2012;38(6):803-13.
109. Carneiro E, Parolin AB, Wichnieski C, Rosa EA, Silva Neto UX, Westphalen VP, et al. Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Arch Oral Biol* 2017;73:166-71.
110. Salinas-Muñoz M, Garrido-Flores M, Baeza M, Huamán-Chipana P, García-Sesnich J, Bologna R, et al. Bone resorptive activity in symptomatic and asymptomatic apical lesions of endodontic origin. *Clin Oral Invest* 2017;21(8):2613-8.
111. Santos S, Couto LA, Fonseca JM, Xavier FCA, Figueiredo ACL, Freitas VS, et al. Participation of osteoclastogenic factors in immunopathogenesis of human chronic periapical lesions. *J Oral Pathol Med* 2017;46(9):846-52.
112. Armada L, Marotta Pdos S, Pires FR, Siqueira JF, Jr. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. *J Endodontic*. 2015;41(8):1281-7.
113. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, 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;124(14):2162-6.
114. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of Periodontol. *Periodontol* 2000. 2013;61(1):16-53.
115. Rawlinson SC, Boyde A, Davis GR, Howell PG, Hughes FJ, Kingsmill VJ. Ovariectomy vs. hypofunction: their effects on rat mandibular bone. *J Dent Res* 2009;88(7):615-20.

116. Zhou S, Yang Y, Ha N, Zhang P, Ma X, Gong X, et al. The Specific Morphological Features of Alveolar Bone. *J Craniofac Surg* 2018;29(5):1216-9.
117. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*. 2018;59(2):99-107.
118. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61(5):577-87.
119. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophysics*. 2014;561:3-12.
120. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res Inter* 2015; 2015: 421746.
121. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).
122. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235(1):176-90.
123. Eroschenko VP, Di Fiore MS. DiFiore's atlas of histology with functional correlations: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
124. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *CJASN*. 2008;3: 131-139.
125. Soares IMV, Fernandes GVO, Larissa Cordeiro C, Leite Y, Bezerra DO, Carvalho MAM, et al. The influence of Aloe vera with mesenchymal stem cells from dental pulp on bone regeneration: characterization and treatment of non-critical defects of the tibia in rats. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2019;27:e20180103.
126. Shah VK, Shalia KK. Stem cell therapy for acute myocardial infarction-long term 24 months follow-up. *J Clin Trials Cardiol*. 2014;1:1-5.
127. Zheng R, Geng T, Wu DY, Zhang T, He HN, Du HN, et al. Derivation of feeder-free human extended pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2021;16(7):1686-96.
128. Dicker A, Le Blanc K, Aström G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research*. 2005;308(2):283-90.
129. Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr., Reagan CR, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995;202(2):137-44.
130. Tsai MS, Hwang SM, Chen KD, Lee YS, Hsu LW, Chang YJ, et al. Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(10):2511-23.
131. Merino JJ, Cabaña-Muñoz ME, Pelaz MJ. The Bluegreen Algae (AFA) Consumption over 48 Hours Increases the Total Number of Peripheral CD34+ Cells in Healthy Patients: Effect of Short-Term and Long-Term Nutritional Supplementation (Curcumin/AFA) on CD34+ Levels (Blood). *J Personal Med* 2020;10(2).

132. Li XD, Wang JS, Chang B, Chen B, Guo C, Hou GQ, et al. *Panax notoginseng* saponins promotes proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *J Ethnopharmacol* 2011;134(2):268-74.
133. Amato A, Terzo S, Marchesa P, Maffongelli A, Martorana M, Scoglio S, et al. Spasmolytic Effects of *Aphanizomenon Flos Aquae* (AFA) Extract on the Human Colon Contractility. *Nutrients*. 2021;13(10).
134. Řezníček V, Plšek J, editors. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.)-the effective source of vitamin C. Proceedings of the Fifth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries,(5th CMAPSEEC), Brno, Czech Republic, 2-5 September, 2008; 2008: Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno.
135. Olas B, Kontek B, Malinowska P, Żuchowski J, Stochmal A. *Hippophae rhamnoides* L. Fruits Reduce the Oxidative Stress in Human Blood Platelets and Plasma. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2016;2016:4692486.
136. Fatima T, Snyder CL, Schroeder WR, Cram D, Datla R, Wishart D, et al. Fatty acid composition of developing sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry and the transcriptome of the mature seed. *PloS one*. 2012;7(4):e34099.
137. Lin Y, Qi X, Liu H, Xue K, Xu S, Tian Z. The anti-cancer effects of fucoidan: a review of both in vivo and in vitro investigations. *Canc Cell Inter* 2020;20:154.
138. Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL. Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine Drugs*. 2015;13(4):2327-46.
139. Obluchinskaya ED, Pozharitskaya ON, Zakharova LV, Daurtseva AV, Flisyuk EV, Shikov AN. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus vesiculosus*. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2021;26(14).
140. Cabral EM, Mondala JRM, Oliveira M, Przyborska J, Fitzpatrick S, Rai DK, et al. Influence of molecular weight fractionation on the antimicrobial and anticancer properties of a fucoidan rich-extract from the macroalgae *Fucus vesiculosus*. *Int J Biolog Macromol* 2021;186:994-1002.
141. Ma L, Wang WQ, Shi R, Zhang XM, Li X, Yang YS, et al. Effects of organic acids on the chemotaxis profiles and biocontrol traits of antagonistic bacterial endophytes against root-rot disease in *Panax notoginseng*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2021;114(11):1771-89.
142. Sha M, Zhou Y, Zhang H, Li Y, Qin Q. Study on differences of chemical components in different parts of *Panax notoginseng*. *J Mod Chin Med*. 2018;20:832-6.
143. Xu C, Wang W, Wang B, Zhang T, Cui X, Pu Y, et al. Analytical methods and biological activities of *Panax notoginseng* saponins: Recent trends. *J Ethnopharmacol* 2019;236:443-65.
144. Thapa BR. Health factors in colostrum. *Indian J Pediatrics*. 2005;72(7):579-81.
145. Godhia ML, Patel N. Colostrum—its Composition, Benefits as a Nutraceutical—A Review. *J Current Research in Nutrition Food Science J*. 2013;1(1):37-47.
146. Pakkanen R, Aalto J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. *J International Dairy Journal* 1997;7(5):285-97.

147. Tokuyama H, Tokuyama Y, Migita S. Isolation of two new proteins from bovine colostrum which stimulate epidermal growth factor-dependent colony formation of NRK-49F cells. *Growth factors* (Chur, Switzerland). 1990;3(2):105-14.
148. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Animal Sci* 2009;87(13 Suppl):3-9.
149. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1Ra through a NF-kappaB- and MAPK-dependent mechanism. *Journal Nutrit* 2010;140(2):382-91.
150. Grip J, Steene E, Einar Engstad R, Hart J, Bell A, Skjæveland I, et al. Development of a novel beta-glucan supplemented hydrogel spray formulation and wound healing efficacy in a db/db diabetic mouse model. *Eur J Pharma Biopharma* 2021.
151. Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, et al. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* (Baltimore, Md : 1950). 2006;177(3):1661-9.
152. Meghwal M, Goswami TK. Piper nigrum and piperine: an update. *Phytotherapy Research : PTR*. 2013;27(8):1121-30.
153. Dahigaonkar K, Yelpure CS, Syed NF, Wajid FA. Use of spices in treatment of dental infections. *J World J Pharmaceut Res*. 2018;7(4):1-12.
154. Karthikeyan G, RV G, Thangavelu L. Antimitotic activity of Piper nigrum on clinical isolates of candida. *Int J Res Pharma Sci* 2019;10(2).
155. Badmaev V, Majeed M, Prakash L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation. *J Nutrit Biochem* 2000;11(2):109-13.
156. Zutshi RK, Singh R, Zutshi U, Johri RK, Atal CK. Influence of piperine on rifampicin blood levels in patients of pulmonary tuberculosis. *J Assoc Physicians India*. 1985;33(3):223-4.
157. Zutshi R, Singh R, Zutshi U, Johri R, Atal C. Influence of piperine on rifampicin blood levels in patients of pulmonary tuberculosis. *J The Journal of the Association of Physicians of India*. 1985;33(3):223-4.
158. Dal-Fabbro R, Cosme-Silva L, Rezende Silva Martins de Oliveira F, Capalbo LC, Piazza FA, Ervolino E, et al. Effect of red wine or its polyphenols on induced apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54(12):2276-89.
159. Günay A, Arpağ OF, Atilgan S, Yaman F, Atalay Y, Acikan I. Effects of caffeic acid phenethyl ester on palatal mucosal defects and tooth extraction sockets. *Drug Design, Development Therapy*. 2014;8:2069-74.
160. Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers in Surgery And Medicine* 2007;39(10):788-96.
161. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8(3):138-40.

162. Lin X, Chi D, Meng Q, Gong Q, Tong Z. Single-Cell Sequencing Unveils the Heterogeneity of Nonimmune Cells in Chronic Apical Periodontitis. *Front Cell Developmental Biol.* 2021;9:820274.
163. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(2):161-70.
164. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016;86:119-30.
165. Kumagai K, Vasanji A, Drazba JA, Butler RS, Muschler GF. Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model. *J Orthopaedic Res*: 2008;26(2):165-75.
166. Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AG. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews.* 2011;17(6):393-402.
167. Holland R, Gomes JEF, Cintra LTA, Queiroz Í OA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J Appl Oral Sci FOB.* 2017;25(5):465-76.
168. Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin* 2013;9(5):303-15.
169. Lee SK, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(4):411-8.
170. Criscitiello C, Viale G, Gelao L, Esposito A, De Laurentiis M, De Placido S, et al. Crosstalk between bone niche and immune system: osteoimmunology signaling as a potential target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews.* 2015;41(2):61-8.
171. Hoch AI, Binder BY, Genetos DC, Leach JK. Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PloS one.* 2012;7(4):e35579.
172. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Progress.* 2009;25(6):1539-60.
173. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica chimica acta; Int J Clin Chem* 2001;313(1-2):95-105.
174. Ebeling PR, Akesson K. Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Best practice & research Clin Rheumatol.* 2001;15(3):385-400.
175. Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Dabbaghmanesh MH, Talezadeh P, Koohpeyma F, Gholami A. Supportive Role of Probiotic Strains in Protecting Rats from Ovariectomy-Induced Cortical Bone Loss. *Probiotics Antimicrobial Proteins.* 2019;11(4):1145-54.
176. Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Açil Y, et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutrit* 2007;137(3 Suppl 2):838-846.
177. Marending M, Peters OA, Zehnder M. Factors affecting the outcome of orthograde root canal therapy in a general dentistry hospital practice. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endodontics.* 2005;99(1):119-24.

178. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - Part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J*. 2008;41(1):6-31.
179. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J* 2015;48(10):933-51.
180. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc* 1939; 2003;134(1):43-51
181. Fouad A, Barry J, Russo J, Radolf J, Zhu Q. Periapical lesion progression with controlled microbial inoculation in a type I diabetic mouse model. *J Endodontic*. 2002;28(1):8-16.
182. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endodontic*. 1996;22(8):418-21.
183. Metzger Z, Huber R, Slavescu D, Dragomirescu D, Tobis I, Better H. Healing kinetics of periapical lesions enhanced by the apexum procedure: a clinical trial. *J Endodontic*. 2009;35(2):153-9.
184. Cotti E, Schirru E, Acquas E, Usai P. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *J Endodontic*. 2014;40(12):1902-11.
185. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JCJAop. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti- inflammatory, and bone- sparing agents. A systematic Review. 2003;8(1):12-37.
186. Wang Y, Chang CF, Chou J, Chen HL, Deng X, Harvey BK, et al. Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage. *Exper Neurol*. 2005;193(1):75-84.
187. Gemma C, Mesches MH, Sepesi B, Choo K, Holmes DB, Bickford PC. Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2002;22(14):6114-20.
188. Mikirova NA, Jackson JA, Hunninghake R, Kenyon J, Chan KW, Swindlehurst CA, et al. Circulating endothelial progenitor cells: a new approach to anti-aging medicine? *J Translational Med* 2009;7:106.
189. Shytle RD, Ehrhart J, Tan J, Vila J, Cole M, Sanberg CD, et al. Oxidative stress of neural, hematopoietic, and stem cells: protection by natural compounds. *Rejuvenation Research*. 2007;10(2):173-8.
190. Bachstetter AD, Jernberg J, Schlunk A, Vila JL, Hudson C, Cole MJ, et al. Spirulina promotes stem cell genesis and protects against LPS induced declines in neural stem cell proliferation. *PloS one*. 2010;5(5):e10496.
191. Muñoz CA, Kiger RD, Stephens JA, Kim J, Wilson AC. Effects of a nutritional supplement on periodontal status. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ : 1995)*. 2001;22(5):425-428.
192. Nuzzo D, Presti G, Picone P, Galizzi G, Gulotta E, Giuliano S, et al. Effects of the *Aphanizomenon flos-aquae* Extract (Klamin®) on a Neurodegeneration Cellular Model. *Oxidative Med Cell Long* 2018;2018:9089016.

193. Kamat JP, Boloor KK, Devasagayam TP. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1487(2-3):113-27.
194. Scoglio S, Lo Curcio V, Catalani S, Palma F, Battistelli S, Benedetti S. Inhibitory effects of *Aphanizomenon flos-aquae* constituents on human UDP-glucose dehydrogenase activity. *J Enzyme Inhibition Med Chem* 2016;31(6):1492-7.
195. Bhat VB, Madyastha KM. C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(1):20-5.
196. Romay C, González R. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxyl radicals. *J Pharma Pharmacol* 2000;52(4):367-8.
197. Bhat VB, Madyastha KM. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochem Biophysical Res Commun* 2001;285(2):262-6.
198. De Caro V, Murgia D, Seidita F, Bologna E, Alotta G, Zingales M, et al. Enhanced In Situ Availability of *Aphanizomenon Flos-Aquae* Constituents Entrapped in Buccal Films for the Treatment of Oxidative Stress-Related Oral Diseases: Biomechanical Characterization and In Vitro/Ex Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2019;11(1).
199. Le Bell A, Soderling E, Rantanen I, Yang B, Kallio H. Effects of seabuck thorn oil on the oral mucosa of Sjogren's syndrome patients: a pilot study. *J Dent Res* 2002;81:104-106.
200. Wang L. Sea buckthorn oil and chymotrypsin are effective in treating ulcerative stomatitis of children. *J Hippophae*. 1992;5:32-4.
201. Pentelescu C, Pop DM, Colceriu L, Deleanu A. Utilizarea Călinei (*Hippophae Rhamnoides*) In Tratamentul Gingivitei Acute. *J Clujul Medical*. 2012;85(2).
202. Wang F, Xiao Y, Neupane S, Ptak SH, Römer R, Xiong J, et al. Influence of Fucoidan Extracts from Different *Fucus* Species on Adult Stem Cells and Molecular Mediators in In Vitro Models for Bone Formation and Vascularization. *Marine Drugs*. 2021;19(4).
203. Cui C, Wang P, Cui N, Song S, Liang H, Ji A. *Stichopus japonicus* Polysaccharide, Fucoidan, or Heparin Enhanced the SDF-1 α /CXCR4 Axis and Promoted NSC Migration via Activation of the PI3K/Akt/FOXO3a Signaling Pathway. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36(8):1311-29.
204. Jun JY, Jung MJ, Jeong IH, Yamazaki K, Kawai Y, Kim BM. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae against Dental Plaque Bacteria. *Marine drugs*. 2018;16(9).
205. Ayrapetyan ON, Obluchinskaya ED, Zhurishkina EV, Skorik YA, Lebedev DV, Kulminkaya AA, et al. Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology*. 2021;10(1).
206. Merino JJ, Parmigiani-Izquierdo JM, Toledano Gasca A, Cabaña-Muñoz ME. The Long-Term Algae Extract (*Chlorella* and *Fucus* sp) and Aminosulphurate Supplementation Modulate SOD-1 Activity and Decrease Heavy Metals (Hg(++), Sn) Levels in Patients with Long-Term Dental Titanium Implants and Amalgam Fillings Restorations. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2019;8(4).

207. Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. Panax notoginseng attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;106(1):121-8.
208. Jin UH, Park SG, Suh SJ, Kim JK, Kim DS, Moon SK, et al. Inhibitory effect of Panax notoginseng on nitric oxide synthase, cyclo-oxygenase-2 and neutrophil functions. *Phytotherapy research : PTR*. 2007;21(2):142-8.
209. Li XD, Chang B, Chen B, Liu ZY, Liu DX, Wang JS, et al. Panax notoginseng saponins potentiate osteogenesis of bone marrow stromal cells by modulating gap junction intercellular communication activities. *Cell Physiol Biochem* 2010;26(6):1081-92.
210. Kim HR, Cui Y, Hong SJ, Shin SJ, Kim DS, Kim NM, et al. Effect of ginseng mixture on osteoporosis in ovariectomized rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30(2):333-45.
211. Jang YJ, Kim ME, Ko SY. n-Butanol extracts of Panax notoginseng suppress LPS-induced MMP-2 expression in periodontal ligament fibroblasts and inhibit osteoclastogenesis by suppressing MAPK in LPS-activated RAW264.7 cells. *Arch Oral Biology*. 2011;56(11):1319-27.
212. Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA. Passive oral immunisation of children. *Lancet* (London, England). 1989;2(8675):1336.
213. Stephan W, Dichtelmüller H, Lissner R. Antibodies from colostrum in oral immunotherapy. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*. 1990;28(1):19-23.
214. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Diseases*. 2002;8(1):23-9.
215. Pedersen AM, Andersen TL, Reibel J, Holmstrup P, Nauntofte B. Oral findings in patients with primary Sjögren's syndrome and oral lichen planus--a preliminary study on the effects of bovine colostrum-containing oral hygiene products. *Clinical oral investigations*. 2002;6(1):11-20.
216. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311-5.
217. Hunter KW, Jr., Gault RA, Berner MD. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology*. 2002;35(4):267-71.
218. Robbins E, Seeley R. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. *Journal of Food Science*. 1977;42(3):694-8.
219. Trepel F. [Dietary fibre: more than a matter of dietetics. II. Preventative and therapeutic uses]. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2004;116(15-16):511-22.
220. Grip J, Steene E, Engstad RE, Hart J, Bell A, Skjæveland I, et al. Development of a novel beta-glucan supplemented hydrogel spray formulation and wound healing efficacy in a db/db diabetic mouse model. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2021;169:280-91.
221. Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljević D, Moran CA. Natural and modified (1->3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology*. 2005;25(4):205-30.

222. Silva Vde O, Lobato RV, Andrade EF, de Macedo CG, Napimoga JT, Napimoga MH, et al. β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with Periodontal Disease. *PloS one*. 2015;10(8):e0134742.
223. de OSV, Lobato RV, Andrade EF, Orlando DR, Borges BDB, Zangeronimo MG, et al. Effects of β -Glucans Ingestion on Alveolar Bone Loss, Intestinal Morphology, Systemic Inflammatory Profile, and Pancreatic β -Cell Function in Rats with Periodontitis and Diabetes. *Nutrients*. 2017;9(9).
224. Gülçin I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *Int J Food Sci Nutrition*. 2005;56(7):491-9.
225. Nahak G, Sahu R. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. *J Journal of Appl Pharma Sci* 2011;1(8):153.
226. Sarker M. Induction of Humoral Immunity Through the Enhancement of IgM Production in Murine Splenic Cells by Ethanolic Extract of Seed of *Piper nigrum* L. *J Scientific Res* 2012;4(3):751-6.
227. Dong Y, Huihui Z, Li C. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model. *J Period Res* 2015;50(6):758-65.
228. Sweta V, Geetha R. In vitro antibacterial activity of Clove and Pepper on *Streptococcus mutans*. *Asian J Pharma Clin Res* 2015;8(5).
229. Bellamkonda P, Koothati RK, Bee A, Desai A, Aarthi G, Aarthi R. Evaluation of Antimicrobial Activity of Extracts of *Terminalia chebula* and *Piper nigrum* against *Streptococcus mutans*: An In Vitro Study. *J Pharma Res Int* . 2021:218-24.
230. Karsha PV, Lakshmi OB. Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Ind J Nat Products Res* 2010;1(2):213-5.
231. Kaho ZM, Kadum AR, Hadi AAJJoPS, Research. Evaluation of antibacterial activity of *Piper nigrum* extract against *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*. *J Pharma Sci Res* 2019;11(2):367-70.
232. Hakim RF, Alwi F. Effect of Black Pepper Extract (*Piper nigrum* L) towards *Streptococcus Mutans* Growth. *Dentika: Dental Journal*. 2020;23(1):13-7.
233. Kalaiselvam R, Soundararajan K, Rajan RM, Deivanayagam K, Arumugam C, Ganesh A. Comparative Evaluation of the Anti-bacterial Efficacy of Herbal Medicaments and Synthetic Medicaments Against *Enterococcus faecalis* using Real-time Polymerase Chain Reaction. *Cureus* 2019;11(7):e5228.
234. Said SM, Aidin ZZ, Baharin SA, Jantan I. Effects of Spice Oils on Endodontal Bacteria. *Int Conference Nat Products 2014; Malaysia 2014*: 186.
235. Chen S, Lei H, Luo Y, Jiang S, Zhang M, Lv H, et al. Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens. *Int Endod J* 2019;52(7):1028-39.
236. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1994;78(4):494-502.
237. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Sur, Oral Med, Oral Pathol*. 1965;20:340-9.

238. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9(3):129-35.
239. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Labor Animals*. 2010;44(1):1-6.
240. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*. 2004;428(6982):493-521.
241. 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 Endodontic*. 2010;36(2):244-50.
242. Fukada SY, Silva TA, Saconato IF, Garlet GP, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dental Res* . 2008;87(12):1155-9.
243. Qian H, Guan X, Bian Z. FSH aggravates bone loss in ovariectomised rats with experimental periapical periodontitis. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):2997-3006.
244. Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J* 2021;54(8):1342-52.
245. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol* 2014;59(9):944-53.
246. 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 Endodontic*. 2012;38(7):943-7.
247. 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 Endodont* . 2012;38(2):191-5.
248. Paula-Silva FWG, Ribeiro-Santos FR, Petean IBF, Manfrin Arnez MF, Almeida-Junior LA, Carvalho FK, et al. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E 2 and leukotriene B 4 signaling in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci FOB*. 2020;28:e20190699.
249. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *J Endodon* 2015;41(9):1474-9.
250. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Cardoso CBM, Pipa CB, Kawai T, et al. Omega-3 Fatty Acids Reduce Inflammation in Rat Apical Periodontitis. *J Endodontic*. 2018;44(4):604-8.
251. Dal-Fabbro R, Marques-de-Almeida M, Cosme-Silva L, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2019;52(3):329-36.

252. Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, de Oliveira SHP, Chiba FY, et al. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Invest* 2018;22(3):1395-401.
253. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RC, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PC, et al. Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endodontic*. 2015;41(5):671-5.
254. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J*. 2020;53(8):1084-92.
255. Folwarczna J, Janas A, Cegiela U, Pytlik M, Śliwiński L, Matejczyk M, et al. Caffeine at a Moderate Dose Did Not Affect the Skeletal System of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Nutrients*. 2017;9(11).
256. Shin J, Choi Y, Kim J, Yu AR, Shin JS, Choi YY, et al. High doses of caffeine reduce in vivo osteogenic activity in prepubertal rats. *Journal of anatomy*. 2015;227(1):10-20.
257. Drapeau C, Antarr D, Ma H, Yang Z, Tang L, Hoffman RM, et al. Mobilization of bone marrow stem cells with StemEnhance improves muscle regeneration in cardiotoxin-induced muscle injury. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(9):1819-23.
258. Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(2):186-93.
259. Dal-Fabbro R, Cosme-Silva L, Capalbo LC, Chaves-Neto AH, Ervolino E, Cintra LTA, et al. Excessive caffeine intake increases bone resorption associated with periapical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54(10):1861-70.
260. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Prado ASD, Oliveira DP, et al. Dietary supplementation with multi-strain formula of probiotics modulates inflammatory and immunological markers in apical periodontitis. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2021;29:e20210483.
261. Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *Journal of clinical Periodontol*. 2018;45(2):204-12.
262. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(6):954-60.

9. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 18.03.2021-1452



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARARLARI

Oturum Tarihi
18.03.2021

Oturum Saati
10:00

Oturum Sayısı
2021/05

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18.03.2021 tarihinde saat 10:00'da Kurul Başkanı Prof. Dr. Mustafa İSSİ başkanlığında, aşağıda imzaları bulunan kurul üyelerinin katılımlarıyla toplanarak gündemdeki konuları görüşmüş ve aşağıdaki kararları almıştır.

Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Sinan OCAK tarafından yürütülecek olan "Ratlarda deneysel olarak oluşturulan apikal periodontitis üzerinde Stemregen® konak modülasyon terapisinin etkileri" başlıklı araştırma projenizde 27 adet erkek Sparque-Dawley Rat kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait projenin "Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi" gereği altı ay aralıklarla Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna bilgi verilmesi şartıyla uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

1. Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt Sinan OCAK
2. Arş. Gör. Dt. Fatma GÖNÜLLÜ
3. Doç. Dr. Serkan DÜNDAR

Kurul Üyeleri:

Prof. Dr. Mustafa İSSİ
Prof. Dr. Gülşüm ÖKSÜZTEPE
Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Prof. Dr. Asiye BAŞUSTA
Doç. Dr. Serkan DÜNDAR (Katılmadı)
Doç. Dr. Burcu GÜL BAYKALIR
Dr. Öğr. Üyesi Eşef BOLAT (Bulunmadı)
Vet. Hek. Ebru GÖKDERE
Omur UYGUR
Murat DAĞHAN (Bulunmadı)

Başkan
Prof. Dr. Mustafa İSSİ
Kurul Başkanı

Prof. Dr. Gülşüm ÖKSÜZTEPE
Prof. Dr. Asiye BAŞUSTA
Ebru GÖKDERE

Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Doç. Dr. Burcu GÜL BAYKALIR
Omur UYGUR

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 2: Orjinallik Raporu

RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN APİKAL PERİODONTİTİS ÜZERİNDE STEMREGEN® KONAK MODÜLASYON TERAPİSİNİN ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 7	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Fırat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.genedirex.com İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Çankırı Karatekin University Öğrenci Ödevi	<% 1