

MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN ENDODONTİDE KULLANILABİLİRLİĞİ

THE USABILITY OF MOLECULAR INDICATORS IN ENDODONTICS

Arş. Gör. Gözde AKBAL*, Prof. Dr. Ali ERDEMİR*

*Endodonti anabilim dalı, Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Kırıkkale, Türkiye

Özet

Pulpanın ve periapikal dokuların enflamatuvar durumunu anlamak için günümüzde kullanılan yöntemlerle ancak sınırlı bir bilgi elde edilebildiği hatta bu yöntemlerin çoğu zaman doğruyu yansıtmadığı son yapılan sistematik araştırmalar ile ortaya konmuştur. Bu durum araştırmacıları; endodontik tanı koymada alternatif yollar aramaya yöneltmiştir. Moleküler değerlendirme bu yönde alternatif yollardan biri olarak görülebilir. Hüresel ve moleküler düzeyde fonksiyonel olan 'biomarker'lar patolojik sürecin devam etmesinde gerekli elementlerdir. Moleküler belirteçlerin tespit edilmesi patolojik durumun teşhis edilmesinde yardımcı olabilir. Bu derlemede, şimdiye kadar hangi moleküler belirteçlerin araştırıldığı, örneklerin alınabileceği bölgeler, kullanılan metodlar ve çalışmalardaki son durum hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: endodonti, moleküler diağnoz, enflamasyon, pulpa

Abstract

To understand the inflammatory state of the pulp and periapical tissues, only the limited information can be obtained with the methods currently used and the systematic investigations have revealed that it does not often reflect the truth. This situation has prompted researchers to look for alternative ways in endodontic diagnosis. Molecular evaluation can be seen as one of the alternative ways in this direction. 'Biomarkers' which are functional at the cellular and molecular level are essential elements in the pathological process. Detection of molecular markers may be helpful in diagnosing the pathological condition. In this review, it is aimed to give information about which molecular markers have been searched until now, the regions where the samples can be taken, the methods used and the latest situation in the studies.

Keywords: endodontics, molecular diagnostics, inflammation, pulp

Giriş

Diagnoz; hastalık belirtilerine ve hastalıkla ilgili her türlü muayene bulgularına dayandırılarak hastalığın niteliğinin ortaya konması, spesifik bir hastalıkta sebep-etki ilişkisinin anlaşılmasıdır. Günümüzde endodontik diağnoz klinik semptomlar, pulpa testleri ve periapikal radyografiler ile konulmaktadır. Bu yöntemler faydalı olsa da kendi limitasyonları bulunmakta [1-3], dahası

linik bulgular ile pulpanın histolojik durumu her zaman korelasyon göstermemektedir [4]. Yanlış teşhis ve tedavilere neden olabilecek bu durum, daha spesifik yöntemlerin araştırılmasına yol açmıştır. Klinik endodontide hastalığın sebebi, ağız florasında bulunan ya da normalde bulunmayıp geçici olarak sayısı artmış mikroorganizmaların, diş sert dokularında oluşturduğu fırsatçı bir enfeksiyondur [5]. Pulpa ve periradiküler hastalıklar fırsatçı enfeksiyon kaynaklı olduğundan, mikroorganizmalar ya da konakçı yanıtı sonucu ortaya çıkan moleküller tanıda hedef olabilir.

Endodontik Diağnoz

Dental anamnez tedavinin kararlaştırılmasında çok etkili olsa da

İletişim Adresi

Dt. Gözde AKBAL
Kırıkkale Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Endodonti A.D. 71100
Kırıkkale

e-mail: gozdeakbal1@gmail.com

pulpanın durumunu doğru teşhis etmek açısından sadece katkıda bulunabilir. Çalışmalar göstermiştir ki; bir dişin ağrı öyküsü olup olmaması, o dişin durumuyla ilgili gerekli bilgiyi vermez [6]. Bu nedenle pulpanın vitalitesini sürdürmeyi amaçlayan tedavilerden sonra ve rutin kontrollerde pulpa testi yapılması önerilmektedir. En çok kullanılan metod soğuk testidir. Diş kronuna soğuk teması ile vital, ısıya duyarlı sinir lifleri uyarılır. Diğer metodlar ise, sıcak uygulanması, elektrikli pulpa testi, mevcut restorasyon üzerinden aeratör uygulanmasıdır. Fakat bu testlerin, travma sonrası, pulpa kanal obliterasyonu ya da dişte koronal restorasyon olması durumunda doğruluğu şüphelidir.

Pulpa testine negatif cevap alınan dişler apikal periodontitis varlığı açısından radyografik olarak kontrol edilir. Periapikal radyolusensi bulunması pulpa nekrozu ve periapektteki enflamasyonun histolojik belirtisi ile ilişkilendirilir [7]. Oysa ki kökün apikal üçlüsünde kalan pulpada histolojik olarak sinir lifleri dahil olmak üzere bir çok zarar görmemiş doku gözlenmiştir [8]. Ayrıca, periapektteki bir değişikliğin radyografide görülmesi, bir yılı alabilmektedir [9]. İki boyutlu görüntülemenin bir diğer problemi ise anatomik süperpozisyon meydana gelmesidir. Örneğin, süngerimsi kemikteki bir apikal periodontitis, çok geniş bir lezyon mevcut olsa bile, radyografik olarak görülemeyebilir [10, 11]. Teoride 3 boyutlu görüntüleme bu problemi çözebilir [12]; ancak bu yöntemler sonucu oral dokuların maruz kaldığı radyasyon standartlara göre kabul edilemezdir [13]. Periapikal dokuların histolojisi ile radyografik görüntüsü arasındaki ilişki, konvansiyonel radyografların aksine 3 boyutlu görüntülemeye henüz ispatlanamamıştır. Örneğin; dental volumetrik tomografide skar dokusu ile iyileşmenin nasıl görüneceği bilinmemektedir [14]. Sağlıklı bir diş ise dental volumetrik tomografide periodontal aralığı genişlemiş gözükülebilmektedir [15].

Moleküler Diagnoz

Hastanın subjektif yanıtları ve geleneksel pulpa testlerinin ötesine geçmek için araştırmalar başlamıştır. Araştırılan diagnostik metodlar bölgeye özgü olmalı ve şimdiki testlerden daha kesin sonuçlar

vermelidir. Bu şekilde ileri tedavilerden kaçınmak ve vital dokuları korumak mümkün olur. Moleküler metodlar belirli bir klinik vakada gerekli tedavinin boyutunu belirleyebilir. Örneğin restoratif diş hekimliğinde; restorasyon öncesi pulpanın bir tedaviye ihtiyaç duyup duymadığı belirlenebilir. Kanal tedavisi sınırları içinde bile, pulpa bütünlüğü korunup korunamayacağı, ya da, pulpanın çıkarılması veya amputasyon yapılacaksa bu prosedürlerin hangi seviyede gerçekleştirilmesi gerektiği öğrenilebilir. Ayrıca; apikal periodontitisli bir dişte pulpa tamamen çıkarılacaksa, kanal dolumundan önce periapektteki enflamasyonun iyileşmeye başlayıp başlamadığı ortaya çıkarılabilir.

Bütün bu yukarıda sayılan bilgilere erişmek için, etkilenen bölgenin moleküler analizi diagnostik bir değere sahip olabilir. Fırsatçı bir enfeksiyon ile mücadele ettiğimizden, bu konu çerçevesinde ilk araştırılması gereken soru ise, bakteriyel varlığı işaret eden moleküllerin mi yoksa etkilenen dokuların enflamasyon durumunu işaret eden moleküllerin mi belirlenmesi gerektiğidir.

Bakteriyi hedef almak hastalığın sebebine direk erişime izin verir. Geçmişte, kanal dolumu öncesi bakteri miktarının azaldığını ya da bakterilerin yok olduğunu belirlemek için kanal içeriğinden kültür yapılmıştır. Sonra bu işlem klinisyen uygun antibiyotik terapisini seçebilsin diye antibiyogram oluşturmak için uygulanmıştır [16]. Oysa ki, endodontik enfeksiyonlar non-spesifik karma bakterilerden meydana gelmektedir [17]. Endodontik enfeksiyonlar istilacı türlerin özgünlüğünden çok ekolojik faktörlerin değişmesinden ileri gelmektedir. Bu nedenle 'ekolojik plak hipotezi' [18] periodontal hastalıklar ile sınırlı kalmayıp endodontik hastalıklar için de geçerli olmaktadır [19]. Bütünyle düşünüldüğünde, bu şartlar altında üstün diagnostik değeri olan anahtar bir mikroorganizma ya da spesifik bir mikroorganizma grubu belirlemek pek de mümkün değildir.

Moleküler diagnoz bağlamında, bakteri varlığındansa konakçı yanıtına ulaşmanın bazı net avantajları vardır. Bu sebeple bu yöndeki araştırmalar daha yoğundur. Her bölge ve doku sıvısı kendine has konakçı faktörleri bulundurmaktadır [20]. Bakteri

varlığına bakmaktansa konakçı yanıtına bakmak, kendiliğinden, kontaminasyon (örneğin tükürük ile) sorununu önlemektedir. Analiz edilen molekülün bileşimi enflamasyon süreci içerisinde değişmektedir. Bu nedenle hastalıkla ilişkili faktörler, sağlıklı ilişkili olanlar ile kontrol edilebilir ya da karşılaştırılabilir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) hem pulpal hem periapikal enflamasyonda belirlenmiştir [21, 22]. Bu enzim grubu, pulpa ve periapikal bölgede enflamasyon sırasında görüldüğü gibi ekstrasellüler matriksin yıkımından sorumludur. Ekstrasellüler matriks yıkımını bakteri intrasellüler komponentleri, metabolitleri ve diğer moleküller meydana getirir ve periradiküler lezyon oluşumuna devam eden bir süreç başlatır [22]. MMP'lar normal dokularda düşük seviyelerde eksprese edilen, enflamasyonda sayıları artan endopeptidazlardır. MMP-8 seviyeleri periapikal eksuda varlığında yüksek iken, kök kanal tedavisi ilk seansından sonra belirgin bir şekilde düşmektedir [21]. Immunohistokimyasal boyama pulpa ve periapikal granülomalarda MMP-8 ve en çok MMP-8 eksprese eden hücre tipi olan polimorfonükleer lökosit (PMNL) varlığını göstermiştir.

SP, NKA ve CGRP pulpa ve periodonsiyumda mevcuttur. Bu peptitler trigeminal gangliondan kalkan ve miyeliniz C lifleri ve bazı A-delta liflerinde eksprese edilir. Bu peptitlerin kan akımı üzerinde, enflamasyon ve immün cevapta önemli etkileri vardır. Dolayısıyla, pulpal ağrı üzerinde etkisi olabilir. Çekilmiş ve endodontik olarak tedavi edilmiş ağırlı dişlerden alınan pulpa dokularında yapılan bir çalışmada, ağırlı dişlerde, ağrısız dişlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda SP, NKA ve CGRP bulunmuştur [23]. Enflame periradiküler dokularda SP artışı Tuncer ve arkadaşlarının [24] yaptığı bir çalışmada da gösterilmiştir.

Alkalin fosfataz (ALP) mineralize doku formasyonunda hayati önem taşımaktadır ve normal pulpalara göre reversible pulpitisli dişlerde aktivitesinin sekiz kat arttığı gösterilmiştir. Fakat irreversible pulpitiste normal pulpayla eşit değerlerde ALP aktivitesi saptanmıştır [25]. Bu sonuç, ALP'nin yaralanmadan sonra ilk pulpa cevabında rolü olduğunu gösterebilir. Hüresel proteazlar, elastaz ve katepsin-G PMN lökositlerin

lizozomal degranülasyonu ile serbest bırakılırlar ve bağ dokunun yıkımına neden olurlar. Fakat, serum proteaz inhibitörü α 2-makroglobulinler nonspesifik pulpal doku yıkımını hafifletirler. Ortadan şiddetliye enflame pulpalar arasında katepsin-G ve α 2-makroglobulinde belirgin bir korelasyon görülmüştür [26].

Periapikal lezyonlarda ayrıca kemik hücre aktivasyonunu düzenleyen interlökin saptanmıştır. Interlökin-1 (IL-1) başlıca monosit ve makrofajlar tarafından üretilir ve organ kültürlerinde kemik rezorpsiyonunun güçlü bir tetikleyicisidir. ELİSA testi kullanılarak periapikal lezyonlarda IL-1 β aktivitesi gösterilmiş, bu da periapikal lezyonlarda IL-1 β üretildiğini ve lokal olarak salınarak kemik yıkımı oluşturduğunu teyit etmiştir [27].

Yukarıda örneği verildiği gibi birçok molekül çeşitli yöntemler kullanılarak ölçülmüş, günümüze kadar moleküler diaznoz için en uygun yöntem ve belirteç araştırılmıştır. Endodontide şimdiye kadar moleküler diaznoz için dişeti oluşu sıvısı, pulpa kaynaklı kan, dentin kaynaklı sıvı ve periapikal sıvı örnekleri kullanılmıştır.

Dişeti Oluşu Sıvısı (DOS)

DOS dişeti oluşundan kaynaklanan bir salgıdır. Bu sıvı antikor, bakteriyel antijen, protein ve sitokinler gibi çok sayıda konakçı faktörü içerir [28]. 1950'lerin sonunda DOS'nın, periodontal enflamasyonla ilişkilendirilmesi fikri ortaya atılmıştır. Çünkü DOS periodontal ligament tarafından üretilir ve modifiye edilir [29]. Bundan sonra yapılan bütün çalışmalar, periodontal olarak etkilenmiş dişlerde DOS'ndaki konakçı faktörlerinin, sağlıklı olan dişlerdekinden farklı olduğunu göstermiştir [30]. Aynı sonuç ortodontik tedavi sonrası ve travma sonrası kök rezorpsiyonu olan dişlerde de gösterilmiştir [31, 32]. Bu gözlemlerden sonra ortak sonuç; periodontal enflamasyonun, altında yatan sebep ne olursa olsun değerlendirilebileceğidir.

Çünkü periodonsiyum ve endodontiyumun damarsal ve sinirsel kaynakları fonksiyonel ve anatomik olarak bağlantılıdır [33, 34]. DOS örneği almak non-invaziv bir yöntem olduğundan bütün klinik vakalarda diaznozistik bilgi sağlamak amacıyla kullanılabilir. Fakat yapılan çalışmalarda, endodontik olarak etkilenmiş dişlerde DOS'dan alınan

örneklerde konakçı faktörlerindeki değişiklikler daha belirsiz bulunmuştur. Bazı çalışmalarda; ağrılı ve ağrısız dişlerde nörotransmitter, IL-8 ve MMP-8 bileşiminin DOS'nda değişiklik gösterdiği gözlenmiştir [35-38]. Diğer araştırmalar; asemptomatik apikal periodontitisi ve sağlıklı kontrol grubu arasında, DOS'ndaki moleküler kompozisyondaki farklılıkları ölçmüşlerdir [39-41].

DOS analizleri bazı araştırmacılar tarafından ümit verici olarak değerlendirilmektedir. Çünkü apikal periodontitis, marjinal periodontitis gibi periodontal ligamentteki lokal bir enflamasyondur. Teorik olarak apikal periodontitisin dinamiği ile ilgili bilgilere erişmek (örneğin, kanal tedavisi sonrası apikal periodontisteki iyileşme süreci) DOS analizleri ile mümkün olabilir. Fakat, DOS'ndaki konakçı mediatörlerinin yükselmesi konusunda önemli bir sorun vardır. Bu sorun, sebebinden bağımsız olarak, enflamasyonun doğal bağışıklık sisteminin non-spesifik bir süreci olduğudur [42]. Bundan dolayı, marjinal ve apikal periodontal enflamasyonu birbirinden ayırmak zorlaşmaktadır.

Karapanou ve arkadaşları [35] yaptıkları çalışmalarında, IL-8 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ölçümleri için geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerden, bitişindeki dişlerden ve kontralateralindeki dişlerden DOS örnekleri elde etmişlerdir. 7 geri dönüşümsüz pulpitisli dişten lokal anestezi yapıldıktan sonra örnekler toplanmış ve farklı bir grup olarak değerlendirilmiştir. Ağrı şiddeti sözlü sayısal skala (1-10) kullanılarak rapor edilmiştir. 25 dişten alınan örneklerde TNF- α , DOS'nda tespit edilememişken, 18 dişten alınan örneklerde IL-8 geri dönüşümsüz pulpitisli dişlerde, bitişindeki ve kontralateralindeki dişlere göre belirgin bir şekilde daha yüksek ölçülmüştür. Skalada ağrı şiddeti 5'in üstünde olan dişlerde, kontralateral dişe göre belirgin bir şekilde yüksek IL-8 seviyesi ölçülmüştür. Lokal anestezi yapılmış grupta çok düşük IL-8 seviyesi bulunmuştur. Bu durumda DOS'ndaki IL-8 miktarını ölçmenin akut pulpitisli hastaların evrelendirilmesinde faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Avellan ve arkadaşları [36] yaptıkları çalışmada elektrik ile stimüle edilen deneysel diş ağrısının SP ve MMP-8'in DOS'ndaki

seviyelerinde değişiklik oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Üst santral dişlere uygulanan ağrı stimülasyonu ile DOS'larındaki SP ve MMP-8 seviyelerinde belirgin bir şekilde artış görülmüştür. Stimüle edilmemiş kontrol dişlerinde bu seviyeler değişmeden kalmıştır. Bu sonuçlar enflamasyon reaksiyonlarının pulpadan etrafındaki periodontal dokulara lokal nörojenik yayılması ihtimalini desteklemektedir.

Belmar ve arkadaşları [39] yaptıkları çalışmada etkilenmiş ve sağlıklı dişlerden DOS örneği elde ederek apikal lezyonlu dişlerin DOS'ndaki jelatinolitik aktiviteyi saptamayı amaçlamışlardır. Etkilenmiş dişlerin DOS örneklerinde, sağlıklı dişlere göre proMMP-9 seviyeleri belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur ve bu seviyeler MMP-9 aktivitesi ile orantılıdır. Aynı şekilde MMP-2 aktivitesi de sadece hastalıklı örneklerde saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda, MMP-9 ve MMP-2'nin periapikal lezyonlu dişlerden alınan DOS örneklerinde oldukça yüksek olduğu ve bu jelatinazların kronik apikal periodontitisi monitorize etmek için faydalı belirteçler olduğu belirlenmiştir.

Su-Jung Shin ve arkadaşları [38] DOS'ndaki MMP-8 ve SP seviyelerinin nonvital dişlerin kök kanal tedavisi sırasındaki değişimlerini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Tedaviye başlamadan önce, ikinci seansta irigasyon yapmadan önce ve üçüncü seansta kanal dolumu gerçekleşmeden olmak üzere örnek toplanarak, MMP-8 ve SP seviyeleri ölçülmüştür. Hastaların subjektif ağrı seviyeleri belirgin bir şekilde MMP-8 ve SP seviyeleri ile bağlantılı bulunmuştur. MMP-8 ve SP seviyeleri kök kanal tedavisi sürecinde düşmüş ve birbirleri ile pozitif bir korelasyon göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda, periradiküler inflamasyonun DOS'ndaki MMP-8 ve SP seviyelerini yükselttiği gözlenmiştir.

Diğer bir çalışmada, asemptomatik apikal periodontitis tanısı ile çekim endikasyonlu dişler ve sağlıklı fakat ortodontik nedenle çekim endikasyonu konmuş dişler toplanmış; apikal lezyonlar ve sağlıklı periodontal ligamentlerden elde edilen homojenize doku örneklerinde MMP-2,-9 seviyeleri ve/veya aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca asemptomatik apikal periodontitis (APP) tanısı konmuş endodontik tedavi yapılacak dişler seçilmiş, APP'li dişlerden ve

kontralateralindeki sağlıklı dişlerden DOS örnekleri alınmıştır. Endodontik tedavi sonrası tekrar APP'li dişlerden DOS örneği toplanmıştır. Homojenize doku ve DOS örneklerinde total oksidan ve antioksidan miktarları belirlenmiştir. MMP-2,-9 aktivitesi apikal lezyonlarda yüksek bulunmuştur. Toplam oksidan miktarı MMP-2 ve lezyon büyüklüğü ile pozitif yönde korelasyon göstermiştir. Kontrol grubu ve kök kanal tedavisi yapılmış gruba göre, apikal lezyonlu dişlerin DOS örneklerinde belirgin bir şekilde daha düşük antioksidan miktarı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, apikal lezyonların oksidan dengesizliği ve artmış MMP-2,-9 aktivitesi gösterdiği, bunların asemptomatik apikal periodontitis gelişmesine katkıda bulunabileceği görülmüştür. Ayrıca oksidan dengesizliği konservatif endodontik tedavi ile normal düzeylerine dönmektedirler. DOS'ndaki bu mediatörler hasta başı apikal durum tanısında belirteç olarak faydalı olabilir [40].

Burgener ve arkadaşları [41] DOS örneklerinde interlekin-1beta (IL-1 β) ve dentin sialoproteininin (DSP) apikal periodontitis tanısı için uygun bir belirteç olup olmadığını belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. DOS örnekleri apikal periodontitisli dişlerden ve sağlıklı kontralaterallerinden toplanmıştır. Kontrol grubuna göre, apikal periodontitisli grup DOS örneklerinde belirgin bir şekilde yüksek protein içeriği saptanmıştır. IL-1 β ve DSP seviyeleri hastalıklı grupta daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bu çalışma sonucunda, DOS'nda yüksek total protein seviyesinin, periapikal hastalık için muhtemel bir belirteç olabileceği öngörülmüştür.

Pulpa Kaynaklı Kan

Kan ve hücrel komponentleri spesifik ve non-spesifik bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar. Pulpadaki kan, periferel kandan farklı olarak bölgeye özgü bilgi alabilmeyi sağlayacak faktörler içerebilir.

İlk olarak Zürih Üniversitesi'nden Dr. Florian Prader pulpa kaynaklı kan hemogramını incelemiştir. 1949'da ilerleyen endodontik enfeksiyonlu dişlerin, pulpasındaki kan smearleri ile histolojik olarak hesaplanan enflamasyon seviyelerini karşılaştırmış ve çalışma sonucunda bakteri mevcudiyeti, hücrel kan bileşenlerinin, özellikle PMNL'lerin artışı ile bağlantılı

bulunmuştur. On beş yıl sonra bir diğer çalışmada Guthrie ve arkadaşları [43] pulpaları çürük nedeniyle açılmış dişlerin klinik semptomlarını, pulpa kaynaklı kan smearlerini ve aynı dişler çekildikten sonra histolojik durumlarını karşılaştırmışlardır. Dental pulpa hemogramı ve pulpa hastalığının seviyesi arasında kesin bir ilişki bulunamamış ancak pulpasında yaygın enflamasyon olduğu daha sonra mikroskopik olarak belirlenmiş dişlerden alınan kan örneklerinde nötrofil sayısında artış tespit edilmiştir. Pulpanın ekspoz olduğu bölgede aşırı kanama ve kanda, dejenerasyon ve karyolizise sebep olan nötrofillerin varlığı pulpadaki geniş enflamasyonun indikatörü olarak bulunmuştur. Sıcak, soğuk, elektrikli pulpa testleri, mobilite ve perküsyon hassasiyeti pulpitis derecesini belirlemede bir değere sahip bulunmazken, gece ağrısı hikayesi dikkate değer şekilde pulpal enflamasyonla ilişkili bulunmuştur.

Bu yöndeki araştırmaların geçmişte çok ilgi görmemesinin sebebi, pulpa kaynaklı kan örneği elde edebilmek için pulpa odasına girilmesi gerekliliğidir. Pulpa odasına girilmesi durumunda, pulpanın canlı kalma şansının azaldığı bilinmektedir [44].

Modern moleküler teknikler kullanılarak (enzime bağlı immunosorban yöntem, ELİSA) pulpal kaynaklı kanda protein seviyesinde moleküler belirteç ölçmek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Nakanishi ve arkadaşları [45] enflamasyon süresince artan belirteçlere bakmışlar, IgG, IgA, IgM, elastaz ve özellikle prostaglandin E2'nin sağlıklı dişlere göre enflamasyonlu dişlerde artmış olduğunu görmüşlerdir.

EİSalhy ve arkadaşları [46] klinik olarak geri dönüşümsüz pulpitis, asemptomatik pulpası açığa çıkmış derin çürüklü dişler ve normal dişler şeklinde tanımlanmış 3 grubun pulpal kan örneklerinde IL-2,-6,-8,-10, TNF- α ve interferon- γ (IFN- γ) seviyelerini hesaplamış ve enflamatuvar sitokinlerin, anti-enflamatuvar sitokinlere oranlarının değişip değişmediğini araştırmışlardır. IL-6, TNF- α ve IFN- γ normal pulpa grubuna göre belirgin bir şekilde diğer gruplarda yüksek bulunmuştur. IL-2 ve IL-10 seviyeleri çürükle açığa çıkmış asemptomatik pulpa grubunda, diğer gruplara göre belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur. IL-8 seviyesi, IL-6/IL-10 ve IL-8/IL-10 oranları geri dönüşümsüz pulpitis grubunda çürükle

ekspoze olmuş dişlere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda, IL-8 seviyesi ve IL-6/IL-10 ve IL-8/IL-10 oranları potansiyel pulpa enflamasyonu indikatörleri olarak düşünülmüştür. Çalışma sonucunda, pulpa kaynaklı kanda sitokin seviye değerlendirmesinin pulpa enflamasyonu tanısı koymada yardımcı olabileceği belirtilmiştir.

Evrosimovska ve arkadaşları [47] enflame ve sağlıklı pulpa dokusunda kolajenaz (MMP-1, -8, -13) seviyelerini ve dağılımını ölçmek için kronik pulpitis tanısı konmuş dişlerden ve ortodontik sebeplerden çekilmiş molar dişlerden örnek almışlardır. Kolajenaz seviyeleri enflame örneklerde, sağlıklı örneklerle göre belirgin bir şekilde daha yüksek seviyelerdedir. Sonuçlar, MMP'lerin enflamasyon sürecinde ekstrasellüler matriks yıkımında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışma enflamasyon sürecinin monitorize edilmesinde ve pulpa enflamasyonunun tanısında çağdaş bir metod bulma konusunda yeni bir yol açmıştır.

İnflamasyonlu pulplarda dentin matriks protein-1 (DMP-1) varlığını incelemek ve pulpa enflamasyonundaki rolünü anlamak amacıyla Abd-Elmeguid ve arkadaşları [48] bir çalışma yapmışlardır. Normal pulpa grubunda DMP-1'in ekspresyonu görülmezken, enflame pulpa grubunda DMP-1, tüm örneklerde merkez pulpada ve subodontoblastik hücre tabakasında lokalize edilmiştir. Ayrıca DMP-1'in fibroblastlardan IL-6 ve IL-8 üretimini uyardığı belirlenmiştir. Sonuçlar DMP-1'in diş pulpasındaki enflamatuvar değişikliklerin oluşumuna katılabileceğini göstermektedir.

Martin-Gonzalez ve arkadaşları [49] sağlıklı ve enflame pulpalarda leptin ekspresyonunu araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Pulpa örnekleri çürüksüz çekilmiş üçüncü molar dişlerden elde edilirken, 7 adet üçüncü molar dişte enflamasyon çekimden hemen önce pulpa ekspoz edilerek tetiklenmiştir. Bütün örneklerde leptin ekspresyonu gözlenmiş, ancak enflame pulpa dokusunda leptin ekspresyonu sağlıklı gruba göre belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bu çalışma ile enflame pulpada görülen leptin ekspresyon artışı, leptinin pulpal enflamasyonda ve immün cevapta rol oynayabileceğini göstermiştir.

Accorsi Mendonça ve arkadaşları [50] yaptıkları çalışmada sağlıklı ve enflame pulpalarda MMP-2 ve MMP-9'un jelatinolitik aktivitesini ve MMP-2 doku inhibitörü (TIMP-2) ve myeloperoksidaz proteininin (MPO) ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Enflame pulpa dokularında sağlıklı dokulara kıyasla MMP-9, aktif MMP-2, TIMP-2 ve MPO düzeylerinde artış görülmüştür. Sonuç olarak, bütün örnekler MMP-2 ekspresyonu ile ilişkili olmasına rağmen, bu MMP'nin aktif formu yalnızca enflame pulpalarda gözlenmiştir. Enflame pulpalarda, MMP-9, TIMP-2 ve MPO'nun upregülasyonu gözlenmiştir.

Histonsuz bir DNA bağlayıcı protein olan 'high mobility group box 1' (HMGB1), hücre dışı bölgede serbest bırakılır ve enflamasyonu başlatır. HMGB1, vasküler ve enflamatuvar hastalıklara aktif olarak katılan ilerlemiş glikasyon son ürünleri (RAGE) için olan reseptör de dahil olmak üzere, ilgili hücre sinyal iletim reseptörlerine bağlanır. RAGE ve HMGB1'in pulpitis patogenezinde yer alıp almadığını incelemek ve odontoblast benzeri hücrelerde (OLC-1) RAGE ve HMGB1 ekspresyonu üzerine Prevotella intermedia lipopolisakkarid (LPS)'inin etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak klinik olarak enflame diş pulpasında RAGE ve HMGB1 ekspresyon seviyeleri sağlıklı diş pulpasından daha yüksek bulunmuştur. LPS, HMGB1'i üreten OLC-1 hücrelerini RAGE yoluyla doz bağımlı bir şekilde stimüle etmiştir. Bu bulgular, RAGE ve HMGB1'in oral bakteriyel enfeksiyona verilen pulpal immün yanıtta önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [51].

Mente ve arkadaşları [52] 'pulpitis, nötrofil granülositlerin invazyonu ve bunların MMP-9 salınımı ile ilişkilidir' hipotezini araştırmak amacıyla, reversible pulpitisli, irreversible pulpitisli ve asemptomatik derin çürüklü dişlerin pulpalarından kan örnekleri toplamışlardır. Asemptomatik dişlerdeki MMP-9 seviyeleri, reversibl pulpitisli veya irreversible pulpitisli dişlerinkinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Asemptomatik dişlerin ve NSAİ almış irreversible pulpitisli dişlerin MMP-9 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu bulgular, pulpa kan örneklerindeki MMP-9 düzeylerinin, pulpa doku inflamasyonunun farklı evrelerinde ayırıcı nitelikte yararlı bir tanı aracı olabileceğini göstermektedir.

Pulpa patogenezinde son çalışmalarda reversible pulpitiste, irreversible pulpitise göre osteokalsin ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir [53]. Osteokalsin pulpada reparatif moleküldür, tamir gereken durumlarda kalsifikasyon alanlarının ve kan damarlarının etrafındaki hücrelerde ve matrikste lokalize olur; fakat normal dokularda bulunmaz.

Dentin Kaynaklı Sıvı

Dentin kaynaklı sıvı, dentin tübülerinde bulunan hücre dışı bir sıvıdır [54]. Pulpanın durumu hakkında bilgi edinmek için dentin sıvısı örnekleri alınması düşüncesiyle yapılan bir çalışmada, köpek molar dişlerine açılmış kavitelere, negatif basınç uygulanarak örnekler toplanmış, dentin sıvısı miktarı ve protein konsantrasyonu ölçülmüştür. Dentin sıvısındaki protein konsantrasyonu plazmanın ellide biri bulunmuştur. Bu sıvının elde edilmesi ve analizi, altındaki pulpanın durumu hakkında bilgiye non-invaziv bir yöntem ile ulaşılabildiği açısından ümit verici olarak nitelendirilmiştir [55]. Knuttson ve arkadaşları [56] yaptıkları çalışmada, bukkal kaviteyi salin solüsyonu ile doldurduktan 15 dakika sonra, kavitedeki içeriği toplayarak serum albümin seviyelerini analiz etmişler ve pulpa örnekleri ile kıyaslamışlardır. Albümin ve IgG bütün dentin sıvısı örneklerinde bulunmuştur. Fibrinojen bütün pulpa örneklerinde tespit edilmişken, toplam 16 dentin sıvısı örneğinin sadece 4'ünde tespit edilmiştir. Klinik olarak pratik uygulanabilir olmaması ve sıvıdaki düşük protein seviyeleri yöntemin olumsuz yönleridir.

Dentin kaynaklı sıvı analizi ile ilgili son zamanlarda yapılan bir çalışmada, dolgu değişimi gereksinimi olan klinik olarak sağlıklı dişler ve irreversible pulpitisi ağrı semptomlu dişlerin kaviteyi, 2 dakika süre ile polivinylidene difloride (PVDF) membran ile kaplanmış, bu membranlar, açılmış dentin tübüllerinden dentinal sıvı toplamak için kullanılmıştır. Daha sonra membranlar, fizyolojik salin içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Bu solüsyonlardaki toplam MMP-9 seviyelerine bakılmıştır. Semptomatik dişlerden alınan dentin kaynaklı sıvıdaki MMP-9 seviyeleri sağlıklı örneklerle göre belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur [57].

Dentinal sıvı toplama konusunda farklı selüloz membranların, su absorbe etme ve protein serbestleme açısından PVDF ile

karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır [58]. Bu klinik çalışmada selüloz materyali ve PVDF, sağlıklı insan dişlerinde dolgu değişimi sırasında açığa çıkmış dentin tübüllerinden toplanabilen MMP-2 seviyelerine göre karşılaştırılmıştır. Por büyüklüğü en fazla olan (12–15 µm) selüloz membran, PVDF'ye göre belirgin bir şekilde daha çok sıvı absorbe etmiştir. Protein salımları aynı olup, por büyüklüğü en az olan selüloz membran belirgin bir şekilde daha fazla protein ihtiva etmiştir. Geniş por büyüklüğü olan selüloz membran kullanılarak belirlenebilecek miktarda MMP-2 13 dişten 9'unda toplanabilmişken, PVDF membran kullanılarak 13 dişten 1'inde belirlenebilmiştir.

Zehnder ve arkadaşları [57] dentin kaynaklı sıvıda MMP-9 seviyeleri tespit edilebilir düzeyde mi ve dentin kaynaklı sıvıdaki MMP-9 seviyeleri geri dönüşümsüz pulpitisi dişler ve sağlıklı dişler arasında değişim gösteriyor mu sorularına yanıt bulmak amacıyla geri dönüşümsüz pulpitisi tanısı konmuş dişlerin ve dolgu değişimi gerekli sağlıklı dişlerin kaviteylerinden, 2 dakika boyunca PVDF membranlar ile dentin kaynaklı sıvı toplanmıştır. Semptomatik dişlerdeki MMP-9 seviyeleri klinik olarak sağlıklı olanlara göre belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda hassas bir analiz ile dentin kaynaklı sıvıda pulpa dokusu yıkımının (MMP-9) tespit edilebileceği görülmüştür.

Dentinal sıvı analizi prosedürünün zorlukları çözümlenebilir ise, koronal pulpanın sağlığını devam ettirmeyi amaçlayan bütün girişimler için en faydalı diaznoz örneği dentinal sıvı olacaktır. Pulpanın indirek kuafajla canlı kalma şansı olup olmadığı gibi çözülenememiş klinik vakalara ışık tutacaktır.

Periapikal Sıvı

Periapikal sıvı, periapikal bölgede bulunan hücre dışı bir sıvıdır. Periapikal dokular enfekte olduğunda, periapikal sıvı eksuda haline gelmekte ve sıvının kompozisyonu değişmektedir [27].

Eksuda oluşumu ani konakçı reaksiyonu olduğundan, eksudanın analiz edilmesi enflamasyonun durumu hakkında faydalı bilgiler verebilir. Kanal tedavisi sırasında periapikal sıvı toplama işlemi, pulpanın tamamen çıkarılmasından sonra paper point veya metilselüloz şeritler ile veya şırınga ile aspirasyon yaparak uygulanabilir.

Periapikal sıvının analiz edilmesi ile ilgili göze çarpan diğer bir özellik ise, mikrobiyal enfeksiyona karşı enflamasyon cevabının, araştırmacılar tarafından insanda kapalı bir ortam içerisinde araştırılabilmesidir [59]. Endotoksin gibi bakteri kaynaklı faktörler ve sitokinler, Ig'ler, MMP'lar gibi konakçı kaynaklı faktörler insan kök kanallarında tanımlanmıştır [60]. Birçok çalışmada, bazı faktörlerin konsantrasyonları gösterilmiş ve klinik semptomlar [61], eksuda varlığı [62] ya da tedavi öncesi apikal radyolusensi [63] ile korelasyon yapılmıştır. Ayrıca kanal tedavisi ve sonrasında belirli faktörlerin miktarının düşmesi kaydedilmiştir [64]. Bütün bu çalışmalar sonucunda, periapikal sıvının moleküler belirteçler için analiz edilebileceği ve bu belirteçlerin konsantrasyonlarının farklı klinik durumlar altında değiştiği gösterilmiştir.

Periapikal sıvı özellikle iki seanslı tedavilerde iyileşmenin erken belirtilerinin monitorize edilmesinde yardımcı olabilir. [65, 66] Periapikal radyolusensilerin yavaş gerilemesinin aksine, periapikal sıvıdaki moleküler kompozisyonun değişimi çabuk meydana gelmektedir. Bu nedenle hasta başı uygulama ile periapikal sıvı analizi, ikinci seans endodontik tedaviye başlarken, kök kanal sistemi artık doldurulabilir mi yoksa hala enfekte mi karar vermek için kullanılabilir.

Alptekin ve arkadaşları [61] periapikal eksudalarda nötrofil elastaz (NE) seviyelerini belirlemek ve bu seviyelerin endodontik olarak sorunlu dişlerdeki klinik belirti ve semptomlarla olan ilişkisini ölçmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Semptomlu dişler, semptomsuz dişlere göre daha yüksek NE seviyeleri göstermiştir. NE'daki farklılık NE seviyeleri konsantrasyon yerine total miktar olarak ölçüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma ile, periapikal lezyonlardaki NE seviyelerinin klinik semptomlar ile ilişkili olabileceği ve total enzim miktarının daha güvenilir bir bilgi sunma yöntemi olabileceği gösterilmiştir.

Yaptıkları diğer bir çalışmada, Alptekin ve arkadaşları [62] periapikal eksuda NE ve PGE2 seviyelerini, bu seviyelerin klinik semptomlarla olan ilişkilerini araştırmışlar ve ilk endodontik seans sonrası bu mediatörlerin seviyelerindeki değişimleri belirlemişlerdir. Klinik semptomlu (iltihap drenajı, şişlik) dişlerin periapikal eksudasında NE ve PGE2 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Büyük

periapikal radyolusensi (>1cm) bulunan kanallardaki eksudalarda, küçük radyolusensi bulunan (<1cm) kanallardaki eksudalara göre daha yüksek oranda PGE2 belirlenmiştir. Periapikal eksudalardaki NE seviyeleri PGE2 seviyeleri ile korelasyon göstermektedir. Mediatörlerin seviyeleri ilk seans kanal tedavisi sonrası değişiklik göstermemiştir. Periapikal eksuda NE ve PGE2 seviyeleri periapikal hastalık semptomlarını regüle edebilir, fakat bu çalışmanın sonuçları bu ilişkiyi ortaya koymada yetersiz kalmıştır.

Carneiro ve arkadaşları [67] apikal periodontitis lezyonlarında MMP-9 ekspresyonunu belirlemek amacıyla, epitelize ve epitelize olmayan apikal periodontitis lezyonlarından doku örnekleri toplamışlardır. Her iki lezyon tipinde de, sağlıklı periapikal ligamentle karşılaştırıldığında MMP-9 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, epitelize ve epitelize olmayan lezyonlar arasında MMP-9 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Henriques ve arkadaşları [68] endodontik tedaviye direnç gösteren periapikal lezyonlarda IFN- γ , TNF- α , IL- β , IL-17A, IL-10 ve MCP-1 ile ilgili mRNA ekspresyonunu belirlemek için endodontik tedaviye direnç gösteren periapikal lezyonlu dişlerden ve protetik sebeplerden endodontik tedavi yapılacak sağlıklı dişlerden örnek almışlardır. IFN- γ , TNF- α , IL-17A ve MCP-1 mRNA ekspresyonlarında iki grup arasında belirgin bir farklılık bulunurken, IL- β mRNA ekspresyonunda gruplar arasında belirgin bir farklılık bulunmamıştır. IL-10 mRNA ekspresyonu iki grupta da belirlenmemiştir. Bu çalışma sonucunda, IFN- γ , TNF- α , IL-17A ve MCP-1 mRNA ekspresyonlarında endodontik olarak başarısız olmuş grupta, sağlıklı gruba göre belirgin bir şekilde artış görülmüştür.

Ahmed ve arkadaşları [69] semptomatik apikal periodontitisli dişlerde MMP-9 ekspresyonunun belirgin bir şekilde yükseldiği ve tespit edilen gram negatif bakteri miktarı ile korelasyon gösterdiği hipotezini doğrulamak için, semptomatik ve asemptomatik periapikal lezyonlu dişlerden doku örnekleri toplamışlardır. Semptomlu doku örnekleri, asemptomatik doku örneklerine göre daha yüksek ortalama gram-negatif hücre sayısı ve MMP-9 alan yüzdesi göstermiştir. Gram negatif hücre sayısı ile

MMP-9 alan yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur. Sonuçlar semptomatik periapikal lezyonlarda gram-negatif bakterilerin ve MMP-9'un belirgin rolleri olduğunun göstergesi kabul edilebilir.

Apikal periodontitise uzanan moleküler olaylar silsilesi tam olarak bilinmemektedir. Nötrofil kemotaksisi ile ilişkili ana enflamatuar mediatör IL-8 ve kemik yıkımı ile ilişkili NF- κ B reseptör aktivatörü RANKL ve osteoprotegerin (OPG) bu konu ile ilgili araştırılması gereken moleküllerdir. Rechenberg ve arkadaşları [70] semptomatik geri dönüşümsüz pulpitis ve asemptomatik apikal periodontitis tanısı konmuş dişlerin periapikal sıvısındaki RANKL, OPG ve IL-8 seviyelerini incelemişlerdir. RANKL pulpitisli dişlerde, periodontitisli dişlere göre belirgin bir şekilde daha yüksek eksprese edilirken, OPG çoğu örnekte tespit limitinin altında kalmıştır. RANKL seviyeleri ile ters olarak IL-8 seviyeleri pulpitisli dişlerde, periodontitisli dişlere göre belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur. Spearman'ın korelasyon analizi RANKL ve IL-8 seviyeleri arasında belirgin bir negatif korelasyon olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre, apikal periodontitis gelişiminde, RANKL tarafından oluşturulan periapikal kemik yıkımı sinyali, IL-8 tarafından oluşturulan enflamatuar hücre toplanma sinyalinden önce meydana gelmektedir.

Sonuç

Pulpal enflamasyon ve patolojide enflamatuar aktiviteyi belirlemek ve monitorize etmek için, aynı zamanda periapikal lezyonlu dişlerde kök kanal tedavisinin başarısını belirlemek için bir seçenek olarak periapikal eksuda analizi yapılabilir. Pulpanın durumunun, pulpayı açmadan non-invaziv bir şekilde belirlenmesi için dentin kaynaklı sıvının araştırılması gereksiz kanal tedavilerinden kaçınılabilmesi ve vital pulpa tedavilerinin başarısı açısından büyük bir buluş olacaktır. Elde edilen protein miktarının yeterli olması açısından non-invaziv bir yöntem olarak dişeti oluğu sıvısının araştırılmasına daha çok yönelinebilir. Bütün bu işlemlerin rutin tanı prosedürlerinde kullanılması için daha çok araştırmaya ve geliştirmeye ihtiyaç vardır ancak ortaya çıkacak sonuç bütün çabaya değerlidir.

Kaynaklar

1. Chen, E. and P.V. Abbott, *Dental pulp testing: a review*. Int J Dent, 2009. **2009**: p. 365785.
2. Levin, L.G., *Pulp and periradicular testing*. Pediatr Dent, 2013. **35**(2): p. 113-9.
3. Mejare, I.A., et al., *Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review*. International Endodontic Journal, 2012. **45**(7): p. 597-613.
4. Seltzer, S., I.B. Bender, and M. Ziontz, *The Dynamics of Pulp Inflammation: Correlations between Diagnostic Data and Actual Histologic Findings in the Pulp*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1963. **16**: p. 969-77.
5. Bergenholtz, G., *Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth*. Odontol Revy, 1974. **25**(4): p. 347-58.
6. Michaelson, P.L. and G.R. Holland, *Is pulpitis painful?* Int Endod J, 2002. **35**(10): p. 829-32.
7. Brynolf, I., *A histological and roentgenological study of the periapical region of human upper incisors*. Vol. 11. 1967: Almqvist & Wiksell.
8. Langeland, K., *Tissue response to dental caries*. Endod Dent Traumatol, 1987. **3**(4): p. 149-71.
9. Orstavik, D., *Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man*. Int Endod J, 1996. **29**(3): p. 150-5.
10. Bender, I.B. and S. Seltzer, *Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. 1961*. J Endod, 2003. **29**(11): p. 702-6; discussion 701.
11. Bender, I.B. and S. Seltzer, *Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: II. 1961*. J Endod, 2003. **29**(11): p. 707-12; discussion 701.
12. Patel, S., *New dimensions in endodontic imaging: Part 2. Cone beam computed tomography*. Int Endod J, 2009. **42**(6): p. 463-75.
13. Pauwels, R., et al., *Effective dose range for dental cone beam computed tomography scanners*. Eur J Radiol, 2012. **81**(2): p. 267-71.
14. Rud, J., J.O. Andreasen, and J.E. Jensen, *Radiographic criteria for the assessment of healing after endodontic surgery*. Int J Oral Surg, 1972. **1**(4): p. 195-214.
15. Pope, O., C. Sathorn, and P. Parashos, *A comparative investigation of cone-beam computed tomography and periapical radiography in the diagnosis of a healthy periapex*. J Endod, 2014. **40**(3): p. 360-5.
16. Lane, A.J. and L.I. Grossman, *Culturing root canals by endodontic diplomates: a report based on a questionnaire*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1971. **32**(3): p. 461-6.
17. Sundqvist, G., *Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994. **78**(4): p. 522-30.
18. Marsh, P.D., *Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque*. Proc Finn Dent Soc, 1991. **87**(4): p. 515-25.
19. Chavez de Paz, L.E., *Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities*. J Endod, 2007. **33**(6): p. 652-62.
20. Kuo, M.L., I.B. Lamster, and G. Hasselgren, *Host mediators in endodontic exudates. I. Indicators of inflammation and humoral immunity*. J Endod, 1998. **24**(9): p. 598-603.
21. Gusman, H., R.B. Santana, and M. Zehnder, *Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps*. Eur J Oral Sci, 2002. **110**(5): p. 353-7.
22. de Paula-Silva, F.W., et al., *High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas*. J Endod, 2009. **35**(9): p. 1234-42.
23. Awawdeh, L., et al., *Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth*. Int Endod J, 2002. **35**(1): p. 30-6.
24. Tuncer, L.I., T. Alaçam, and B. Oral, *Substance P Expression Is Elevated in Inflamed Human Periradicular Tissue*. Journal of Endodontics, **30**(5): p. 329-332.
25. Spoto, G., et al., *Alkaline Phosphatase Activity in Normal and Inflamed Dental Pulps*. Journal of Endodontics, 2001. **27**(3): p. 180-182.
26. Rauschenberger, C.R., et al., *Comparison of human polymorphonuclear neutrophil elastase, polymorphonuclear neutrophil cathepsin-G, and alpha 2-macroglobulin levels in healthy and inflamed dental pulps*. J Endod, 1994. **20**(11): p. 546-50.
27. Matsuo, T., et al., *Interleukin-1 α and interleukin-1 β in periapical exudates of infected root canals: Correlations with the clinical findings of the involved teeth*. Journal of Endodontics, 1994. **20**(9): p. 432-435.
28. Taba, M., Jr., et al., *Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases*. Dent Clin North Am, 2005. **49**(3): p. 551-71, vi.
29. Lamster, I.B., *Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests*. Ann Periodontol, 1997. **2**(1): p. 123-37.
30. Loos, B.G. and S. Tjoa, *Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid?* Periodontol 2000, 2005. **39**: p. 53-72.
31. George, A. and C.A. Evans, *Detection of root resorption using dentin and bone markers*. Orthod Craniofac Res, 2009. **12**(3): p. 229-35.
32. Kumar, V., A. Logani, and N. Shah, *Dentine sialoprotein expression in gingival crevicular fluid during trauma-induced root resorption*. Int Endod J, 2013. **46**(4): p. 371-8.
33. Vertucci, F.J. and R.G. Williams, *Furcation canals in the human mandibular first molar*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1974. **38**(2): p. 308-14.
34. Capra, N.F., et al., *Simultaneous demonstration of neuronal somata that innervate the tooth pulp and adjacent periodontal tissues, using two retrogradely transported anatomic markers*. Exp Neurol, 1984. **86**(1): p. 165-70.
35. Karapanou, V., D. Kempuraj, and T.C. Theoharides, *Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis*. J Endod, 2008. **34**(2): p. 148-51.
36. Avellan, N.L., et al., *Experimental tooth pain elevates substance P and matrix metalloproteinase-8 levels in human gingival crevice fluid*. Acta Odontol Scand, 2008. **66**(1): p. 18-22.
37. Awawdeh, L.A., et al., *Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth*. European journal of oral sciences, 2002. **110**(3): p. 185-191.
38. Shin, S.J., et al., *Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **112**(4): p. 548-54.
39. Belmar, M.J., et al., *Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **105**(6): p. 801-6.
40. Dezerega, A., et al., *Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response*. J Inflamm (Lond), 2012. **9**(1): p. 8.
41. Burgener, B., et al., *Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis*. J Endod, 2010. **36**(8): p. 1307-10.
42. Hahn, C.-L. and F.R. Liewehr, *Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(3): p. 213-219.

43. Guthrie, T.J., R.E. McDonald, and D.F. Mitchell, *Dental Pulp Hemogram*. J Dent Res, 1965. **44**: p. 678-82.
44. Bjorndal, L., et al., *Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy*. Eur J Oral Sci, 2010. **118**(3): p. 290-7.
45. Nakanishi, T., T. Matsuo, and S. Ebisu, *Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps*. J Endod, 1995. **21**(3): p. 131-6.
46. Elsalhy, M., F. Azizieh, and R. Raghupathy, *Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation*. Int Endod J, 2013. **46**(6): p. 573-80.
47. Evrosimovska, B., et al., *Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue*. Prilozi, 2012. **33**(2): p. 191-204.
48. Abd-Elmeguid, A., et al., *Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts*. Journal of endodontics, 2012. **38**(1): p. 75-80.
49. Martin-Gonzalez, J., et al., *Leptin expression in healthy and inflamed human dental pulp*. Int Endod J, 2013. **46**(5): p. 442-8.
50. Accorsi-Mendonça, T., et al., *Evaluation of gelatinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and myeloperoxidase protein in healthy and inflamed human dental pulp tissue*. Journal of endodontics, 2013. **39**(7): p. 879-882.
51. Tancharoen, S., et al., *Overexpression of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box 1 in human dental pulp inflammation*. Mediators Of Inflammation, 2014. **2014**: p. 754069-754069.
52. Mente, J., et al., *A Prospective Clinical Pilot Study on the Level of Matrix Metalloproteinase-9 in Dental Pulpal Blood as a Marker for the State of Inflammation in the Pulp Tissue*. Journal of Endodontics, 2016. **42**(2): p. 190-197.
53. Abd-Elmeguid, A., et al., *Osteocalcin Expression in Pulp Inflammation*. Journal of Endodontics, 2013. **39**(7): p. 865-872.
54. Coffey, C.T., M.J. Ingram, and A.M. Bjorndal, *Analysis of human dentinal fluid*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1970. **30**(6): p. 835-7.
55. Maita, E., et al., *Fluid and protein flux across the pulpodentine complex of the dog in vivo*. Archives of Oral Biology, 1991. **36**(2): p. 103-110.
56. Knutsson, G., M. Jontell, and G. Bergenholtz, *Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth*. Archives of Oral Biology, 1994. **39**(3): p. 185-190.
57. Zehnder, M., F.J. Wegehaupt, and T. Attin, *A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation*. J Endod, 2011. **37**(1): p. 17-20.
58. Zehnder, M., et al., *Comparison of vehicles to collect dentinal fluid for molecular analysis*. J Dent, 2014. **42**(8): p. 1027-32.
59. Stashenko, P., R. Teles, and R. D'Souza, *Periapical inflammatory responses and their modulation*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(4): p. 498-521.
60. Wahlgren, J., et al., *Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates*. Int Endod J, 2002. **35**(11): p. 897-904.
61. Alptekin, N.O., et al., *Neutrophil elastase levels in periapical exudates of symptomatic and asymptomatic teeth*. J Endod, 2005. **31**(5): p. 350-3.
62. Alptekin, N.O., et al., *The effect of endodontic therapy on periapical exudate neutrophil elastase and prostaglandin-E2 levels*. J Endod, 2005. **31**(11): p. 791-5.
63. Takayama, S., et al., *Relationship between prostaglandin E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis*. J Endod, 1996. **22**(12): p. 677-80.
64. Shimauchi, H., et al., *The change of periapical exudate prostaglandin E2 levels during root canal treatment*. Journal of Endodontics, 1997. **23**(12): p. 755-758.
65. Tavares, W.L., et al., *Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections*. J Endod, 2012. **38**(10): p. 1368-71.
66. Tavares, W.L., et al., *The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth*. J Endod, 2013. **39**(7): p. 889-92.
67. Carneiro, E., et al., *Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009. **107**(1): p. 127-132.
68. Henriques, L.C.F., et al., *Cytokine Analysis in Lesions Refractory to Endodontic Treatment*. Journal of Endodontics. **37**(12): p. 1659-1662.
69. Ahmed, G.M., et al., *Expression Levels of Matrix Metalloproteinase-9 and Gram-negative Bacteria in Symptomatic and Asymptomatic Periapical Lesions*. Journal of Endodontics, 2013. **39**(4): p. 444-448.
70. Rechenberg, D.-K., et al., *Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis*. Cytokine, 2014. **69**(1): p. 116-119.