

**IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN
POLİMORFİZMLERİNİN APİKAL
PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL...**

**Elçin TEKİN BULUT
İnönü Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi
Endodonti Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema BELLİ**

Doktora Tezi - 2015

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN POLİMORFİZMLERİNİN
APİKAL PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL
LEZYONLARINDA KEMİK YIKIMI OLUŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Elçin TEKİN BULUT

**İnönü Üniversitesi ve Selçuk Üniversitesi
Endodonti Anabilim Dalı
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK**

**Ortak Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sema BELLİ**

**Bu Araştırma TÜBİTAK Tarafından
114S951 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA
2015**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi ile Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Endodonti Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Elçin TEKİN BULUT'un**; “**IL-17, IL-17R, IL-23 ve IL-23R Gen Polimorfizmlerinin Apikal Periodontitis Hastalarının Periapikal Lezyonlarda Kemik Yıkımı Oluşması Üzerine Etkisi**” konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2015


Prof. Dr. Sema BELLİ
Selçuk Üniversitesi
Ortak Tez Danışmanı
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Hamdi Oğuz YOLDAŞ
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Ali ERDEMİR
Kırıkkale Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Fuat AHMETOĞLU
İnönü Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pulpa Hastalıklarının Sınıflandırılması	3
2.1.1. Geri Dönüşümlü Pulpa İltihabı (Reversible Pulpitis)	3
2.1.2. Geri Dönüşümsüz Pulpa İltihabı (Irreversible Pulpitis).....	3
2.1.3. Ülseratif ve Hiperplastik Pulpa İltihabı	4
2.1.4. Pulpa Nekrozu	4
2.1.5. Retrogressif Pulpa Değişiklikleri	4
2.1.6. İnternal Rezorbsiyon	5
2.1.7. Pulpada Tümör	5
2.2. Periradiküler Doku Hastalıkları	5
2.2.1. Akut Apikal Periodontitis	6
2.2.2. Akut Apikal Apse	6
2.2.3. Kronik Apikal Apse	6
2.2.4. Kronik Apikal Periodontitis	7
2.2.5. Kondensing Osteitis	7
2.3. Periapikal İndeks Skorlaması	7
2.4. Bağışıklık Sistemi	8
2.5. Enflamasyon	8
2.6. Periapikal Hastalığın Oluşmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü	9
2.6.1. Yardımcı T17 (T helper 17/Th17) Hücreleri.....	12
2.6.2. İnterlökin 17 ve Reseptörü	14
2.6.3. İnterlökin 23 ve Reseptörü	15
2.7. DNA	15
2.8. DNA Dizinde Meydana Gelen Mutasyonlar	16
2.9. Polimorfizm	18

2.10. Alel	19
2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
2.12. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM)	21
2.13. Amaç	22
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Hasta Seçimi	23
3.2. Örneklerin Toplanması	23
3.3. Genomik DNA'nın İzolasyonu:	24
3.4. dsDNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi:	27
3.5. Hastalarda araştırılacak TNP'lerin belirlenmesi.....	30
3.6. Primerler'in Tasarlanması	31
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM) :	33
3.8. Örneklerin dizilemesi	36
3.8.1 Agaroz Jel Elektroforezi	37
3.9. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1 IL-17A Geni TNP Bulguları (rs542129933)	40
4.2. IL-17RA Geni TNP bulguları (rs562543976)	47
4.3. IL-23A Geni TNP Bulguları (rs180825144)	53
4.4. IL-23R Geni TNP Bulguları (rs10489630)	59
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73
EKLER.....	82
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	82
EK.2. ETİK KURUL ONAYI.....	83

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tüm tez çalışmam boyunca yol gösterici olan danışmanım Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK'e ve ortak doktora danışmanım Prof. Dr. Sema Belli'ye sonsuz saygılarımla teşekkür ederim. Desteğini ve katkılarını esirgemeyen Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Fuat AHMETOĞLU'na ve Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Barış Emre DAYANÇ'a sonsuz saygılarımla teşekkür ederim.

Sevgili çalışma arkadaşlarım, yol arkadaşlarım Yrd. Dr. Mevlüt Sinan OCAK, Dt. Levent AKINCI, Dr. Dt. Hatice ALÇİN, Uzman Dt. Aliye KAMALAK, Dt. Seren İSPİR, Dt. Elif Ezgi KAYNAK ve Dr. Dt. Reyhan ŞİŞMAN'a sonsuz şükran duygularıyla teşekkür ederim.

İstatistiksel analizlerdeki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Harika GÖZÜKARA BAĞ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Sonsuz sabır, sevgi ve yol göstericiliğinden dolayı sevgili eşim Fatih BULUT'a ve her zaman yanımda olan annem Zekiye TEKİN, babam Mehmet Ali TEKİN, kardeşlerim Gülçin TEKİN GÖKÇE, Sinem TEKİN ve teyzem Behiye DEMİRAL'a sonsuz minnet duygularıyla teşekkür ederim. Evimizi şenlendiren, neşe kaynağımız biricik oğlum Mert BULUT'a varlığından dolayı sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

ÖZET

IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN POLİMORFİZMLERİNİN APİKAL PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL LEZYONLARINDA KEMİK YIKIMI OLUŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Amaç: Bu klinik çalışmanın amacı; radyografik inceleme ve ağız içi muayene sonrasında derin çürük tespit edilen ve apikal periodontitis teşhisi konan dişleri bulunan sağlıklı bireylerde; periapikal alanlarda lezyon oluşumunda IL-17, IL-17 Reseptörü (IL-17R), IL-23 ve IL-23 Reseptörü (IL-23R) gen polimorfizmlerinin etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Tıbbi hikâyesinde herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, klinik ve radyografik muayene sonrasında derin çürük kavitesi tespit edilen diş/dişleri olan 18-65 yaş arası bireyler çalışmaya dâhil edildi. Deney grubu; termal ve elektrik pulpa testlerine negatif yanıt veren ve radyografide periapikal lezyon tespit edilen dişleri bulunan apikal periodontitis hastalarından; kontrol grubu ise termal ve elektrik pulpa testlerine pozitif yanıt veren ve radyografide sağlıklı dişleri periapikal dokuları bulunan irreversible pulpitis hastalarından oluşturuldu. Hastaların bukkal epitel hücrelerinden elde edilen çift sarmallı deoksiribonükleik asit (dsDNA) örnekleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizlerinde genotiplerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ScreenClust HRM (QIAGEN/Düsseldorf, Almanya) yazılımına yüklenerek genotipler belirlendi.

Bulgular: Apikal periodontitis ve irreversible pulpitis hastaları arasında IL-17A (rs542129933), IL-17RA (rs562543976), IL-23A (rs180825144) ve IL-23R (rs10489630) gen polimorfizmlerinin etkileri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

Sonuç: Bu çalışmanın sınırları dâhilinde IL-17 (rs542129933), IL-17R (rs562543976), IL-23 (rs180825144) ve IL-23R (rs10489630) tek nükleotit polimorfizmlerinin (TNP) periapikal lezyonlarda kemik yıkımının oluşması üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apikal periodontitis, IL-17, IL-23, periapikal lezyon, polimorfizm.

ABSTRACT

EFFECT OF IL-17, IL-17R, IL-23 AND IL-23R GENE POLYMORPHISMS ON THE FORMATION OF BONE DESTRUCTION AT PERIAPICAL LESIONS OF APICAL PERIODONTITIS PATIENTS

Objective: The objective of this clinical study is to investigate the effects of IL-17, IL-17 Receptor (IL-17R), IL-23 and IL-23 Receptor (IL-23R) gene polymorphism on lesion formation in periapical regions of the healthy individuals who have teeth with deep carious lesions and diagnosed with apical periodontitis after the radiographic investigation and examination of the oral cavity.

Material and Methods: We included the individuals who diagnosed with deep carious lesions on their teeth after the clinical and radiographic examination between the ages of 18-65 with no systemic illnesses in their medical history. Apical periodontitis patients that have teeth with periapical lesions in their radiographs and gave negative response to thermal and electric pulp tests formed the experimental group; irreversible pulpitis patients that have teeth with healthy periapical tissues on their radiographs and gave positive response to thermal and electric pulp tests formed the control group. Double strand deoxyribonucleic acid (dsDNA) samples which was obtained from the patient's buccal epithelial cells used in polymerase chain reaction (PCR) and also High Resolution Melting analysis (HRM) to determine the genotypes. The ScreenClust HRM (QIAGEN/ Duesseldorf, Germany) software was used to analyze the acquired data to identify the genotypes.

Results: There were no statistically significant differences between the apical periodontitis patients and the irreversible pulpitis patients in terms of IL-17A (rs542129933), IL-17RA (rs562543976), IL-23A (rs180825144) ve IL-23R (rs10489630) gene polymorphisms.

Conclusion: Within the limitations of this study IL-17 (rs542129933), IL-17R (rs562543976), IL-23 (rs180825144) and IL-23R (rs10489630) single nucleotide polymorphisms (SNP) have no effects on bone resorption in periapical lesions.

Key words: Apical periodontitis, IL-17, IL-23, periapical lesion, polymorphism.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
C	: Sitozin (Cytosine)
°C	: Santigrat derece
CCL	: Kemokin ligandı
CXCL8	: Kemokin (C-X-C motif) ligand 8
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Double strand DNA (çift sarmallı)
EG	: EvaGreen
FcγRIIIA	: Fc gama reseptör üç A
IL	: İnterlökin
IFN-γ	: İnterferon gama
G	: Guanin
$\gamma\delta$ T	: Gama Delta T
HRM	: High Resolution Melting (Yüksek çözünürlüklü erime)
MCP	: Monosit kemotaktik protein
MMP	: Matriksmetalloproteinaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
μl	: Mikro litre
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
R	: Reseptör
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer kappa ligand
RNase A	: Ribonükleaz A
rpm	: Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
T	: Timin
T_m	: Temperature of melting (Tipik erime sıcaklığı)
TGFβ	: Transforming growth factor β (Dönüştürücü büyüme faktörü)
Th	: T helper (yardımcı T)
TNF-α	: Tumor necrosis factor- α (Tümör nekroz faktör)
TNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
Treg	: Regulator T cells (Düzenleyici T hücreleri)
qPCR	: Quantitative PCR (gerçek zamanlı PCR)
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Apikal periodontitis oluşum döngüsü.....	10
Şekil 2.2. Bağışıklık sistemi hücrelerinin farklılaşma şeması.....	12
Şekil 2.3.DNA, baz çiftlerinin şeker-fosfat iskeletine bağlandığı çift heliks formundadır. Şekilde DNA'nın çift heliks yapısı görülmektedir.....	16
Şekil 2.4. Tek nükleotid polimorfizmi.....	18
Şekil 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonunda gerçekleşen döngülerin şema halinde anlatımı.....	20
Şekil 3.1. Bukkal toplama fırçası.....	25
Şekil 3.2. Bukkal toplama fırça tepeleri 1,5 µl' lik mikro santrifüj tüpünde etiketlenerek muhafaza edilmesi	26
Şekil 3.3. Yeni 1,5 µl' lik mikro santrifüj tüplerine alınan dsDNA örneklerinin muhafaza edilmesi.....	26
Şekil 3.4. Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre	28
Şekil 3.5. Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre cihazı için kullanılan A, B, C, D, E, F, G, H bölmelerinden oluşan ve her bir bölümünde iki kuyucuk bulunan özel tabla	28
Şekil 3.6. Spektrofotometre ile ölçülen dsDNA miktarlarının Microsoft Excel programına kaydedilen sonuçlar gösterilmektedir. Mavi oklar her bir bölmeyi, beyaz oklar ise her bir bölmenin iki kuyucuğunu göstermektedir....	29
Şekil 3.7. Mavi ok ile gösterilen 0,1 µl'lik PCR tüpleri 72' lik özel tablasına etiketlenerek yerleştirildi ve bu tüplerde hazırlanan reaksiyonların her birinin hacmi 10 µl idi.....	34
Şekil 3.8.Ok ile gösterilen 0,2 µl' lik PCR tüpleri 36'lık özel tablasına etiketlenerek yerleştirildi ve bu tüplerde hazırlanan reaksiyonların her birinin hacmi 25 µl idi.....	35
Şekil 3.9. Rotor-Gene Q gerçek zamanlı PCR cihazı	35
Şekil 3.10. Elektroforez jel tepsisi	38
Şekil 3.11. Elektroforez ünitesi içerisinde jel tepsisinin yerleştirildiği hazne	38
Şekil 3.12. Elektroforez güç ünitesi	38
Şekil 3.13. UV ışık altında alınan jel görüntüsü	39

Şekil 4.1.1. IL-17A geni (rs542129933) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini belirten ham veri görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	43
Şekil 4.1.2. IL-17A geni (rs542129933) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmal DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	44
Şekil 4.1.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 12/Kontrol grubu/ Genotipi (CC)yabanıl tip homozigot).....	45
Şekil 4.1.4. IL-17A geni (rs542129933) tayini Kontrol Grubu/113 no'lu hastaya ait homozigot yabanıl tip (CC) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.....	46
Şekil 4.2.1. IL-17RA (rs562543976) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	49
Şekil 4.2.2. IL-17RA (rs562543976) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmal DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	50
Şekil 4.2.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 12/Deney grubu/Genotipi (AA) yabanıl tip homozigot)	51
Şekil 4.2.4. IL-17RA (rs562543976) tayini Deney Grubu/138 no'lu hastaya ait homozigot yabanıl tip (AA) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.....	52
Şekil 4.3.1. IL-23A (rs180825144) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	55

Şekil 4.3.2. IL-23A (rs180825144) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	56
Şekil 4.3.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 79/Kontrol grubu/Genotipi (AA) yabancı tip homozigot.....	57
Şekil 4.3.4. IL-23A (rs180825144) tayini Deney Grubu/122 no'lu hastaya ait homozigot yabancı tip (AA) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.....	58
Şekil 4.4.1. IL-23R (rs10489630) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	61
Şekil 4.4.2. IL-23R (rs10489630) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.....	62
Şekil 4.4.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 35/Deney grubu/Genotipi (GG) yabancı tip homozigot.....	63
Şekil 4.4.4. IL-23R (rs10489630) tayini Kontrol Grubu/112 no'lu hastaya ait heterozigot yabancı tip (GT) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP ve dizileme işlemi sırasında her iki baz için de sinyal veren dizileme belirtilmektedir.....	64

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. İnsan genomunda bulunan Tek Nükleotit Polimorfizmleri.....	31
Tablo 3.2. Tasarlanan primerlerin baz dizileri, baz sayıları, saflıkları, ait oldukları genler ve TNP'leri görülmektedir.....	32
Tablo 3.3. Her bir örnek için PCR reaksiyon bileşen miktarları.....	34
Tablo 3.4. Rotor Gene Q cihazı kurulum parametreleri	36
Tablo 4.1. IL-17A (rs542129933) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı	40
Tablo 4.2. IL-17A geni (rs542129933) [C/T] değişimi gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen CC (yabancıl tip), TT (varyasyon), CT (heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğu.....	41
Tablo 4.3. IL-17A geni (rs542129933) [C/T] değişimi gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir	41
Tablo 4.4. IL-17A (rs542129933) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.....	41
Tablo 4.5. IL-17RA (rs562543976) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı	47
Tablo 4.6. IL-17RA (rs562543976) [A/G] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen AA (yabancıl tip), GG (varyasyon), AG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.....	47
Tablo 4.7. IL-17RA (rs562543976) [A/G] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.....	48
Tablo 4.8. IL-17RA (rs562543976) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.....	48
Tablo 4.9. IL-23A (rs180825144) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı.....	53
Tablo 4.10. IL-23A (rs180825144) [A/G] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen AA (yabancıl tip), GG (varyasyon), AG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.....	53

Tablo 4.11. IL-23A (rs180825144) [A/G] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.....	53
Tablo 4.12. IL-23A (rs180825144) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.....	54
Tablo 4.13. IL-23R (rs10489630) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı.....	59
Tablo 4.14. IL-23R (rs10489630) [G/T] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen GG (yabanıl tip), TT (varyasyon), TG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.....	59
Tablo 4.15. IL-23R (rs10489630) [G/T] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.....	59
Tablo 4.16. IL-23R (rs10489630) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.....	60

1. GİRİŞ

Endodonti geleneksel olarak pulpa bağ dokusu ve periapikal dokuların biyolojisini ve patolojisini kapsamaktadır. Klinik olarak endodonti; kök kanalının eğelerin kullanımı ve kök kanal dolgusu ya da endodontik cerrahi ile tedavisi olarak algılanmaktadır. Kök kanal tedavisinin teorik ve klinik olarak gerekliliğine karar verildiğinde amaç kök kanal sistemindeki enfeksiyonu önlemek ya da yok etmektir. Nihayetinde kök kanal tedavisinin biyolojik olarak amaçladığı apikal periodontitis hastalığını önlemek ya da tedavi etmektir (1).

Periapikal enflamasyon, pulpa bağ dokusundan kaynaklanan enfeksiyon, fiziksel veya iyatrojenik travma, endodontik tedavi sonrasında dolgu materyallerinden kaynaklanan hasar nedenleri ile oluşur (2, 3). Periapikal enflamasyonun oluşumu oldukça karmaşıktır. Antikorlar, sitokinler, araşidonik asit metabolizması ve nöropeptitler gibi konağın bağışıklık sisteminin bileşenleri periapikal enflamasyonun patogenezinde dâhil olurlar. Ekzojen (dış kaynaklı) antienflamatuvar etkenler ve biyolojik cevap düzenleyicileri, periapikal cevabın büyüklüğünü ve şiddetini etkileyebilir (3).

Kök kanal sistemindeki enfeksiyonun periapikal dokularda neden olduğu enflamasyonun sonucu olarak ortaya çıkan periapikal lezyonlar periapikal dokularda meydana gelen kemik yıkımı ile karakterizedir. Kemik yıkımı osteoklast hücrelerinin benzersiz bir fonksiyonudur ve etiyoloji ne olursa olsun osteoklast aktivitesi kemik kütle kaybını belirler (4).

Son yıllarda gelişen moleküler teknolojilerin önemli katkıları ile periapikal enflamasyonlarda bağışıklık sisteminin hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan sitokin, kemokin ve enzimler gibi protein moleküllerinin rolleri daha fazla araştırmacı tarafından dikkate alınmakta ve incelenmektedir (4-9). Bu proteinlerin kodlandıkları genlerdeki farklılıklar, üretilen protein moleküllerinin farklılaşmasına, bireylerin hastalıklara yatkınlıklarında ve bireyler arasında oluşan bağışıklık cevapta farklılıklara neden olabilir.

DNA (Deoksiribonükleik asit) dizisinde meydana gelen mutasyonlar DNA'nın tek bir bazında, daha uzun baz dizilerinde, tüm bir gende ya da bir kromozom parçasında meydana gelebilmektedir. Oluşan bu mutasyonlar kimi zaman sessiz kalarak genin ürettiği proteinde farklılaşmaya neden olmaz iken, kimi zaman da proteini değiştirebilmekte ve bu yeni proteinler doğru bir şekilde fonksiyon gösterememektedirler (10). Tek nükleotid polimorfizmi (TNP) DNA dizisinin tek bir bazında meydana gelen

mutasyonlardır ve popülasyonda karşılaşılabilen bu varyasyonların enflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, psoriasis gibi hastalıklara yatkınlıkta rol oynayabileceği belirtilmiştir (11).

Bağışık cevap sırasında salgılanan ve çok çeşitli fonksiyonları olan sitokinlerin ifade edildiği genler üzerinde yapılan oldukça fazla sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır (12-17). Literatüre periapikal lezyonlar açısından baktığımızda ise yapılan çalışmaların az sayıda olduğu görülmektedir ve buna rağmen bazı tek nokta polimorfizmlerinin periapikal bağışıklık cevabı üzerinde etkisi olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (18, 19).

Bu klinik çalışmanın amacı; herhangi bir sistemik hastalığı olmayan bireylerde; periapikal kemik yıkımı oluşması üzerine interlökin 17 (IL-17), IL-17 Reseptörü (IL-17R), IL-23 ve IL-23 Reseptörü (IL-23R) gen polimorfizmlerinin etkilerinin araştırılmasıdır.

Edinilen bu bilgiler ışığında; “IL-17, IL-23, IL-17R ve IL-23R gen polimorfizmlerinin; derin çürüklerden etkilenen dişlerde kemik yıkımının ve periapikal lezyonun oluşumuna etki eder” hipotezi kurulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulpa Hastalıklarının Sınıflandırılması

Sağlıklı pulpaya sahip dişler belirtisizdirler. Bu dişler canlılık testlerine, perküsyon ve palpasyona normal sınırlar içerisinde cevap verirler. Radyografik olarak farklı derecelerde pulpal kalsifikasyonlar tespit edilse dahi kökte ve çevre dokuda rezorbsiyona, pulpanın çürük ile ya da mekanik olarak ortaya çıkmış olduğuna dair herhangi bir bulgu görülmez. Böyle dişlerde endodontik tedavi gerekli değildir (20, 21).

2.1.1. Geri Dönüşümlü Pulpa İltihabı (*Reversible Pulpitis*)

Dentin hipersensitivitesinden başlayarak pulpa bağ dokusunda oluşan hafif iltihaba kadar dişte meydana gelen patolojik değişikliklerin varlığını işaret eden subjektif ve objektif bulgularla ilişkili klinik durumun genel sınıflaması geri dönüşümlü pulpa iltihabı olarak adlandırılır (22, 23). Başlangıç çürükleri, ekspozite dentin, yakın bir zamanda yapılmış dental tedavi, periodontal küretaj, mine kırıkları, servikal erozyon, okluzal atrizyon ve kusurlu restorasyonlar bu duruma neden olan faktörlerdir ve irritanın uzaklaştırılması belirtileri çözecektir (20, 23). Pulpa patolojisi olmadan ekspozite dentin varlığında uyarının termal, evaporatif, mekanik, ozmotik ya da kimyasal bir uyarın olması durumunda bazen keskin, hızlı ve geri dönebilen bir ağrı olabilir. Bu durum kafa karışıklığına neden olabilir ve dentin sensitivitesi (ya da hipersensitif dentin) olarak bilinir (20, 22). Bazı durumlarda ise pulpa bağ dokusunda meydana gelen hiperemi (uzun süren vazodilatasyon) ya da lokal iltihap sonucunda da dentin hipersensitivitesi meydana gelebilir (22). Tedavide etkenin ortadan kaldırılması yeterlidir, kök kanal tedavisi gerekli değildir.

2.1.2. Geri Dönüşümsüz Pulpa İltihabı (*Irreversible Pulpitis*)

Pulpa bağ dokusunda şiddetli iltihabın varlığını işaret eden kesik kesik ya da kendiliğinden oluşan ağrı belirtileri gibi subjektif ve objektif bulgularla kendini gösteren bu klinik durum semptomatik geri dönüşümsüz pulpa iltihabı olarak adlandırılır (21, 23). Sıcak ağrıyı arttırırken soğuk ağrıya neden olmaz. Sıklıkla çok soğuk ağrıya azalmayı sağlayarak hastaların rahatlamasına yardımcı olur. Pulpitis nedeniyle ağrısı olan hasta ağrının kökenini ayırt edemeyebilir ve ağrı çevre dokulara yayılabilir. Ağrılı uyarın uzaklaştırılsa bile ağrının kesilmesi dakikalardan saatlere kadar uzayan sürelerde devam edebilir. Ağrı keskin ya da künt, sınırlandırılmış, yaygın ya da yansıyan şekilde olabilir

(20, 21, 23). Radyografide ise periradiküler dokularda değişiklik olmayabilir ya da minimal olabilir. Tespit edilen periodontal ligamentteki kalınlaşma ve bazı durumlarda yetenekli ve geniş pulpa odasının ve kök kanal boşluğunun kalsifikasyonu belki irreversible pulpitis için kanıt olabilir (20). Diş kök kanal tedavisi uygulanması gerekmektedir. Geri dönüşümsüz pulpa iltihabının tedavi edilmemesi durumunda ise pulpanın iyileşme yeteneğinin olmaması nedeniyle pulpa nekrotik hale gelir (23).

2.1.3. Ülseratif ve Hiperplastik Pulpa İltihabı

Pulpa bağ dokusunun çürükle ekspozite olduğu noktada oluşan apse (ülser) oluşumu ile karakterize kronik bir enflamasyondur. Bu enflamatuvar durum için pulpanın kronik apsesi terimi kullanılabilir ve burada apse granülasyon dokusu ile sarıdır (22).

Hiperplastik pulpa iltihabı (pulpa polibi) kronik bir iltihabı olan genç pulpanın granülasyon dokusunun çürük kavitesinde okluzale doğru aşırı büyümesinden (hiperplazi) kaynaklanan geri dönüşümsüz pulpa iltihabıdır. Genç pulpanın direncinin yüksek olması, zengin damarlanması, pulpanın geniş çürük kavitesi içerisine doğru büyüebilme imkânı olması ve doku proliferasyonunun pulpa polibine neden olduğu düşünülmektedir (22, 23).

2.1.4. Pulpa Nekrozu

Pulpanın kan akışı kesildiğinde ve pulpal sinirler fonksiyonlarını yitirdiğinde pulpa nekrotik hale gelir. Bu durum belirti veren ya da vermeyen geri dönüşümsüz pulpa iltihabının bir sonucu olarak ya da travmatik bir yaralanma sonrasında ani kan akışının kesilmesi nedeniyle oluşur (24). Pulpa nekrozunda diş pulpa testlerine negatif yanıt verir. Pulpa tamamen nekrotik olduktan sonra diş tipik olarak belirtisizdir ve bu durum hastalık sürecinin periapikal dokulara doğru genişlemesine kadar devam eder (20). Pulpa nekrotik olduğu zaman kök kanalı içerisinde bakteriyel büyüme devam eder ve enfeksiyon (enfeksiyonun bakteriyel toksinleri) periodontal ligament boşluğuna doğru genişlediğinde diş perküsyona pozitif cevap verir ve kendiliğinden başlayan ağrılar oluşabilir. Dişin periapikal bölgesinde radyografik değişiklikler meydana gelir ve bu durum periapikal ligament boşluğundaki genişlemeden periapikal radyolüsent lezyona kadar değişen derecelerde olabilir (20).

2.1.5. Retrogressif Pulpa Değişiklikleri

Pulpa bağ dokusunda travma, çürük, periodontal hastalıklar, operatif işlemler gibi etkenler retrogressif değişikliklere neden olurlar. Pulpa kalsifikasyonları genelde pulpa

taşları ve diffüz kalsifikasyonlar şeklinde kendini gösterir. Bu kalsifikasyonların olası kaynakları olarak kan damarlarındaki pıhtı ve damar duvarlarını çevreleyen kollojen kılıflar gösterilmektedir. İrritasyon, odontoblastların yer değiştirmesi ya da ölümleri neticesinde sert dokunun dentin duvarları üzerinde geniş alanlarda oluşması ise kalsifik metamorfoz olarak adlandırılan bir başka kalsifikasyon türüdür.

Pulpa bağ dokusunda yaşlanma ile beraber görülebilen ve hücre çaplarının küçülmesi ile neticede organın küçülmesine neden olan atrofi, abrazyon ve okluzal aşınma gibi nedenlerle şiddetlenebilir (22, 23).

2.1.6. İnternal Rezorbsiyon

İnternal kök rezorbsiyonu kök kanal boşluğunun oval şekilde genişlemesi ile karakterize edilir ve daimi dişlerde sık görülmezler. Genelde belirti vermeyen bir durumdur ve çoğunlukla alınan rutin bir radyografi ile tesadüf eseri teşhis edilirler.

İnternal kök rezorbsiyonu, pulpadaki granülasyon dokusuna komşu olan multinükleer dev hücrelerin kökün internalinde rezorbsiyona neden olması ile karakterize edilir. Koronal bölgede pulpa genelde nekrotiktir ancak internal rezorbsiyon alanını da içerisine alan apikal pulpa canlı kalabilir. Bu nedenle canlılık testlerinde yanıltıcı cevaplar alınabilir. İnternal kök rezorbsiyon teşhisi konan dişlerde endodontik tedavi gereklidir (20).

2.1.7. Pulpada Tümör

Pulpa bağ dokusunda tümör metastazları ender olarak görülür. Ancak tespit edilen sarkoma, Burkitt lenfoma ve malign epitel tümörlerine rastlandığı bildirilmiştir (22).

2.2. Periradiküler Doku Hastalıkları

Sağlıklı periapikal dokulara sahip dişler, perküsyona, palpasyona ya da termal ve elektrik testlere normal sınırlar içerisinde cevap verirler. Klinik ve radyografik olarak herhangi bir patoloji belirtisi yoktur (25).

Apikal periodontitis bir enflamatuvar hastalıklar grubudur, endodontik enfeksiyonun devamıdır ve kök kanal sisteminden kaynaklanan mikrobiyal enfeksiyona karşı konağın savunma cevabı şeklinde kendini gösterir. Bu süreç; çürük, travma ya da iyatrojenik işlemlerle bakterilerin kök kanal sistemini istila etmesi ve burada kolonize olmaları ile meydana gelen pulpa nekrozundan sonra oluşur. Nekrotik olan kök kanalında kolonize olan bakteriler periradiküler dokularda hasarı ve enflamatuvar değişikliklerin artışı tetikler. Aslında enflamatuvar değişiklikler tüm kök kanal sistemi nekrotik

olmadan önce bile gözlenebilirler (26). Enfekte olmuş radiküler pulpa ve periodontal ligament ara yüzünde lokal enflamasyon, sert dokuların yıkımı, diğer periapikal dokuların yıkımı ve sonunda “periapikal lezyon” olarak adlandırılan çeşitli histopatolojik kategorilerde apikal periodontitis oluşumu ile sonuçlanan, mikrobiyal faktörlerle konağın savunması arasındaki aktif savaş olarak görülür (27).

2.2.1. Akut Apikal Periodontitis

Pulpa iltihabının periradiküler dokular içerisine doğru ilk yayılması ile oluşan klinik tablodur. Pulpa dokusundan periradiküler dokulara ulaşan iltihabi mediyatörler, nekrotik pulpadan kaynaklanan bakteri endotoksinleri, taşkın enstrümantasyon, kullanılan kimyasalların (irrigasyon ya da dezenfeksiyon solüsyonları) ve kök kanal dolgu maddelerinin periradiküler dokulara taşması, hiperoklüzyona neden olan restorasyonlar akut apikal periodontitise neden olabilir (22, 23).

Akut apikal periodontitis hastalarında orta dereceden şiddetliye doğru değişen rahatsızlıklar, çiğneme esnasında ve perküsyonda ağrı klinik belirtilerdir. Nekrotik pulpadan kaynaklanan akut apikal periodontitisin aksine pulpa iltihabının neden olduğu durumlarda hasta termal ve elektrik testlerine yanıt verebilir. Radyografide genelde sağlıklı periodontal ligaman ve kesintisiz lamina dura izlenirken, bazı durumlarda periodontal ligamanın kalınlaşması akut apikal periodontitisten kaynaklanabilir (23).

2.2.2. Akut Apikal Apse

Apse terimi şişme ya da eksuda varlığının ya da oluşumunun işareti olarak kullanılır (25). Akut apikal apse; sınırlandırılmış veya diffüz likefaksiyon nekrozunun periradiküler dokuları harap ettiği lezyonlardır ve nekrotik pulpadan kaynaklanan mikrobiyal olan ve olmayan iritanlara bağışıklık sisteminin yanıtı olarak oluşan şiddetli iltihapsal tepkidir. Hastaların ortadan şiddetliye değişen rahatsızlık veya şişlikleri vardır (22, 23). Dişler genelde perküsyon ve palpasyonda ağrılıdır. Hastada yüksek ateş ve lökositöz görülebilir (22). Radyografik olarak ise lamina duranın kesintiye uğradığı bir durumdan periradiküler dokularda geniş radyolusent alanlara kadar değişiklik görülebilir (23).

2.2.3. Kronik Apikal Apse

Periradiküler dokularda uzun süren ancak konak savunmasının düşük düzeyli cevabı ile oluşan iltihabi reaksiyonudur. Çoğu defa akut apikal periodontitisin ardından oluşan lezyonların mukoza ya da deri yüzeyine drene olması (sinüs fistülü) ile karakterize

edilirler (22, 23).

2.2.4. Kronik Apikal Periodontitis

Kronik apikal periodontitis pulpadan kaynaklanan, akut apikal periodontitisin ileri aşamalarında ortaya çıkan ve periodontal dokuların yıkımının görüldüğü, klinik olarak belirti vermeyen bir hastalıktır. Hasta perküsyona az ağrı ile ya da negatif olarak cevap verebilir ve palpasyonda hafif hassasiyet olabilir. Radyografik olarak ise lamina duranın kesintiye uğradığı bir durumdan periradiküler dokularda geniş radyolusent alanlara kadar değişiklik görülebilir (23). Periapikal lezyonların kist veya granülom olarak teşhislerinin konulmasının sadece radyografi ile olmayacağı ve histopatolojik bulgular ile kesin olarak tanı koyulabileceği genel olarak kabul görmektedir (24).

2.2.5. Kondensing Osteitis

Kronik apikal periodontitis hastalığı olan dişte apekse komşu trabeküler ve spongios kemikte enflamasyonun yıkım yerine etkin kemik oluşumu ile karakterizedir. Uzun süren düşük düzeyde enflamasyonun/enfeksiyonun ya da lokal dokuların enflamasyona/enfeksiyona yüksek direncinin neden olabileceği düşünülmektedir (20, 22).

2.3. Periapikal İndeks Skoruması (PAI)

Ørstavik ve arkadaşları 1986 senesinde periapikal hastalığın muhtemel değerlendirilmesine dayanan içeriğine kıyasla; doğruluk, güvenilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırt edilebilme yetenekleri açısından değerlendirilebilen ve “Periapikal İndeks Skoruması Sistemi (PAI)” olarak adlandırdıkları bir skoruması sistemi geliştirmişlerdir (28).

Bu sınıflandırma şu şekildedir:

- Skor 1: Normal periapikal dokular
- Skor 2: Kemik yapısında küçük yapısal değişiklikler
- Skor 3: Bir miktar mineral kaybı ile birlikte kemik yapısında görülen değişiklikler.
- Skor 4: Belirgin ve iyi tanımlanabilen periapikal radyolusensi ile periodontitis teşhisi.
- Skor 5: Alevlenen özellikleri ile şiddetli periodontitis (28).

2.4. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık; hastalıklara -özellikle enfeksiyöz hastalıklara- karşı direnç olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı dirençte aracılık eden hücreler, dokular ve moleküllerin bütünü bağışıklık sistemi olarak adlandırılır ve bu hücrelerin eşgüdümlü reaksiyonları ile enfeksiyöz mikroplara karşı üretilen moleküller ise bağışık cevaptır (29).

Mikroplara karşı savunma doğal bağışıklık sisteminin erken reaksiyonları ve sonrasında edinsel bağışıklığın geç cevapları aracılığı ile olmaktadır. Doğal bağışıklık, mikroplara karşı erken bir savunma hattı oluşturmaktadır. Enfeksiyon oluşmadan önce bile oluşabilecek enfeksiyonlara karşı hızlıca cevap verebilecek şekilde temkinli hücrel ve biyokimyasal savunma mekanizmalarını içerir. Doğal bağışıklığın aksine edinsel bağışıklık, enfeksiyon ajanlarına maruz kaldığında aktif olan ve belirli bir mikroba her bir başarılı maruz kalma ile savunma kapasitesi ve önemi artan bir bağışık cevaptır. Edinsel bağışıklığın enfeksiyonlara cevabı gelişir ve adapte olur (30).

Hümmoral ve selüler (hücre aracılı) olmak üzere ikiye ayrılan edinsel bağışıklık, ekstraselüler ve intraselüler mikroplara karşı sırayla farklı hücreler ve moleküller aracılığı ile savunma sağlamak için tasarlanmıştır (29).

2.5. Enflamasyon

Deri, solunum yolları ve bağırsak sistemini kaplayan mukoza; patojenler için ilk savunma sistemini oluşturmakta ve enfeksiyonlara karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer oluşturmaktadır. Bu savunmayı aşan mikroorganizmalar hemen doğal bağışıklık sistemini oluşturan hücre ve moleküllerle karşılaşrlar. Dokularda bulunan makrofajlar birçok bakteriyel yüzeyin ortak bileşenlerine bağlı reseptörlerle bakterileri tanır. Bu reseptörlerin devreye girmesiyle makrofajlar bakterileri hem içlerine alarak yok ederler hem de diğer bağışıklık hücrelerine önemli sinyalleri ileten sitokin ve kemokin denilen proteinleri salgırlar. Benzer cevaplar virüs, mantar ve parazitler için de gerçekleşir.

Sitokin hücreler tarafından salgılanan ve uygun reseptörleri bulunan, çevredeki hücrelerin davranışlarını etkileyen proteinlerin genel adıdır. Kemoatraktan sitokin ailesinin üyeleri olan kemokinler ise küçük proteinlerdir. Kemokinler kemotaksise aracılık ederek salgılandıkları hücreye doğru yakınlarındaki kemokin reseptörü bulunan hücreleri enflamasyon bölgesine çekerler. Örneğin nötrofilleri ve monositleri kan dolaşımından enfekte olmuş dokuya doğru çekerler (31).

Aktive edilmiş makrofajlarla salgılanan sitokin ve kemokinler, enflamasyon olarak bilinen işlemi başlatırlar. Enflamasyon; patojenleri direk yok etmeye yardım eden

proteinleri ve hücreleri kandan enfekte olmuş dokulara çekerek enfeksiyonla savaşmak için yararlıdır. Bununla beraber, enflamasyon enfekte dokudan lenf taşıyan mikropların ve antijen gösteren hücrelerin yakındaki lenfoid dokulara akışını artırır, burada lenfositleri aktive ederler ve edinsel bağışıklık tepkisini başlatırlar. Edinsel bağışıklık başlatıldığında, enflamasyon, edinsel bağışıklık sisteminin etkileyici bileşenlerini-antikor moleküllerini ve etkileyici (effector) T hücrelerini enfeksiyon bölgesine çeker (32).

Bağışıklık sisteminin hücreleri tüm vücuda dağılmış durumdadır ancak enfeksiyon durumunda bu hücreleri ve onların ürünlerini enfeksiyon bölgesinde yoğunlaştırmak gerekmektedir (33). Enflamasyon klinik olarak sıcaklık, ağrı, kızarıklık ve şişlik ile tarif edilir. Bu özelliklerden her biri bölgesel kan damarlarındaki sitokin veya diğer enflamatuvar aracılardan etkisini gösterir (32). Bu cevap sırasında üç önemli olay gerçekleşir:

- Enfekte olan bölgeye kan akışı artar.
- Endotel hücrelerinin geri çekilmesinden dolayı kapiller geçirgenlik artar. Bu durum, kapillerden normalden daha büyük hücrelerin geçişine izin verir ve böylece mediyatörlerin enfeksiyon bölgesine ulaşmasına imkan sağlar. Sıcaklık, kızarıklık ve şişlik enflamasyon sırasında kan damarlarındaki genişlemeden ve geçirgenliğin artmasından kaynaklanır. Bu da dokulara bölgesel kan akışının artması, doku sıvısı ve kan proteinlerinin sızmasına neden olur (32, 33).
- Lökositler venüllerden dışarıya, çevre dokulara göç ederler. Enflamasyonun erken safhalarında özellikle nötrofiller yaygındır fakat ileri safhalarda monositler ve lenfositler de enfeksiyon bölgesine doğru göç ederler (33).

Sitokinler ve kompleman sistemin parçalarının, kan damarlarını ayıran endotelyum üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Endotel hücrelerinin kendileri enfeksiyona cevap olarak sitokin üretirler. Proenflamatuvar sitokinler endotel hücrelerinin yapışkanlık özelliklerinde değişime neden olurlar. Böylece dolaşan lökositlerin endotel hücrelere yapışmasına neden olurlar ve onların arasında enfeksiyon bölgesine göç ederler ve burada kemokinler tarafından çekilirler. Dokulara hücrelerin göç etmesi ve onların bölgesel reaksiyonları ise ağrının nedenidir (32).

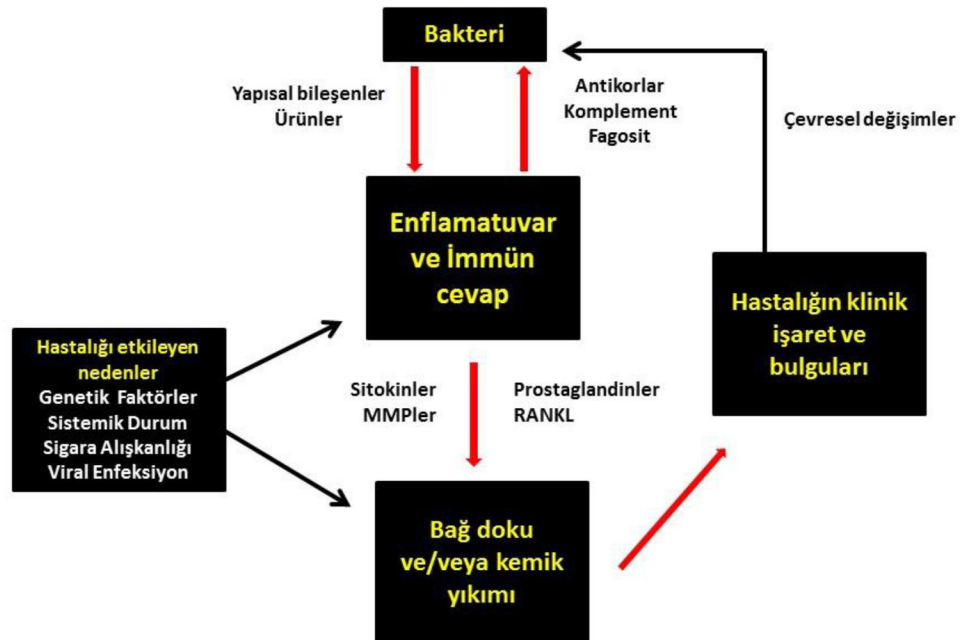
2.6. Periapikal Hastalığın Oluşmasında Bağışıklık Sisteminin Rolü

Apikal periodontitis asıl olarak kök kanal sistemindeki enfeksiyondan kaynaklanan mikrobiyal kökenli enflamatuvar bir hastalıktır. Periradiküler enflamasyonu kimyasal ve fiziksel faktörler de uyartabilir ancak oldukça fazla bilimsel kanıt apikal

periodontitisin çeşitli formlarının gelişmesine ve devamlılığına esas olarak endodontik enfeksiyonun neden olduğunu işaret etmektedir. Endodontik enfeksiyonun farklı tiplerinde 460'tan fazla bakteriyel tür tespit edilmiştir. Mantarların, arkeaların ve virüslerin de bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (2).

Apikal periodontitisin etiyolojisinde ekzojen ve endojen (konak kaynaklı) faktörler yer alabilir. Endojen faktörler hem konağın metabolik ürünlerini (ürat ve kolesterol kristalleri) hem de osteoklastları aktive eden sitokinleri ya da diğer enflamatuvar mediyatörleri içerirler (20).

Kök kanal sistemini enfekte eden bakteriler periradiküler doku seviyesinde enflamatuvar ve immün cevabı harekete geçirir. Bu cevaplar koruyucu ya da yok edici olabilir. Apikal periodontitis bağ dokusu ve kemik yıkımı sonucu gerçekleşir. Patolojik durum tarafından başlatılan çevresel değişimler intraradiküler bakteri topluluğunun yapısını ve virülansını etkileyebilir ve tehlikeli bir döngüyü başlatabilir (Şekil 2.1). Konağın bakteriyel enfeksiyona savunma cevabı genetik ya da sonradan kazanılan koşullarla değiştirilebilir. Bu faktörler hastalığın ilerlemesini, yapısını, şiddetini ve tedaviye cevabını etkileyebilir (2).



Şekil 2.1 Apikal periodontitis oluşum döngüsü (2).

Apikal periodontitisin önemli patolojik olaylarından biri kemik ve dental sert dokuların osteoklastik bozunumudur (27). Kemiğin yeniden modellenmesi iki tip hücrenin: kemik erimesinden sorumlu osteoklastlar ve vital kemik oluşumundan sorumlu osteoblastların koordine aktivitesini gerektirir. Osteoklast ve osteoblast aktivitesindeki dengesizlik osteoporoz gibi kemik hastalıklarına neden olur (34).

Osteoklastlar monosit/makrofaj kökenli, kemik matriksini bozan ve dinamik olarak iskeletin şeklini değiştiren çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklastların üretimi fizyolojik olarak osteoblastlar gibi mezenşimal hücreler tarafından desteklenmektedir, bu da osteoklast neslinin farklılaşması için gerekli sinyalleri sağlamaktadır (35). Periapikal lezyonlarda periapikal kemik yıkımı osteoklastlar tarafından gerçekleştirilir ve osteoklast aktivitesinin veya osteoklastogenezin regülasyonunun azalması doğrudan lezyon genişleme denetimini etkinleştirir ve sebep ne olursa olsun, osteoklast aktivitesi iskelet kütle kaybının ilerlemesini belirler (4, 36).

Bu lezyonlar, nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar ve mast hücreleri gibi enflamatuvar hücrelerin kalıcı göç ve infiltrasyonu ile karakterize edilir (8). Hücrel bağışıklık $CD4^+$ T hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkilidir ki bu hücreler proteik bakteriyel antijenlerle aktive olurlar. Aktive edilmiş $CD4^+$ T lenfositler antikor üretimini ve lokal enflamasyonu uyarırlar ve makrofaj ve nötrofillerin fagositoz ve öldürme etkilerini arttırırlar (2). T Lenfositler, periapikal enflamatuvar infiltrasyonda en yaygın hücrelerdir. Kök kanal sistemindeki enfeksiyonu sınırlayan ve aynı zamanda alveolar kemiğin tahribatına yol açan sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi ile ilişkilidirler (37).

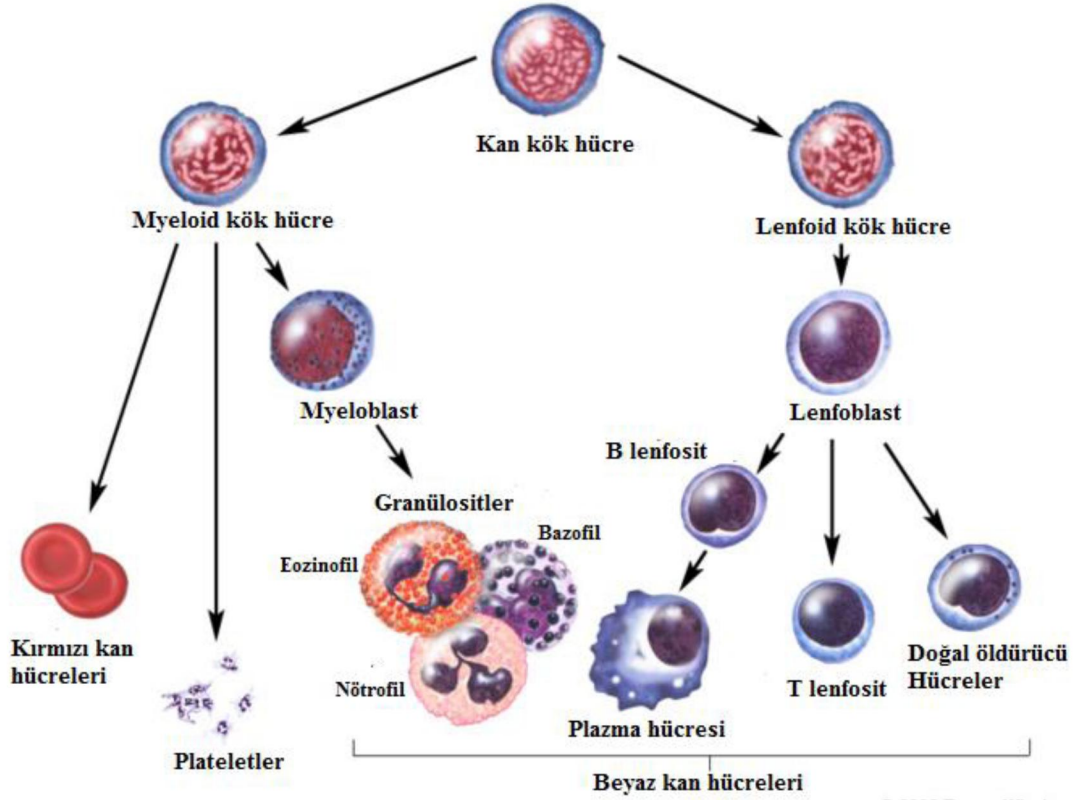
Kök kanal sistemindeki bir enfeksiyonun neden olduğu ve alveol kemiği kaybı ile sonuçlanan, insan periapikal lezyonlarında, daha yüksek IL-17 düzeyleri ile daha fazla sayıda nötrofil, asemptomatik lezyonlara göre semptomatik lezyonlarda daha fazla gözlenmiştir (38).

Buna ek olarak, IL-17 ifadesi dişeti oluşu sıvısı içerisinde sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında periodontitis hastalarının dokularında yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, IL-17'nin dentoalveolar enfeksiyon ve enflamasyonda proenflamatuvar bir rol oynadığını güçlü bir şekilde desteklemektedir (38).

2.6.1. Yardımcı T-17 (T helper-17 / Th17) Hücreleri

Edinsel bağışıklık cevabı T ve B lenfositlere dayalıdır (39). Lenfositler bağışıklık sisteminin bir parçası olan beyaz kan hücrelerinin bir türüdür. B hücreleri ve T hücreleri olmak üzere lenfositlerin iki ana tipi vardır (Şekil 2.2). B hücreleri, istila eden bakteri,

virüs ve toksinlere saldırmak için kullanılan antikoru üretirler. T hücreleri ise virüsler tarafından ele geçirilen veya kanserli olan vücudun kendi hücrelerini yok etmektedir (40). Büyük miktarda lenfosit her gün primer ya da merkezi lenfoid organlarında (timus ve doğum sonrası kemik iliği) üretilir (33).



Şekil 2.2. Bağışıklık sistemi hücrelerinin farklılaşma şeması (40).

CD4⁺ T hücreleri, adaptif bağışıklık cevabının önemli bir bileşenidir. Saf ve geleneksel CD4⁺ T lenfositler antijen ile ilk etkileşim süresince aldıkları sinyallere göre belirlenen 4 farklı hücre tipine dönüşmektedir. Bu 4 hücre popülasyonunu Th1, Th2, Th17 ve uyarılmış düzenleyici T hücreleri (Tregulator-Treg) oluşturmaktadır. (41).

CD4⁺ T lenfositleri şu yardımcı fonksiyonları gerçekleştirirler:

1) B hücrelerinin antijen üreten plazma hücrelerine dönüşmesine yardımcı olurlar;
 2) CD8⁺ T hücrelerinin etkinleştirilmiş sitotoksik T hücrelerine dönüşmesine yardımcı olurlar;

3) Makrofajların aşırı duyarlılığı geciktirme etkisine yardım ederler (örneğin, *Mycobacterium tuberculosis* ile enfeksiyonu sınırlar) (42).

Th hücreleri kazanılmış bağışıklığın yönetilmesinde önemli rol oynarlar. Bu

hücreler fonksiyonlarını çoğunlukla hedef hücreler tarafından etkinleştirilen ya da toplanan sitokin ve kemokinleri salgılayarak gerçekleştirirler (41). Şu ana kadar 200'ün üzerinde farklı insan sitokini tanımlanmıştır. İnsan genomu haritalandırma projesi, var olan sitokin gen ailelerinin yeni üyelerini ortaya çıkarmakta ve tamamen yeni aileleri tanımlamaktadır (33).

Th17 hücreleri ekstrasellüler bakteriler ve mantarlara karşı adaptif bağışık yanıtta aracılık ederler ve enflamatuvar/otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol alırlar. Gram pozitif ve Gram negatif türlerin ve mantarların da dâhil olduğu birçok patojen Th17 cevabını başlatabilir (43). Th17 hücreleri TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör-Alfa), IL-6 (44), IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 sitokinlerini salgırlar (41, 43).

Th17 hücreleri yüksek seviyelerde IL-23R üretimine neden olurlar. IL-23 başlangıçta Th17 hücreleri için farklılaşma faktörü olarak önerilmiştir, ancak farelerde yapılan bir çalışmada CD4⁺ saf T hücrelerinden Th17 farklılaşmasını başlatamamışsa da Th17 hücrelerinin yaşamını devam ettirmesi ve fonksiyonlarını sürdürmesi için kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Th17 hücre farklılaşması 3 safhadan oluşur.

1) IL-1 (45), TGF β (*transforming growth factor β* /dönüştürücü büyüme faktörü beta), ve IL-6 ya bağlı farklılaşma safhası, TGF β 'nin artması FoxP3 ifadesine ve Treg hücre neslinin uyarılmasına neden olur.

2) TGF β ile birlikte ek olarak proenflamatuvar sitokin IL-6'nın üretilmesi FoxP3 ifadesini ve Treg hücre neslini baskılar ve eş zamanlı olarak IL-17 üretimini uyarır bu da Th17 hücrelerinin farklılaşması ile sonuçlanır (46).

3) Farklılaşma sonrasında ise IL-21 vasıtasıyla çoğaltma safhası ve IL-23 sebebiyle dengeleme safhası ile Th17 hücreleri fonksiyonlarına devam ederler (41).

Kemik metabolizması açısından bakıldığında, *in vitro* çalışmalar Treg hücrelerinin güçlü osteoklast oluşumu ve fonksiyonunu bastırırken Th17 hücrelerinin, osteoklastogenezi teşvik ettiğini göstermiştir (47). *In vivo* çalışmalar, anti-Th17 tedavisinin murinlerdeki artritte eklem iltihabı, kıkırdak tahribatı ve kemik kaybını önlediğini göstermiştir (48).

Th17 hücrelerinin; IL-1, IL-6, IL-8/CXCL8 (kemokin (C-X-C motif) ligand 8) gibi sitokinlerin salgılanmasını uyararak esas proenflamatuvar sitokin IL-17'yi üretmesi polimorfonükleer lökosit ve mononükleer fagositlerin takviyesi ile sonuçlanır ve osteoklastogenezi artırır (49). Kemikte, IL-17 osteoklastları aktive edebilen Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa*) Ligandının (RANKL) osteoblastlarda sentezlenmesini indükleyebilir ve bu da kemik erimesini

tetikleyecektir (43). Th17 farklılaşmasının ve IL-17 ifadesinin en güçlü uyaranları IL-1 β ve IL-23'tür, bunlar ağırlıklı olarak bakteriyel moleküller ve proenflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilen dendritik hücreler tarafından üretilir (49). IL-23/Th17 yolunun insanlarda kronik enflamatuvar hastalıkların patofizyolojisinde etkili olduğu kayda değerdir (43).

2.6.2. İnterlökin 17 ve Reseptörü

IL-17, Rouvier ve ark. tarafından 1993 yılında tanımlanmış ve ilk olarak CTLA8 olarak isimlendirilmiştir (50). Th17 hücreleri, $\gamma\delta$ T (Gama Delta T) hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar da dâhil olmak üzere, çeşitli immün hücre tipleri tarafından salgılanan bir proenflamatuvar sitokindir (38). Birincil olarak T hücreleri tarafından üretilmesine rağmen, IL-17, açık bir şekilde doğal bağışıklık sisteminin birçok hücresi, özellikle granülosit kökenli hücreler, üzerinde güçlü etkisi olan ve bu nedenle doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık arasında önemli bir köprü molekül olarak göz önüne alınan bir sitokindir (8). İn vitro olarak fibroblastları, epitel hücrelerini, endotelial hücreleri ve osteoblastları; IL-6, IL-8, granülosit koloni-uyarıcı faktör ve matris metaloproteinaz gibi proenflamatuvar sitokinleri üretmeleri için aktive ettiği gösterilmiştir ve hatta enflamatuvar cevabın uyarılmasında önemli bir role sahiptir (41).

IL-17'nin osteoblastik hücrelerde RANKL başlatılması yoluyla osteoklastogenezi desteklediği bildirilmiştir (51). IL-17'nin şu anda kabul edilen CD4⁺ T hücrelerinin sınıflandırılmasına göre Th17'nin osteoklastogenik tek altkümüsi olduğu ve Th17 hücrelerinin osteoblastik hücrelerde RANKL' nin büyük bir olasılıkla IL-17 aracılığı ile başlatılması yoluyla osteoklastogeneze imkân sağladığını göstermektedir (35, 43).

IL-17 insanlarda romatoid artrit gibi birçok otoimmün ve enflamatuvar hastalığın ilerlemesinde güçlü bir rol alan proenflamatuvar işlevlerini temel olarak IL-17RA'ya bağlanarak gerçekleştirir (38). IL-17A, IL-17RA'ya yüksek affinite ile bağlanır (41). IL-17R bilinen herhangi bir sitokin reseptörü ile sekans (dizi) benzerliği olmayan tip-I transmembran bir proteindir. Hematopoetik dokularda yüksek miktarlarda olduğu ifade edilirken, osteoblastlarda, fibroblastlarda, epitelyal ve endotelial hücrelerde, B ve T lenfositlerde ve ayrıca sinoviyosit, kondrosit ve sinoviyal endotelial hücrelerde varlığı gösterilmiştir ve neredeyse tüm hücrelerde ve dokularda üretilmektedir (50, 52, 53). Dentoalveolar enflamasyon ve kemik kaybında IL-17RA sinyalinin kesin rolü hala net değildir (38).

2.6.3. İnterlökin 23 ve Reseptörü

IL-23, doğuştan ve kazanılmış bağışık yanıtta anahtar rol alan, IL-12 sitokin ailesinin bir üyesidir ve p40 ve p19 alt ünitelerden oluşan tip-I heterodimerik bir proteindir (54). İlk olarak Oppman ve ark. tarafından 2000 yılında keşfedilmiştir (55). Antijenlere karşı ilk aşamada üretilir ve lokal bağışıklık yanıtın harekete geçirilmesinde önemlidir. Bundan başka IL-23 doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunda T hücrelerinin çoğalmasında ve antikor üretiminin düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır. Ayrıca IL-23 hücre içi patojenlere karşı hücreyle taşınan bağışıklıkta önemli olan proenflamatuvar sitokinleri düzenler (56).

IL-23, p40 alt ünitesini paylaştığı ve reseptörlerinden birini IL-12 ile alt ünite (IL-12 β 1) oluşturduğu halde, IL-23 ve IL-12 seçmeli olarak sırasıyla Th1 ve Th17 polarizasyonunda kritik roller oynar (35). IL-23 esas olarak antijen sunan dendritik hücrelerden ve makrofajlardan salgılanır (57). İnsan dendritik hücrelerinin; CD4⁺ T hücrelerinin IL-17 salgılayan Th17 hücrelerine farklılaşmasını uyarmak için IL-1 β , IL-6, IL-23 ve TGF- β salgıladığı gösterilmiştir (58).

IL23/IL17 yolu kronik enflamatuvar insan hastalıklarında kayda değer bir şekilde aracılık etmektedir (43). IL-23, Th17 hücrelerinden IL-17 salgılanmasına neden olan birincil faktördür ve IL-23 eksikliğinde Th17 hücrelerinin gelişmesinde TGF- β ve IL-6'nın eksik kaldığı gösterilmiştir (59).

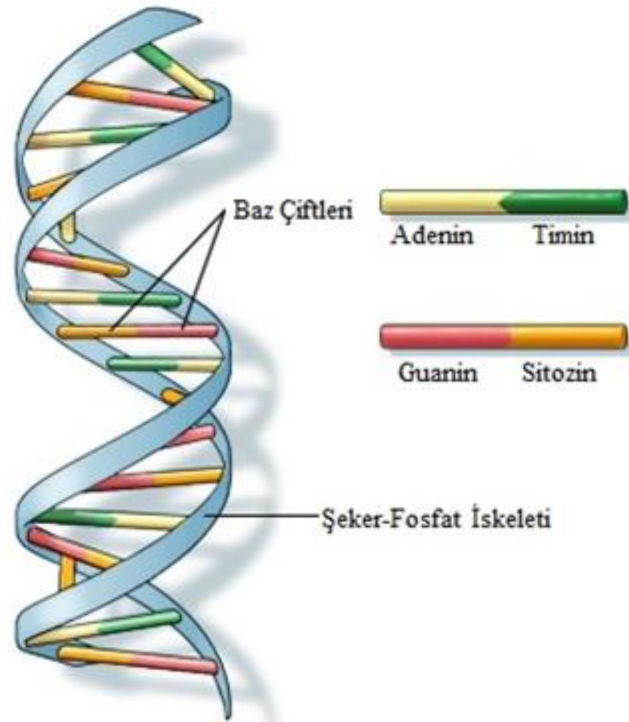
IL-23, IL-17 aracılı enflamasyonda Th17 hücrelerinin gelişmesini ve IL-17 salgılanmasını sağlayarak anahtar bir rol oynar ki bu fonksiyonunu bir heterodimerik reseptör kompleksi olan IL-23R ve IL-12R β 1 alt birimleri aracılığı ile gerçekleştirir (57, 60). IL-23R, IL-23 için özel iken IL-23R β 1 peptidi aynı zamanda IL-12 reseptörünün de parçasıdır (57, 61). IL-23R'ü IL-23p19 alt ünitesine bağlanan ekstrasellüler N-terminal immünoglobulin benzeri domain ve iki sitokin reseptör domaininden oluşur, hematopoetin reseptör ailesine mensuptur. IL-23R zinciri genelde aktive hafıza hücrelerinde olduğu gibi doğal öldürücü hücrelerde, monosit/makrofajlarda, dendritik hücrelerde (alt seviyelerde) sentezlenir (62).

IL-23'ün kolit, gastrit, psoriasis, romatoid artrit, Lyme artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, Crohn hastalığı, multiple skleroz gibi birçok otoimmün enflamatuvar hastalıkta aracı, kronik enflamasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (63).

2.7. DNA

DNA insanlarda ve neredeyse tüm diğer organizmalarda bulunan kalıtsal

materyaldir. Bir kişinin vücudundaki neredeyse tüm hücreler aynı DNA'ya sahiptir. DNA hücre çekirdeğinde bulunur ayrıca küçük bir miktar DNA mitokondrilerde de bulunur ve bu mitokondrial DNA olarak adlandırılır. DNA' da ki bilgi adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve timin (T) olarak adlandırılan 4 kimyasal bazda depolanır. İnsan DNA'sı yaklaşık olarak 3 milyar baz içerir ve %99'dan fazlası her insanda aynıdır. Bu bazların dizilmeleri, organizmanın yapılanması ve devamlılığını sürdürmesi için gerekli bilgiyi belirler. DNA baz çiftleri birbirlerine özeldir. A ile T, C ile G aralarında baz çiftlerini oluştururlar. Her bir baz ayrıca bir şeker molekülü ve bir fosfat molekülüne bağlanır. Bir baz, bir şeker ve bir fosfatın birlikte oluşturdukları yapı nükleotid olarak adlandırılır. Nükleotidler iki uzun tel üzerinde dizilerek çift heliks olarak adlandırılan bir spiral oluştururlar (Şekil 2.3). DNA'nın en önemli özelliği kopyalanabilmesi ya da kendini kopyalamasıdır. Bu kritiktir çünkü hücre bölünmesi sırasında yeni hücreye DNA'nın tamamen aynı olan kopyası böylece aktarılabilir (64).



DNA, baz çiftlerinin şeker-fosfat iskeletine bağlandığı çift heliks formundadır.

Şekil 2.3. DNA, baz çiftlerinin şeker-fosfat iskeletine bağlandığı çift heliks formundadır. Şekilde DNA'nın çift heliks yapısı görülmektedir (64).

2.8. DNA Dizisinde Meydana Gelen Mutasyonlar

DNA dizisinde kalıcı olarak meydana gelen değişimlere mutasyon adı verilir.

Mutasyonlar çevresel ya da hücrel etkenlerden kaynaklanabilirler. DNA'da mutasyona neden olabilen fiziksel ya da kimyasal ajanlar mutajenik olarak adlandırılırlar. Güneş ışığı, radyasyon, sigara kullanımı çevresel mutasyon nedenleri olabilirken, DNA'nın kopyalanması sırasında hücrede meydana gelen hatalar da toksik ürünlerin üretimine neden olabilirler (65). Mutasyonlar DNA'nın alternatif formları ile sonuçlanırlar ve bu durum genellikle DNA varyantları olarak bilinir. Bununla birlikte DNA'nın herhangi bir bölgesi için bir ya da daha fazla varyasyonun popülasyonda (sıklığının 0.01'den yüksek olması) yaygın olması durumunda bu varyasyonlar polimorfizm olarak tanımlanırlar. Toplumda sıklığı 0.01'den az olan DNA varyasyonları genellikle nadir varyasyonlar olarak adlandırılırlar (66). DNA dizisinde oluşabilen mutasyon türleri ise şöyledir:

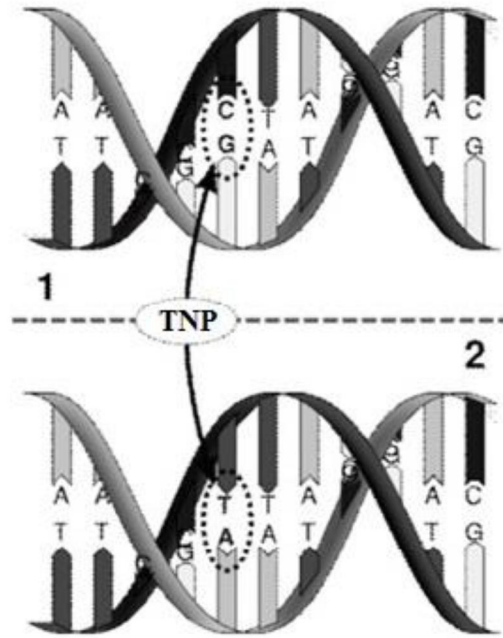
- a. **Sessiz mutasyonlar**; genin protein kodlaması sırasında 3 bazdan oluşan bir amino asit kodunda nokta mutasyon oluşmasına rağmen sentezlenen amino asitte değişimin olmadığı mutasyonlardır.
- b. **Missense (kayıp) mutasyonlar**; bir DNA baz çiftinin değişmesi ile DNA'nın üçlü kodunda oluşan değişikliğin kodlanan amino asidin farklılaşmasına neden olduğu mutasyonlardır ve böylece üretilen proteinde değişikliğe neden olan mutasyon tipidir.
- c. **Nonsense mutasyonlar**; yine bir DNA baz çiftinin değişmesi sonucu DNA'nın üçlü kodunda kodlanan amino asidin proteinin sentezlendiği DNA zincirine protein sentezinin durması için erken sinyal gönderilmesine neden olur (stop kodonu oluşur). Bu mutasyon türü daha kısa olan, yeterli fonksiyon gösteremeyebilen ya da hiç fonksiyon gösteremeyen bir protein üretimi ile sonuçlanır.
- d. **İnsersiyon**; DNA bazlarının sayısında oluşan değişimdir ve DNA zincirine farklı bir DNA parçası eklenir ve baz sayısı artar. Bu durumda üretilen protein fonksiyon gösteremeyebilir.
- e. **Delesyon**; DNA baz dizisinden bir parça DNA'nın kopması ile oluşan bu mutasyon sırasında DNA'dan ayrılan parça birkaç bazlık olabileceği gibi tüm geni içine alan ya da komşu genleri de içine alan daha geniş kayıplar da olabilir.
- f. **Duplikasyon**; kromozomun kopyalanması sırasında aynı DNA parçasının anormal şekilde bir ya da daha fazla kopyasının DNA zincirine eklenmesidir.

- g. Çerçeve kayması;** bu mutasyon genin protein sentezi aşamasında DNA'nın üçlü kodunun okunması sırasında DNA bazlarındaki eklenme ya da azalma yani bu üçlü kodun kayması sonucu oluşur. Böylece bazların gruplanması ve amino asit kodu değişir ve oluşan protein genelde fonksiyonel değildir. İnsersiyon, delesyon ve duplikasyon çerçeve kayması mutasyonuna neden olabilirler.
- h. Tekrarlayan uzama;** kısa DNA dizilerinin tekrar etmesi ile oluşan bu mutasyon türünde sentezlenen protein uygun olarak çalışmayabilir (10).

2.9. Polimorfizm

Bir popülasyonda farklı bireyler arasındaki DNA'nın kodlanan ya da kodlanmayan dizilerindeki varyasyonlar polimorfizm olarak adlandırılır (39).

Tek nükleotid polimorfizmi ise (TNP) Adenin (A) gibi tek bir nükleotit yerine diğer üç nükleotitten birinin, Sitozin (C), Guanin (G), Timin (T), geçmesi ile (Şekil 2.4) yani belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotidin değişikliği ile oluşan bir varyasyondur (39, 67).



Şekil 2.4. Tek nükleotid polimorfizmi (68).

TNP, insan DNA dizisinde en çok rastlanılan genetik varyasyondur ve insan genomunda birkaç milyon TNP belirlenmiştir. TNP'lerin diyabet, kalp hastalıkları ve

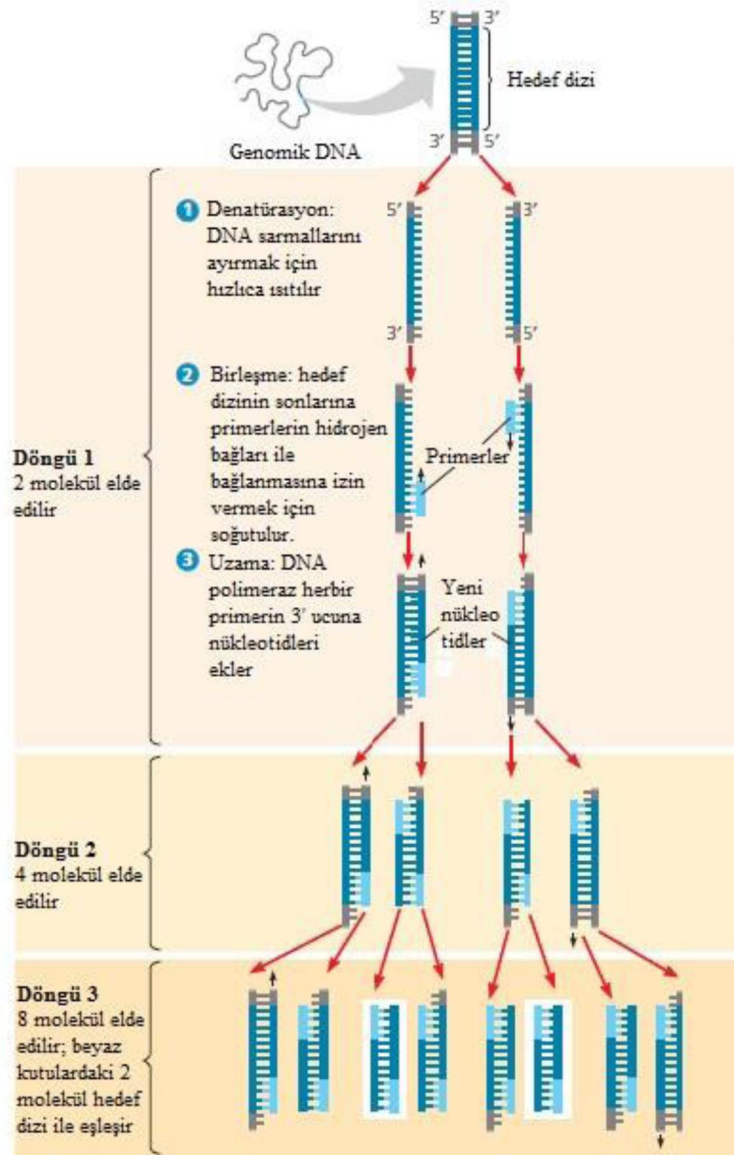
birçok kanser türü ile bağlantılı oldukları bulunmuştur (39, 67).

2.10. Alel

Bir genin alternatif versiyonları alel olarak adlandırılır. Her birey biri anne diğeri babadan olmak üzere bir genin iki kopyasını yani iki alel taşır. Bu iki alelin farklı olması durumunda fenotipte görünen alel dominant, diğeri ise çekinik olarak adlandırılır (39).

2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR/Polymerase Chain Reaction) 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen devrim niteliğinde bir yöntemdir. PCR, DNA'nın polimeraz yeteneğini kullanarak, sunulan şablon sarmalına tamamlayıcı yeni DNA dalı sentez etmek için kullanılır. DNA polimeraz sadece önceden var olan 3'-OH grubunun üzerine nükleotid ekleyebildiğinden, ilk nükleotidi eklenebileceği bir primere ihtiyacı vardır (Şekil 2.5). Bu gereklilik araştırmacının yükseltmek istediği şablon sekansın belirli bir bölgesinin betimlenmesini mümkün kılar. PCR reaksiyonunun sonunda, spesifik sekansın milyarlarca kopyası (amplikonlar) birikmiş olacaktır (69).



Şekil 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonunda gerçekleşen döngülerin şema halinde anlatımı (39).

Kuantitatif PCR (qPCR), gerçek zamanlı PCR olarak ta bilinmektedir, nükleik asitlerin çoğaltma, belirleme ve miktar ölçümü için güçlü bir araç olmuştur. Genleri sayıca ve spesifik olarak tespit etme özelliği hem araştırma hem de tanı uygulamalarında paha biçilemez olmuştur. Tespit etmenin anahtarı, DNA çoğaltımının gidişatını takip eden fluoresan bildirme molekülüdür. Sinyal üretiminin tipine bağlı olarak, bildirme molekülü genellikle prob olarak bahsedilen fluorejenik olarak etiketlenen oligonükleotit ya da basit fluorejenik DNA-bağlama boyası olabilir (70).

2.12. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM)

DNA'nın erime ve ortamda bulunan primerler ile birleşebilme ve tekrar ayrılma özellikleri birçok klinik, genetik ve adli testlerin geliştirilmesini sağlamıştır. DNA tespiti ve tanımlanması için çeşitli nükleik asit ve sinyal amplifikasyon yöntemleri kullanan köklü teknolojiler DNA'nın hibridizasyon özelliğine bağlıdır (71). DNA'nın hibridizasyonu; tek iplikli nükleik asit moleküllerinin tamamlayıcı dizileri ile uygun koşullar altında kendiliğinden eşleşerek çift iplikli hibrid moleküller (melezler) oluşturma özelliğine dayanır.

HRM (High Resolution Melting) analizi DNA analizinde kullanılan yeni bir metottur. Genotiplendirme, mutasyon taraması ve dizi eşleştirme analizleri için basit ama etkili bir yöntem olmasından dolayı popüleritesi artmaktadır. Bu metot ile PCR amplifikasyonu tamamlandıktan sonra PCR'yi engellemeyen doymuş boya floresanları tarafından izlenen erime eğrileri ortaya çıkarılabilmektedir (72).

Amplikonların HRM analizi, doymuş DNA bağlama boyalarının varlığında DNA erimesine bağlıdır. Solüsyonun sıcaklığı artırıldığında amplikonun spesifik sekansı (özellikle GC kısmı ve uzunluğu) erime tavrını belirler. Floresan sinyalinin sıcaklığa bağlı olarak grafiği çizdirildiğinde, çift bağlı DNA tek bağlı DNA'ya dönüştüğünde floresan şiddeti azalır ve boya serbest bırakılır. Erime eğrisinin türevi alınarak DNA'nın % 50'sinin çift bağlı olduğu durumdaki erime sıcaklığının (T_m) yaklaşımı yapılabilir. Erime eğrisinin benzersiz şekli, türev grafiği veya farklılık grafiği amplikon analizi için kullanılabilir (71).

Genotipleme için küçük amplikonların kullanılması, primerler TNP'lere olabildiğince yakın seçildiği için, analiz tasarımını kolaylaştırır. Amplikonların büyüklükleri azaldıkça genotipler arasındaki T_m farklılıkları artar böylece daha iyi ayırt etmeye izin verir (71).

HRM isteğe bağlı serbestleşen EvaGreen (EG) gibi boyalar kullanarak psödo genlerin ya da alelik varyantların ilgilenilen bölgeye yakın bir uzaklıkta olması nedeniyle genotipin yorumlanmasının karmaşık olduğu durumlarda kompleks genotipleri çözmek için potansiyele sahiptir (73). EG yeni geliştirilen DNA bağlama boyasıdır, yakın zamanda qPCR, PCR sonrası DNA erime eğim analizi ve diğer birçok uygulamalarda kullanılmıştır (70).

2.13. Amaç

Kişiler arasında bağışık yanıtta farklılıklar olması, genetik faktörlerin etkilerinin bu farklılıklara neden olabileceğini işaret etmektedir. Tek nükleotit polimorfizmi, DNA dizisindeki tek bir bazın değişiminden kaynaklanan ve en sık karşılaşılan DNA varyasyonudur. Bu varyasyonlar genin fonksiyonlarını değiştirebilirler. Varyasyonların bilinmesi, hastalıkların teşhisi, önlenmesi ve tedavisinde önemli olabilmektedir.

Tek nükleotid polimorfizmiyle meydana gelen kısa varyasyonla, kemik yıkımı ve periapikal lezyon oluşumu değişir mi? Apikal periodontitis hastalığına genetik yatkınlık var mıdır? Aklımızdaki bu sorular ve edindiğimiz bilgilerden yola çıkarak bu çalışmanın amacı sağlıklı bireylerde; periapikal alanlarda lezyon oluşumunda IL-17 (rs8193037), IL-17 Reseptörü (IL-17R) (rs9606615), IL-23 (rs184428061) ve IL-23 Reseptörü (IL-23R) (rs753051) gen polimorfizmlerinin etkilerinin araştırılmasıdır.

Literatürün geniş bir taraması ve planladığımız çalışma doğrultusunda; “IL-17, IL-23, IL-17R ve IL-23R gen polimorfizmleri; derin çürüklerden etkilenen dişlerde kemik yıkımının ve periapikal lezyonun oluşumuna etki eder” hipotezi kurulmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hasta Seçimi

İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim dalına başvuran hastalar arasından çalışma için belirlenen ölçütlere uygun 123'ü kadın, 96'sı erkek toplam 219 hasta çalışmaya dâhil edildi. Helsinki Deklarasyonu etik kurallarına uygun olarak gerçekleştirilen bu çalışma, Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 16.04.2014 tarihli ve 2014/66 no'lu kararı ile onaylandı. Çalışmaya katılan tüm bireylere araştırma öncesinde araştırmanın amacı ve yöntemine ilişkin ayrıntılı bilgi verildikten sonra Etik Kurul tarafından kabul edilmiş olan "*Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu*" ile bireylerin onayı alındı.

Tıbbi hikâyesinde herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, 18-65 yaş arası bireyler çalışmaya dâhil edildi. Hastaların yaş, cinsiyet, iletişim bilgileri ve sağlık geçmişi bilgileri forma not edildi. Hastaların ağız içi ayrıntılı muayenelerinin tamamlanması ve panoramik röntgen filmlerinin incelenmesi sonrasında derin çürük olan dişleri tespit edildi. Ağız içi muayene bilgileri (diş eksiklikleri, önceki restorasyonları, önceki kök kanal tedavileri, tedavi ihtiyacı olan dişleri) hazırlanan forma diğer bilgilerle birlikte not edildi.

Araştırmanın deney grubu; derin çürük tespit edilen diş/dişlerinde periapikal kemik yıkımı olan ($PAI \geq 3$) ve termal ile elektrik pulpa testlerine negatif yanıt veren bireylerden oluşturuldu. Kontrol grubuna ise derin çürük tespit edilen, termal ile elektrik pulpa testlerine pozitif yanıt veren, periapikal dokuları sağlıklı olan ($PAI \leq 2$) diş/dişleri olan sağlıklı bireyler dâhil edildi. Hem deney hem de kontrol gruplarının şartlarını aynı anda sağlayan dişleri tespit edilen hastalar çalışmaya dâhil edilmedi.

Hasta sayısı; %90 güç ile $\alpha=0.05$ 1. tip hata düzeyinde 2 grubu mutasyon görülme açısından karşılaştırmak için grup başına gerekli minimum hasta sayısı 79 olarak hesaplandı. Çalışma süresince toplam 219 (123 kadın, 96 erkek) hastadan alınan örnekler üzerinde çalışıldı. Bu doktora tez çalışması kapsamında moleküler analizler için İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırma laboratuvarı kullanıldı.

3.2. Örneklerin Toplanması

Hastalardan örnek alma işlemi; genomik DNA'nın izolasyonu için temin edilen bukkal hücre kitinin içerisinde bulunan bukkal toplama fırçalarının, hastaların bukkal

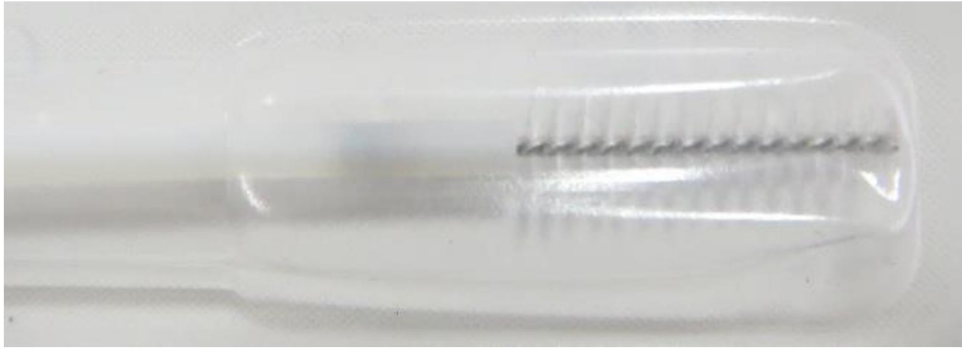
mukozalarına 10 kere sürülmesi yolu ile elde edildi. Daha sonra fırçalar 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri içerisine yerleştirildi. Fırçaların tüpün dışında kalan sap kısımları steril bir makas yardımı ile kesilerek uzaklaştırıldı. Örneklerin içerisinde bulunduğu 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri etiketlendikten sonra +2/+8 °C arasında Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalında buzdolabında muhafaza edildi. Bu şekilde örnekler kullanım klavuzuna uygun olarak en fazla bir ay süreyle saklandı. DNA izolasyon protokolüne göre örneklere 300 µl Cell Lysis solüsyonu eklendi ve bu şekilde muhafaza edilmesi (protokole göre 2 yıla kadar) tercih edildi. Toplanan örneklerin analizi bir yıl içerisinde tamamlandı. Bu aşamadan sonra örnekler İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunan buzdolabında (+2/+8 °C) muhafaza edildi.

3.3. Genomik DNA'nın İzolasyonu:

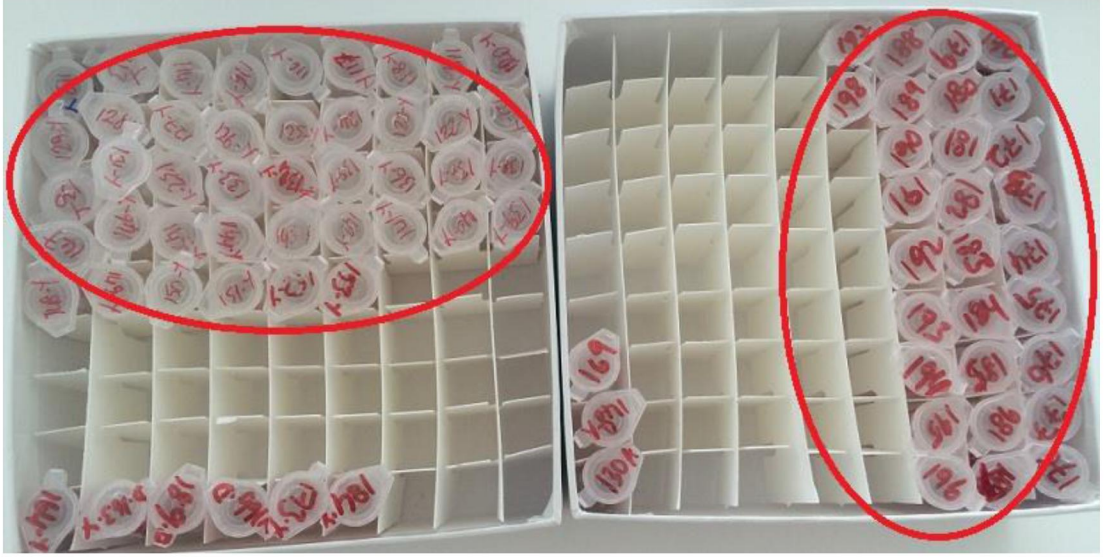
Hastaların ağız içi bukkal mukozalarından sürüntü yoluyla örnek alınması işlemi takiben genomik DNA'nın izolasyon işlemi Gentra Puregene Bukkal Hücre Kiti (QIAGEN, USA, Kat. no: 158845) kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan protokol aşamaları aşağıda açıklanmıştır:

- 1) Bukkal hücreleri toplamak için, bukkal toplama fırçası (Şekil 3.1) ağız içine 10 kere kuvvetlice sürülür. Bu aşamada bukkal epitel hücreleri fırçaya yapışır.
- 2) Steril makas kullanılarak toplama fırçası sapından ayrılır ve ayrılmış fırça tepesi 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilir (Şekil 3.2). Tüpe 300 µl Cell Lysis (Hücre Lizis) solüsyonu eklenir. Bu aşamada fırçadaki epitel hücreleri parçalanmaya başlayarak açığa çıkan DNA saklanmak üzere stabilize olur.
- 3) 65 °C'de su banyosunda 60 dakika inkübe edilir. Bu aşamada epitel hücrelerin parçalanması tamamlanır, olası DNaz enzimleri sıcaklıkla bozunur. Toplama fırçası tepesi hücre lizis solüsyonundan çıkarılır, tepe tüpün yanlarına sürtülerek olabildiğince fazla sıvının tüpte kalması sağlanır.
- 4) RNA'ları (Ribonükleik asit) uzaklaştırmak için 1,5 µl RNase A (Ribonükleaz A) solüsyonu eklenir ve tüp 25 kere ters-düz çevrilerek karıştırılır. 37 °C'de 15 dk. inkübe edilir. Örnek hızla soğuması için buzda 1 dk. bekletilir.
- 5) 100 µl Protein Precipitation (Protein Çöktürme) solüsyonu eklenir ve yüksek hızda (16000 x g) 20 sn. santrifüj (SİGMA 1-14, Almanya) edilir.
- 6) Tüpler buzda 5 dk. inkübe edilir.
- 7) Tüpler 13000-16000 x g'de 3 dk. santrifüj edilir.

- 8) 300 µl isopropanol ve 0,5 µl *Glycogen* (Glikojen) Solüsyonu yeni bir 1,5 ml mikro santrifüj tüpünde karıştırılır ve bir önceki adımda santrifüjden sonra elde edilen süpernatant (sıvı kısım) dikkatlice yeni tüplerin içerisine eklenir (Şekil 3.3).
- 9) Her tüp 50 kere nazikçe ters-düz çevrilerek karıştırılır.
- 10) Tüpler 13000-16000 x g'de 3 dk. santrifüj edilir.
- 11) Süpernatant dikkatlice bir pipet yardımıyla atılır ve temiz bir emici havlu üzerine ters çevirerek geride kalan sıvı boşaltılır, pellet'in tüpün içinde kalması sağlanır.
- 12) % 70v/v Etanol'den 300 µl tüplere eklenir ve DNA'yı yıkamak için tüpler birkaç defa ters-düz çevrilir.
- 13) Tüpler 13000-16000 x g'de 1 dk. santrifüj edilir.
- 14) Süpernatant dikkatlice bir pipet yardımıyla atılır. Temiz bir emici havlu üzerine ters çevirerek geride kalan sıvı boşaltılır, pellet'in tüpün içinde kalması sağlanır. 5 dk. boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.
- 15) Her tüpe 100 µl DNA Hydration solüsyonu (DNA'nın uygun koşullarda saklanması için kullanılan tamponlayıcı solüsyon) eklenir ve artan hızda 5 sn. süre ile vorteks (MIXER UZUSIO VTX-3000L, Japonya) yardımıyla karıştırılır.
- 16) DNA'nın çözünmesi için tüpler 65 °C su banyosunda 1 saat inkübe edilir.
- 17) Tüm tüpler nazik sallamayla (120 rpm) oda sıcaklığında bir gece (12-18 saat) inkübe edilir. Sızıntıyı önlemek için tüp kapağının sıkıca kapalı olduğundan emin olunur. Örnekler 10 sn. santrifüj edilip saklama tüplerine transfer edilir.



Şekil 3.1. Bukkal toplama fırçası.



Şekil 3.2. Bukkal toplama fırça tepeleri 1,5 µl'lik mikro santrifüj tüpünde etiketlenerek muhafaza edildi. Her bir hastanın dosyasına verilen numara tüplerin üzerine yazıldı.



Şekil 3.3. Yeni 1,5 µl'lik mikro santrifüj tüplerine alındı. Beyaz ok ile çift sarmallı DNA örneklerinin hastanın dosya numarası ve içeriğini (DNA) belirtilecek şekilde etiketlenmesi gösterilmektedir.

3.4. dsDNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi:

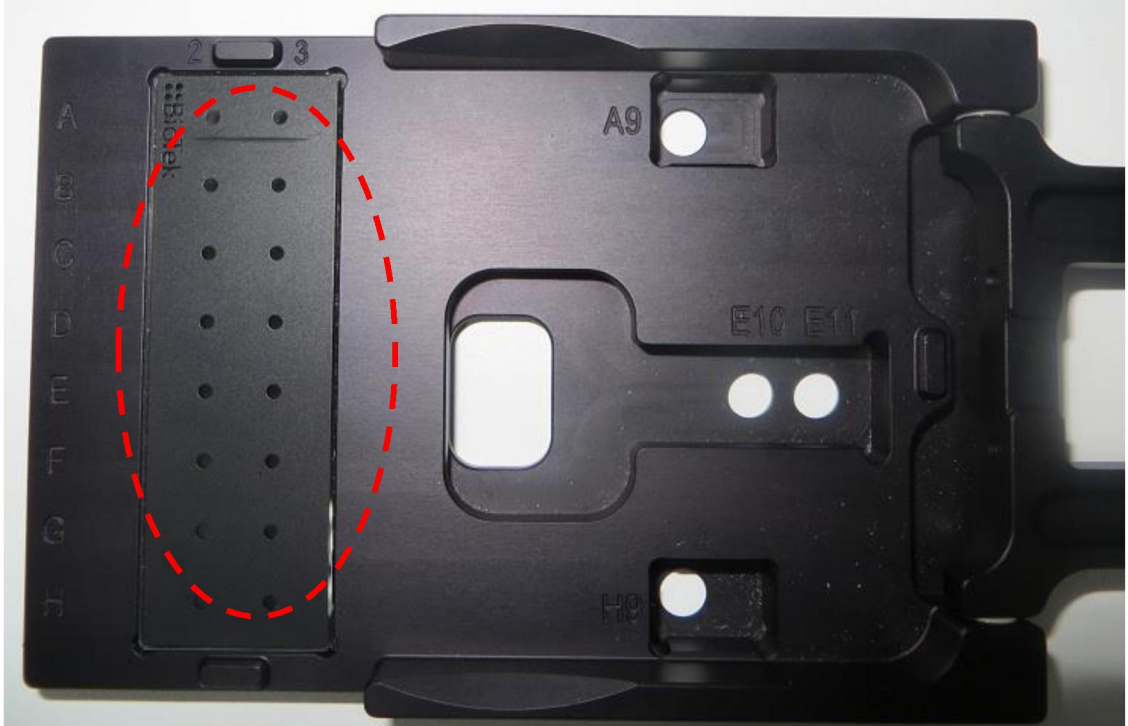
Genomik DNA'nın izolasyon işleminin ardından dsDNA (double strand-çift sarmallı) miktar ve kalitesinin belirlenmesi için 260nm/280nm dalga boyunda absorbans oranları ölçüldü (Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre (BioTek, USA)) (Şekil 3.4). Elde edilen dsDNA miktarı ölçümünde 260nm'de 1,0 absorbans okuması, çift sarmallı DNA için 50µg/ml'ye denk gelmektedir. Kullandığımız cihaz ve yazılım bu oranı kullanarak absorbans değerlerinden konsantrasyonu hesaplamaktadır. Saflaştırılmış genomik DNA'nın 260nm/280nm absorbans oranında 1.8 ve 2.0 aralığında olması genomik DNA saflığı olarak kabul edildi (74).

Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre kullanılarak dsDNA miktar ve kalite ölçümü yapmak için A, B, C, D, E, F, G, H bölmelerinden oluşan ve her bir bölümünde iki kuyucuk bulunan cihaza ait özel tabla kullanıldı (Şekil 3.5). Epoch cihazının bağlı olduğu bilgisayarda bulunan Gen5 2.00 (BioTek, USA) programında '*Nucleic acid quantification*' seçeneği dsDNA miktarını ölçmek üzere seçildi.

Bilgisayar programı hazır hale geldikten sonra cihazın işlem sırasında kalibrasyonunun gerçekleştirilmesi için tablanın ilk bölümünün (A) iki kuyucuğuna 2 µl DNA Hydration solüsyonundan eklendi. Diğer bölmelerin her birine (B-H) farklı DNA örnekleri duplike olarak 2'şer µl olacak şekilde yerleştirildi ve özel tablanın kapağı kapatıldı. Tabla cihaz içerisindeki özel bölümüne doğru oryantasyon ile yerleştirildi. Cihazın bağlı olduğu bilgisayar yardımı ile okuma işlemi başlatıldı. Cihazın okuma işlemi tamamlandığında sonuç konsantrasyonlar (µg/ml) Microsoft Excel programına kaydedildi (Şekil 3.6). Gerekli görülen durumlarda ölçümler tekrarlandı ve PCR ve HRM analizleri için yeterli miktar ve saflıkta olmayan örnekler çalışmaya dâhil edilmedi.



Şekil 3.4. Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre (BioTek, USA).



Şekil 3.5. Epoch çift ışınlı taramalı spektrofotometre cihazı için kullanılan A, B, C, D, E, F, G, H bölmelerinden oluşan ve her bir bölmesinde iki kuyucuk bulunan özel tabla (BioTek, USA).

	A	B	C	D	E	F	G
1	Sample Results						
2							
3	Sample Type	dsDNA					
4	Sample Read	2					
5	Date	22.5.2015					
6	Time	14:53:07					
7							
8				2	3		
9				0,029	0,03	260	
10				0,018	0,019	280	
11				1,61	1,591	260/280	
12				28,844	30,187	µg/mL	
13				0,014	0,015	260	
14				0,008	0,009	280	
15				1,699	1,711	260/280	
16				13,894	15,116	µg/mL	
17				0,027	0,028	260	
18				0,016	0,016	280	
19				1,706	1,718	260/280	
20				26,865	27,559	µg/mL	
21				0,051	0,048	260	
22				0,036	0,034	280	
23				1,406	1,409	260/280	
24				50,807	48,092	µg/mL	
25				0,17	0,125	260	
26				0,116	0,08	280	
27				1,469	1,565	260/280	
28				170,085	125,172	µg/mL	
29				0,07	0,049	260	
30				0,035	0,031	280	
31				2,009	1,575	260/280	
32				69,784	48,87	µg/mL	

Şekil 3.6. Spektrofotometre ile ölçülen dsDNA miktarlarının Microsoft Excel programına kaydedilen sonuçlar gösterilmektedir. Mavi oklar her bir bölme, beyaz oklar ise her bir bölmenin iki kuyucuğunu göstermektedir.

3.5. Hastalarda araştırılacak TNP'lerin belirlenmesi

Hastalardan elde edilen bukkal hücrelerin genomik DNA'ları üzerinde hangi TNP'nin araştırılacağıın tespiti sırasında kaliteli ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek adına HRM analizinin ölçütleri dikkate alındı.

(a) çalışılacak DNA bölgesinin PCR ürününün yaklaşık 80-100 baz uzunluğunda olması

(b) çalışılmak istenen DNA bölgesinde araştırılmak istenen TNP haricinde farklı TNP'lerin olmaması,

(c) belirlenecek olan TNP'lerin sınıfı, (Sınıf 1 ve 2 TNP'leri HRM analizi ile tespit etmek daha kolaydır ve daha zor ayırt edilen Sınıf 3 ve 4 TNP'ler ile karşılaştırıldığında insan genomunda daha yüksek bir oranda gözlenirler (Tablo 3.1).

(d) belirlenecek olan TNP'lerin türü (intron varyant gibi), dikkatle incelendi (75).

Bu çalışmada IL-17A, IL-17RA, IL-23A ve IL-23R genlerinin her biri için araştırılacak TNP'ler şunlardır:

1. IL-17A için belirlenen TNP: rs542129933'dir. Mutasyon türü intron varyanttır. Sınıf 1 bir TNP'dir (baz değişimi C/T).

AGAGCAATTCTCAAA[C/T]TTTCTACAGATTTCT

2. IL-17RA için belirlenen TNP: rs562543976'dır. Mutasyon türü intron varyanttır. Sınıf 1 bir TNP'dir (baz değişimi A/G).

AAAGAAAGAAAACAC[A/G]TCCTTCAAATTTCTG

3. IL-23A için belirlenen TNP: rs180825144'dür. Mutasyon türü upstream varyant 2kb'dir. Sınıf 1 bir TNP'dir (baz değişimi A/G).

CTAATAGGGGGCATC[A/G]GGTAGGAATCAAAC

4. IL-23R için belirlenen TNP: rs10489630'dur. Mutasyon türü intron varyanttır. Sınıf 2 bir TNP'dir (baz değişimi G/T).

AGAACTATAGAAAAC[G/T]GACAACTAAATTATC

Tablo 3.1. İnsan genomunda bulunan Tek Nükleotit Polimorfizmleri, bunların sınıflandırılması, her sekans varyantının iki homozigot nüfus arasındaki beklenen erime sıcaklık (T_m: temperature of melting) değerleri ve onların yüzde oluşumu

Tek nokta mutasyon sınıflaması	Baz değişimi	Tipik erime sıcaklığı (T _m) eğri değişimi	İnsan genomunda teorik oluşum oranı
Sınıf 1	C/T ve G/A	Geniş (>0.5, ortalama 1.0 °C)	%64
Sınıf 2	C/A ve G/T	Geniş (>0.5, ortalama 1.0 °C)	%20
Sınıf 3	C/G	Küçük (0.2-0.5 °C)	%9
Sınıf 4	A/T	Küçük (0.2-0.5 °C)	%7

3.6. Primerler'in Tasarlanması

Polimeraz zincir reaksiyonu öncesinde IL-17A, IL-17RA, IL-23A ve IL-23R genlerinin TNP'lerinin tespiti için gerekli olan primerler tasarlandı.

Her bir TNP için primerlerin istenilen performansta çalışmama olasılığı göz önüne alınarak toplam 3 farklı primer tasarlandı. Her bir primer 5' 3' doğrultusunda ileri (forward) ve geri (reverse) olmak üzere iki farklı baz dizisinden oluşmaktadır. Dizayn aşamasında NCBI internet sitesinin primer oluşturmak için tasarlanmış olan Primer BLAST internet sayfası kullanıldı (76).

Primer BLAST internet sayfasında kullanılmak istenen primerlerin özelliklerinin tanımlanması sonrasında verilen kriterlere uygun olarak insan genomunu tarayan program tarafından otomatik olarak tasarlanan primerler kaydedildi. HRM reaksiyonlarında kullanmak üzere tasarlanan primerler Tablo 3.2. belirtilmektedir.

Tablo 3.2. Tasarlanan primerlerin baz dizileri, baz sayıları, saflıkları, ait oldukları genler ve TNP'leri görülmektedir.

GENLER	PRİMERLER	PRİMERLERİN UZUNLUKLARI	SAFLAŞTIRMA	
IL23R TNP ID: rs10489630	Primer 1	<i>Forward primer (5'__3')</i> CCCTCACTGGGAGCTTCATT <i>Reverse primer (3'__5')</i> AGTGCTGATTGCATGGAAAGAT	20 Baz 23 Baz	HPLC
	Primer 2	<i>Forward primer (5'__3')</i> CCTCACTGGGAGCTTCATTG <i>Reverse primer (3'__5')</i> GTGCTGATTGCATGGAAAGATAA	21 Baz 24 Baz	
	Primer 3	<i>Forward primer (5'__3')</i> TGGGAGCTTCATTGGATGTC <i>Reverse primer (3'__5')</i> AGTGCTGATTGCATGGAAAGATAA	21 Baz 25 Baz	HPLC
	Primer 1	<i>Forward primer (5'__3')</i> ACTGAGAAAAAGAAGCCCGTT <i>Reverse primer (3'__5')</i> TCTCCAATAGGATGGTGAGC	21 Baz 21 Baz	
	Primer 2	<i>Forward primer (5'__3')</i> ACTGAGAAAAAGAAGCCCGTTT <i>Reverse primer (3'__5')</i> CCCAATAGGATGGTGAGCTGT	22 Baz 21 Baz	HPLC
	Primer 3	<i>Forward primer (5'__3')</i> AACTGAGAAAAAGAAGCCCGTT <i>Reverse primer (3'__5')</i> GATGGTGAGCTGTTGCAATG	22 Baz 21 Baz	
IL17A TNP ID: rs542129933	Primer 1	<i>Forward primer (5'__3')</i> TACCAGTCAAACCTGGAAGGA <i>Reverse primer (3'__5')</i> CTGTCTGTGCTTGGTTAAAGA	21 Baz 22 Baz	HPLC
	Primer 2	<i>Forward primer (5'__3')</i> ATTACCAGTCAAACCTGGAAGGA <i>Reverse primer (3'__5')</i> TGTCTGTGCTTGGTTAAAGAAA	23 Baz 23 Baz	
	Primer 3	<i>Forward primer (5'__3')</i> TACCAGTCAAACCTGGAAGGAC <i>Reverse primer (3'__5')</i> CTGTCTGTGCTTGGTTAAAGAAA	22 Baz 24 Baz	HPLC
	Primer 1	<i>Forward primer (5'__3')</i> CAGAGATAGACAGCTCTGGGC <i>Reverse primer (3'__5')</i> CCTCCCCTCACTATACCACATT	21 Baz 22 Baz	
	Primer 2	<i>Forward primer (5'__3')</i> TCTTCTCCAGAGATAGACAGCTC <i>Reverse primer (3'__5')</i> TCCCCTCACTATACCACATTGC	23 Baz 22 Baz	HPLC
	Primer 3	<i>Forward primer (5'__3')</i> AGCTTCTTCCAGAGATAGACAG <i>Reverse primer (3'__5')</i> CCTCACTATACCACATTGCATCC	23 Baz 23 Baz	

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi

IL-17A, IL-17RA, IL-23 ve IL-23R genlerinin araştırdığımız TNP'lerini tespit için PCR ve HRM analiz kiti (Type-it HRM PCR Kit, Qiagen, USA Katalog numarası: 206544) kullanıldı. Protokolü aşağıda belirtildi.

1. x HRM PCR Master Mix, primer solüsyonları, RNase içermeyen su, şablon DNA'lar ve kontrol DNA'ları kullanılmadan önce vorteks yardımıyla kısaca karıştırılır. Solüsyonlar kullanılmadan önce tamamıyla karıştırılmış olması önemlidir.
2. PCR Reaksiyon karışımı Tablo 3.3'e göre hazırlanır.
3. Reaksiyon karışımı iyice karıştırılır, uygun hacimlerde PCR tüplerine (şekil 3.7. ve şekil 3.8.) boşaltılır.
4. Eşit miktar ve hacimlerde şablon DNA'lar (2 μ l genomik DNA, her bir örnek için eşit miktarda) tekli PCR tüplerine eklenir ve iyice karıştırılır. Yeterli miktarda DNA eklenmelidir ki bütün örnekler 30'un altında C_T (Döngü Eşiti) değeri gösterebilir. Örnekler üç C_T değerinden daha fazla farklılık göstermemelidir.
5. Rotor Gene Q PCR cihazı (QIAGEN, Dusseldorf, Almanya) (gerçek zamanlı döndürücü) (şekil 3.9) işlem için Tablo 3.4 de gösterilen şekilde programlanır.
6. PCR tüpleri gerçek zamanlı döndürücüye yerleştirilir, PCR döngü programı ve ardından HRM analizi başlatılır.
7. Data analizi yapılır.

Tablo 3.3. Her bir örnek için PCR reaksiyon bileşen miktarları.

Bileşenler	25 µl Reaksiyon Hacmi	10 µl Reaksiyon Hacmi	Son Konsantrasyon
Reaksiyon karışımı			
2 x HRM PCR Master mix	12.5 µl	5.0 µl	1x
10 µM primer karışımı	1.75 µl	0.7 µl	0.7 µM ileri primer 0.7 µM geri primer
RNase-free su	Değişken	Değişken	
Şablon DNA	Değişken (tüm reaksiyonlar için eşit hacimde)	Değişken (tüm reaksiyonlar için eşit hacimde)	Ökaryot : 1-50 ng DNA/reaksiyon
Her Bir Reaksiyonun Toplam Hacmi	25 µl	10 µl	-



Şekil 3.7. Mavi ok ile gösterilen 0,1 µl'lik PCR tüpleri 72'lik özel tablasına etiketlenerek yerleştirildi ve bu tüplerde hazırlanan reaksiyonların her birinin hacmi 10 µl idi.



Şekil 3.8. Ok ile gösterilen 0,2 µl'lik PCR tüpleri 36'lık özel tablasına etiketlenerek yerleştirildi ve bu tüplerde hazırlanan reaksiyonların her birinin hacmi 25 µl idi.



Şekil 3.9. Rotor-Gene Q (QIAGEN, Almanya) gerçek zamanlı PCR cihazı.

Tablo 3.4. Rotor Gene Q cihazı kurulum parametreleri.

Basamak	Zaman	Sıcaklık	Ek Bilgiler
Başlangıç PCR Aktivasyon adımı	5 dak.	95 °C	HotStarTaq ^{Plus} DNA polimeraz bu ısıtma adımında aktive edilir
Denatürasyon	10s	95 °C	Primerlerin uygun çalışma sıcaklıkları göz önüne alınarak birleşme ayrılma sıcaklığı her reaksiyon için 59-62,5 °C sıcaklıklarda değiştirilmiştir.
Birleşme/Ayrılma	30s	59-62,5 °C	
Çevrim sayısı	40		10-50 ng şablon DNA ya da 10-50 pg mikrobiyal DNA
HRM	2s	65-95 °C/0.1°C artış ile	Floresan veri toplanması

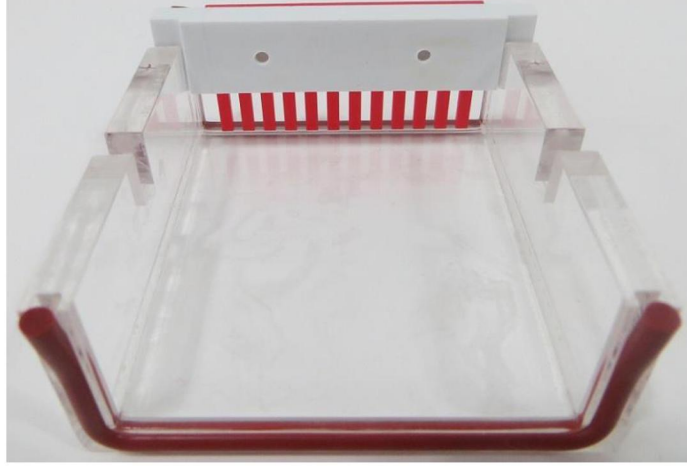
Planlanan her bir PCR reaksiyonunun hazırlanması sırasında 36'lık PCR aparatı için kullanılan 0.2 µl'lik PCR tüplerinde 25 µl hacimde, 72'lik aparat için ise 0.1 µl'lik PCR tüplerinde 10 µl hacimde reaksiyonlar hazırlandı. Her bir PCR reaksiyonunda her bir örnekten 2 µl DNA örneği kullanıldı ve eksik kalan hacim RNase-free su ile tamamlandı.

3.8. Örneklerin Dizilemesi

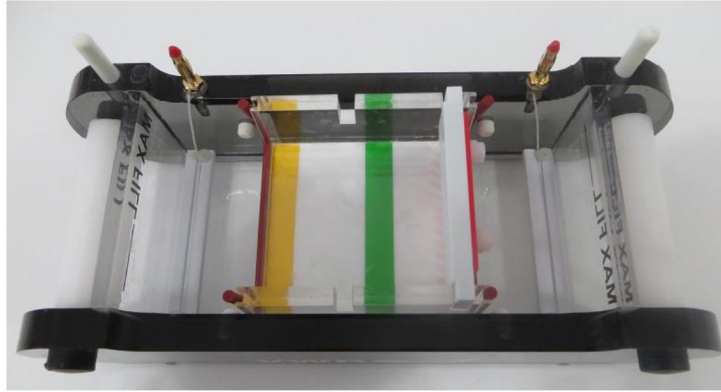
PCR ve HRM analizleri sonrasında elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve onaylanması için örneklerin DNA dizilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Hizmet alımı ile gerçekleştirilen dizileme analizi için PCR analizi 50µl'lik reaksiyon hacminde yukarıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi. Her örnek için agaroz jel elektroforezinde 15µl PCR ürünü yürütülerek saflığı onaylandı. Sonrasında tüplere 30µl PCR ürünü ve farklı tüplere her bir örnek için 5µl primer hazırlandı ve tüpler parafilm ile sıkıca kapatılarak hizmet alımı yapılacak şirkete kargo ile gönderildi. Dizileme için istek formları doldurularak elektronik posta yolu ile iletildi.

3.8.1 Agaroz Jel Elektroforezi

1. % 2'lik jel elektroforezi hazırlamak için 4g agaroz ve 400 ml 1xTAE tamponu (40 miliMolar Tris-asetat, 1mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)) ölçülerek cam deney kabına kondu (1xTAE tamponu hazır olarak bulunan 50xTAE tamponunun 1/50 oranında saf su ile karıştırılması ile hazırlandı).
2. Hazırlanan karışım toz agarozun erimesini sağlamak için mikrodalga fırına yerleştirildi. Fırın içerisinde ısınan karışım taşmaması için 30 sn aralıklarla kontrol edildi.
3. Agarozun tamamen erimesi ve kabarcıkların tamamen yok olmasının ardından karışım mikrodalga fırından çıkarıldı.
4. Karışım içerisine 5 µl 0.5 µg/ml etidiyum bromid eklendi.
5. Karışım jel tepsisine dökülmeden önce bir süre soğuması beklendi.
6. Agaroz karışımı örnek yükleme tarakları yerleştirilerek hazırlanan jel tepsi içerisine döküldü ve katılaşması beklendi (Şekil 3.10).
7. Jelin katılaşmasının ardından tarak ve kenar bantlar çıkarıldı. Jel tepsi yatay jel elektroforez ünitesi içerisindeki hazneye yerleştirildi ve hazne jelin üstünü kapatacak şekilde 1xTAE tamponu ile dolduruldu (Şekil 3.11).
8. Tarak çıkarıldıktan sonra oluşan ilk kuyucuğa 100bp'lik DNA ladder (marker DNA) kalan 19 kuyucuğa örnekler yüklendi.
9. 15µl PCR ürünü ve 3µl yükleme tamponunun (6X) karıştırılmasının ardından oluşan karışım kuyucuklara yerleştirildi ve DNA'nın katoda doğru yürüyeceği şekilde kapağı kapatıldı.
10. 110 V ve 500mA programında kurulan elektroforez güç ünitesi (VWR, Power Source 300 V, USA) 15 dakika süre ile çalıştırıldı (Şekil 3.12).
11. İşlemin tamamlanmasının ardından ultraviyole (UV) ışık altında jelin fotoğrafı çekildi (Şekil 3.13).



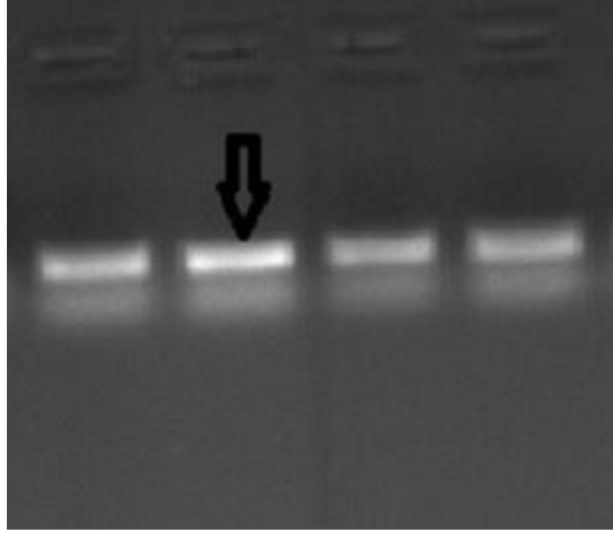
Şekil 3.10. Elektroforez jel tepsi.



Şekil 3.11. Elektroforez ünitesi içerisinde jel tepsinin yerleştirildiği hazne.



Şekil 3.12. Elektroforez güç ünitesi (VWR, Power Source 300 V, USA).



Şekil 3.13. UV ışık altında alınan jel görüntüsü. Siyah ok görmek istediğimiz şekilde keskin PCR ürününe ait bandı göstermektedir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Hastaların TNP'lerinin tespiti için ScreenClust HRM (QIAGEN, Dusseldorf, Almanya) yazılımı kullanıldı. PCR ve HRM analizlerinden elde edilen sonuçlar ScreenClust HRM yazılımına yüklendi. Yazılım dsDNA örneklerinin birbirlerinden ayrıldıkları noktada oluşan floresan boya ışınması ile tespit edilen pik sıcaklıklarına göre grupların dağılımını yaparak sonuç elde etmeyi amaçlamaktadır. Dizileme sonrası genotip tayini yapılan örnekler ile yazılımın sıcaklıklara göre ayırdığı gruplar karşılaştırarak genotip tayini yapıldı.

İstatistiksel analiz IBM SPSS sürüm 21.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deney grupları arasında homozigot (mutasyon), homozigot (yabancıl tip) ve heterozigot genotiplerin dağılımları Pearson kesin ki-kare testi kullanılarak gerçekleştirildi. Heterozigot genotipin bulunmadığı IL-23A geni deney ve kontrol grupları arasında ise dağılım Fisher kesin ki-kare testi kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir gen için deney ve kontrol gruplarının genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg kuralına uygunlukları Pearson ki-kare hesaplaması ile test edildi. Ayrıca her bir gen için belirlenen genotiplerin alellerinin sıklıkları Pearson ki-kare testi kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu doktora tez çalışması süresince bukkal toplama fırçası yardımı ile 219 (123 kadın, 96 erkek) hastanın bilgisi ve rızası ile bukkal epitel hücre örnekleri alındı. DNA analizi, PCR ve HRM analizleri sonrasında elde edilen verilerin değerlendirilmesi aşamasında IL-17A geni (rs542129933) için toplam 193, IL-17RA geni (rs562543976) için toplam 211, IL-23A geni (rs180825144) ve IL-23R geni (rs10489630) için 203 hastanın verileri, TNP tespiti sırasında değerlendirildi. Genotiplerin dağılımı; dizileme sonrası genotip tayini yapılan örneklerden elde edilen veriler ile birlikte ScreenClust HRM yazılımı kullanılarak tespit edildi.

4.1. IL-17A Geni TNP Bulguları (rs542129933)

IL-17A geni TNP analizi için toplam 193 hastanın verileri değerlendirildi. Bu hastaların 110'u kadın iken 83'i erkektir. Deney grubunda periapikal lezyon varlığı tespit edilen 92 hastanın ise 56'sı kadın, 36'sı ise erkek hastalardan oluşmaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. IL-17A (rs542129933) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı

	KADIN		ERKEK		Toplam
	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	
IL-17A	56	54	36	47	193
	110		83		

IL-17A geni (rs542129933) TNP'si için belirlenen genotipler karşılaştırıldığında kontrol grubu ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p < 0.248$). Deney grubunun genotip dağılımı Hardy-Weinberg kuralına (değişmeyen kararlı popülasyonlarda gen sıklıklarının dağılımının hesaplanması) uygun olarak tespit edilirken ($p = 1$), kontrol grubunun genotip dağılımı ise uyumsuz olarak bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. IL-17A geni (rs542129933) [C/T] değişimi gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen CC (yabanıl tip), TT (varyasyon), CT (heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğu

17A	TT		CT		CC		p	Hardy-Weinberg
	n	%	n	%	n	%		p
Deney	0	0	0	0	92	100	0.248	1
Kontrol	3	3	1	1	97	96		<0.001

Hastaların genotip dağılımları cinsiyetlerin kendi içlerinde değerlendirildiğinde kadın hastaların arasında deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=1). Erkek hastalar arasında yine deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.25). Kontrol grubunda cinsiyetler birbiri ile karşılaştırıldığında cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0.091). Deney grubunda ise genotipte (CC) farklılık bulunmadığından cinsiyetler arasında karşılaştırma yapılmamıştır.

T ve C baz sıklığı hesaplandığında deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.015) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. IL-17A geni (rs542129933) [C/T] değişimi gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.

17A	T	C	p
Deney	0	184	0.015
Kontrol	7	195	

IL-17A (rs542129933) geni TNP tespiti sırasında PCR ve HRM analizlerinde kullanılan primer çifti (ileri ve geri primerler) Tablo 4.4.'de gösterilmektedir. Bu primerler çoğaltmak istediğimiz DNA parçasının 5'→3' uçlarına spesifik olarak bağlanmaktadırlar. Kullandığımız primer çiftinin ayrılan çift sarmallı DNA'nın tek sarmalına en uygun bağlanma sıcaklığı da Tablo 4.4'de belirtilmektedir.

Tablo 4.4. IL-17A (rs542129933) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya bağlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.

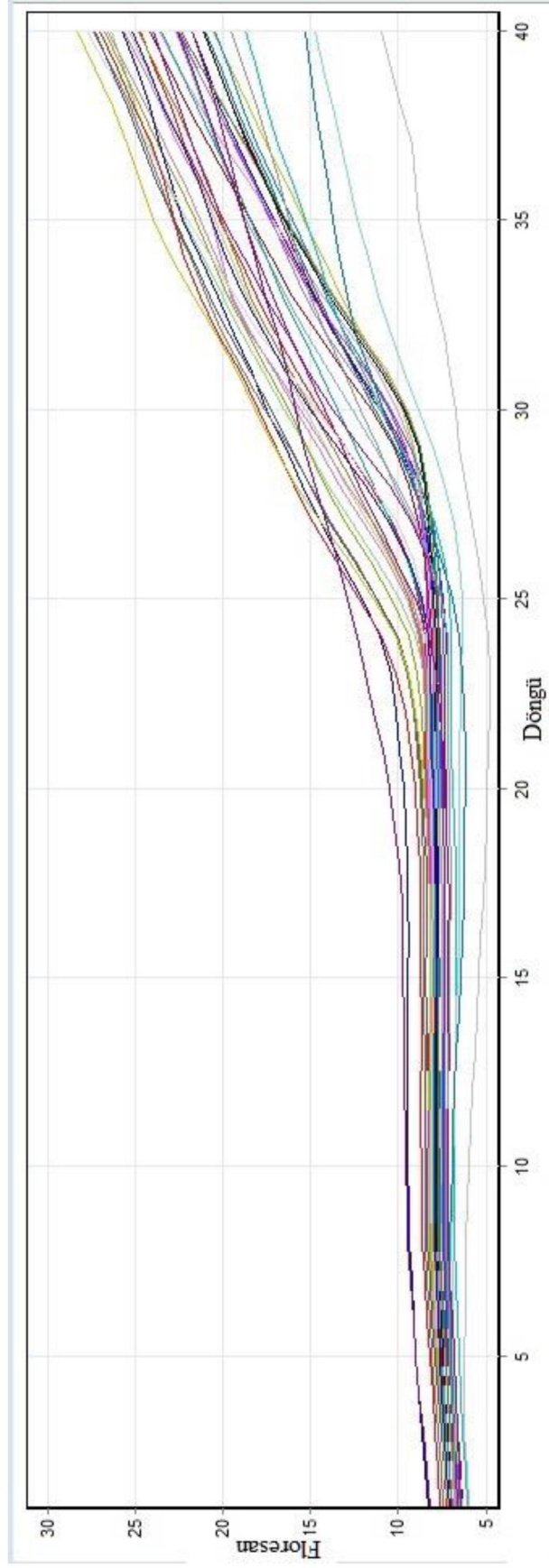
IL-17A	Primer Dizisi	Başlangıç bağlanma sıcaklığı
(rs542129933)	(5'→3') İleri: TAC CAG TCA AAC CTG GAA GGA C Geri: CTG TCC TGT GCT TGG TTA AAG AAA	62°C

Şekil 4.1.1’de PCR döngüleri sırasındaki floresan boya hareketleri görülmektedir. Sadece çift sarmallı DNA’ya bağlanan bu özel floresan boya (EvaGreen) PCR döngülerinin başlangıcında çift sarmallı DNA’ya bağlı haldedir. Ancak sıcaklığın artması ve DNA sarmallarının ayrılması ile floresan boya serbestleşmektedir.

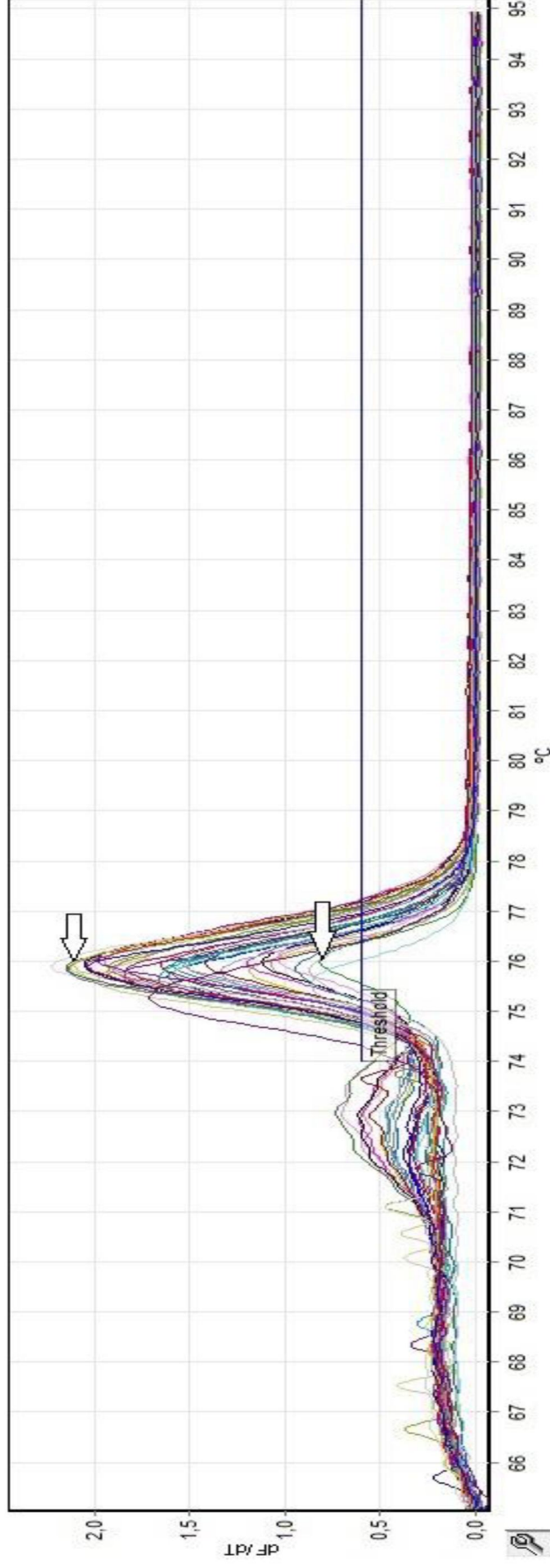
Şekil 4.1.2’de ampliconların (PCR ile çoğaltılan DNA dizileri) karşılaştırmalı olarak denatürasyon eğrileri genotipten kaynaklanan farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre otomatik olarak genotiplerin (CC/TC/CC) tanımlanmasını içermektedir. Bu grafik PCR ve HRM analizleri sırasında elde edilmektedir.

Şekil 4.1.3’de ScreenClust HRM yazılımı ile ayrıntılandırılan PCR ve HRM verilerinden elde edilen denatürasyon eğrilerine ve genotiplerin farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre ampliconların normalizasyon süreci belirtilmektedir.

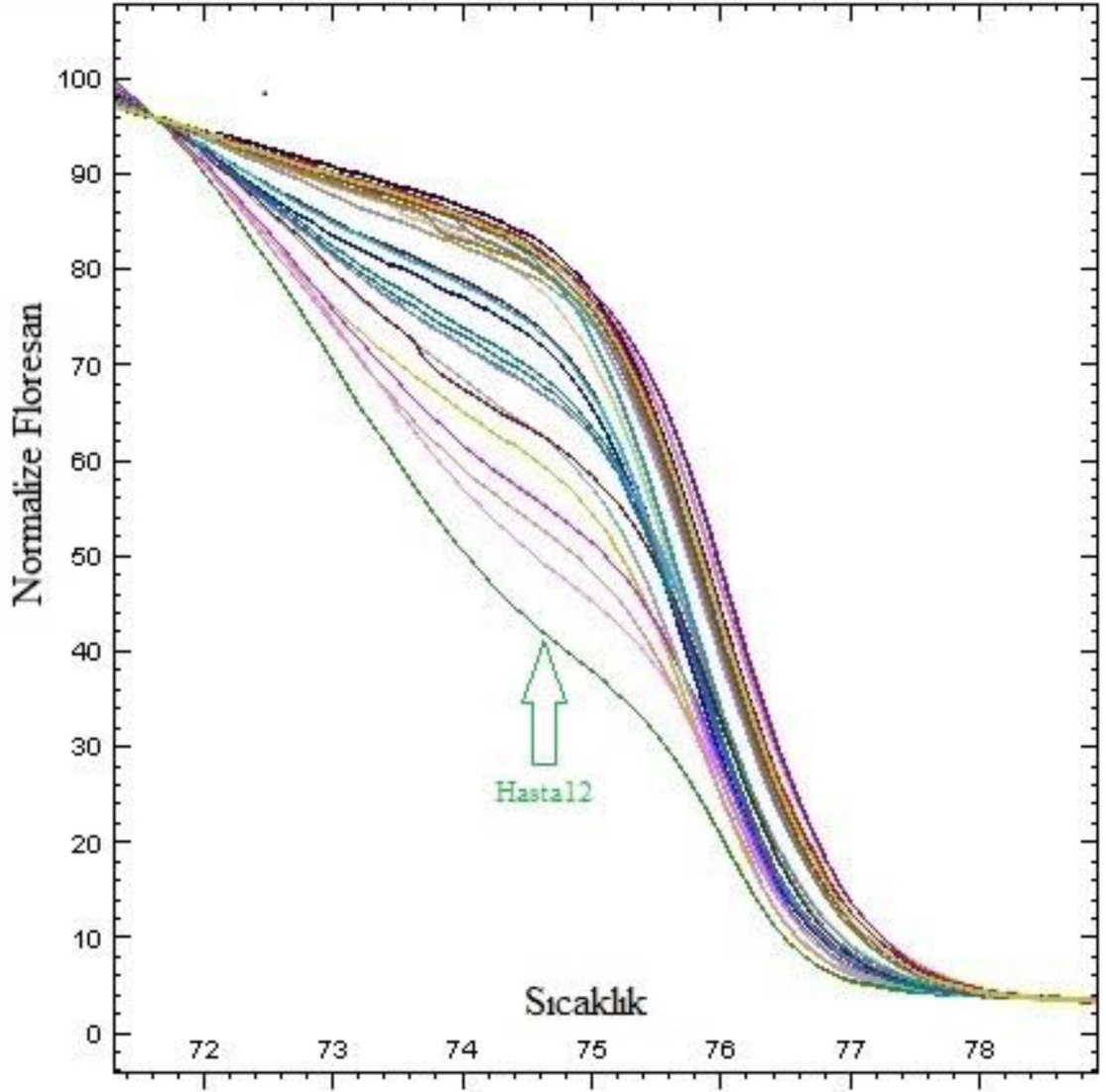
Şekil 4.1.4’de ise IL-17 geni için Yeni Jenerasyon Dizileme tekniği ile genotipi belirlenen bir hastanın, dizileme sonuçları ile homozigot yabancı tip (CC) olarak belirlenen rs542129933 TNP bazı gösterilmektedir.



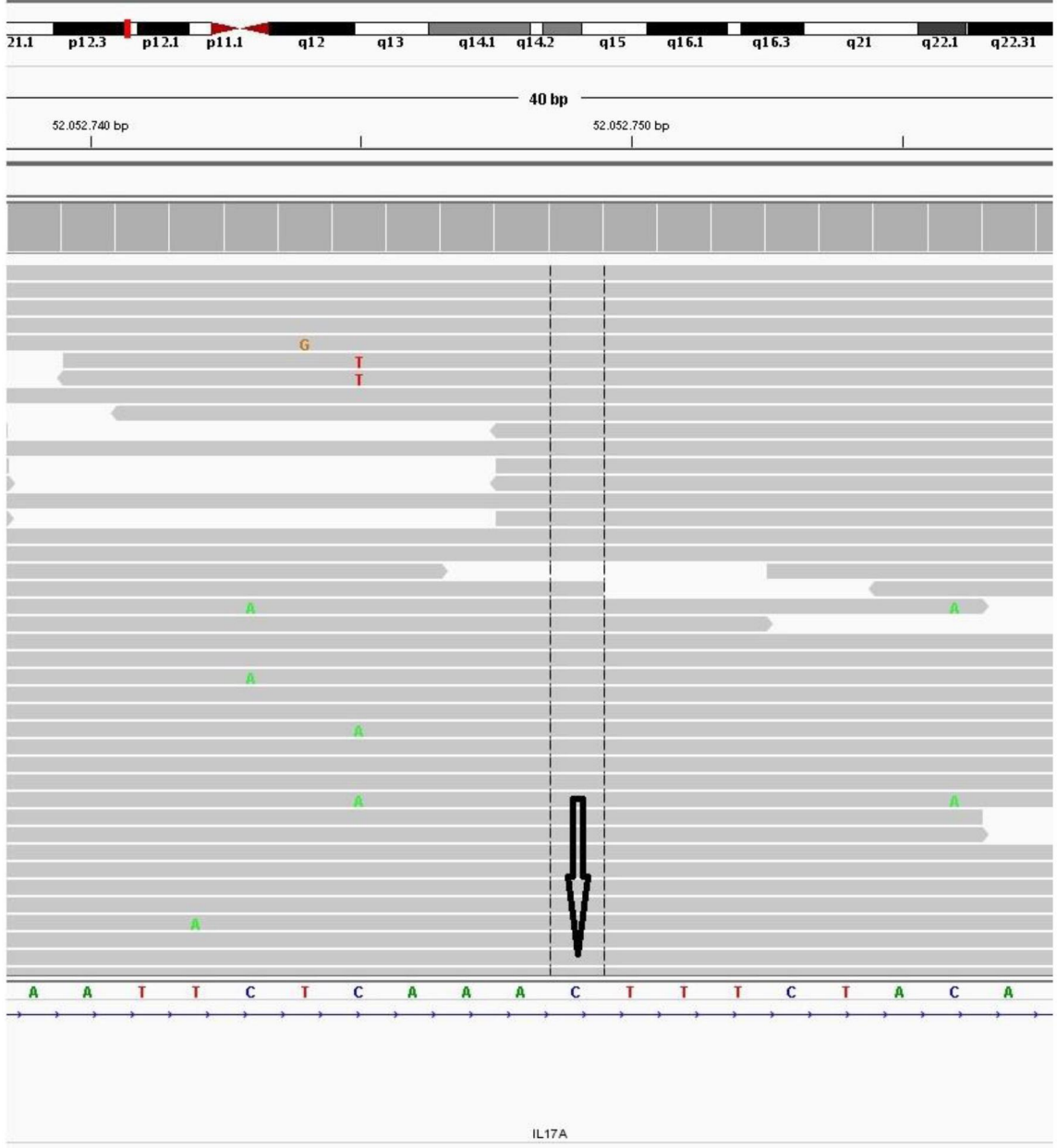
Şekil 4.1.1. IL-17A geni (rs542129933) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini belirten ham veri görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.1.2. IL-17A geni (rs542129933) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.1.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 12/Kontrol grubu/Genotipi (CC)yabancıl tip homozigot).



Şekil 4.1.4. IL-17A geni (rs542129933) tayini Kontrol Grubu/113 no'lu hastaya ait homozigot yabancı tip (CC) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.

4.2. IL-17RA Geni TNP bulguları (rs562543976)

IL-17R geni TNP analizi için toplam 211 hastanın verileri değerlendirildi. Bu hastaların 120'si kadın iken 91'i erkektir. Deney grubunda periapikal lezyon varlığı tespit edilen 97 hastanın ise 59'u kadın, 38'i ise erkek hastalardan oluşmaktadır (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. IL-17RA (rs562543976) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı

IL-17RA	KADIN		ERKEK		Toplam
	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	
	59	61	38	53	211
	120		91		

IL-17RA (rs562543976) TNP'si için belirlenen genotipler karşılaştırıldığında kontrol grubu ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p < 0.336$). Deney grubunun genotip dağılımı Hardy-Weinberg kuralına uygun olarak tespit edilirken ($p = 0.877$), kontrol grubunun genotip dağılımı ise uyumsuz olarak bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. IL-17RA (rs562543976) [A/G] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen AA (yabancıl tip), GG (varyasyon), AG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.

17RA	AA		AG		GG		p	Hardy-Weinberg
	n	%	n	%	n	%		p
Deney	94	96.9	3	3.1	0	0	0.336	0.877
Kontrol	112	98.2	1	0.9	1	0.9		<0.001

Hastaların genotip dağılımları cinsiyetlerin kendi içlerinde değerlendirildiğinde kadın hastaların arasında deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 1$). Erkek hastalar arasında yine deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0.116$). Kontrol grubunda cinsiyetler birbiri ile karşılaştırıldığında cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.716$). Deney grubunda ise yine cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p = 0.278$).

A ve G bazlarının sıklığı hesaplandığında deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0.015$) (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. IL-17RA (rs562543976) [A/G] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.

17RA	A	G	p
Deney	191	3	1
Kontrol	225	3	

IL-17RA (rs562543976) geni TNP tespiti sırasında PCR ve HRM analizlerinde kullanılan primer çifti (ileri ve geri primerler) Tablo 4.8.'de gösterilmektedir. Bu primerler çoğaltmak istediğimiz DNA parçasının 5'→3' uçlarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Kullandığımız primer çiftinin ayrılan çift sarmallı DNA'nın tek sarmalına en uygun bağlanma sıcaklığı da Tablo 4.8.'de belirtilmektedir.

Tablo 4.8. IL-17RA (rs562543976) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA' ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.

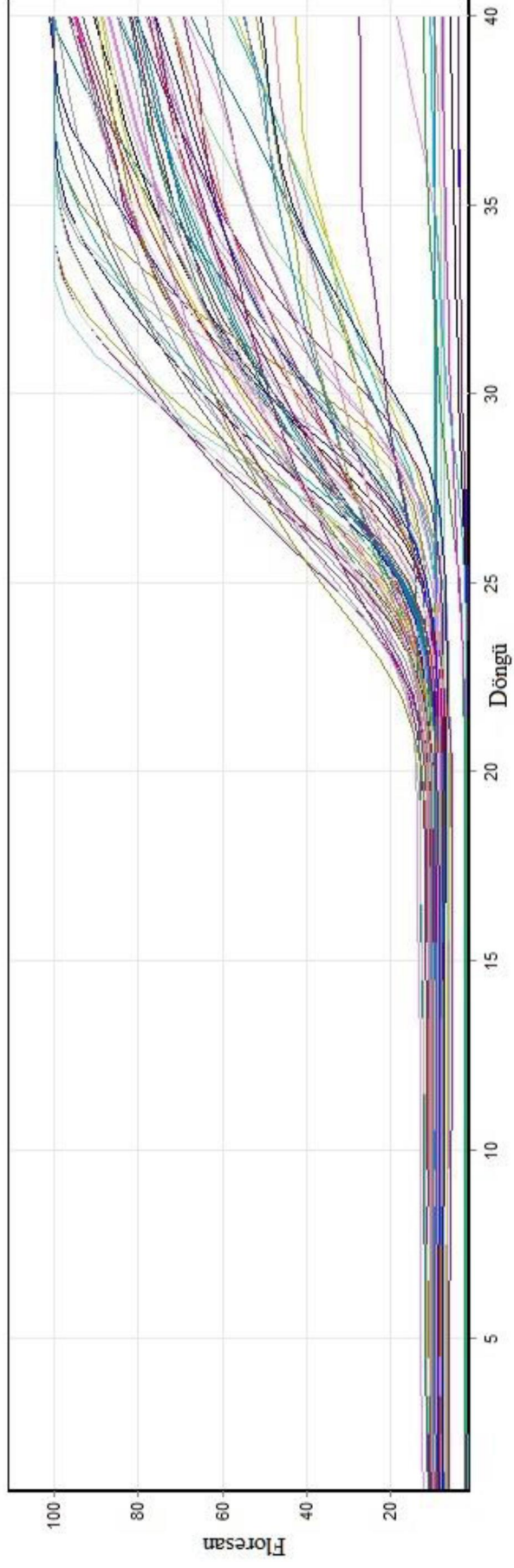
IL-17RA	Primer Dizisi	Başlangıç bağlanma
(rs562543976)	(5'→3')	sıcaklığı
	İleri: CAG AGA TAG ACA GCT CTG GGC	62,5°C
	Geri: CCT CCC CTC ACT ATA CCA CAT T	

Şekil 4.2.1'de PCR döngüleri sırasındaki floresan boya hareketleri görülmektedir. Sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanan bu özel floresan boya (EvaGreen) PCR döngülerinin başlangıcında çift sarmallı DNA'ya bağlı haldedir. Ancak sıcaklığın artması ve DNA sarmallarının ayrılması ile floresan boya serbestleşmektedir.

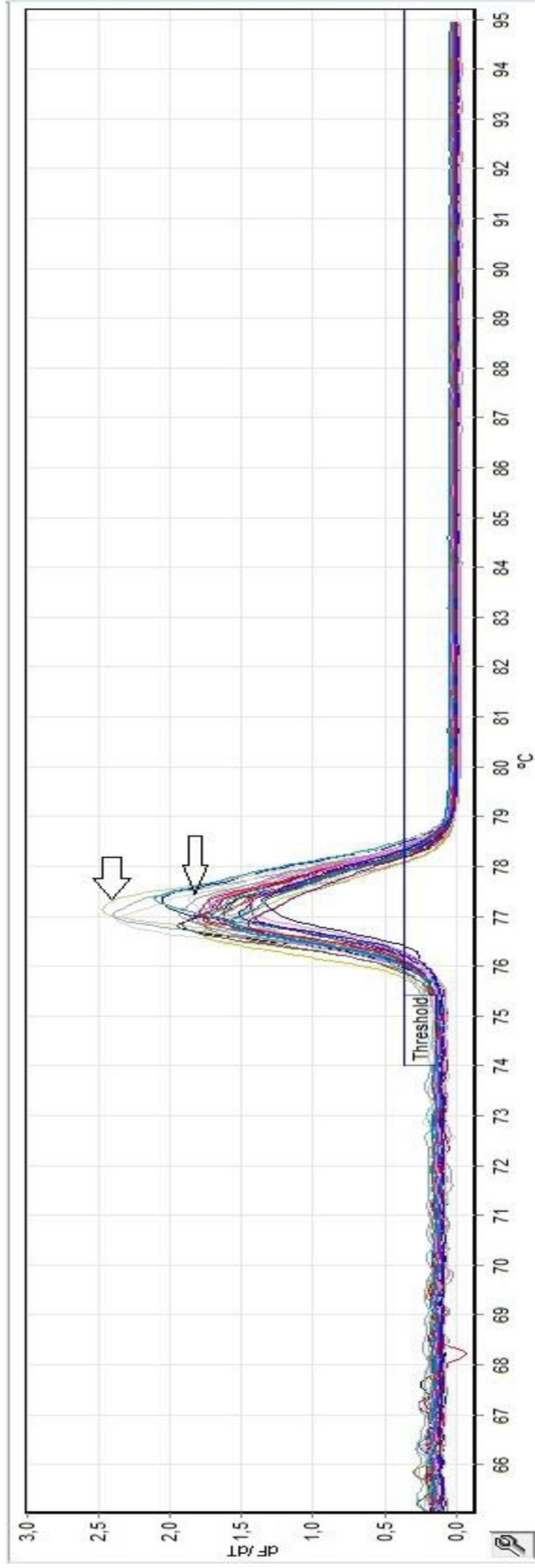
Şekil 4.2.2'de ampliconların (PCR ile çoğaltılan DNA dizileri) karşılaştırmalı olarak denatürasyon eğrileri genotipten kaynaklanan farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre otomatik olarak genotiplerin (AA/AG/GG) tanımlanmasını içermektedir. Bu grafik PCR ve HRM analizleri sırasında elde edilmektedir.

Şekil 4.2.3'de ScreenClust HRM yazılımı ile ayrıntılandırılan PCR ve HRM verilerinden elde edilen denatürasyon eğrilerine ve genotiplerin farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre ampliconların normalizasyon süreci belirtilmektedir.

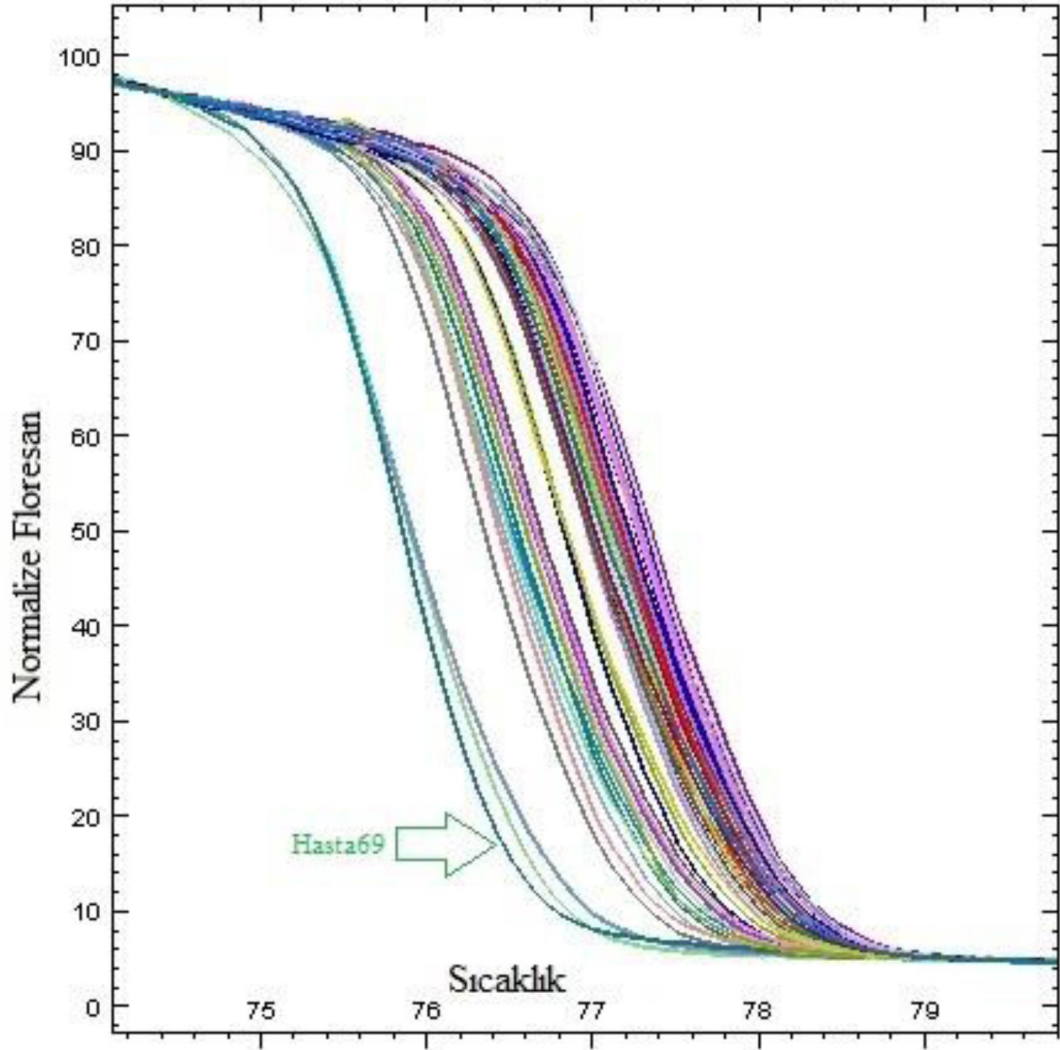
Şekil 4.2.4'de ise IL-17RA geni için Yeni Jenerasyon Dizileme tekniği ile genotipi belirlenen bir hastanın, dizileme sonuçları ile homozigot yabancı tip (AA) olarak belirlenen rs562543976 TNP bazı gösterilmektedir.



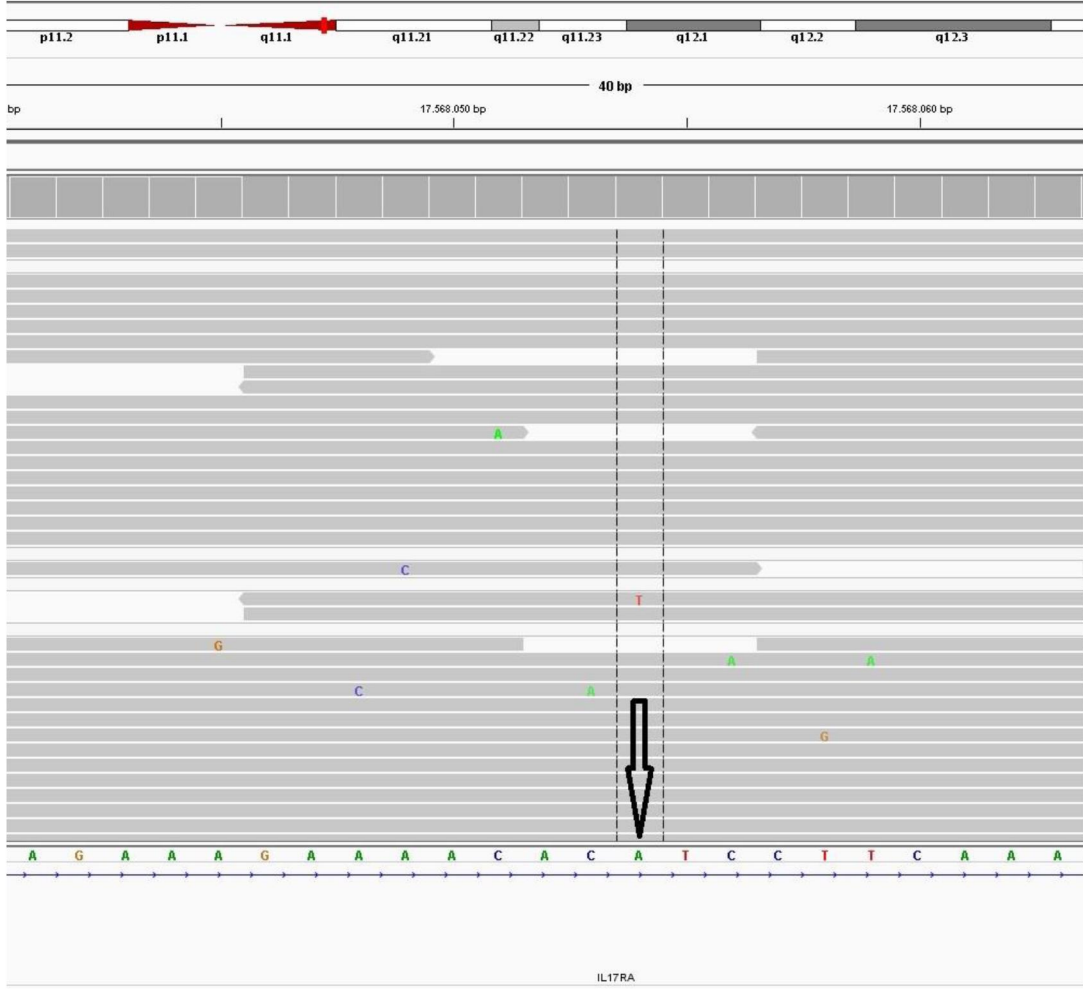
Şekil 4.2.1. IL-17RA (rs562543976) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.2.2. IL-17RA (rs562543976) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.2.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 12/Deney grubu/Genotipi (AA) yabancı tip homozigot).



Şekil 4.2.4. IL-17RA (rs562543976) tayini Deney Grubu/138 no'lu hastaya ait homozigot yabancı tip (AA) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.

4.3. IL-23A Geni TNP Bulguları (rs180825144)

IL-23A geni TNP analizi için toplam 203 hastanın verileri değerlendirildi. Bu hastaların 114'ü kadın iken 89'u erkektir. Deney grubunda periapikal lezyon varlığı tespit edilen 94 hastanın ise 56'sı kadın, 38'i ise erkek hastalardan oluşmaktadır (Tablo 4.9.).

Tablo 4.9. IL-23A (rs180825144) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı

IL-23A	KADIN		ERKEK		Toplam
	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	
	56	58	38	51	203
	114		89		

IL-23A (rs180825144) TNP'si için belirlenen genotipler karşılaştırıldığında kontrol grubu ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.5$). Deney grubunun genotip dağılımı Hardy-Weinberg kuralına uygun olarak tespit edilirken ($p=1$), kontrol grubunun genotip dağılımı ise uyumsuz olarak bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. IL-23A (rs180825144) [A/G] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen AA (yabancıl tip), GG (varyasyon), AG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.

23A	AA		AG		GG		p	Hardy-Weinberg
	n	%	n	%	n	%		p
Deney	94	100	0	0	0	0	0.5	1
Kontrol	107	98.2	0	0	2	1.8		<0.001

A ve G bazlarının sıklığı hesaplandığında deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.127$) (Tablo 4.11.).

Tablo 4.11. IL-23A (rs180825144) [A/G] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.

23A	A	G	p
Deney	188	0	0.127
Kontrol	214	4	

IL-23A (rs180825144) geni TNP tespiti sırasında PCR ve HRM analizlerinde kullanılan primer çifti (ileri ve geri primerler) Tablo 4.12.'de gösterilmektedir. Bu

primerler çoğaltmak istediğimiz DNA parçasının 5'→3' uçlarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Primer çiftinin ayrılan çift sarmallı DNA'nın tek sarmalına en uygun bağlanma sıcaklığı da Tablo 4.12.'de belirtilmektedir.

Tablo 4.12. IL-23A (rs180825144) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.

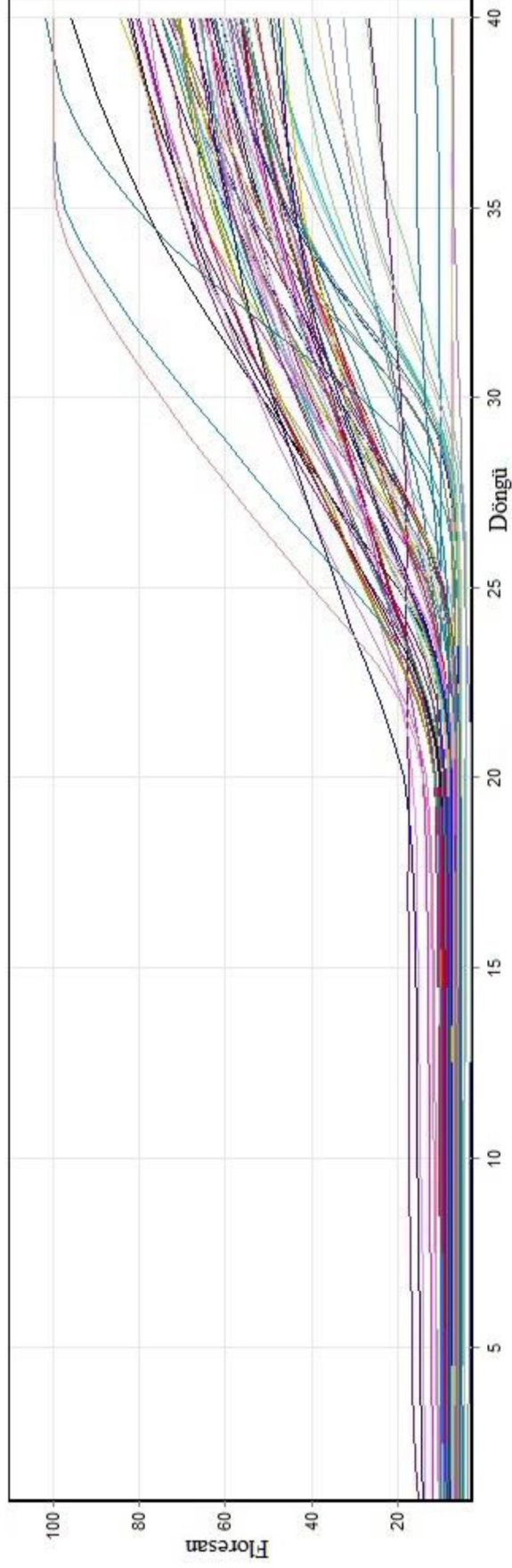
IL-23A	Primer Dizisi (5'→3')	Başlangıç bağlanma sıcaklığı
(rs180825144)	İleri: ACT GAG AAA AAG AAG CCC GTT T Geri: CCC AAT AGG ATG GTG AGC TGT	59.5°C

Şekil 4.3.1'de PCR döngüleri sırasındaki floresan boya hareketleri görülmektedir. Sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanan bu özel floresan boya (EvaGreen) PCR döngülerinin başlangıcında çift sarmallı DNA'ya bağlı haldedir. Ancak sıcaklığın artması ve DNA sarmallarının ayrılması ile floresan boya serbestleşmektedir.

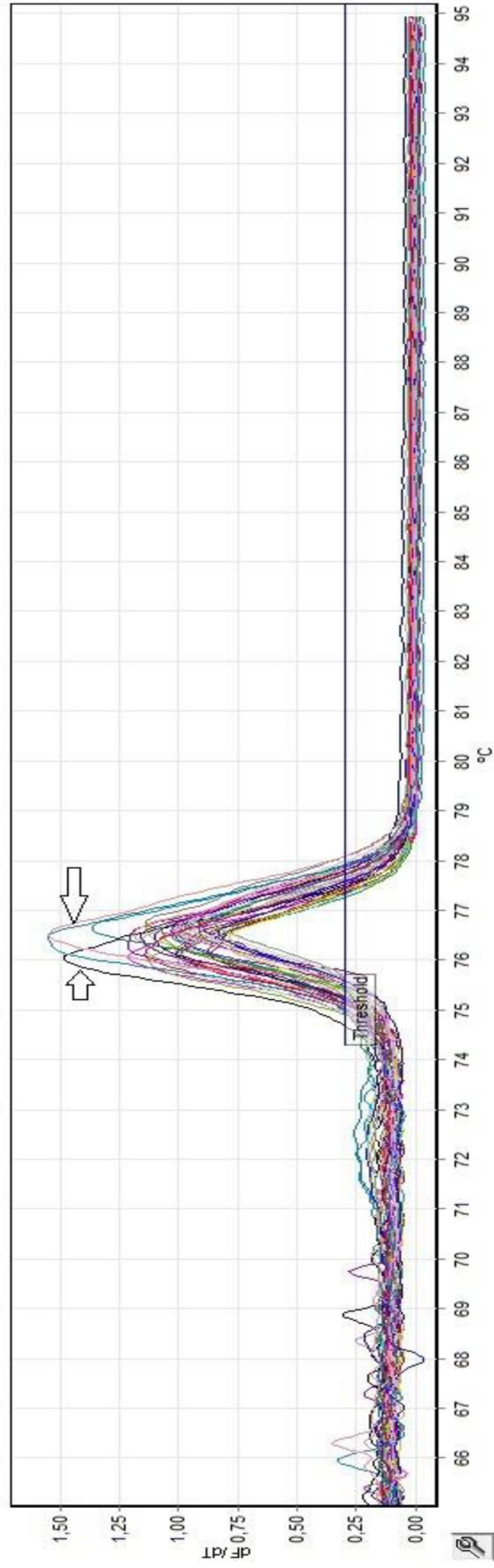
Şekil 4.3.2'de amplikonların (PCR ile çoğaltılan DNA dizileri) karşılaştırmalı olarak denatürasyon eğrileri genotipten kaynaklanan farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre otomatik olarak genotiplerin (AA/AG/GG) tanımlanmasını içermektedir. Bu grafik PCR ve HRM analizleri sırasında elde edilmektedir.

Şekil 4.3.3'de ScreenClust HRM yazılımı ile ayrıntılandırılan PCR ve HRM verilerinden elde edilen denatürasyon eğrilerine ve genotiplerin farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre amplikonların normalizasyon süreci belirtilmektedir.

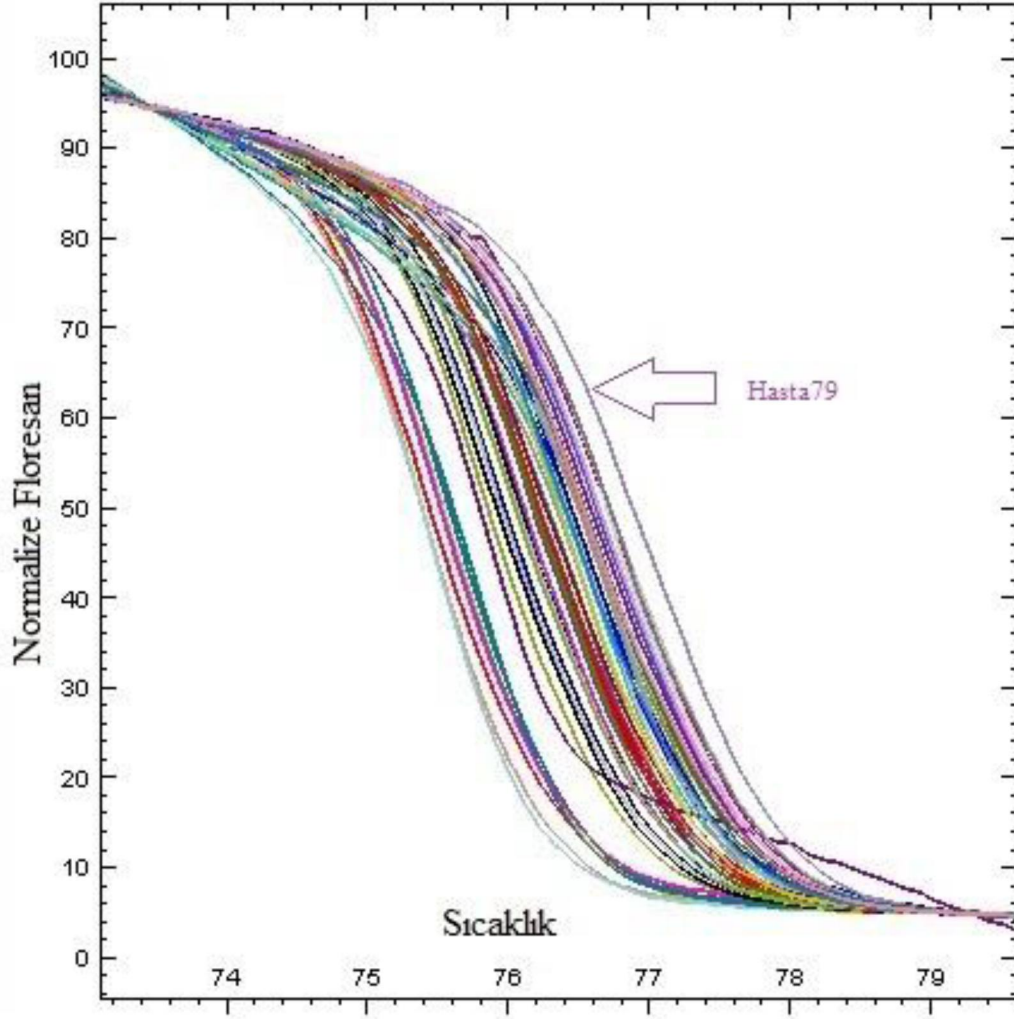
Şekil 4.3.4'de ise IL-23 geni için Yeni Jenerasyon Dizileme tekniği ile genotipi belirlenen bir hastanın, dizileme sonuçları ile homozigot yabancı tip (AA) olarak belirlenen rs180825144 TNP bazı gösterilmektedir.



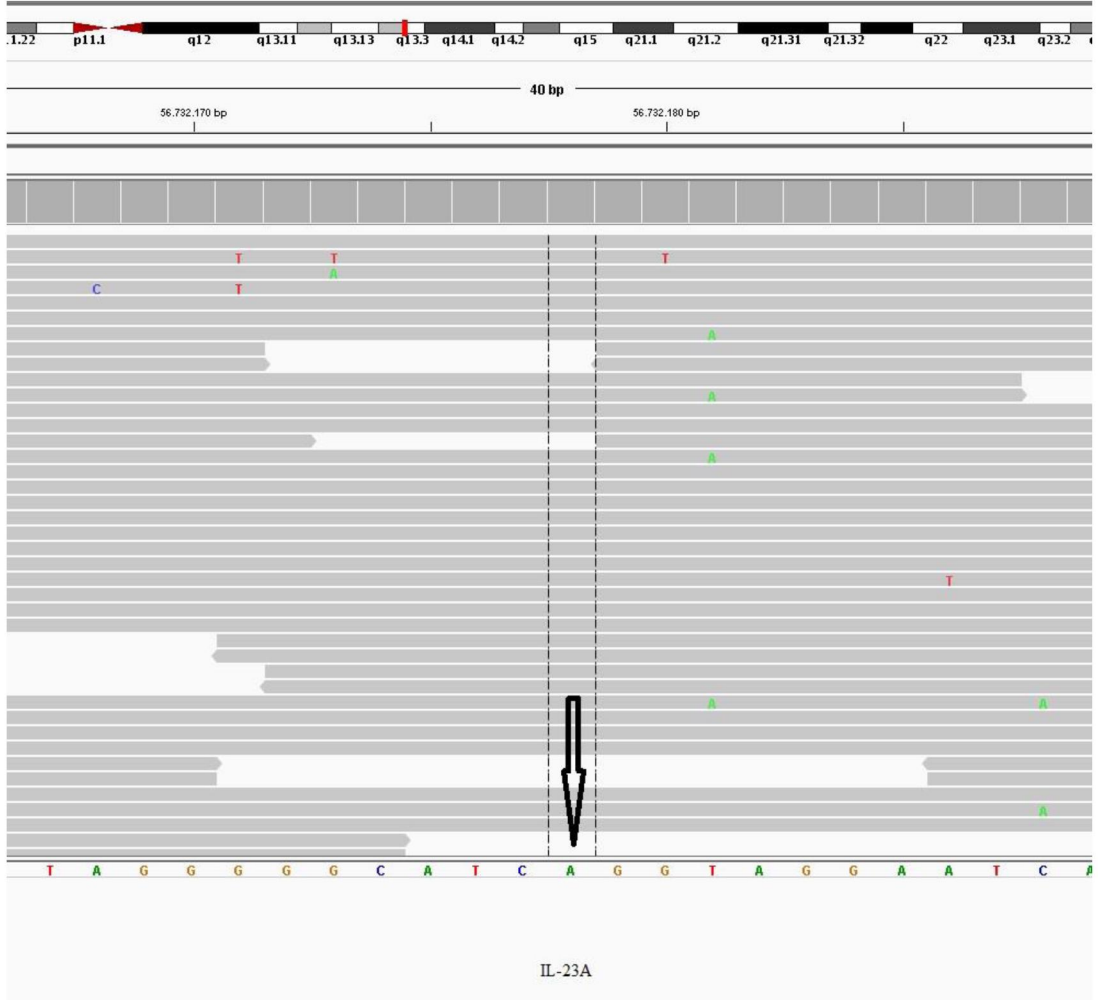
Sekil 4.3.1. IL-23A (rs180825144) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.3.2. IL-23A (rs180825144) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.3.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 79/Kontrol grubu/Genotipi (AA) yabancı tip homozigot).



Şekil 4.3.4. IL-23A (rs180825144) tayini Deney Grubu/122 no'lu hastaya ait homozigot yabancı tip (AA) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP belirtilmektedir.

4.4. IL-23R Geni TNP Bulguları (rs10489630)

IL-23R geni TNP analizi için toplam 203 hastanın verileri değerlendirildi. Bu hastaların 113'ü kadın iken 90'ı erkektir. Deney grubunda periapikal lezyon varlığı tespit edilen 94 hastanın ise 56'sı kadın, 38'i ise erkek hastalardan oluşmaktadır (Tablo 4.13.).

Tablo 4.13. IL-23R (rs10489630) TNP analizi için verileri değerlendirilen hastaların hastalıklara ve cinsiyete göre dağılımı

IL-23R	KADIN		ERKEK		Toplam
	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	Periapikal lezyon varlığı	İrreversible pulpitis	
	56	57	38	52	203
	113		90		

IL-23R (rs10489630) TNP'si için belirlenen genotipler karşılaştırıldığında kontrol grubu ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.144$). Deney ve kontrol grupları genotip dağılımı Hardy-Weinberg kuralına uyumlu olarak bulundu (sırasıyla $p=0.867$, $p=0.785$) (Tablo 4.14.).

Tablo 4.14. IL-23R (rs10489630) [G/T] değişimini gösteren TNP'lerin hastalarda tespit edilen GG (yabancıl tip), TT (varyasyon), TG (Heterozigot) dağılımı ve bu dağılımın Hardy-Weinberg kuralına uygunluğunun istatistiksel analizi belirtilmektedir.

23R	GG		TG		TT		p	Hardy-Weinberg
	n	%	n	%	n	%		p
Deney	21	22.3	46	48.9	27	28.7	0.144	0.867
Kontrol	34	31.2	55	50.5	20	18.3		0.785

G ve T bazlarının sıklığı hesaplandığında deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.053$) (Tablo 4.15.).

Tablo 4.15. IL-23R (rs10489630) [G/T] değişimini gösteren TNP'nin baz sıklıkları belirtilmektedir.

23R	G	T	p
Deney	88	100	0.053
Kontrol	123	95	

IL-23R (rs10489630) geni TNP tespiti sırasında PCR ve HRM analizlerinde kullanılan primer çifti (ileri ve geri primerler) Tablo 4.16.'da gösterilmektedir. Bu primerler çoğaltmak istediğimiz DNA parçasının 5'→3' uçlarına spesifik olarak

bağlanmaktadır. Primer çiftinin ayrılan çift sarmallı DNA'nın tek sarmalına en uygun bağlanma sıcaklığı da Tablo 4.16.'da belirtildi.

Tablo 4.16. IL-23R (rs10489630) geni için kullanılan primer dizileri ve DNA'ya başlangıç bağlanma sıcaklıkları belirtilmektedir.

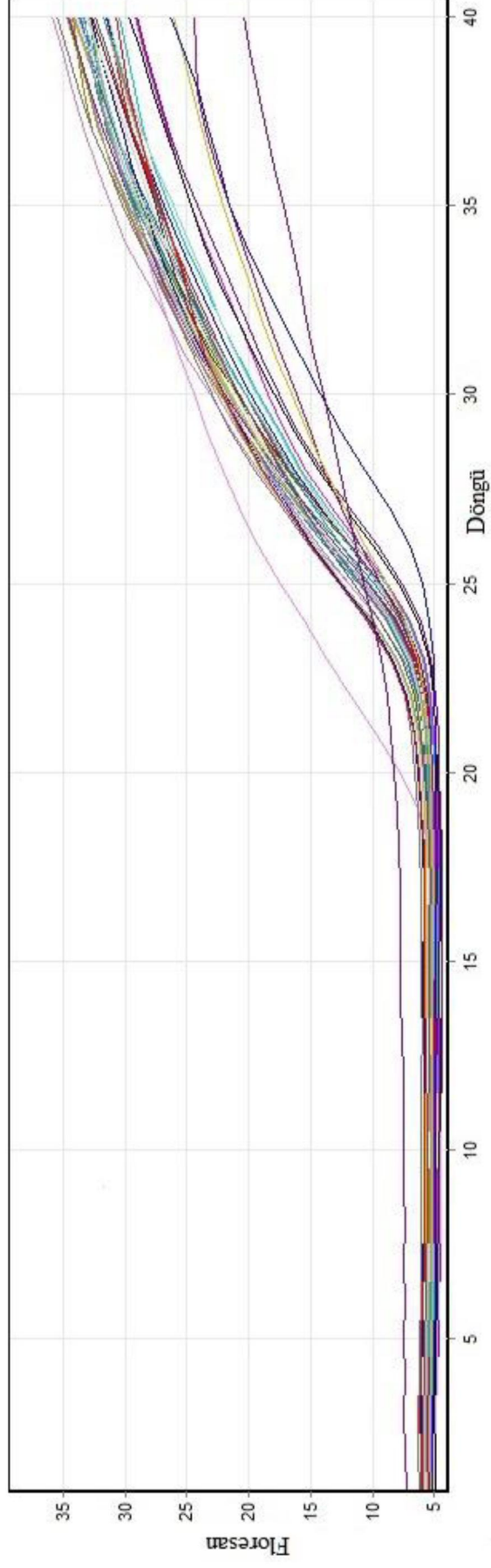
IL-23R	Primer Dizisi (5'→3')	Başlangıç bağlanma sıcaklığı
(rs10489630)	İleri: CCT CAC TGG GAG CTT CAT TTG Geri: GTG CTG ATT TGC ATG GAA AGA TAA	60.5°C

Şekil 4.4.1'de PCR döngüleri sırasındaki floresan boya hareketleri görülmektedir. Sadece çift sarmallı DNA'ya bağlanan bu özel floresan boya (EvaGreen) PCR döngülerinin başlangıcında çift sarmallı DNA'ya bağlı haldedir. Ancak sıcaklığın artması ve DNA sarmallarının ayrılması ile floresan boya serbestleşmektedir.

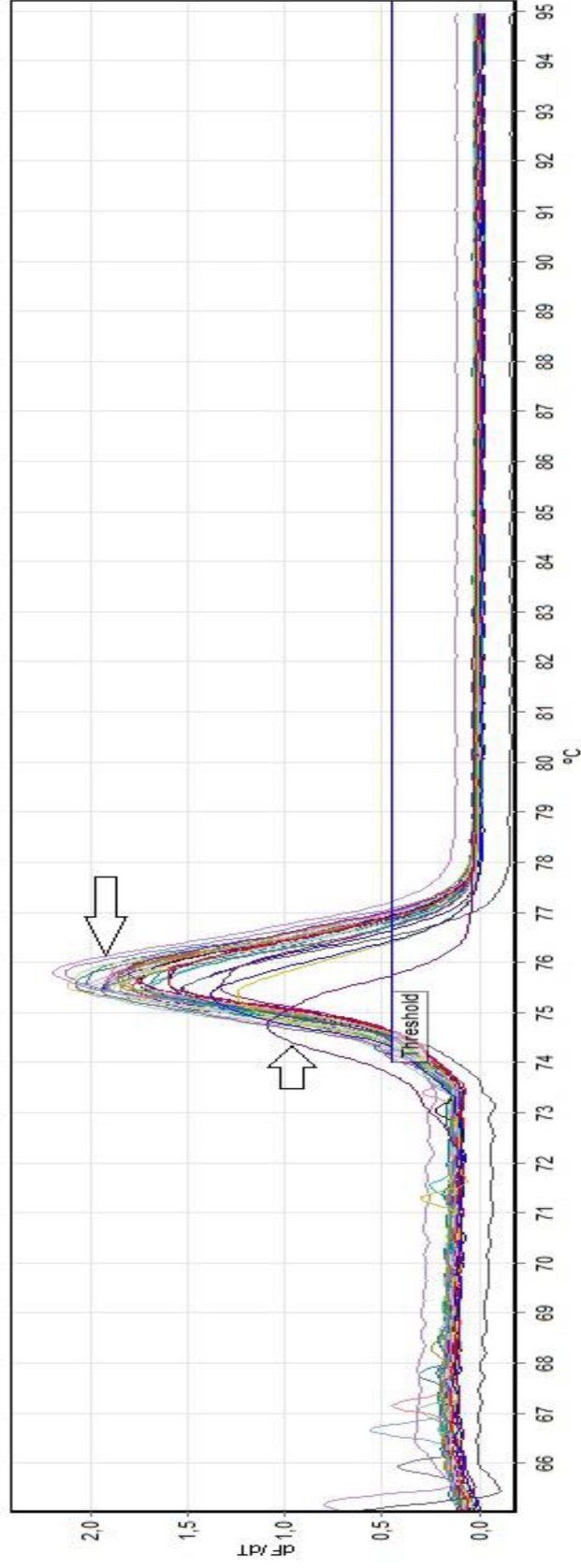
Şekil 4.4.2'de ampliconların (PCR ile çoğaltılan DNA dizileri) karşılaştırmalı olarak denatürasyon eğrileri genotipten kaynaklanan farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre otomatik olarak genotiplerin (GG/GT/TT) tanımlanmasını içermektedir. Bu grafik PCR ve HRM analizleri sırasında elde edilmektedir.

Şekil 4.4.3'de ScreenClust HRM yazılımı ile ayrıntılandırılan PCR ve HRM verilerinden elde edilen denatürasyon eğrilerine ve genotiplerin farklı erime sıcaklıklarına (T_m) göre ampliconların normalizasyon süreci belirtilmektedir.

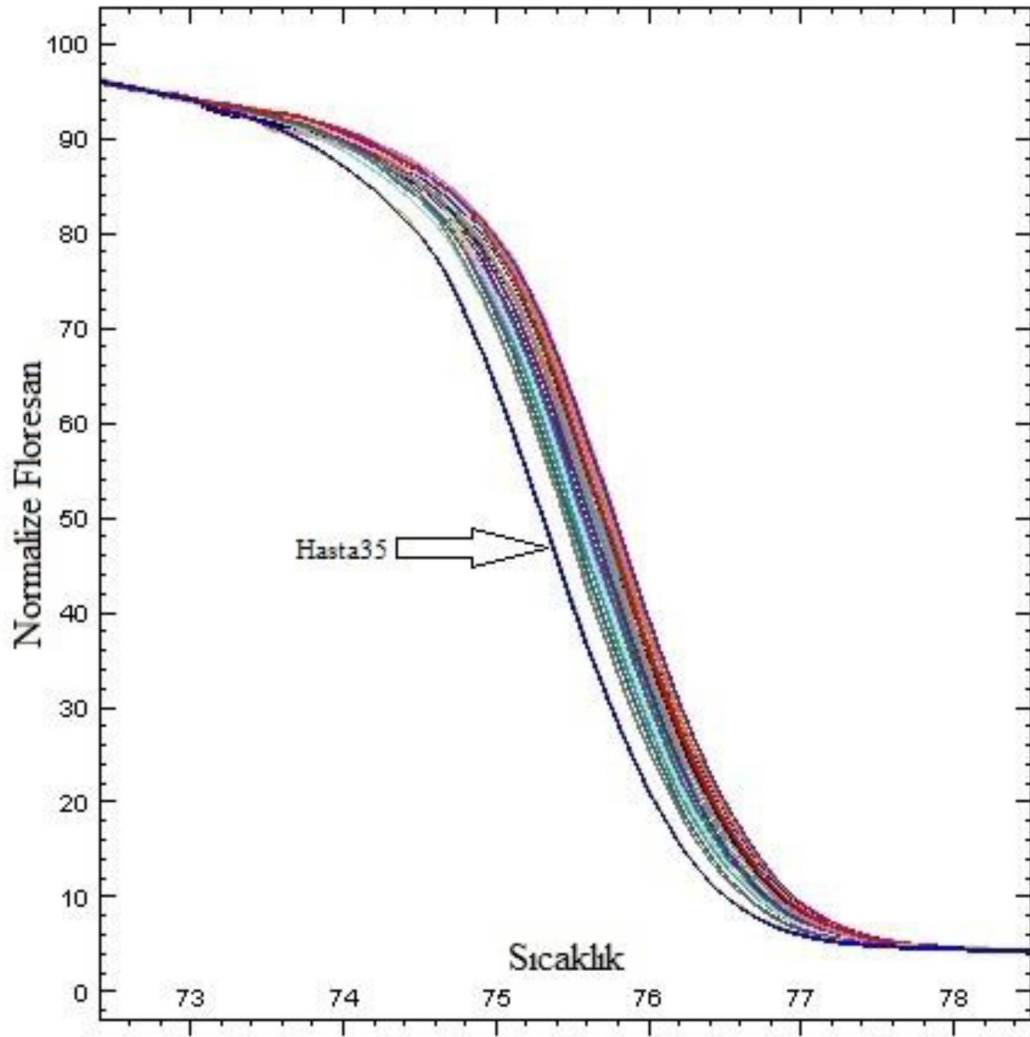
Şekil 4.4.4'de ise IL-23R geni için Yeni Jenerasyon Dizileme tekniği ile genotipi belirlenen bir hastanın, dizileme sonuçları ile heterozigot (GT) olarak belirlenen rs10489630 TNP bazı gösterilmektedir.



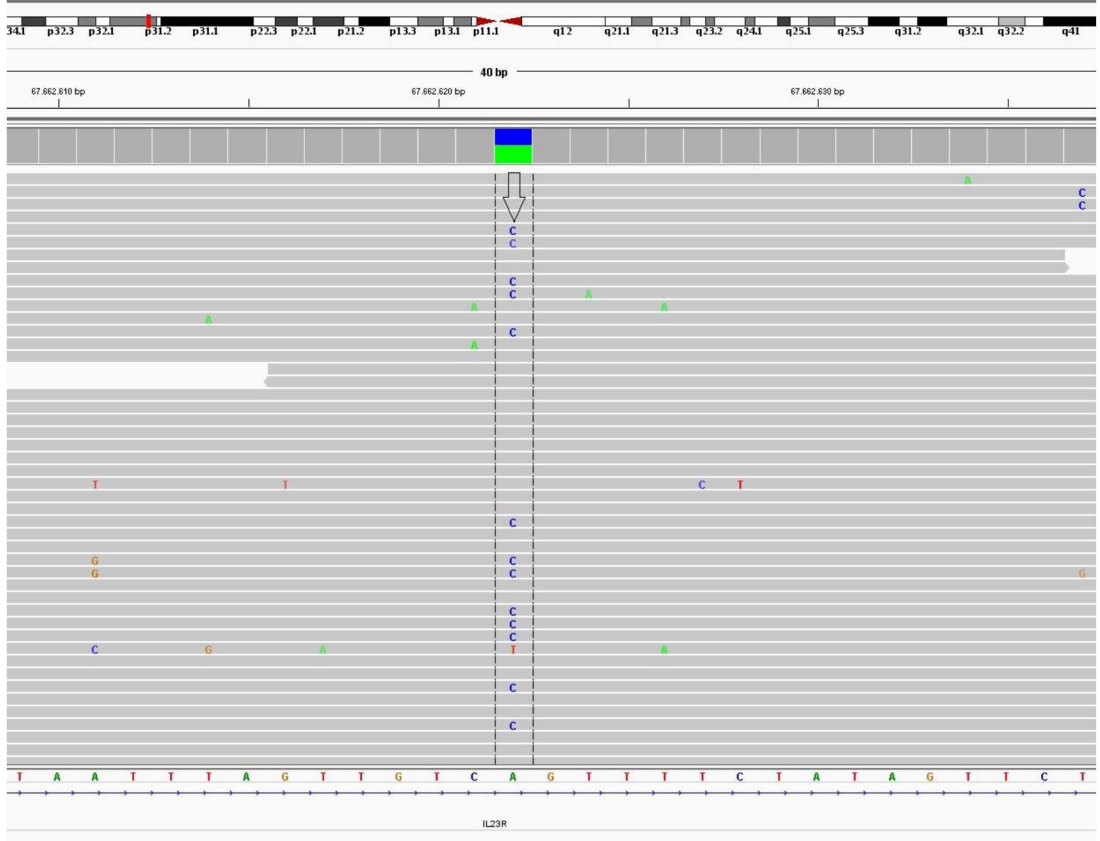
Şekil 4.4.1. IL-23R (rs10489630) için örneklerin PCR analizinde çoğaltma işleminin gerçekleştiği döngü sayısı ve bu döngüleri takiben ortaya çıkan floresan boya hareketlerini gösteren ham veri grafiği görülmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.4.2. IL-23R (rs10489630) için örneklerin HRM analizi sırasında çift sarmalı DNA'ların birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklıkta oluşturdukları pikler gösterilmektedir. Her bir renk farklı bir hastayı temsil etmektedir.



Şekil 4.4.3. ScreenClust HRM yazılımı ile PCR ve HRM analizi verilerinin normalize edilmesi ile elde edilen sıcaklığa göre floresan boyanın miktarını belirten grafik gösterilmektedir (Hasta 35/Deney grubu/Genotipi (GG) yabancı tip homozigot).



Şekil 4.4.4. IL-23R (rs10489630) tayini Kontrol Grubu/112 no'lu hastaya ait heterozigot yabancı tip (GT) olarak Yeni Jenerasyon Dizileme analizi ile belirlenen genotip gösterilmektedir. Ok ile TNP ve dizileme işlemi sırasında her iki baz için de sinyal veren dizileme belirtilmektedir.

5. TARTIŞMA

Var olan birçok deneysel ve klinik çalışmaya rağmen; etiyolojik olarak uyarıcı özel faktörler ile periapikal lezyonun gelişmesi, idamesi ve çözünmesiyle ilişkili katılımcı hücreler ve büyüme mediyatörleri tam olarak anlaşılmış değildir (77). Kemik yıkımında hücresel bağışık yanıtın ve enflamatuvar sürecin düzenlenmesinde her bir sitokin rolü daha fazla araştırma gerektirmektedir (78). Bağışıklık cevabından bahsederken koruyucu ve yıkıcı kavramları dikkatli tanımlanmalıdır. Çünkü konak savunmasında mikroorganizmaların uzaklaştırılması için rol alan aynı reaksiyonlar doku hasarı ile sonuçlanabilir (49).

Enflamasyon ya da tamir mekanizmaları ile ilişkili genlerin polimorfizmi farklı genotipte ve farklı aleller taşıyan bireylerde bağışıklık cevabında farklılıklar görülmesine neden olabilir (79). Periapikal lezyonların oluşumu üzerine farklı genotiplerin etkisini inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır (80, 81). İnsan hastalıklarının büyük bir çoğunluğunun etiyolojisinde genetik bir bileşen bulunmaktadır. Hastalığa hangi genetik faktörlerin nasıl ve hangi boyutta katkı sağladığı, etiyolojinin genetik temelini belirlemesi ve bu bilginin kullanılması hastalığın tanı ve tedavisi için önemli bulguları içerir (82).

Genetik polimorfizmler genetik varyasyonlardır ve karmaşık hastalıkların ortaya çıkmasında katkıları olabilir (81). Birçok tek nükleotid polimorfizmi hücre fonksiyonlarını etkilemez ancak hastalıklara yatkınlığa neden olabilir ya da bireyin ilaçlara olan cevaplarını etkileyebilir (83). Bu çalışmada; sağlıklı bireylerde periapikal lezyonlarda oluşan kemik yıkımına genetik yatkınlık olabilir mi sorusuna cevap bulabilmek amacıyla tedavi edilmemiş derin çürük kavitesi ve nekrotik pulpası olan apikal periodontitis hastalarının IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL-23R rs10489630 gen polimorfizmleri araştırıldı.

IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL23R rs10489630 gen polimorfizmleri daha önce araştırılmamış olduğundan dolayı farklı popülasyonlarda bu TNP'lerin farklı genotiplerinin dağılımları bilinmemektedir. [C/T] değişimi gösteren IL-17 rs542129933 TNP'si için verileri değerlendirilen 193 hastanın (110 kadın, 83 erkek) 3'ünde TT varyasyonu, 189 hastada ise CC yabanıl tip tespit edildi. [A/G] değişimi gösteren IL-17R rs562543976 TNP'si için verileri değerlendirilen 211 hastanın (120 kadın, 91 erkek) 1'inde GG varyasyonu, 206'sında ise AA yabanıl tip tespit

edildi. [A/G] değişimi gösteren IL-23 rs180825144 TNP' si için verileri değerlendirilen 203 hastanın (114 kadın,89 erkek) 2'sinde GG varyasyonu, 201 hastada ise AA yabancı tip tespit edildi. [G/T] değişimi gösteren IL23R rs10489630 TNP' si ise varyasyonun en sık rastlandığı gen idi. Verileri değerlendirilen 203 hastanın (113 kadın, 90 erkek) 55'inde yabancı tip GG genotipi, 47'sinde TT varyasyonu, 101'inde ise TG heterozigot genotip tespit edildi. Ancak kontrol ve deney grupları arasında genotipler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

Periapikal hastalıklara genetik yatkınlığın araştırıldığı bir çalışmada tedavi edilmemiş derin çürüklerden etkilenen ve periapikal lezyon boyutunun 3mm'den büyük olduğu hastalardan aldıkları örneklerde birkaç farklı sitokinin gen polimorfizmini araştırmışlardır. Araştırmacılar IL-1 β geni rs1143643 tek nükleotid polimorfizminin periapikal lezyonun gelişimine yatkınlıkta bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir (18). Bir başka çalışmada yine periapikal lezyonun gelişimine yatkınlığın araştırıldığı bir başka çalışmada MMP3 (matriks metalloproteinaz) rs639752 ve rs679620 gen polimorfizmlerinin periapikal lezyon varlığı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (84).

Bu tez çalışmasında planlanan, periapikal lezyonun ve kemik yıkımının oluşumuna yatkınlığın araştırılması olduğu için hastaların periapikal lezyonlarının boyutu ölçülmedi. Panoramik radyografileri ve gerekli görülen durumlarda periapikal radyografileri incelenerek periapikal lezyon varlığı tespit edilen hastalar çalışmaya dâhil edildi. Hastaların periapikal lezyonları değerlendirilirken PAI skorlamasına dayanılarak inceleme yapıldı ve PAI \geq 3 olarak değerlendirilen lezyonlar çalışmaya dâhil edildi.

Bu çalışmada IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL-23R rs10489630 gen polimorfizmlerinin apikal periodontitis teşhisi konan sağlıklı bireylerde periapikal lezyon oluşması ve kemik yıkımı üzerine etkisi vardır hipotezi kuruldu. Yapılan analizlerin sonucunda ise deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Ancak bu genlerin farklı tek nükleotid polimorfizmleri ile farklı topluluklarda yapılacak araştırmalar genetik farklılıkların apikal periodontitis üzerindeki etkilerinin er ya da geç ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacaktır.

Apikal periodontitis üzerine genetik polimorfizmin etkilerinin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Semptomatik dental apselerde farklı sitokinin polimorfizmlerinin araştırıldığı çalışmada genetik faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmiştir (80). Kök kanal tedavileri tamamlanan, en az bir yıl süresince takip edilen ve başarı sağlanamayan inatçı apikal periodontitis vakalarında belirli genetik işaretlerin artan IL-1 β üretimi ile ilişkili olabileceğini ve bunun da inatçı

apikal periodontitise yatkınlığın artmasına katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir (81). İnatçı apikal periodontitis enfeksiyonların varlığı tespit edilen hastalarda yapılan bir çalışmada CD14 ve Toll benzeri reseptör 4 (TRL, *Toll Like Receptor*) (85) ve bir başka çalışmada ise FcγRIIIA (Fc gama reseptör üç A) (79) gen polimorfizmlerinin endodontik tedavi cevabını etkilemediği belirtilmiştir. Farklı bir araştırma ise Fcγ reseptörü genlerinin polimorfizmlerinin inatçı enfeksiyonlarda bazı durumlarda apikal periodontitis bulunan hastalarda endodontik cevabı etkileyebileceğini belirtmiştir (86).

IL-1β rs1143634 gen polimorfizminin ortodontik tedavi sonrası kök kanal tedavisi yapılan eksternal apikal kök yıkımı olan hastalarda genetik varyasyonların homozigot TT aleli olan hastalarda vital pulpası olan kontrol grubu dişlerinden farklı olduğu bulunmuştur (87). Bir başka çalışmada ise yine IL-1β rs1143634 gen polimorfizminin hastalarda ortodontik tedavi sonrası kök kanal tedavisi yapılan eksternal apikal kök yıkımının genişlemesinde genetik varyasyonların varlığına istinaden olabileceği belirtilmiştir (88). Ayrıca IL-1 reseptör antagonist geni rs419598 ve IL-1β rs1800587 geni polimorfizmleri de ortodontik tedavi sonrası kök kanal tedavisi yapılan eksternal apikal kök yıkımının gelişmesine yatkınlıkta belirleyici olarak gösterilmiştir (89).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda TNP belirlemek için kullanılan yöntemlerden farklı olarak bu çalışmada HRM yöntemi kullanılmıştır. HRM analizi ile PCR'ın aynı reaksiyonda kullanılabilmesi, yöntemin küçük sıcaklık değişimlerine olan hassasiyeti ve TNP belirlemede etkin bir analiz olması nedeniyle bu yöntem tercih edildi. HRM analizi sırasında kullandığımız kit ve cihaz sayesinde sıcaklık PCR analizinden sonra 0.1 °C aralıklarla arttırılarak TNP'lerin buldukları noktadaki ayrılma sıcaklıkları tespit edildi. Apikal periodontitis etiolojisinde genetik polimorfizmlerin etkilerini araştırmak amacı ile yapılan çalışmalarda HRM yönteminin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Sunulan çalışmada IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL23R rs10489630 gen polimorfizmleri araştırıldı. Literatürde IL-17, ILR, IL-23 ve IL23R polimorfizmlerinin bazı otoimmün hastalıkların, enflamatuvar hastalıkların ve kanser türlerinin etiolojisinde etkisi olabileceğini belirten birçok çalışma bulunmaktadır (17, 61, 90, 91).

Bu çalışmanın planlanması aşamasında ve araştırma süresince yapılan literatür taramaları IL-17, IL-17, IL-23 ve IL-23R gen polimorfizmlerinin apikal periodontitis hastalarında araştırıldığı bir çalışmanın var olmadığını göstermektedir. Bu genlerle yapılan birkaç polimorfizm çalışması ise periodontal hastalıklar açısından genlerin

etkilerini değerlendirmektedir. IL-17A, IL-17F ve IL-23R gen polimorfizmlerinin şiddetli periodontitisi olan hastalarda araştırıldığı çalışmada IL-17A rs2275913 gen polimorfizminin T aleli periodontal hastalığın yokluğu ile ilişkilendirilmiştir (92). Kadkhodazadeh ve ark. (93) periimplantitis ve kronik periodontitis hastalarında IL-17R gen polimorfizmi ile ilişkili bulamamışken, periimplantitis ve kronik periodontitisin IL-17 ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (94). Ayrıca kronik periodontal hastalıklarda IL-17A ve IL-17F polimorfizmlerini inceleyen çalışmada araştırmacılar IL-17A geninin bir alelini yüksek kronik periodontitis riski ile ilişkilendirmiştir (95).

Apikal periodontitis hastalarında IL-17 ve IL-17R sitokin profillerinin farklı topluluklar ve hastalığın farklı tipleri üzerinde araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Colic ve ark. (77) hücre kültürü içerisinde insan periapikal lezyon örneklerindeki mononükleer hücrelerde Th1, Th2, Th17 hücreleri ve Treg hücre sitokinlerinin üretimleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları ve lezyon örneklerinin klinik belirtileri ile bağlantılarını değerlendirmişlerdir. Buna göre semptomatik lezyonlarda asemptomatik lezyonlara göre yüksek IL-17 üretiminin yüksek oranda nötrofil varlığı arasında pozitif bir bağlantı olduğunu tespit etmişlerdir. IL-17RA eksikliği oluşturulan farelerde IL-17 cevabı tamamen kaldırıldığında *Porphyrromanas gingivalis* ile indüklenen periodontal enfeksiyonda kemik yıkımının arttığı ve genişlediği gözlenmiştir (96). Sıçanlarda periapikal lezyon oluşturularak yapılan bir başka hayvan çalışmasında 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerde hücresel olarak incelenen periapikal lezyon bölgelerinde Th17 hücreleri lezyon oluşumunun her safhasında tespit edilmiş ve sayılarının lezyonun genişleme süresince arttığı bildirilmiştir (8). Yine sıçanlarda yapılan bir çalışmada Th17 ile ilgili sitokinlerin periapikal kemik yıkımının başlangıcında birincil katılımcılar olabilecekleri belirtilirken (97), bir diğer çalışmada araştırmacılar sıçanların alt molar dişlerinde oluşturdukları periapikal lezyonlarda buldukları IL-17⁺ T ve FoxP3⁺ Treg hücre dinamiklerindeki dengesizliğin periapikal lezyonların ilerlemesinde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (47). İnatçı endodontik enfeksiyonlarda yapılan sitokin analizinde ise artan IFN-γ (interferon), IL-17A, TNF-α ve MCP-1'in (monosit kemotaktik protein-1) mRNA (mesajcı ribonükleik asit) değerleri bulunmuş ve bu enfeksiyonlarda proenflamatuar sitokin profilinin baskın olduğunu öne sürmüşlerdir (7). İnsan periapikal kist ve periapikal granülom örneklerinin histolojik yapılarını ve sitokin, kemokin profilini araştırdıkları çalışmalarında araştırmacılar fistül varlığı olan örneklerde IL-17 ifadesini anlamlı derecede yüksek olarak bulmuşlardır (78).

IL-17, yapılan insan ve hayvan çalışmalarında periapikal lezyonlardaki varlığı

tespit edilmiş (7, 8, 47, 77, 78, 97), doku yıkımı ve kronik enflamasyon ile karakterize edilen romatoid artrit (98) gibi otoimmün hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan ve bakteriyel enfeksiyonlarda (91) önemli olan bir sitokindir. Tüm bu nedenlerle IL-17 geninin apikal periodontitis etiyolojisinde önemi bu çalışmada araştırıldı. IL-23 ise Th17 hücrelerinin farklılaşmasındaki önemi ve Th17 hücrelerinden IL-17 salgılanmasını teşvik etmesi nedeniyle sunulan çalışmada araştırıldı (49). Bu sitokinlerin bağlandıkları reseptörlerin araştırılması ayrıca önemliydi. Çünkü sitokinler fonksiyonlarını kendi spesifik reseptörlerine bağlanarak gerçekleştiren protein molekülleridir (31).

de Oliveira ve ark. periapikal lezyonun oluşma mekanizmasına dâhil olan farklı sitokinler üzerinde çalışmışlardır. IL-22 eksikliği oluşturulan farelerde yapılan çalışmada araştırmacılar oral mikrobiyal profilin farklılaştığını ve 6 bakteriyel türün (*Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus anginosus*, *Prevotella intermedia*) varlığında anlamlı farklılık olduğunu tespit etmişlerdir. Periapikal lezyon oluşumunu ve gelişimini takip ettikleri 42 gün içerisinde IL-22 eksik olan farelerde deneysel sürecin sonunda daha küçük periapikal lezyon ve daha düşük miktarda osteoklast varlığı olduğunu tespit etmişlerdir (99).

Farelerde IL-6 eksikliği oluşturan araştırmacılar molar pulpa ekspozundan sonraki 1, 2, 3, 4 ve 8. haftalarda periapikal lezyon alanlarını incelemişlerdir. IL-6 eksikliği olan farelerde daha büyük periapikal lezyonların daha hızlı geliştiğini ve IL-6 eksikliğinin periapikal lezyonun gelişimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir (100).

Bir başka havan çalışmasında araştırmacılar kemik yıkıcı ve düzenleyici sitokinleri farelerde oluşturdukları periapikal enflamasyon bölgesinde incelemişlerdir. Araştırmacılar 7, 14 ve 28. günlerde inceledikleri periapikal enflamasyon bölgesinde sitokin ağının bakteriyel enfeksiyona cevap olarak aktive edildiği ve Th-1 tip sitokinlerin (IL-2, IL-12, IFN- γ) artışını tespit etmişlerdir. Araştırmaları sonucunda periapikal kemik yıkımı süresince Th-1 hücreleri tarafından düzenlenen proenflamatuvar yolun daha baskın olabileceğini bildirmişlerdir (101).

Sıçanlarda oluşturulan periapikal lezyon bölgesindeki proteinleri inceleyen bir çalışmada araştırmacılar bir kemokin olan *Fraktalkine* (CX3CL1) ve reseptörünün (CX3CR1) (102) bir diğer çalışmada ise (103) MMP-8 ve MMP-13 kemokinlerinin varlıklarını incelemişlerdir. Araştırmacılar bu kemokinlerin ve proteinlerin periapikal lezyonun gelişimi ile ilişkili olduklarını ve belki bu kemokin ve reseptörünün periapikal enflamasyon süresince kemik yıkımının da içinde olduğu doku yıkımının ilerlemesine katkılabileceğini iddia etmişlerdir.

Nekrotik pulpa teşhisi konan ve akut periapikal belirtisi olmayan 20 hastadan, ilk seansta kök kanal şekillendirme ve temizleme sonrası ve 7 gün sonra ikinci seansta örnek olarak periapikal dokulardaki Alfa-2 integrin ve Isı Şoku (*Heat Shock*) proteininin ifadesini ve proenflamatuvar ve immüno-regülatör sitokin cevap profilini incelemişlerdir. Bakterilerin azaldığı ikinci seans örneklerinde daha düşük TNF- α , kemokin ligandı 5 (CCL5), MP2/MCP-1 ve IL-18 seviyelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (37).

Martinho ve ark. (104) endodontik enfeksiyon kaynaklı apikal periodontitis teşhisi konan 21 hastadan örnek olarak, hastaların radyografik olarak belirlenen periapikal lezyonlarının boyutu, eksuda varlığı, palpasyonda ağrı, perküsyonda hassasiyet belirtilerini kaydederek sitokin profili değerlendirmiştir. Bu çalışmada artan periapikal lezyon boyutu ve eksuda varlığı ile TNF- α ve IL-16 arasında pozitif bir ilişki olduğunu tespit etmişlerdir.

İnatçı periapikal enflamasyonu olan hastaların dişlerinin periapikal bölgesinden aldıkları örneklerde interferon-gama (INF- γ), TNF- α , IL-17A ve MCP-1 mRNA ifadelerinin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Bunun yanında ise IL-1 β ifadesinde farklılık olmadığını tespit eden araştırmacılar endodontik enfeksiyonun farklı türlerinde baskın olan proenflamatuvar profilin de değişebileceğini belirtmişlerdir (7).

de Oliveira ve ark. radiküler kist, periapikal granülom teşhisi konan hastalardan alınan örneklerde ise bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen Galektin-3 ve Galektin-9 proteinlerinin ve TLR-2 ve TLR-4'ün ifadesini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu proteinlerin ve reseptörlerin kist ve granülomlarda periapikal enflamasyonun etkinleştirilmesi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (105).

Hastaların periapikal lezyonlarından alınan örneklerde proenflamatuvar sitokin profilini inceleyen Gazivoda ve ark. semptomatik lezyonlarda asemptomatik lezyonlara kıyasla daha yüksek oranda granülosit ve daha yüksek seviyelerde IL-1, IL-6 ve IL-8 salgılandığını belirtmişlerdir. Çalışmada geniş boyuttaki lezyonlarda daha küçük lezyonlara kıyasla ise daha düşük mononükleer fagositoz, yüksek oranlarda CD8⁺ T hücreleri ve yüksek seviyelerde TNF- α , IL-6 ve IL-10 salgılandığı belirtilmiştir (106). Colic ve ark. bir başka çalışmada periapikal lezyon örneklerinde IL-12 ve IFN- γ arasında ve aynı zamanda IL-12 ve IL-10 arasında pozitif bağıntı olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı antijen-sunan hücreler tarafından IL-10 ve IL-12 üretimi arasında iyi bir denge olduğunu ve IFN- γ aracılığı ile bu dengenin periapikal lezyonlarda kronik enflamasyonun izlediği yolu kontrol edebileceğini düşünmüşlerdir (107).

Apikal periodontitis hakkında yapılan polimorfizm çalışmalarında araştırmaya dâhil olan kadın ve erkek hastaların sayılarını belirtmeler dahi cinsiyetler arasında yapılan herhangi bir kıyaslamadan bahsetmemektedir (18, 84). Bu çalışmaya katılan kadın ve erkek hastalar kendi aralarında ve birbirleri ile kıyaslandığında cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi.

Bu araştırmada çenelerin yaygın bir hastalığı olan apikal periodontitisin karmaşık etiyolojisi üzerinde konak savunmalarındaki farklılıkların etkisine bakıldı. Literatürde IL-17, IL-17R, IL-23 ve IL-23R genlerinin özellikle enflamatuvar süreçte belirtilen etkilerinin apikal periodontitiste konak savunmaları arasında oluşabilecek farklılıkların araştırılması önemli idi. Bu çalışma ile IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL23R rs10489630 gen polimorfizmlerinin apikal periodontitis etiyolojisinde konak savunması açısından bir farklılık yaratmadığı tespit edildi.

İnsan genomunda yaklaşık her 500-1000 bazda bir rastlanabilen (83) tek nükleotid polimorfizmleri hastalıkların oluşumu, gelişmesi ve bu hastalıklara karşı geliştirilecek olan tedavilerin daha etkili olabilmesinde katkı sağlayabilecek geniş ve araştırılması gereken bir alandır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 ve IL23R rs10489630 gen polimorfizmlerinin apikal periodontitis periapikal lezyon alanlarında kemik yıkımı oluşması üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışma IL-17, IL-17R, IL-23 ve IL-23R genleri ile yapılan, apikal periodontitis hastalarında periapikal lezyon alanlarında kemik yıkımı oluşması üzerine gen polimorfizmlerinin etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Araştırılan tek nükleotid polimorfizmlerinin genotiplerinin sıklıkları farklı toplumlarda da belirlenmemiştir.

IL-17 ve IL-23 genleri ile ilgili var olan literatür artmaktadır. Araştırmalar bu sitokinlerin ve genlerinin, özellikle otoimmün ve enflamatuvar mekanizmalardaki rolünün önemi üzerinde durmaktadır. Apikal periodontitis etiyojisine katılan bu sitokinler, bağlandıkları spesifik reseptörler ve genleri ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekli ve önemlidir.

Ayrıca, sunulan çalışmada IL23R rs10489630 tek nükleotid polimorfizmi için belirlenen genotiplerde IL-17 rs542129933, IL-17R rs562543976, IL-23 rs180825144 genleri tek nükleotid polimorfizmlerine oranla daha yüksek sayıda varyasyon tespit edildi. Bu durum, daha farklı popülasyonlarda yapılacak çalışmalar ile elde edilebilecek farklı bulgular olabileceğini işaret etmekte ve çalışılan genler ile ilgili daha fazla araştırma yapılmasının gerekliliği konusundaki düşüncelerimizi desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Ørstavik D, Pitt Ford TR. Essential endodontology : prevention and treatment of apical periodontitis. 2nd ed. Oxford, UK ; Ames, Iowa: Blackwell Munksgaard; 2008:1.
2. Siqueira j. F. J. Treatment of Endodontic Infections. 1th ed. Siqueira j. F. J, editor. Quintessence British Library Cataloguing in Publication Data: Quintessence Publishing; 2011:3-5.
3. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1998;9(4):498-521.
4. Wang L, Peng B. Correlation between platelet-derived growth factor B chain and bone resorption in rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2007;33(6):709-11.
5. Letra A, Ghaneh G, Zhao M, Ray H, Jr., Francisconi CF, Garlet GP, et al. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2013;39(9):1141-6.
6. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86(4):306-19.
7. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *Journal of endodontics*. 2011;37(12):1659-62.
8. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2009;35(2):216-20.
9. Yang L, Zhang C, Peng B. Immunolocalization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2009;35(6):834-7.
10. Medicine USNLo. What kinds of gene mutations are possible? : U.S. National Library of Medicine; 18.11.2015 [cited 20.11.2015]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/possiblemutations>.
11. Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier MC. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Annals of medicine*. 2011;43(7):503-11.
12. Jia X, Hu M, Wang C, Wang C, Zhang F, Han Q, et al. Coordinated gene expression of Th17- and Treg-associated molecules correlated with resolution of the monophasic experimental autoimmune uveitis. *Molecular vision*. 2011;17:1493-507.

13. Tao Y, Zhang X, Zivadinov R, Dwyer MG, Kennedy C, Bergsland N, et al. Immunologic and MRI markers of the therapeutic effect of IFN-beta-1a in relapsing-remitting MS. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*. 2015;2(6):e176.
14. Loos M, Lauffer F, Schlitter AM, Kleeff J, Friess H, Kloppel G, et al. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of type 2 autoimmune pancreatitis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2015.
15. Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, Shikotra A, Nagarkar DR, Siddiqui S, et al. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Science translational medicine*. 2015;7(301):301ra129.
16. Zhai Y, Xu K, Huang F, Peng H, Feng CC, Zhu KK, et al. Association of interleukin 23 receptor gene polymorphisms (rs10489629, rs7517847) with rheumatoid arthritis in European population: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2012;39(9):8987-94.
17. Yu P, Shen F, Zhang X, Cao R, Zhao X, Liu P, et al. Association of single nucleotide polymorphisms of IL23R and IL17 with ulcerative colitis risk in a Chinese Han population. *PloS one*. 2012;7(9):e44380.
18. Dill A, Letra A, Chaves de Souza L, Yadlapati M, Bigueti CC, Garlet GP, et al. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. *Journal of endodontics*. 2015;41(2):197-200.
19. Sun M, Fu SM, Dong GY, Wu D, Wang GX, Wu Y. Inflammatory factors gene polymorphism in recurrent oral ulceration. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2013;42(7):528-34.
20. Hargreaves KM, Cohen S, Berman LH. Cohen's pathways of the pulp. 10th ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier; 2011: 36-8, 551, 643-4.
21. Castellucci A. Endodontics. 1th ed. 50131 Florence, Italy: Il Tridente; 2004: 139.
22. Alaçam TA, Alev ; Aydın, Murat ; Tınaz, Cemal; Ömürlü, Hüma; Can, Hülya Erten; Uzel, İlter ; Yıldırım, Sibel Endodonti. 2. Baskı. Ankara: Özyurt Matbaacılık; 2012:71-91.
23. Walton RE, Torabinejad M. Endodonti : Temel ilkeler ve uygulamalar. 4. Baskı. St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier; 2009:49-65.
24. Çalışkan M. Endodontide Tanı ve Tedaviler. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2006:105, 139-143.

25. John I. Ingle LKB, J. Craig Baumgartner. Ingle's Endodontics. 6th edition ed. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House; 2008:349, 507.
26. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian dental journal*. 2007;18(4):267-80.
27. 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.
28. Orstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol*. 1986;2(1):20-34.
29. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology : functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012.
31. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York: Garland Science; 2012:102.
32. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2008:7-9.
33. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. 6th ed. Edinburgh ; New York: Mosby; 2001:10, 22-29, 119.
34. He B, Hu M, Li SD, Yang XT, Lu YQ, Liu JX, et al. Effects of geraniin on osteoclastic bone resorption and matrix metalloproteinase-9 expression. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2013;23(3):630-4.
35. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2673-82.
36. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *Journal of endodontics*. 2015;41(9):1474-9.
37. Bambirra W, Jr., Maciel KF, Thebit MM, de Brito LC, Vieira LQ, Sobrinho AP. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. *Journal of endodontics*. 2015;41(7):1085-90.
38. AlShwaimi E, Berggreen E, Furusho H, Rossall JC, Dobeck J, Yoganathan S, et

- al. IL-17 receptor A signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. *Journal of immunology*. 2013;191(4):1785-91.
39. Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB, et al. *Campbell biology*. 10th edition. ed. 2014: 412-5.
40. Health P. Lymphocyte 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022042/>.
41. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
42. Warren Levinson EJ. *Medical Microbiology & Immunology*. 4th ed. Four Stamford Plaza, 107 Elm Street, Stamford, CT 06912: Appleton & Lange; 1996:315-6.
43. Toussirot E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflammation & allergy drug targets*. 2012;11(2):159-68.
44. Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology*. 2008;38(10):2636-49.
45. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*. 2008;87(9):817-28.
46. Hwang ES. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei medical journal*. 2010;51(4):484-91.
47. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2014;40(1):56-62.
48. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):650-9.
49. Marton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):155-63.
50. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-76.
51. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1345-52.
52. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive

arthritis? *Cytokine*. 2008;41(2):84-91.

53. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.

54. Song GG, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associations between interleukin-23 receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2012;39(12):10655-63.

55. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-25.

56. D'Elia MM, Del Prete G, Amedei A. Targeting IL-23 in human diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2010;14(7):759-74.

57. Kim ES, Kim SW, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, et al. Interactions between IL17A, IL23R, and STAT4 polymorphisms confer susceptibility to intestinal Behcet's disease in Korean population. *Life sciences*. 2012;90(19-20):740-6.

58. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. *Journal of immunology*. 2009;182(6):3372-9.

59. Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *European journal of immunology*. 2012;42(9):2263-73.

60. Hazlett J, Stamp LK, Merriman T, Highton J, Hessian PA. IL-23R rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with rheumatoid arthritis. *Genes and immunity*. 2012;13(3):282-7.

61. Popa OM, Kriegerova E, Popa L, Schneiderova P, Dutescu MI, Bojinca M, et al. Association study in Romanians confirms IL23A gene haplotype block rs2066808/rs11171806 as conferring risk to psoriatic arthritis. *Cytokine*. 2013;63(1):67-73.

62. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 2012;135(2):112-24.

63. Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;71(3):134-45.

64. Medicine USNLo. What is DNA? 2015 [updated 18.11.2015]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>.

65. Project CGaE. Mutations: The University of Vermont [updated 2001; cited 2015

- 20.11.2015]. Available from: <http://www.uvm.edu/~cgep/Education/Mutations.html>.
66. Strachan T, Goodship J, Chinnery PF. Genetics and genomics in medicine. xviii, 526 pages p.
67. Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gomez M, Torres O, Florez L, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *International endodontic journal*. 2013;46(1):71-8.
68. Thomas M AS, du Souich C, Van Allen M, Boerkoel C.F. What can genomics do for health care? *BC Medical Journal*. 2009;51(7):298-301.
69. NCBI. Polymerase Chain Reaction (PCR) 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr>.
70. Fei Mao W-YL, Xing Xin. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*. 2007;7:76.
71. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and molecular pathology*. 2008;85(1):50-8.
72. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007;8(6):597-608.
73. Twist GP, Gaedigk R, Leeder JS, Gaedigk A. High-resolution melt analysis to detect sequence variations in highly homologous gene regions: application to CYP2B6. *Pharmacogenomics*. 2013;14(8):913-22.
74. Ng DP, Koh D, Choo SG, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2004;343(1-2):191-4.
75. Biosystems A. A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis 01.11.2015. Available from: <https://sbmsaiumu.files.wordpress.com/2013/06/hrm-guide.pdf>.
76. NCBI. Primer-BLAST/A tool for finding specific primers. 01.11.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
77. Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Vasilijic S, Rudolf R, Lukic A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular immunology*. 2009;47(1):101-13.
78. Marcal 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. *Journal of endodontics*. 2010;36(6):995-9.
79. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Provenzano JC, Guilherme BP. Polymorphism of the

- FcgammaRIIIa gene and post-treatment apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2011;37(10):1345-8.
80. de Sa AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *International endodontic journal*. 2007;40(7):563-72.
81. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2011;37(4):455-9.
82. Tarannum F, Faizuddin M. Effect of gene polymorphisms on periodontal diseases. *Indian journal of human genetics*. 2012;18(1):9-19.
83. Sripichai O, Fucharoen S. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2007;90(2):394-8.
84. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *Journal of endodontics*. 2012;38(5):604-7.
85. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Goncalves LS. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):168-72.
86. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC. Relationship between Fcgamma receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. *Journal of endodontics*. 2009;35(9):1186-92.
87. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico RM, Ballesta S, Ortiz-Ariza E, Mendoza-Mendoza A, Perea E, et al. Interleukin 1 gene cluster SNPs (rs1800587, rs1143634) influences post-orthodontic root resorption in endodontic and their contralateral vital control teeth differently. *International endodontic journal*. 2012;45(11):1018-26.
88. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico RM, Ortiz-Ariza E, Ballesta S, Mendoza-Mendoza A, Perea E, et al. Postorthodontic external root resorption in root-filled teeth is influenced by interleukin-1beta polymorphism. *Journal of endodontics*. 2012;38(3):283-7.
89. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico R, Ballesta-Mudarra S, Ortiz-Ariza E, Ortega-Rivera H, Mendoza-Mendoza A, et al. *Postorthodontic external root resorption is associated with IL1 receptor antagonist gene variations*. *Oral diseases*. 2012;18(2):198-

205.

90. Zhang X, Yu P, Wang Y, Jiang W, Shen F, Wang Y, et al. Genetic polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F and their association with inflammatory bowel disease in a Chinese Han population. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*. 2013;62(8):743-50.
91. Nakada TA, Russell JA, Boyd JH, Walley KR. IL17A genetic variation is associated with altered susceptibility to Gram-positive infection and mortality of severe sepsis. *Critical care*. 2011;15(5):R254.
92. Saraiva AM, Alves e Silva MR, Correia Silva Jde F, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Human immunology*. 2013;74(2):207-14.
93. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Amid R, Youssefi N, Mehdizadeh AR. Interleukin 17 receptor gene polymorphism in periimplantitis and chronic periodontitis. *Acta medica Iranica*. 2013;51(6):353-8.
94. Kadkhodazadeh M, Baghani Z, Ebadian AR, Youssefi N, Mehdizadeh AR, Azimi N. IL-17 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis and peri-implantitis in Iranian patients: a cross-sectional study. *Immunological investigations*. 2013;42(2):156-63.
95. Correa JD, Madeira MF, Resende RG, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, de Souza Dda G, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators of inflammation*. 2012;2012:846052.
96. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*. 2007;109(9):3794-802.
97. Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, et al. Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2013;39(3):164-70.
98. Paulissen SM, van Hamburg JP, Dankers W, Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2015;74(1):43-53.
99. de Oliveira KM, da Silva RA, De Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, et al. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and th

- e progression of induced periapical lesions in murine teeth. *International endodontic journal*. 2015;48(1):46-59.
100. 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 surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2001;92(1):83-8.
101. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44(1):55-66.
102. Wang L, Sun Z, Liu L, Peng B. Expression of CX3CL1 and its receptor, CX3CR1, in the development of periapical lesions. *International endodontic journal*. 2014;47(3):271-9.
103. Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *International endodontic journal*. 2011;44(8):739-45.
104. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *Journal of endodontics*. 2012;38(6):740-5.
105. de Oliveira Rde C, Beghini M, Borges CR, Alves PM, de Araujo MS, Pereira SA, et al. Higher expression of galectin-3 and galectin-9 in periapical granulomas than in radicular cysts and an increased toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression are associated with reactivation of periapical inflammation. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):199-203.
106. Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2009;38(7):605-11.
107. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010;39(9):690-6.

EK.1. ÖZGEÇMİŞ

25.06.1980 tarihinde Mersin’de doğdum. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde başladığım diş hekimliği eğitimimi 2005 yılında tamamladım. 2005-2009 yılları arasında özel ağız diş sağlığı polikliniğinde, 2009-2010 yılları arasında Gaziantep Karkamış Merkez Sağlık Ocağında ve Malatya Ağız ve Diş Sağlığı Merkezinde çalıştım. 2010 yılında doktora eğitimime başladım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

EK.2. ETİK KURUL ONAYI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN POLİMORFİZMLERİNİN APİKAL PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL LEZYONLARINDA KEMİK YIKIMI OLUŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014/66

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN POLİMORFİZMLERİNİN APİKAL PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL LEZYONLARINDA KEMİK YIKIMI OLUŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014/66

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/66	Tarih: 16.04.2014		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmannın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmannın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Başkanın Unvanı / Adı / Soyadı:	Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ	Psikiyatri	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Saim YOĞLU	Biyoistatistik	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Türkan TOĞAL	Anesteziyoloji ve Rea.	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ahmet KARADAĞ	Çocuk Sağlığı ve Hast.	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Aladin POLAT	Fizyoloji	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H.Birgül CUMURCU	Psikiyatri	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI	Tıbbi Mikrobiyoloji	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		IL-17, IL-17R, IL-23 VE IL-23R GEN POLİMORFİZMLERİNİN APİKAL PERİODONTİTİS HASTALARININ PERİAPİKAL LEZYONLARINDA KEMİK YIKIMI OLUŞMASI ÜZERİNE ETKİSİ						
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2014/66						
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK	Diş Hekimliği	Inönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Uzm. Dr. Ömer Murat AYDIN	Nükleer Tıp Uzmanı	Malatya Devlet Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Metin TAY	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Zafer ERGÜZEL	Hukuk	Inönü Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Hasan KONAN	Sivil Üye	Zaloglu Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. R. KARLIDAĞ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.