

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**SÜT DİŞİ FİZYOLOJİK KÖK REZORPSİYONUNDA
APOPTOZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yeşim TURAN ÖZDOĞAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neşe AKAL

ANKARA
Nisan 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**SÜT DİŞİ FİZYOLOJİK KÖK REZORPSİYONUNDA
APOPTOZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Yeşim TURAN ÖZDOĞAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neşe AKAL

ANKARA
Nisan 2007

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 03/2002-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

Anneannemin Hatırası...

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Pedodonti Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: .../.../2007

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
....Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
.....Üniversitesi**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
.....Üniversitesi**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
.....Üniversitesi**

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
.....Üniversitesi**

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Neşe AKAL'a,

Tezimin kurgulanması ve ilerleme sürecindeki katkıları ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin OYGÜR ve Prof. Dr. Alev ALAÇAM' a,

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve fikirlerini paylaşan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Benay TOKMAN ve Doç. Dr. F. Figen KAYMAZ'a,

Eğitimim süresince gösterdiği ilgi ve destekten dolayı hocam sayın Prof. Dr. Tezer ULUSU'ya,

Tezimin değerlendirme kısmındaki yardım ve katkılarından dolayı Dr. Dt. Emre BARIŞ ve Doç. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ 'a,

Doktora eğitimimin bana kazandırdığı en büyük maneviyat olan sevgili dostlarım Dr. Dt. A. Evren ÜLKER ve Dr. Dt. Dilek TUNA'ya,

Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, asistanlığın yorucu aynı zamanda güzel anlarını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimize, teknisyenimize, işlem yetkilimize ve sevgili Fazilet BAŞDEMİR'e,

Sevgi ve desteklerini esirgemeyen, hayattaki en değerli varlığım canım aileme; annem, babam, kız kardeşlerim ve hayat arkadaşım eşime

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Şekiller, Resimler, Grafikler	v
Tablolar	vii
Semboller, Kısaltmalar	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Süt Dişi Pulpa Histolojisi	3
2.1.1. Pulpanın Tabakaları	3
2.1.1.a. Odontoblastik Tabaka	3
2.1.1.b. Subodontoblastik Tabaka	3
2.1.1.c. Hücreden Zengin Tabaka	4
2.1.1.d. Santral Tabaka	4
2.1.2. Pulpanın Hücreleri	4
2.1.2.a. Odontoblastlar	4
2.1.2.b. Fibroblastlar	4
2.1.2.c. Farklılaşmamış Mezenşimal Hücreler	5
2.1.2.d. Makrofajlar	5
2.2. Süt Dişi Fizyolojik Kök Rezorpsiyonu	6
2.3. Apoptozis	18
2.3.1. Apoptozisin Yer Aldığı Olaylar	19
2.3.2. Nekroz ve Apoptozis Arasındaki Farklar	21
2.3.3. Apoptozis Mekanizmasında Yer Alan Moleküller	24
2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları	25
2.3.4.1.a. Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis	26
2.3.4.1.b. Mitokondri aracılı apoptozis	26
2.3.4.2. p-53 gen aracılı apoptozis	29

2.3.5. Diş Hekimliği Alanında Yapılan Apoptozis Çalışmaları	29
2.3.5.a. Pulpa ve Apoptozis	30
2.3.5.b. Alveolar Kemik ve Apoptozis	32
2.3.6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1. TUNEL Yöntemi ile Değerlendirme	37
3.1.1. TUNEL Yöntemi İçin Örneklerin Hazırlanması	37
3.1.2. TUNEL Yöntemi İşlemleri	41
3.1.3. Kesitlerin Değerlendirilmesi	43
3.1.4. İstatistiksel değerlendirme	43
3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Değerlendirme	43
3.2.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu İçin Örneklerin Hazırlanması	43
3.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskop Doku Takibi İşlemleri	44
3.2.3. Kesitlerin İncelenmesi	45
4. BULGULAR	47
4.1. TUNEL Yöntemi Bulguları	47
4.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu Bulguları	59
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ	83
7. ÖZET	85
8. SUMMARY	87
9. KAYNAKLAR	89
10. ÖZGEÇMİŞ	111

Şekiller, Resimler, Grafikler

Şekil 1. Nekroz ve apoptoziste görülen yapısal değişiklikler dizisi	23
Şekil 2. Ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptozisin şematik görünümü	28
Resim 1. Çekilen süt dişinin kök boyunun ölçülmesi	38
Resim 2. Elde edilen pulpa dokusu örneği	40
Resim 3. ApopTag Plus Peroksidaz In Situ Apoptozis Detection Kit	41
Resim 4. JEOL- JEM 1011 transmisyon elektron mikroskobu	46
Resim 5a. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde TUNEL yöntemi ile kron ve kök pulpasında yer alan hücrelerde homojene yakın boyanma (TUNEL)	48
Resim 5b. Aynı örnekte, santral ve periferel pulpada yer alan hücrelerde görülen homojene yakın boyanma (TUNEL)	48
Resim 6. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast hücreleri (TUNEL)	49
Resim 7. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast ve odontoblast hücreleri (TUNEL)	50
Resim 8. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast ve vasküler endotelial hücreler (TUNEL)	51
Resim 9. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif vasküler endotelial ve mononükleer inflamatuvar hücreler (TUNEL)	52
Resim 10. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast ve vasküler endotelial hücreler (TUNEL)	53
Resim 11. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde odontoblastik tabakada gözlenen ApopTag pozitifliği (TUNEL)	54

Resim 12. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde, odontoblastik tabakada gözlenen ApopTag pozitifliği (TUNEL)	55
Resim 13. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif inflamatuvar hücreler (TUNEL)	56
Resim 14. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, apoptotik fibroblast hücresi (TEM)	60
Resim 15. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kök pulpa dokusu örneğinde, apoptotik odontoblast hücreleri (TEM)	61
Resim 16. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, apoptotik fibroblast hücresi (TEM)	62
Resim 17. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, apoptotik odontoblast hücresi ve dokuda izlenen apoptotik cisimcik (TEM)	63
Resim 18. Genç daimi diş kron pulpa dokusu örneğinde, apoptozise uğramış fibroblast hücresi (TEM)	64
Resim 19. Genç daimi diş kök pulpa dokusu örneğinde, apoptotik odontoblastlar (TEM)	65
Resim 20. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, makrofaj hücresi (TEM)	66
Resim 21. Genç daimi diş kök pulpa dokusu örneğinde, apoptotik vasküler endotelial hücreler (TEM)	67
 Grafik 1. Çalışma gruplarına ait örneklerin ortalama AI değerleri	 58

Tablolar

Tablo I. Nekroz ve apoptozis arasındaki temel farklar	22
Tablo II. Kramer ve Ireland'ın süt dişi kök uzunluğu tabloları	38
Tablo III. Çalışma gruplarına ait AI değerleri	57
Tablo IV. Çalışma gruplarına ait istatistiksel veriler	58

Semboller, Kısaltmalar

IL-1, -6, -11	İnterlökin-1, -6, -11
TNF- α	Tümör nekroze edici faktör-alfa
MMP-9	Matriks metaloproteinaz-9
MT1-MMP	Membran tip 1-matriks metaloproteinaz
H ⁺ -ATPaz	H ⁺ -adenozin trifosfataz
RANKL (ODF)	Osteoklast diferensiasyon faktörü
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
Ag-NOR	Silver-binding nucleolar organizier region
OPG	Osteoklastogenez inhibe edici faktör/ osteoprotegerin
HLA-DR+	Human leukocyte antigens
DNA	Deoksiribonükleik asit
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Bax, Bid, Bim, Bad, Bak	Pro-apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyeleri
BCL-2, Bcl-XL	Anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyeleri
Kaspaz	Caspase-cystein dependent aspartate-specific proteases
TNFR	Tümör nekroze edici faktör reseptörü
DD	Ölüm alanı (Death domain)
FAS(CD-95)	TNFR ailesinden bir transmembran reseptörü
Sit C	Sitokrom c
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
IAP	İnhibitör apoptozis proteini
FADD	Fas associated protein with death domain
p-53	Tümör baskılayıcı gen
MIB-1	Hücre proliferasyonunu gösteren bir marker
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP- biotin Nick End Labeling

TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
dUTP	2'-deoksiuridin 5'-trifosfat
AI	Apoptotik indeks
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu

1. GİRİŞ

Süt dişinin yaşam süreci fizyolojik kök rezorpsiyonunun tamamlanmasını takiben süt dişinin düşmesi ve daimi dişin erüpsiyonu ile son bulmaktadır^{1,2}. Süt dişi kök rezorpsiyonu fizyolojik ve genetik faktörlerin kontrolü altında olmakla birlikte, lokal faktörlerden etkilenen programlı gelişimsel bir olay olarak tanımlanmaktadır³. Organizmanın genel gelişim ve büyüme dengesi içinde yer alan süt dişi köklerinin fizyolojik rezorpsiyonu, inorganik yapıların demineralizasyonu ve özellikle kollajen fibrillerin parçalanmasını içeren organik matriksin yıkımıyla gerçekleşmektedir. Günümüze kadar, süt dişi köklerinin rezorpsiyonunda etkin olan faktörler ve mekanizmalar hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Oldukça kompleks olan bu mekanizmalar hakkında kesin sonuçlara varılamamış olmakla birlikte, araştırmaların birleştiği ortak nokta diş sert dokularının yıkımında odontoklastların başlıca etken olmasıdır^{1,3-11}.

Diş sert dokularında gözlenen fizyolojik kök rezorpsiyonu kısmen açıklığa kavuşturulmuş, pulpa ve periodontal ligament gibi yumuşak dokuların rezorpsiyon mekanizması hakkındaki bilgiler ise sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte, periodontal ligament rezorpsiyonunda kollajen yıkımının yanısıra fizyolojik olaylarla tetiklenen apoptotik hücre ölümünün görev aldığı da bildirilmektedir^{3,8}.

Doku kinetiğindeki fizyolojik ve patolojik olayların reglasyonunda görev alan bir hücre ölüm şekli olan apoptozis, genetik olarak programlanmaktadır^{12,13}. Yaşlı ve fonksiyon göremeyen hücrelerin kontrollü ve genetik olarak belirlenmiş bir mekanizma ile evre hücrelere zarar vermeden yok edildiği bu hücre ölüm tipinin¹⁴, yine fizyolojik olan ve genetik olarak düzenlenen süt dişi kök rezorpsiyonundaki⁸ olası rolü değerlendirilmesi gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Odontogenez sırasında dişin formasyonunun başlangıcından kök gelişiminin tamamlanmasına kadar birçok olayda apoptotik mekanizma yer almaktadır^{15,16}. Apoptozisin sağlıklı insan ve rat daimi diş pulpa dokusunda yaşam siklusunu tamamlamış yaşlı odontoblastları da içeren pulpa hücre popölasyonunun regölasyonunda görev aldığı bilinmektedir^{17,18}. Fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında süt dişi pulpasında gözlenen değişikliklerde de apoptozisin rolü olup olmadığının araştırılması, fizyolojik kök rezorpsiyonunun biyolojik mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasında önem taşıyabilir.

Sunulan araştırmanın amacı, farklı düzeylerde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi pulpa dokusunda apoptotik hücre ölümünün araştırılması ve süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda apoptozisin rolü olup olmadığının değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt Dişı Pulpa Histolojisi

Süt dişı ve daimi dişı pulpalari histolojik olarak benzer özelliklere sahiptir ¹⁹. Pulpa, özelleşmiş bir bağ dokusu olup, diğer bağ dokularında olduğu gibi, kan ve lenf damarları, sinir lifleri, kollajen lifler ve hücrelerin içerisinde dağılmış olarak bulunduğu bir ana maddeden oluşmaktadır. Pulpaya etki eden tüm biyolojik olaylarda kollajen fibrillerle desteklenmiş ve büyük oranda su, glikoprotein, mukopolisakkarit ve diğer proteinlerden oluşan bu ana madde etkili olup, aracı bir rol üstlenmektedir^{20,21}.

2.1.1. Pulpanın Tabakaları

Pulpa genel olarak dört tabakada incelenmektedir:

2.1.1.a. Odontoblastik Tabaka: Pulpanın dış kısmını çevreleyen tek sıra halinde dizilmiş odontoblast hücrelerinin oluşturduğu tabakadır. Odontoblast hücrelerinin gövdeleri pulpa içerisinde yer alırken, sitoplazmik uzantıları dentin tübüllerinin içlerine doğru uzanmaktadır. Bu tabakada kapiller kan damarları ve miyelinsiz sinir lifleri bulunmaktadır^{22,23}.

2.1.1.b. Subodontoblastik Tabaka: Odontoblastik tabakanın hemen komşuluğunda yer alan hücreden fakir olan bu bölgede, kapiller kan damarları, miyelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların ince sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır. Pulpanın fonksiyonuna bağlı olarak

subodontoblastik tabakanın genişliği değişmekle birlikte, genç ve aktif pulpada belirgin olmadığı ifade edilmektedir^{8,22,23}.

2.1.1.c. Hücreden Zengin Tabaka: Farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve fibroblastların yoğunlukta olduğu bu tabakada makrofajlar, dentritik hücreler ve lenfositler de yer almaktadır. Hücreden zengin tabakanın kron pulpasında kök pulpasına oranla daha belirgin olduğu, hasara uğramış odontoblast hücrelerinin yerine yenilerinin yapımından sorumlu olduğu belirtilmektedir^{20,22-24}.

2.1.1.d. Santral Tabaka: Pulpa dokusunun en içinde yer alan bu tabakada yoğunlukla fibroblastlar, gevşek bağ dokusuyla çevrilmiş büyük kan ve lenf damarları ile sinirler bulunmaktadır. Farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve makrofajlar sıklıkla perivasküler alanda yer almaktadır^{20,22,23,25}.

2.1.2. Pulpanın Hücreleri

2.1.2.a. Odontoblastlar: Diş gelişimi sırasında primer dentinin ve gelişimini tamamlamış dişlerde sekonder ve tersiyer dentinin yapımından sorumlu, post mitotik nöral krest kökenli ve pulpanın en çok farklılaşabilen hücreleri olarak bilinmektedirler. Bu hücreler dentinin içerdiği kollajen ve proteoglikanların yanı sıra kollajenöz olmayan çeşitli proteinleri de sentezleyebilmektedirler^{20,22,23}.

2.1.2.b. Fibroblastlar: Pulpa bağ dokusunun ana hücreleridir. Fibroblastlar pulpanın her tarafına yayılmış olmakla birlikte, en çok kron pulpasında hücreden zengin tabaka içinde yer almaktadır. Fibroblastların başlıca fonksiyonları tip I ve tip III kollajen sentezlemektir. Aynı zamanda

stimuluslara yanıt olarak kollajeni fagosit etme ve sindirebilme özellikleri bulunduğu için pulpanın kollajen döngüsünden sorumlu hücreler olarak görev yapmaktadırlar^{22,23}.

2.1.2.c. Farklılaşmamış Mezenşimal Hücreler: Hücreden zengin tabakada ve santral pulpa tabakasında bulunmakta ve genellikle kan damarları çevresinde toplanmaktadırlar²². Farklılaşmamış mezenşimal hücreler, hücre bölünmesi için uyarıldıkları zaman genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bağ dokusu hücrelerinden birine dönüşebildikleri gibi, herhangi bir yaralanma ve inflamatuvar olay sırasında makrofaj veya osteo/odontoklastlara da farklılaşabilmektedir^{22,26}.

2.1.2.d. Makrofajlar: Damardan çıkarak doku içerisine giren monositlerdir. Kan damarlarının yakın komşuluğunda bulunan makrofajlar, endositoz ve fagositozda aktif rol oynamaktadırlar. Damar dışına çıkan kan hücrelerini, ölü hücreleri ve dokulardan gelen yabancı hücreleri fagositik aktivitesiyle ortadan kaldırmakta ve içlerine aldıkları materyalleri lizozomal enzimler yardımıyla yok etmektedirler²³.

Pulpa bağ dokusunda odontoblastlar, fibroblastlar, farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve makrofajların yanı sıra, lenfositler, histiositler, dentritik hücreler, perisitler, plazma hücreleri, nöral hücreler, mast hücreleri ve ameboid hücreler de görülmektedir^{20,22,27}.

Birçok araştırmacı süt dişi pulpa dokusunun fizyolojik rezorpsiyonun başlangıç düzeyinden ilerlemiş seviyelerine kadar genç daimi diş pulpa dokusuyla benzer histolojik özelliklere sahip olduğunu bildirmektedir²⁸⁻³⁰. Hobson³⁰, fizyolojik kök rezorpsiyonunda, rezorpsiyon düzeyinin 1/2 seviyesini aşmadığı sağlıklı süt dişi pulpasının, genç sürekli dişler için tanımlanan gevşek yapıdaki pulpa bağ dokusu özelliklerine ve

hücrelerine sahip olduğunu bildirmiştir. Aras ve Ergün²⁹, kök rezorpsiyonu henüz başlamış süt dişi pulpasının histolojik özelliklerinin, tipik pulpa görüntüsüyle aynı olduğunu, Alexander²⁸ rezorpsiyonun %50-75 düzeyine ulaştığı durumlarda dahi süt dişi pulpa histolojisinin, daimi birinci küçük azılarla benzer olduğunu bildirmektedir. Sarı ve arkadaşları³¹ kök rezorpsiyonunun başlangıç aşamasında olup rezorpsiyon düzeyi 1/3 kök boyunu geçmemiş süt dişlerinin pulpaları ile rezorpsiyonun kök boyunun 2/3'üne kadar ulaştığı ileri derecede rezorbe süt dişi pulpaları arasında polarize ışık mikroskobu ile gözlenebilir bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu görüşlerin yanı sıra, Hobson³⁰ sağlıklı süt dişi pulpasının genç daimi diş pulpa dokusuyla benzer olduğunu ancak süt dişinin düşmesine yakın dönemde genellikle inflamatuvar reaksiyonla ilişkili regresif değişikliklerin meydana geldiğini belirtmektedir. Dard ve arkadaşları³² klinik olarak rezorpsiyon görülmeyen olgunluk dönemindeki pulpa dokusunda yer alan fibroblastları, fizyolojik kök rezorpsiyonunun ilerlemesiyle süt dişlerinin köklerinin tamamen rezorbe olduğu ve düşmeye yakın dönemdeki pulpa dokusunda yer alan fibroblastlarla karşılaştırarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında bu son dönemde fibroblastlarda yaşlanma bulgusu olarak değerlendirdikleri sayısal bir azalma ve dejenerasyon olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. Süt Dişi Fizyolojik Kök Rezorpsiyonu

Rezorpsiyon terimi sert dokuların yıkımı ve yıkılan maddelerin, hücresel elemanlar tarafından ortadan kaldırılmasına dayanan dinamik bir olayı tanımlamaktadır³³. Daimi diş erüpsiyon süreci sırasında, erüpsiyon yolunun formasyonu için, erüpte olan dişin koronal kısmında yer alan kemik ile birlikte, süt dişi köklerinde ve periodontal ligament gibi destek dokularında da rezorpsiyon oluşmaktadır^{3,8,10,34}.

Süt dişi düşme proçesinde, kemik ve dişi sert dokularının rezorpsiyonu çok çekirdekli klastik hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir³⁵. Fizyolojik bir olay olan süt dişi düşme proçesinde, endokrin bezlerin aktivitesi, daimi dişin erüpsiyon kuvveti ve rezorpsiyon alanının vaskülarizasyon derecesi gibi birçok faktör rol oynamaktadır^{1,8-10,36-39}. Bu süreçte doku yıkımında rol alan klastik hücrelerin aktivitesi için en önemli uyarının, süt dişinin altında bulunan daimi dişin gelişimi ve erüpsiyondan kaynaklanan endojen basınçlar olduğu bilinmektedir^{4,8-10,37,39}. Ancak, altında daimi dişi germi bulunmayan süt dişlerinde de, gecikmeli olsa bile, kök rezorpsiyonunun gözlenmekte olduğu da ifade edilmektedir⁴⁰. Bunun yanı sıra, organizmanın gelişimi, çiğneme kuvvetlerinin artışı ile süt dişlerinin küçük morfolojik yapısı arasında artan ters orantı, süt dişlerini etkileyen aşırı okluzal travmalar, süt dişi ve periodontal dokularda inflamasyona yol açan patolojik olaylar ve daimi dişin odontojenik epitel hücrelerinden kaynaklanan doku yıkımı aktivitesi gösteren enzimler de klastik hücrelerin aktivasyonunda rol oynayabilmektedir^{1,4,5,8-11,37,39,41}.

Yıktıkları dokuya göre isim alan klastik hücrelerden kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastik hücrelerin aktivasyonunda görev alan sistematik regülatör faktörler arasında; osteoklastik hücre sayısı ve aktivasyonunu arttıran paratiroid hormon ile osteoklast hücresinin sitoplazmik hareketliliğini azaltarak rezorpsiyonu inhibe eden kalsitonin önemli rol oynamaktadır. Osteoklastik regülasyon ve aktivasyonda görev alan lokal regülatör faktörler arasında ise makrofaj koloni stimüle edici faktör, interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-11 ve tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF- α) yer almaktadır. Genel olarak osteoklastların gelişimini stimüle eden bu sitokinler, makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler gibi inflamatuvar hücrelerden salınmaktadırlar^{1,3,11}. Ne ve arkadaşları⁴², tüm sert doku rezorpsiyonundan sorumlu ana hücre tipi olan klastik hücrelerin, makrofaj ve monositlerle bir etkileşim içinde olduğunu, ayrıca

rezorpsiyonun seyri sırasındaki biyolojik olayların, sitokinler, enzimler ve hormonlar gibi kompleks moleküller tarafından organize edildiğini bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı tarafından monositlerin sert doku rezorpsiyonundan sorumlu osteoklastların aktivasyonunda önemli bir rol üstlendikleri belirtilmektedir⁴³⁻⁴⁹.

Monosit ve makrofajlar gibi mononükleer hematopoetik hücrelerden köken alan ve kemikteki Howship lakünlerinde bulunan osteoklastlar, çok aktif hücrelerdir ve rezorpsiyon bölgeleri arasında hareket edebilme kabiliyetine sahiptirler. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu iki aşamada gerçekleşmektedir; kemiğin organik ve inorganik matrikslerine indirgendiği ekstraselüler faz ve indirgenen kemik matriksin yıkıldığı interselüler faz. Bunun yanı sıra, diş sert dokularının rezorpsiyonunda görev alan odontoklastların osteoklastlarla aynı kökenden gelip gelmediği tam olarak bilinmemekte, ancak büyük benzerlikler sergiledikleri görülmektedir^{3,8,10,36,41,42,49-51}. Morita ve arkadaşları⁵, yüksek metabolik aktivite sergileyen odontoklastları, osteoklastların analogu olarak tanımlamışlardır. Furseth⁴ ve Sasaki¹¹, insan süt dişlerinde, çok çekirdekli hücreler olan odontoklastların, yetersiz endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri, vakuol ve ribozom içermeleri gibi en belirgin hücresel özelliklerinin, osteoklastlarla benzer olduğunu, odontoklastların esas olarak diş, osteoklastların ise kemik rezorpsiyonundan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. *In vitro* çalışmalar osteoklastların odontoklastlar gibi dentin ve kemik dokusunu rezorbe edebildiklerini göstermiştir^{6,52,53}. Bu hücrelerin, benzer enzimatik özellikler taşıdığı ve rezorpsiyon sürecinde ortak mekanizmalara sahip oldukları bilinmektedir^{10,11,36,42,49-51,54}. Birçok çalışmada osteoklastlarda varlığı gösterilen güçlü asit fosfataz aktivitesi, odontoklastlarda da saptanmıştır^{50,55-57}. Osteoklastlarla benzer olarak, odontoklastlar fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında mineralize diş dokularının yıkımında görev alan farklı tipte katepsinler salgılamaktadır⁵⁸. Sasaki ve Ueno-Matsuda⁵⁹ yaptıkları çalışmada süt dişi fizyolojik kök

rezorpsiyonunda odontoklastlarda saptadıkları sistein proteazlardan katepsin B ve G varlığının, odontoklastik kök rezorpsiyonu sırasında kollajenin ve kollajen yapısında olmayan diğer matriks proteinlerinin intra/ekstra selüler yıkımıyla meydana gelen rezorpsiyon lakünlerinin oluşumunda rol oynadığına işaret ettiğini bildirmişlerdir. Gotz ve arkadaşları⁵⁸ odontoklastlarda tespit ettikleri katepsin D varlığının, bu molekülün mineralize diş matriksinin yıkımında rol oynadığına ya da diğer proteazların aktivasyonunda fonksiyon görebileceğine işaret ettiğini ifade etmişlerdir. Linsuwanont ve arkadaşları⁶⁰, sığır süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında organik matriksin yıkımında sistein proteazlardan katepsin K'nın rolünü değerlendirdikleri çalışmalarında, odontoklastların katepsin K'yı sentezlediklerini göstermişler ve bu molekülün fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında proteoliz aşamasında yer aldığını öne sürmüşlerdir. Kemik rezorpsiyonunda proteoliz aşamasında rol alan matriks metaloproteinazlardan birkaçının odontoklastlardan da eksprese olduğu gösterilmiştir^{47,61,62}. Linsuwanont ve arkadaşları⁶¹, sığırların süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonunda odontoklastlar tarafından matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9) ekspresyonunu tespit etmişler ve bu molekülün fizyolojik kök rezorpsiyonunda proteoliz aşamasında rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir. Linsuwanont-Santiwong ve arkadaşları⁶² ise, osteoklastlarda saptanan ve osteoklastların fokal proteoliz yaparak ekstraselüler matriksten kemik yüzeyine geçişini sağlamak için kullandığı bilinen membran tip 1-matriks metaloproteinazın (MT1-MMP), sığır süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonuyla ilişkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında; odontoklastlarda MT1-MMP'nin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeyinde ekspresyonunu ve lokalizasyonunu tespit ederek, bu molekülün odontoklastların kök yüzeyine geçişleriyle ilişkili migrasyon aktivitesiyle bağlantılı olabileceğini ve süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu sürecini anlamak için MT1-MMP'nin fizyolojik rolünü, aynı zamanda ekspresyonunda etkin mekanizmaları ortaya çıkarabilecek çok sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Oshiro ve arkadaşları⁴⁷, süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonundaki selüler mekanizmayı araştırmak için, apatit kristallerinin dekalsifikasyonu ve tip I kollajenin yıkımı açısından en önemli enzimler olan H^+ -adenozin trifosfataz (H^+ -ATPaz), katepsin K ve MMP-9'un ve osteoklast formasyonu ve fonksiyonunda anahtar regülatör moleküllerden biri olan osteoklast diferensiasyon faktörünün (RANKL) immünohistokimyasal olarak lokalizasyonunu değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, bu moleküllerin odontoklastlarca ekspresyonlarının; odontoklastların H^+ -ATPaz tarafından yönlendirilen proton iyonlarının aktif ekstrüzyonuyla direkt olarak apatit kristallerinin dekalsifikasyonunda rol oynadıklarına ve hem katepsin K hem de MMP-9 ile dentinde tip I kollajenin ekstrasellüler degradasyonu ile ilişkili olduklarına işaret ettiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, rezorpsiyon dokularında mononükleer stromal hücrelerin ve odontoklastların kendilerinin ürettiği RANKL molekülünün odontoklast diferansiyasyonunda ve aktivitesinin belli bir kısmında rol aldığını öne sürmüşlerdir. Odontoklastlarda kalsitonin reseptörlerinin ekspresyonu gösterilememiş olmakla birlikte, osteoklast ve odontoklastlar arasında sitolojik bir farklılık olmadığı, fizyolojik kök rezorpsiyonunda yer alan selüler mekanizmaların osteoklastik kemik rezorpsiyonunda yer alan mekanizmalarla çok benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Kemik ve dentin dokuları fiziksel ve kimyasal olarak ortak birçok özelliğe sahip olmakla birlikte, bu iki dokunun morfolojik farklılıklarının da var olduğu bilinmektedir. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve odontoklastlarca gerçekleştirilen diş sert dokularının yıkım süreçlerinin benzerlikleri ya da farklılıkları tam olarak netlik kazanmamıştır. Birçok ortak morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip olan osteoklast ve odontoklastların arasındaki spesifik farklılıkları gösteren çalışmalar da mevcuttur⁵⁸. Odontoklastların osteoklastlara oranla boyutsal olarak daha küçük oldukları ve daha az

sayıda rezorpsiyon lakünü oluşturdıkları bildirilmektedir^{58,63,64}. Ayrıca, parathormonun sementoblastlar üzerinden kök rezorpsiyon sürecini etkilemediği ve hiperparatiroid hastalarında kök rezorpsiyonunun gerçekleşmediği ifade edilmektedir^{57,58,65,66}. Lasfargue ve Saffar⁶³, prostanoit sentezinin inhibitörlerinden biri olan indomethasinin alveolar kemiğin osteoklastik rezorpsiyonunu baskımlarken, odontoklastik kök rezorpsiyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Takada ve arkadaşları⁶⁷ osteoklastik kemik rezorpsiyonunun inhibitörü olarak bilinen kalsitoninin fizyolojik kök rezorpsiyonu süreci sırasında odontoklastik aktiviteyle ilişkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, süt dişlerinin periodontal bölgesinden izole edilen odontoklastlarda kalsitonin reseptörlerinin varlığını saptamışlardır. Osteoklast ve odontoklastların birçok yönden ortak fonksiyonları olduğunu ancak odontoklastların osteoklastlardaki sinyalleşme mekanizmasında yer alan protein kinaz C yerine protein kinaz A üzerinden odontoklastik kök rezorpsiyonunu baskılamasıyla, kalsitonin regülasyon mekanizmaları açısından farklılık sergilediğini belirtmişlerdir.

Bu bilgilerin ışığında osteoklast benzeri hücre olarak tanımlanabilen odontoklastlar^{1,3,68}, süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu sürecinde diş sert dokularının rezorpsiyonunda ana hücre olarak rol almaktadır^{1,3,4}. Süt dişi kök rezorpsiyonunda inorganik ve organik matriksin yıkılması iki ayrı olay olup, organik matriksin yıkımı kollajenaz, proteaz ve hyaluronidaz enzimlerinin aktivasyonu ile oluşurken, inorganik yapının yıkımı ise odontoklastlar ve lizozomal enzimler ile gerçekleşmektedir. Dokuların yıkımı organik ve inorganik matriksin aynı anda çözülmesi veya önce organik matriksin yıkılması ve ardından kristal yapının demineralizasyonu ile meydana gelmektedir. Bununla birlikte, rezorpsiyon devamlı bir olay değildir ve sement benzeri bir doku birikiminin olduğu tamir süreci ile yer değiştirmektedir^{1,4,9-11,29,33,69,70}. Fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında rezorbe olan dentin yüzeyinde biriken sementoid ve/veya sement matriks yapısının aktif odontoklastlara komşu aktif

sementoblastlarca üretildiği ve bu hücrelerin rezorbe dentin yüzeyinin remodelasyonunda rol oynadıkları bildirilmektedir⁴⁶. Rezorpsiyon periyodunun kısa sürdüğü, bu süreci takip eden duraklama ve dolayısıyla tamir periyodunun daha uzun sürdüğü belirtilmektedir⁴⁸.

Kök rezorpsiyonu başladıktan sonra, süt dişi ve altındaki daimi diş arasındaki bağ dokusu, dişleri ayıran kemik bölmenin osteoklastlar tarafından rezorbe edilmesini takiben granülasyon dokusuna dönüşmektedir. Kök rezorpsiyonunda aktif rol oynayan bu doku, inflamatuvar bir nitelik taşımayan, aşırı kapillerleşme gösteren bir dokudur ve tipik hücreleri arasında odontoklastlar, fibroblastlar ve makrofajlar yer almaktadır^{1,4,5,10,11,29,37,41,43,69,71}. Granülasyon dokusunda lökositler, plazma hücreleri ve lenfositlere de rastlanması diş değişiminde immunolojik bir mekanizmanın olası rolünü yansıtabilir^{5,43}. Dentinin organik matriksinin yıkımından sorumlu olan bu granülasyon dokusunda, hücresel orijini açık olmayan, kollajenolitik enzim aktivitesi tanımlandığı da bildirilmektedir⁵. Okamura ve arkadaşları⁷¹ ise sığır süt dişlerinin fizyolojik rezorpsiyonu sırasında süt dişi kökü ve gelişen daimi diş arasında lokalize olan spesifik granülasyon dokusunda yer alan odontoklastlarda kollajenazın mRNA düzeyinde eksprese olduğunu tespit ederek, kök rezorpsiyonu sırasında dentinin kollajen yıkımında odontoklastların ürettiği kollajenazın önemli bir rol üstlendiğini öne sürmüşlerdir. Aynı zamanda bu granülasyon dokusunda IL-1 varlığını gösteren araştırmacılar, bu mediatörün odontoklastların indüksiyonu ve aktivasyonunda rol oynayabileceğini, kollajenaz sekresyonunu da stimule edebileceğini ifade etmişlerdir.

Histolojik kesitler incelendiğinde, rezorpsiyonun, süt dişi kökünün apikalindeki dentin yüzeyi boyunca sürekli bir tabaka halinde ya da azı dişlerinde kökler arası bölgede bulunan çok çekirdekli hücreler olan odontoklastların aktivitesiyle meydana geldiği görülmüştür^{4,5,43,46,50,51}.

Sasaki ve arkadaşları¹, süt dişi kök rezorpsiyonu sırasında, odontoklastlar tarafından gerçekleştirilen dentin yüzeyinde oluşan ekstraselüler demineralizasyonu, apatit kristallerinin serbest hale geçmesinin izlediğini, rezorbe dentin yüzeyinde karakteristik olarak, asit trimetafosfataz enzim aktivitesi gözleendiğini bildirmişlerdir. Domon ve arkadaşları⁴⁵, süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda multinükleer odontoklastlarla beraber, sayıları az olmakla birlikte mononükleer odontoklastların da varlığını tespit etmişler, her iki tip hücrede de asit fosfataz enzim aktivesini saptadıklarını ve mononükleer odontoklastların da fizyolojik kök rezorpsiyonunda rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Sasaki ve arkadaşları⁴³, kedilerde, süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasındaki hücresel aktivitelerini değerlendirdikleri araştırmada, diş sert ve yumuşak dokularının yıkımında odontoklastların yanısıra mezenşimal hücrelerin, fibroblastların, sementoblastların ve mononükleer fagositlerin de (makrofajların) önemli roller üstlendiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, bu hücrelerin rezorpsiyondaki fonksiyonel rolleri hala tam olarak bilinmemektedir^{3,11,50}.

Yine Sasaki ve arkadaşları⁴³, osteoblastların kemik rezorpsiyonunun hormonal kontrolünü, paratiroid hormona cevap olarak bazı bilinmeyen çözünebilen maddeler salgılayıp, osteoklastik kemik rezorpsiyonunu aktive ederek gerçekleştirdiğini ve osteoklastların direkt aktivasyonunda görev aldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu hücrelerin, lokal ve sistemik rezorbe edici hormonların salgılanması için gerekli reseptörleri aktive ettiğini, ancak osteoklastların bu etkiyi göstermediğini vurgulamışlardır. Ayrıca, rezorbe dentin yüzeyinde bulunan sementoblastların, osteoblastlar için bir enzim markerı olan, alkale fosfataz aktivitesi sergilediklerini ve bu durumun sementoblastların osteoblastlara morfolojik olarak benzediğinin bir kanıtı olabileceğini

belirtmişlerdir. Araştırmada, eğer böyle bir benzerlik söz konusu ise, sementoblastların odontoklast diferansiasyonunu stimüle edebileceği, bu sementoblastik fonksiyonun, diş rezorpsiyonu sırasındaki odontoklastik fonksiyon aktivitesi için esas olabileceği savunulmaktadır. Furseth⁴, fizyolojik süt dişi rezorpsiyonu sırasında, sementoblastların, odontoklastlar gibi, önemli bir rol üstlendiğini bildirmiştir.

Sahara ve arkadaşları⁴¹, süt dişi düşme süreci sırasında, odontoklastlar tarafından gerçekleştirilen mine rezorpsiyonunu değerlendirdikleri araştırmada minenin, diğer dokulara benzer şekilde, hidrolitik enzimlerce ve asitlerle demineralize olmasını takiben, kristallerin fagosit edilmesiyle rezorbe olduğunu belirtmişlerdir.

Sayısız kan damarı, fibroblast ve makrofaj tarafından desteklenen ve odontoklastlarca gerçekleştirildiği kabul edilen diş sert dokularında gözlenen fizyolojik rezorpsiyon olayı kısmen açığa kavuşturulmuş olmakla birlikte, pulpa ve periodontal ligament gibi yumuşak dokuların rezorpsiyon mekanizması hakkında çok fazla bilgi elde edilememiştir^{3,8,10,36}. Bununla birlikte, Ten Cate ve Anderson³, süt dişi düşme sürecinde ekstraselüler matriks ve fibroblast hücrelerinin ortadan kaldırılmasını içeren periodontal ligament rezorpsiyonunda, kollajen yıkımının yanı sıra, fizyolojik olaylarla tetiklenen apoptotik hücre ölümünün de görev aldığını bildirmişlerdir.

Süt dişi pulpasının, koronal bölgesinin, ileri rezorpsiyon dönemlerinde bile, odontoblastların fonksiyon görmeleri nedeniyle normale yakın bir görünüm sergilediği bilinmektedir^{4,10,29,37,72}. Bununla birlikte, süt dişi pulpasının histopatolojik değerlendirmelerinde, görüntünün rezorpsiyon derecesine bağlı olarak değişebildiği, çok ileri rezorpsiyon aşamalarında pulpa dokusu içine doğru ilerleyen granülasyon dokusunun

bazen tamamen pulpayla yer değiştirdiği saptanmıştır^{4,9,10,33,37,51,73,74}. Rezorpsiyonun ilerlemesiyle birlikte, pulpa dokusundaki hücresel elementlerin bu olaydan etkilendiği ve pulpa hücrelerinin odontoklastlara diferansiye olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, rezorpsiyonun ilerlemesiyle, periodontal doku yıkımına bağlı sekonder bir enfeksiyonun işareti olarak pulpada iltihabi hücre infiltrasyonu gözlendiği bildirilmiştir^{4,37,70,74}.

Bazı araştırmacılar, koronal dentinin pulpa yüzeyinde odontoklastik rezorpsiyon olduğuunu, bunun fizyolojik bir olay olduğuunu, ancak internal rezorpsiyonun başlama sürecinden önce, kök rezorpsiyonu neredeyse tamamlandığı için, internal rezorpsiyonun dişin düşmesinde minör bir etkiye sahip olduğuunu bildirmişlerdir^{4,74}. Ayrıca, Sahara ve arkadaşları⁷⁴, süt dişinin düşme süreci içerisinde koronal dentinde gözlenen bu internal rezorpsiyonun, marjinal periodontal dokularda gözlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ilişkili olabileceğini, ancak böyle bir etkileşim söz konusu ise, bu internal rezorpsiyonun fizyolojik değil, patolojik bir olay olarak nitelendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise, farklı bir yaklaşım ile fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında, odontoklastik aktivite sonucu süt dişlerinde oluşan predentin ve odontoblast tabakasındaki kaybın, pulpa kaplaması tedavilerinde karşılaşılan patolojik internal rezorpsiyon için predispozan faktör olduğuunu belirtmişlerdir⁷⁵. Sahara ve arkadaşları⁵¹, süt dişi düşmeden önce koronal dentinde gözlenen internal rezorpsiyonun, odontoklast sitodiferansiasyonunun değerlendirilmesi için mükemmel bir örnek olduğuunu savunmuşlardır. Rezorpsiyonun son aşamasında, koronal dentindeki fizyolojik internal rezorpsiyon yerini, bir çeşit tamir dokusu olarak kabul edilen, sement benzeri bir doku birikimine bırakmaktadır^{10,50,51,73,74}. Sahara⁵¹ ve Sasaki³⁶, internal rezorpsiyonun sona erdiği bu süreç sırasında, odontoklastların dejenere olmaya başladığını ve rezorbe yüzeylerden uzaklaştığını bildirmişlerdir.

Fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında, süt ve daimi diş arasında bulunan granülasyon dokusunda odontoklastik aktivitenin önemli olduğu, ancak bu süreç içerisinde süt dişi pulpa odasındaki odontoklastik aktivitenin rolünün tartışmalı olduğu belirtilmektedir⁴⁸.

Sahara ve arkadaşları⁷⁰, süt dişinin düşmesinin son aşamasının, dentogingival birleşim epitelinin rezorbe yüzey boyunca migrasyonu ve dişeti epitelinin, kalan pulpa dokusundaki inflamasyon doğrultusunda proliferere olduğunu öne sürerek, süt dişi düşme sürecinde, yara iyileşmesinde gözlenen epitelyal proliferasyonun, kök yüzeyindeki inflamatuvar hücre konsantrasyonunu takip ederek yönlenebilir bir fenomenin söz konusu olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Pulpa ve periodontal dokuların fizyolojik rezorpsiyondaki rolü açıklık kazanmamış olmakla birlikte, fizyolojik kök rezorpsiyonu başlamış süt dişlerinin pulpa ve periodontal dokularında spesifik enzim aktivitesi ve mediatör varlığını gösteren çalışmalar^{28,69,76,77}, bu dokuların fizyolojik kök rezorpsiyonundaki rollerine dikkat çekmektedir. Alexander ve Swerdloff⁶⁹, rezorbe olan süt dişlerindeki mukopolisakkaridaz aktivitesini immünohistokimyasal olarak değerlendirdikleri çalışmada, özellikle periodontal ligamentte bu aktiviteyi gözlemiş, fibroblastların da bu enzim aktivitesinden sorumlu hücreler olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, pulpa dokusunun fizyolojik kök rezorpsiyon sürecindeki rolünün tartışmalı olduğunu, periodontal ligamentteki hücresel elementlere benzer yapılar içermesi nedeniyle, pulpa dokusunda da bu enzim aktivitesinin değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Alexander²⁸, fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında insan süt dişi pulpasındaki kollajenolitik enzim aktivitesini değerlendirdiği çalışmada, pulpa dokusundaki kollajenolitik aktivitenin kök rezorpsiyonu ile arttığını ve bu artışın süt dişinin düşme sürecinde rol oynayabileceğini bildirmiştir. Aras⁷⁸, süt dişi pulpasında

prostoglandin benzeri aktivite düzeyini araştırdığı çalışmasında, değerlerin, kök rezorpsiyonuyla ve süt dişi pulpa dokusunda histopatolojik olarak gözlenen klastik aktivasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile bağlantılı olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, prostoglandin benzeri aktivitenin, klastik hücrelerin farklılaşma ve aktivasyonu için uyarıcı bir etken olarak, rezorptif yanıtı modüle edebileceği düşünülmüştür. Süt dişi kök rezorpsiyonunun ileri aşamalarında ise, dişeti oluğu epitelinin kron altına proliferasyonuna bağlı olarak, pulpada gözlenen iltihabi hücre infiltrasyonunun, prostoglandinlerin aşırı sentezi ve salımına neden olarak rezorpsiyonun şiddetlendirilmesinde etken olabileceği sonucuna varılmıştır. Eronat ve arkadaşları⁷⁶ ise süt dişi kök rezorpsiyonunun erken ve ileri dönemlerinde pulpa dokusunda meydana gelen değişiklikleri hücrelerin proliferatif aktivitelerini ortaya koyan Ag-NOR (silver-binding nucleolar organizer region) boyama tekniği ile incelemişlerdir. Çalışmada süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında, rezorpsiyonun ilerlemesiyle birlikte süt dişi pulpa hücrelerinin nukleuslarında meydana gelen boyanma sayısındaki artış, bu dönemde süt dişi pulpasının metabolik aktivitesinin varlığına ve pulpanın rezorpsiyon proesindeki rolüne dikkat çekmektedir. Fukushima ve arkadaşları⁷⁷, osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunda rol alan osteoklast diferensiasyon faktörü (ODF/ RANKL) ve osteoklastogenez inhibe edici faktör/osteoprotegerin (OPG) varlığını süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda değerlendirmişlerdir. Fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi periodontal ligament hücrelerinden elde edilen kültür ortamında bu hücrelerin RANKL eksprese ettiklerini, fakat OPG ekspresyonlarını azalttıklarını; rezorpsiyon göstermeyen süt dişlerinden ve daimi dişlerden elde edilen periodontal ligament hücrelerinden oluşan kültür ortamında ise sadece OPG ekspresyonu gözlendiğini bildirmişlerdir. Periodontal ligament hücrelerinden ekprese olan RANKL'in odontoklastogenezde rol oynayarak fizyolojik kök rezorpsiyonunu aktive ettiğini ne sürmüşlerdir.

Son dönemde yapılan bir çalışmada Angelova ve arkadaşları⁷⁹, fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında süt dişi pulpa dokusundaki farklı tipteki immünokomponent hücrelerin yoğunluğu ve dağılımını incelemişler, makrofajların, HLA-DR+ (human leukocyte antigens) hücrelerin, T ve B lenfositlerin pulpa dokusunda artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Fizyolojik kök rezorpsiyon sürecinin süt dişlerinin immünolojik durumunu değiştirdiğini, immünolojik olayların süt dişi sert ve yumuşak dokularının rezorpsiyonunda belli bir rol üstlendiğini öne sürmüşlerdir.

Günümüze kadar süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi diş sert dokularının yıkımı kısmen açıklanabilmekte, dişteki yumuşak dokuların rezorpsiyonu ve bu süreçteki rolleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

2.3. Apoptozis

Hücre ölümü, nekroz ya da apoptozis ile gerçekleşmektedir. Nekroz, dışarıdan gelen uyarılarla plazma membranında meydana gelen değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Nekrotik hücrenin şişmesi ve plazma membranın parçalanması sonucunda sitoplazmik içerik, doku aralığına geçmektedir. Nekrotik hücre artıkları, inflamatuvar hücreleri dokuya çekerek bu dokunun parçalanmasına yol açmakta ve inflamasyona neden olmaktadır.

Apoptozis ise, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasar görmüş hücrelerin, çevredeki komşu hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanmaktadır. Apoptotik hücre ölümü, hücrenin kendi genetik

yapısında kodlanmış program sonucu oluşmaktadır. Bu programda, çok kontrollü bir seri olay sonucunda biyokimyasal ve morfolojik olaylar oluşmaktadır. Bu olay, aynı zamanda hücrenin intiharı olarak da adlandırılmaktadır ve dokulardaki hücre sayısını kontrol altında tutmak için en önemli sistemlerden biri olarak kabul edilmektedir⁸⁰⁻⁸².

Apoptozis terimi, ilk kez İskoç araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmasından sorumlu olan yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır¹². Apoptotik süreç ilerledikçe, deoksiribonükleik asidin (DNA) internükleozomal bölgelerinden 180–200 baz çifti veya bunun katları olacak tarzda fragmantasyona uğradığı ve bu DNA fragmanlarının agaroz jel elektrofrezinde merdiven görüntüsü oluşturduğu ifade edilmektedir. Bu bulgu apoptozisin ilk biyokimyasal kanıtı olarak literatüre geçmiş ve özellikle bu tarihten itibaren apoptozisle ilgili yapılan çalışmaların sayısında hızlı bir artış olduğu gözlenmiştir⁸¹⁻⁸³.

2.3.1. Apoptozisin Yer Aldığı Olaylar

Apoptozis, yaşamın ayrılmaz bir parçası olup, hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda görülmektedir⁸⁴.

Apoptozis homeostaz içinde;

1. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımında (örn. fetus implantasyonu, organogenez ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyonda),

2. Erişkinde hormona bağımlı involüsyonda (örn. menstrüel siklusta endometrium hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin regresyonunda),

3.Sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılmasında (örn. deri, gastrointestinal sistem hücrelerinde v.b.),

4.İmmün hücrelerin seçiminde (örn. sitokin deplesyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılmasında) yer almaktadır⁸⁵⁻⁸⁸.

Apoptozis patolojik süreçlerde ise;

1.Tümörlerde büyüme ve regresyon aşamasında hücre ölümünde (örn. kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisiyle ve spontan regresyonda),

2.Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofide (örn. kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybında),

3.Parenkimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı patolojik atrofide (örn. karaciğer, pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi),

4.Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümünde (örn. otoimmün hastalıklarda),

5.Bazı viral hastalıklarda hücre ölümünde (örn. HIV1, HCV, Adenovirüs enfeksiyonlarında),

6.Çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümünde (örn. hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi ve travma gibi nekroz oluşturan etkenlerin düşük düzeylerine maruz kalındığında) rol almaktadır^{87,89,90}.

Her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılmakta ve bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitoz) ve yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. Söz konusu olan bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması, birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunmaktadır⁹¹⁻⁹³. Apoptozis-mitoz arasındaki denge apoptozis lehine bozulursa, yani aşırı hızlanmış bir

apoptozis söz konusu olursa: AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diabet ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıklar oluşabilmekte, eğer denge mitozis yönüne kayarsa, yani apoptozis olması gerekenden daha az gerçekleşirse, kanser meydana gelebilmektedir^{83,94-98}

2.3.2. Nekroz ve Apoptozis Arasındaki Farklar

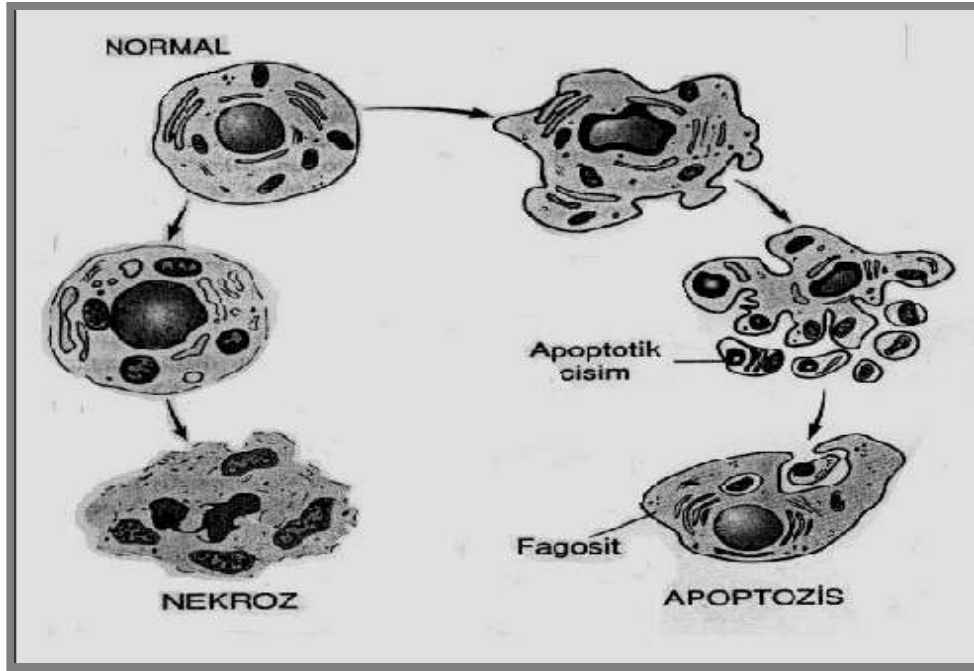
Apoptozisi daha iyi anlamak için bir başka ölüm şekli olan nekroz ile kıyaslayarak incelemek daha doğru olacaktır (Tablo I).

Nekroz patolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilmektedir. Toksinler, şiddetli hipoksi, iskemi ve hipertermi gibi etkenler nekroza neden olurken; azalmış büyüme faktörü, hücre yaşlanması, hücre hasarı, hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılar (düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif düzeyde travma ve hipoksi...) apoptozise neden olmaktadır^{12,84,99,100}.

Tablo I. Nekroz ve apoptozis arasındaki temel farklar^{84,101}.

	NEKROZ	APOPTOZİS
Temel Farklar	☐ Kontrolsüz mekanizma ☐ ATP gerektirmeyen pasif işlem ☐ Hücrelerin gruplar halinde ölmesi ☐ Patolojik şartlarda meydana gelme ☐ Hücre şişmesi ☐ Membran parçalanması ☐ Kromatinin nükleusun her yerinde yaygın olması ☐ Mitokondrial değişiklik (+) ☐ Rastgele DNA parçalanması ☐ Organellerin parçalanması, hücre lizisi ☐ İnflamasyon (+)	☐ Kontrollü mekanizma ☐ ATP gerektiren aktif işlem ☐ Hücrelerin tek tek ya da birkaçının birarada ölmesi ☐ Hem patolojik hem fizyolojik şartlarda meydana gelme ☐ Hücre küçülmesi ☐ Membran bütünlüğünün korunması ☐ Kromatinin nükleer membranın hemen altında yoğunlaşması ☐ Mitokondrial değişiklik (-) ☐ DNA'nın 180–200 baz çifti veya katları olacak şekilde fragmentasyonu ☐ Hücrenin apoptotik cisimciklere parçalanması ve makrofajlarca fagositozu ☐ İnflamasyon (-)

Morfolojik değişiklikler açısından apoptozis ve nekroz arasında önemli farklar bulunmaktadır. Nekrozda hücreler gruplar halinde ölmekteyken, apoptozisde hücreler tek tek veya birkaç tanesi birarada etkilenmektedir. Nekroz ya da apoptozise giden hücrelerde bu ölüm tipine özgün birtakım yapısal değişiklikler meydana gelmektedir^{12,16,84,102} (Şekil 1).



Şekil 1. Nekroz ve apoptoziste görülen yapısal değişiklikler dizisi¹⁰².

Nekrozda aşırı sıvı girişine bağlı olarak hücre şişmektedir. Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilip hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkmakta, hücre yüzeyi yuvarlaklaşmakta ve apoptotik hücre nekrotik hücrenin tam tersine küçülmektedir^{99,100}. Nekrozda membran, nekrotik süreç ilerledikçe parçalanmakta ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşmektedir. Oysa, apoptozis sırasında membranda böyle bir durum söz konusu değildir; membranda küçük tomurcuklanmalar oluşmaktadır. Nekrozda kromatin hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzer olup, apoptotik hücrenin kromatininin ise nükleus membranının hemen altında yoğunlaştığı gözlenmektedir. Nekrotik hücre lizise uğramakta, oysa apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanmaktadır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplı olup, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içermektedirler. Nekrozda, hücre içeriği dış ortama salındığından inflamasyon reaksiyonu

uyarılmakta, ancak apoptoziste apoptotik hücreler veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmamaktadır.

Apoptozisin en önemli özgün yönünü, DNA'nın internükleozomal bölgelerinden 180–200 baz çifti veya bunun katları olacak tarzda kırılması oluşturmaktadır. Bu durum, agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nekrozda ise DNA rastgele parçalanmaktadır. Apoptotik süreç ilerledikçe, membranın iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serinler membranın dış yüzeyine transfer olmaktadır. Dış yüzeye yerleşen fosfatidil serinler, özel boyalar yardımı ile (örn. anneksin V) görünür hale getirilmekte ve apoptotik hücrenin normal hücreden ayrımı gerçekleştirilmektedir.

Pasif bir işlem olan nekrozda adenosin trifosfat (ATP) gerekli olmamakta, aktif bir işlem olan apoptozis de yüksek ATP seviyeleri gerekmektedir^{12,81,92,99,103-111}. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön vermektedir. Bu da apoptozisin erken fazında mitokondrinin önemini göstermektedir. Mitokondrinin ciddi olarak hasar gördüğü durumlarda, apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlanamamakta ve hücre nekroz ile ölmektedir¹¹².

2.3.3. Apoptozis Mekanizmasında Yer Alan Moleküller

Apoptozisin mekanizmasında rol aldığı düşünülen aracı moleküller bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesini Bcl-2 gen ailesi (B-cell leukemia/lymphoma 2) oluşturmaktadır. Bcl-2 gen ailesi, pro-apoptotik (Bax, Bid, Bim, Bad, Bak vs.) ve anti-apoptotik (BCL-2, Bcl-XL) olmak üzere çok sayıda üye içermektedir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu, bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin oranına bağlı olarak

gerçekleşmektedir. Pro-apoptotik olanlar apoptozisi indüklemekte, anti-apoptotik olanlar ise apoptozisi baskılamaktadırlar^{81,92,93,103,110,113-115}.

Apoptotik mekanizmada rol alan bir diğer aracı molekül ailesi ise kaspazlar tarafından oluşturulmaktadır. Kaspaz (caspase-cysteine dependent aspartate–specific proteases) adı, enzimin katalitik aktivesinden gelmektedir. C, sistein proteaz aktivitesinden, aspase ise proteinlerin içindeki aspartik asitten sonraki kısımları parçalamasından dolayı verilmiştir. Kaspazlar, inaktif öncü molekül olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığı için sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir^{92,104,111}.

Kaspazlar, apoptotik süreçte birbirlerini aktive ederek, şelale tarzında reaksiyon dizisine neden olmaktadır. Kaspazların bazıları, başlatıcı kaspaz (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), bazıları da efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) olarak bilinmektedir. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmektedir. Efektör kaspazlar ise ilgili hücre iskelet proteini aktin, DNA tamirinde rol alan poli adenozin difosfat riboz polimeraz gibi proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olmaktadır^{80,115-117}. Kaspazlar indirekt olarak Ca^{2+} bağımlı endonükleazları aktive ederek DNA'da fragmanların oluşmasına neden olmaktadır¹⁶.

2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptotik mekanizmaları, araştırma sonuçlarından ortaya çıkan teoriler olarak değerlendirmek daha doğru olacaktır. Çünkü hala birçok mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Kesin olarak ortaya konulan bir basamaklar zinciri ne yazık ki bulunmamaktadır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, apoptozisin gelişim

sürecinde, gelen sinyalin hücre içi veya hücre dışı oluşuna göre değişen iki yolun etkili olduğunu düşündürmektedir:

- a. Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis (hücre dışı kaynaklı sinyal)
- b. Mitokondri aracılı apoptozis (hücre içi kaynaklı sinyal)^{80,84,111,115}.

2.3.4.1.a. Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis

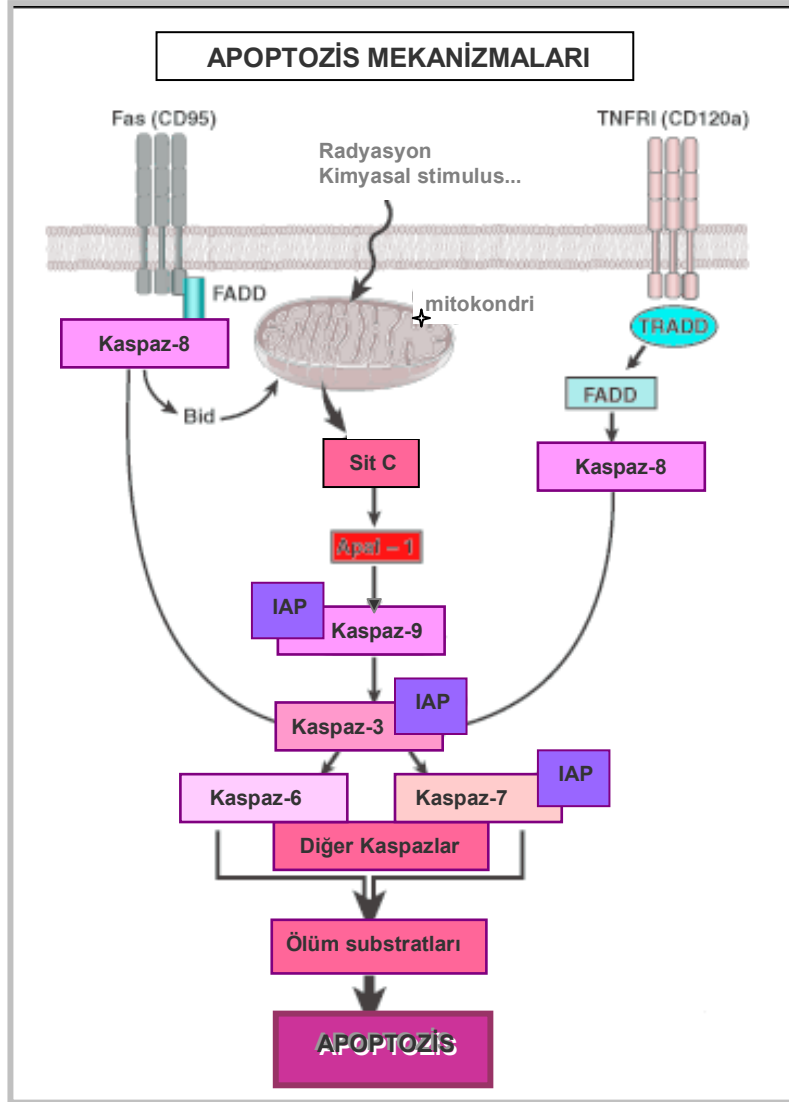
Hipoksi, hipertermi, radyasyon vs. gibi hücre dışı sinyaller, plazma membranındaki ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptotik süreci başlatabilmektedirler. Apoptoziste rol alan membran proteinleri içinde en önemli grubu tümör nekroze edici faktör reseptör (TNFR) ailesi oluşturmaktadır. TNFR ailesi içerisinde apoptozis oluşturan reseptörlerin en önemlileri FAS (CD-95) ve TNFR-1'dir. Ölüm reseptörlerinin, sisteinden zengin hücre dışı alanları ve sitoplazmanın iç kısmında homolog ölüm alanları (death domain: DD) bulunmaktadır. Ölüm reseptörleri kendilerine özgü transmembran proteinini (ligand) bağladıkları zaman, sitoplazmanın iç kısmında bulunan parçaları apoptotik mekanizmayı uyarmakta ve hücre dışı alandan gelen uyarı ölüm alanları ile hücre içine iletilmektedir^{115,118-124} (Şekil 2).

2.3.4.1.b. Mitokondri aracılı apoptozis

Hücre içinden kaynaklanan sinyallerde mitokondri önemli rol oynamaktadır. DNA hasarı, pH'da düşme, hücre döngü bozuklukları hücre içi kaynaklı sinyalleri oluşturmaktadır. Mitokondri dış zarının geçirgenlik

artışını, hücre içi sinyaller ve bazı proteinler (Bcl-2 gen ailesi) ayarlamaktadır.

Bcl-2 gen ailesi üyelerinden pro-apoptotik olarak bilinen bax proteini, sitozolde bulunmakta ve apoptotik uyarı alınmasını takiben mitokondri membranına bağlanmaktadır. Burada küçük delikçiklerin oluşumu indüklenerek seçimli iyon geçirgenliği bozulmakta ve sitokrom c (sit C) ile apoptozis indükleyici faktör mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır. Salınan sit C, sitoplazmik bir protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ile bağlanmakta ve yapıya ATP'nin ve prokaspaz 9'un eklenmesiyle apoptozom adlı kompleks oluşmaktadır. Daha sonra prokaspaz 9, aktif kaspaz 9'a dönüşerek efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive etmekte ve hücre apoptozise gitmektedir. Sit C'nin, mitokondriden sitozole salımı, apoptozisin geriye dönemeyen bir döneme girdiğinin göstergesi olarak görülmektedir^{92,104,115,125,126} (Şekil 2).



Şekil 2. Ölüm reseptörleri ve mitokondri aracılı apoptozisin şematik görünümü¹²⁷.

IAP: İnhibitör apoptozis proteini

FADD: Fas Associated protein with Death Domain (FAS ile ilişkili ölüm alanı proteini)

Apoptotik mekanizmalar arasında yer alan spesifik yollardan birini de DNA hasarına karşı yanıt olarak gelişen p-53 gen aracılı apoptozis oluşturmaktadır.

2.3.4.2. p-53 gen aracılı apoptozis

İç ve/veya dış sinyaller ile DNA'da hasar oluştuğunda, bazı genler aktive olarak hücreyi apoptozise götürmektedir. Bunların en önemlisi p-53 genidir. Normalde inaktif olan p-53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktive olarak p-21 genini harekete geçirmektedir. p-21 geni de hücre döngüsünde blokaj yapmakta ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırmaktadır. Bu süre içerisinde, hücre DNA'sı tamir edilebilir ise, hücre döngüsü üzerindeki blokaj kalkmaktadır. Eğer bu süre içerisinde, DNA hasarı tamir edilemez ise, p-53 geni tekrar harekete geçerek, Bcl-2 gen ailesi üyelerinden pro-apoptotik olarak bilinen bax proteinini aktive etmekte ve hücreyi apoptozise götürerek DNA hasarlı hücreyi ortadan kaldırmaktadır^{114,128,129}.

2.3.5. **Diş Hekimliği Alanında Yapılan Apoptozis Çalışmaları**

Apoptozis vücutta birçok aşamada rol oynayan bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunların dışında, diş hekimliği alanında yapılan çalışmalar ile ilgili literatür değerlendirilmesi yapıldığında apoptozisin;

□Odontogenez safhasında: mine formasyonunun başlangıcında¹³⁰⁻¹³⁴, erüpsiyon sırasında kronun çevresindeki dokularda ve tüberküllerde azalan ameloblastların eliminasyonunda¹³⁵⁻¹³⁸, kök formasyonu tamamlandıktan sonra Hertwig epitelyal kök kını hücrelerinin parsiyel eliminasyonunda^{139,140},

□Pulpa dokusu homeostazında: pulpa hücre popülasyonunun regülasyonunda¹⁷,

□Ağız içi dokularının homeostazında: ağız mukozasının homeostazında¹⁴¹, periodonsiyumun normal turnover ve remodelasyonunda¹⁴²,

□Ağız hastalıklarının ilerlemesinde: Liken planus¹⁴³⁻¹⁴⁵, odontojenik keratokist¹⁴⁶, leukoplakia¹⁴⁶, squamoz hücreli karsinom¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, oral lenfoma¹⁴⁹, aftöz ülserasyon¹⁵⁰, Sjögren sendromu¹⁵¹, mukokutanöz kandida¹⁵² gibi hastalıkların mekanizmasında,

□Alveolar kemik remodelasyonu ve rezorpsiyonunda: enflamasyonla ilişkili kemik kaybında¹⁵³⁻¹⁵⁵, ortodontik diş hareketiyle ilişkili olarak periradiküler dokularda kemik remodelasyonu sırasında¹⁵⁶,

□İmmünolojik yanıt ve enflamasyonda: immün hücre homeostazının sağlanmasında¹⁵⁷, periradiküler lezyon gelişiminde¹⁵⁸,

□Periodontal hastalıklarda: periodontal hastalıklarda oral mikroorganizmalar tarafından üretilen asitlerin farklı inflamatuvar hücrelerin eliminasyonunu inhibe ederek inflamasyonun şiddetlenmesinde¹⁵⁹⁻¹⁶¹,

□Yara iyileşmesinde: yara iyileşmesi proçesinde re-epitelizasyon safhasından sonra myofibroblastların eliminasyonunda¹⁴¹,

□Dental materyallerin ağız dokuları üzerindeki etkisinde: pulpa ve periradiküler dokulara uygulanan materyallerin olumlu ve olumsuz etkilerinin değerlendirilmesinde¹⁶²⁻¹⁶⁶,

□Kemik rezorpsiyonu tedavisinde: tetrasiklinin osteoklastların eliminasyonunu indükleyerek rezorpsiyonu inhibe etmesinde^{167,168} rol oynayan anahtar mekanizma olduğu belirtilmektedir.

2.3.5.a. Pulpa ve Apoptozis

Apoptozisin, sağlıklı pulpa homeostazının bir parçası olduğu öne sürülürken, pulpanın apikal kısmından çok insizal/okluzal kısmında meydana geldiği belirtilmektedir¹⁷. Sağlıklı pulpada apoptotik hücrelerin periferde ve odontoblastik tabakadan daha çok subodontoblastik

tabakayla ilişkili olarak gözlemlendiği bildirilmektedir^{17,169}. Primer dentin yapımına bağlı pulpa odasının hacmi azaldığında, odontoblastlar için mevcut yüzeyin azalması bu hücrelerin ölümünden ziyade çok tabakalı sıralanması ile kompanze edilirken¹⁸, yapılan çalışmalarda kavite preparasyonu gibi odontoblastik süreçte hasar veren durumlarda daha fazla sayıda apoptotik hücre tespit edildiği ifade edilmektedir^{135,162,170}. Bununla birlikte, sekonder dentin yapımının başlamasıyla odontoblastların tek tabakada reorganizasyonu ile ilişkili olarak odontoblast sayısındaki büyük orandaki azalmanın apoptotik mekanizma ile gerçekleştiği ve odontoblastik tabakada apoptotik hücrelerin varlığının bu hücrelerin sayısının regülasyonunda yer alan mekanizmalardan biri olabileceği bildirilmektedir¹⁸. Pulpada yer alan fibroblast ve vasküler endotelial hücrelerde de apoptozise rastlandığı ifade edilmektedir^{17,18}. Apoptotik hücre ölümü bazı karakteristik özellikleri nedeniyle nekroza göre tercih edilse de, apoptozisin pulpanın kendini tamirinde rol oynamadığı ve rejeneratif hücrelerin eliminasyonunda apoptozisin yer almasının buna etken olabileceği belirtilmektedir¹⁶². Apoptozis gerçekleştiğinde, apoptotik cisimcikler ve debrislerin major histokompatibilite Klas II pozitif ve negatif makrofajlar tarafından fagosite edildiği bildirilmektedir¹⁷¹.

Piattelli ve arkadaşları¹⁶⁹, pulpa dokusunda immünohistokimyasal olarak apoptotik mekanizmada yer alan bcl-2 ve p-53 moleküllerinin, aynı zamanda hücre proliferasyonunu gösteren bir marker olan MIB-1 varlığını araştırmışlardır. Çalışmalarında, odontoblastik ve subodontoblastik tabakada bcl-2 pozitif hücrelerin varlığını tespit ettiklerini ve birkaç stromal hücre dışında odontoblastlar dahil olmak üzere MIB-1 pozitif hücre tespit edilemediğini, ayrıca p-53 pozitif hücrelere hiç rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, pulpa hücrelerinin regülasyonunda rol oynayan apoptotik mekanizmada p-53 molekülünün yer almadığı, bcl-2 molekülünün pulpada eksprese olmasının ise yapılmış immünohistokimyasal çalışmalarda odontoblastik ve subodontoblastik

tabakada tespit edilmiş olan apoptotik hücrelerin varlığını açıkladığı ifade edilmiştir. Pulpa dokusunda apoptotik mekanizmada yer alan aracı molekülleri daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirecek ve konuya ışık tutacak çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

2.3.5.b. Alveolar Kemik ve Apoptozis

Kemik remodelasyonu sırasında, osteoblastların bazıları apoptotik mekanizmayla elimine edilirken, bazı osteoblastların ise osteosit olarak gömülü kaldığı bildirilmektedir^{154,172}. Kemik dokusuna ataşmanını kaybeden birçok osteoklast apoptozis süreci ile ölmektedir¹⁷³.

TNF- α 'nın osteoblast apoptozisini indüklediği gösterilmiş ve inflamasyonla ilişkili kemik kaybında rol oynadığı bildirilmiştir¹⁵³⁻¹⁵⁵. Nötrofiller de osteoblastların apoptozisini indüklemekte, bu olay inflamatuvar hücreler ve inflamasyonla ilişkili kemik rezorpsiyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir¹⁷⁴. Diğer taraftan, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer kemik stimule edici hormonlar kemik rezorpsiyonu periyodları sırasında osteoblast apoptozisini indüklemektedir^{153,154}.

Kaneko ve arkadaşları¹³⁶, sürmekte olan sürekli dişlerin üzerinde bulunan kemik bölgesindeki osteosit, osteoblast ve makrofajlarda apoptotik hücre ölümü ile apoptozise bağlı olmayan, sitoplazma çözünmesine bağlı hücre ölümleri gözlediklerini bildirmişlerdir. Ortodontik diş hareketiyle ilişkili olarak periradiküler dokularda da kemik remodelasyonu sırasında apoptozis meydana geldiği bildirilmektedir¹⁵⁶. Belli mediatörler, rezorpsiyonu sınırlandırmakta ve remodelasyon sırasında kemik formasyonuna yardımcı olmaktadır¹⁵³. Osteoblastların,

osteoklast apoptozisinin regülasyonunda rol oynadığına dair kanıtların mevcut olduğu ifade edilmektedir^{175,176}. Aslında, osteoklast aktivitesini stimule eden mediatörlerin bir çoğu osteoblastlar üzerinden etki göstermektedirler¹⁷⁶. Genel olarak, kemik rezorpsiyonunu stimule eden faktörler osteoklast apoptozisini inhibe ederken; kemik rezorpsiyonunu inhibe edenler osteoklast apoptozisini indüklemektedir¹⁷³.

Osteoklast öncül hücrelerinin apoptozisi, etkin olarak kemik rezorpsiyonunu azaltması yoluyla osteoklast hücre popülasyonunun kontrolündeki mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır^{173,177}. Ayrıca, TNF süper ailesinin üyeleri osteoklast apoptozisini inhibe etmekte, öncül hücrelerin maturasyonunu indükleyerek matür fonksiyonel osteoklastların oluşumunu sağlamakta ve kemik yıkımına katkıda bulunmaktadır¹⁷⁵.

Devam eden rezorptif sürecin sonucu olarak ortaya çıkan yüksek ekstraselüler konsantrasyonlarının varlığında, osteoklast apoptozisi indüklenmektedir¹⁷⁸. Benzer biçimde, östrojen, glukokortikoidler, bifosfonatlar ve transforme edici büyüme faktörü-beta gibi moleküllerin de osteoklast apoptozisini stimule ettiği bildirilmektedir¹⁷⁶.

2.3.6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozis ile ilgili çalışmaların hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek kolay olmamaktadır¹⁷⁹. Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içinde geliştiğinden, apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımlamak ve kantifiye etmek zor olmaktadır¹⁸⁰. Genellikle çalışmaların güvenilirliğini arttırmak için farklı yöntemlerin birkaçının bir arada kullanılması önerilmektedir¹⁸¹.

Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için kullanılan yöntemler arasında flow sitometri, ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu yer almaktadır¹⁸². Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem (altın standart) olarak düşünülmektedir^{183,184}. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği yöntem olarak bilinmektedir. Mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subselüler detaylar da incelenebilmektedir. Elektron mikroskobu çalışmalarında, nükleus parçalanması net olarak gözlenmekle birlikte, apoptotik hücrede sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmantasyonu izlenebilmektedir¹⁸⁴.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemler arasında çeşitli sitoplazmik değişikliklerin saptanması (örn. kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonunun ölçülmesi), membran değişikliklerinin belirlenmesi (örn. membran geçirgenliğinin değişmesi), apoptozis sürecinde veya regülasyonunda görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (örn. Bcl/Bax oranı), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla saptanması yer almaktadır. Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler DNA'daki değişikliklere dayalı olan agaroz jel elektroforezi ve TUNEL yöntemidir¹⁸². DNA fragmantasyon esasına dayanan apoptozis saptama yöntemlerinden biri olan TUNEL (**T**erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated **d**UTP-biotin **N**ick **E**nd **L**abeling) yöntemi, DNA fragmantasyonlarının *in situ* olarak tanınmasını sağlamaktadır. Parafin bloklar, donmuş kesitler ve hücre kültürlerinde apoptozisin varlığı bu metotla saptanabilmektedir. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanmakta olduklarından, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ bütünlüğünü kaybetmekte ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselmektedir. TUNEL yönteminde terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi

(2'-deoksiuridin 5'-trifosfat), parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer etmektedir. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıklarına, streptavidin gibi spesifik bir molekülün bağlanıp DNA fragmantasyonlarının uçlarında çözünmeyen renkli bir substrat oluşumunun gerçekleşmesiyle apoptotik hücre tanımlanmaktadır^{185,186}. Son dönemde *in situ* olarak apoptozisin tespit edilmesinde, bağlanma aşamasında hata oluşabildiği belirtilen avidin/biotin sistemi yerine aynı sensitiviteyi gösteren digoksinin/anti-digoksinin sistemi kullanılabilmektedir¹⁸⁷.

Son dönemde kullanılan önemli başka bir yöntem ise Anneksin-V boyası uygulamasıdır. Bu boya sadece apoptotik hücrelerde bulunan ve hücre duvarının dış yüzeyinde yer alan fosfatidil serin varlığını göstermektedir^{188,189}.

Apoptozis mekanizmasının anlaşılması, henüz nedenleri ve biyolojisi tam olarak anlaşılamamış pulpa ve periradiküler hastalıkların tedavisi için yol gösterici olabilmesi ve ağız hastalıklarıyla ilişkisinin kavranarak yeni ilaçların geliştirebilmesi açısından önem taşımaktadır. Apoptozisi indükleyen ya da inhibe eden klinik materyallerin ve ilaçların seçilebilmesiyle yeni tedavi yöntemleri ortaya çıkabileceği gibi, bu mekanizmayı kontrol ederek tedavilerimizi istediğimiz yönde ilerletebilmemiz mümkün olabilecektir. Bunların ötesinde apoptotik mekanizmanın odontogenez aşamalarındaki yerinin kavranabilmesi, periodontal ve pulpa doku homeostazındaki yerinin anlaşılabilmesi diş yapısının yaşam döngüsüne ışık tutarak biyolojik mekanizmaların açıklanmasına yardımcı olabilecektir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırmada yer alan pulpa dokusu örneklerinde, apoptotik hücrelerin saptanmasında *in situ* hibridizasyon tekniği ile TUNEL yöntemi uygulanırken, apoptotik morfolojik değerlendirme transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak yapıldı.

Farklı rezorpsiyon evrelerindeki pulpa bağ dokusunda apoptotik fibroblastları değerlendirmek amacıyla başlangıç ve ilerlemiş düzeyde rezorpsiyon gösteren süt dişi pulpa dokusu örneklerinin yanı sıra, süt dişlerinde rezorpsiyonun başlamadığı dönemdeki pulpa dokusunun histofizyolojik yapısının genç daimi dişlerin pulpa yapısına benzer olduğu bildirildiğinden^{32,190}, çalışma gruplarına genç daimi diş pulpa dokusu örnekleri de dahil edildi.

Çalışma gruplarında, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği'ne başvuran, yaşları 7-12 arasında olan 46 çocuk hastadan, ortodontik ve protetik amaçlı çekilen toplam 34 adet çürüksüz süt kanin ve süt I.molar diş ile Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı tarafından ortodontik amaçlı çekim endikasyonu verilen ve apeks oluşumu tamamlanmak üzere olan 12 adet çürüksüz 1. premolar diştten elde edilen pulpa dokusu örnekleri yer aldı.

TUNEL yöntemi ile değerlendirilen çalışma gruplarında yer alan pulpa dokusu örnekleri, başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu (rezorpsiyon kök uzunluğunun 0-1/3 seviyesinde) olan 14 adet ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu (rezorpsiyon kök

uzunluğunun 1/3-2/3 seviyesinde) olan 16 adet süt dişi ile 10 adet genç daimi dişten elde edildi.

Araştırmanın transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirme aşamasında ise, 2 adet başlangıç ve 2 adet ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu olan süt dişi ile 2 adet genç daimi dişe ait pulpa dokusu örnekleri yer aldı.

Çocukların anamnezinde, sistemik ve alerjik bir problem bulunmamasına, sürekli kullandıkları bir ilaç olmamasına dikkat edildi. Alınan anamnezi takiben, dişlerin inspeksiyon, palpasyon, perküsyon ve elektrikli pulpa testi gibi rutin tanı testleri ile muayeneleri yapıldı ve periapikal radyografileri alındı.

3.1. TUNEL Yöntemi ile Değerlendirme

3.1.1. TUNEL Yöntemi İçin Örneklerin Hazırlanması

Kriterlere uygun süt ve daimi dişler bir iyod solusyonu olan Polyod (%10 Polyvinylpyrrolidon iyod kompleksi) ile silinerek lokal anestezi altında çekildi. Dişlerin çekiminden hemen sonra kök yüzeyindeki yumuşak dokular steril gazlı bez ve kretuar ile uzaklaştırıldı. Süt dişlerinin çekim işlemini takiben kök boyları ölçülerek fizyolojik kök rezorpsiyon dereceleri tespit edildi. Süt dişlerinde kök boyları değerlendirilirken mine-sement sınırı ve kök rezorbsiyonunun en fazla olduğu bölge arasındaki mesafe, ortodontik teşhis cetveli (Dentaurum 029-301) ile ölçülerek tespit edildi (Resim 1). Ölçümlerden sağlanan kök boyu değerleri, Kramer ve Ireland'ın¹⁹¹ süt dişlerinin anatomik ve morfolojik özelliklerini inceleyerek

oluşturdukları, kök uzunluğu ile ilgili tabloları kriter alınarak desteklendi (Tablo II).



Resim 1. Çekilen süt dişinin kök boyunun ölçülmesi.

Tablo II. Kramer ve Ireland¹⁹¹'in süt dişi kök uzunluğu tabloları.

A. Ön grup süt dişlerinin kök uzunlukları.

	KÖK UZUNLUKLARI	
	Üst Çene	Alt Çene
Santral Dişler	10.32 mm	8.86 mm
Lateral Dişler	10.20 mm	9.90 mm
Kanin Dişleri	12.84 mm	10.83 mm

B. Alt süt molar dişlerinin kök uzunlukları.

	KÖK UZUNLUKLARI	
	Alt Çene	
	Mezial Kök	Distal Kök
I. Süt Molar Dişler	10.50 mm	8.94 mm
II.SütMolar Dişler	11.37 mm	10.55 mm

C. Üst süt molar dişlerinin kök uzunlukları.

	KÖK UZUNLUKLARI		
	Üst Çene		
	Meziobukkal Kök	DistobukkalKök	Lingual Kök
I. Süt Molar Dişler	10.76 mm	9.71 mm	10.74 mm
II.Süt Molar Dişler	8.83 mm	8.16 mm	7.68 mm

Takiben dişlerin mezial ve distal yüzeyleri boyunca aeratör yardımıyla alev uçlu frez ile iki longitudinal yiv açılarak yivler okluzal ve apikal bölgede birleştirildi. Bu yive yerleştirilen steril bir cerrahi elevatör yardımıyla ikiye ayrılan dişin pulpa dokusu steril ve keskin bir ekskavatör yardımıyla kron ve kök pulpası bir bütün halinde olacak şekilde dikkatlice çıkarıldı (Resim 2). Pulpa dokusu %10 formol solusyonu içinde 4°C’de 24 saat fikse edildikten sonra parafine gömüldü.



Resim 2. Elde edilen pulpa dokusu örneği.

Kök boyu ölçümleri sonucunda fizyolojik kök rezorpsiyon dereceleri baz alınarak kök rezorbsiyonunun başlangıç düzeyinde (rezorpsiyon kök uzunluğunun 0-1/3 seviyesinde) veya kök rezorbsiyonunun ilerlemiş düzeyde (rezorpsiyon kök uzunluğunun 1/3-2/3 seviyesinde) olduğu saptanan süt dişlerinden ve genç daimi dişlerden üç farklı çalışma grubu oluşturuldu:

Grup I'de başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren 14 adet çürüksüz süt dişi (süt kanin ve süt I.molar),

Grup II'de ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren 16 adet çürüksüz süt dişi (süt kanin ve süt I.molar),

Grup III'te apeksi tamamlanmak üzere olan 10 adet çürüksüz genç daimi diş (1.premolar) yer aldı.

3.1.2. TUNEL Yöntemi İşlemleri

Araştırmada yer alan ilgili pulpa dokusu örneklerinin TUNEL yöntemi ile *in situ* hibridizasyon tekniği kullanılarak değerlendirilmesi Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Apoptotik hücrelerin, fragmente olan DNA'ları baz alınarak saptanmasında TUNEL yöntemi ve *in situ* hibridizasyon tekniği ile ApopTag Plus Peroksidaz In Situ Apoptozis Detection Kit (Serologicals Corp, USA cat#S7101, lot#3G036) (Resim3) kullanıldı.



Resim 3. *In situ* hibridizasyon tekniği için kullanılan ApopTag Plus Peroksidaz In Situ Apoptozis Detection Kit (Serologicals Corp, USA cat#S7101, lot#3G036).

1. Formol ile tespit edilip parafin bloklara gömülmüş tüm çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinden mikrotom (Leica SM

2000 R, Germany) ile 5µ kalınlığında kesitler elde edildi. Bu kesitler ApopTag kit değerlendirmesi için adeziv cama alındı ve deparafinizasyon işlemi yapılmak üzere 56°C’da 14-16 saat etüvde bekletildi.

2. Daha sonra sırasıyla 15 dakika ksilol ve 10 dakika saf alkolde bekletilerek kesitlerin deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemleri tamamlandı.

3. Kesitler fosfat tampon solusyonu (pH: 7,4) ile yıkandı. Daha sonra fosfat tampon solusyonu içerisinde dile edilen 20 µg/ml proteinaz K ile oda ısısında 20 dakika inkübe edildi.

4. İşlem sonrası distile su ile yıkanan kesitler endojenöz peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla taze hazırlanmış %3 hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika bekletildi.

5. Bu işlemi takiben kesitler “equilibration” tampon ile muamele edildikten sonra DNA fragmanlarının işaretlenmesi amacıyla TUNEL reaksiyonu, terminal deoksinükleotidil transferaz ile 37 °C’de 90 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi.

6. Kesitler yıkandı ve enzimle birleşmemiş nükleotidler uzaklaştırıldı.

7. Takiben antidigoksinin peroksidaz konjugat ile 50 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Daha sonra kesitler fosfat tampon solusyonu ile yıkandı ve taze hazırlanan % 0,005 3,3’-diaminobenzidin ile işaretlenen DNA fragmanlarının görüntülenmesi amacıyla, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.

9. Zemin boyaması için %0,5’lik metil green ile 10 dakika işleme tabi tutulan kesitler distile su ile yıkandı ve % 100 n-bütanol ile dehidrate edildikten sonra kapatma balzamu uygulanarak lamel ile kapatıldı.

Kontrol dokusu olarak; ApopTag kit içerisinde kontrol doku olarak bulunan kemirgen (rodent) meme dokusu kullanıldı.

3.1.3. Kesitlerin Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarına ait TUNEL yöntemi ile boyanmış pulpa dokusu kesitleri ışık mikroskobu ile (Nikon Eclipse E600, Japan) değerlendirildi ve fotoğraflandı (Nikon Coolpix 5000, Japan). Pulpa dokusu örneklerinde açık renkteki metil green'in oluşturduğu zemin üzerindeki koyu kahverengi nükleer boyanma gösteren pulpa fibroblast hücreleri ApopTag pozitif olarak değerlendirildi. Sayım işlemi, X400 büyütmede 5 farklı mikroskobik alan içine düşen pozitif boyanma gösteren hücreler ve boyanma olmayan hücrelerin okuler grid (10X10mm) yardımıyla sayılmasıyla gerçekleştirildi. Apoptag pozitif hücrelerin toplam hücrelere oranı hesaplanarak, gruplara ait apoptotik indeks^{192,193} (AI) değerleri elde edildi.

3.1.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma gruplarına ait apoptotik indeks verileri homojen dağılım gösterdi ve tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Değerlendirme

3.2.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu İçin Örneklerin Hazırlanması

Prosedürlere uygun olarak ilgili dişlerin çekimini takiben, süt dişlerinin rezorpsiyon derecelerinin belirlenmesinde ve pulpa dokularının çıkartılmasında önceki basamaklar aynen uygulandı. Kron ve kök pulpa

dokularını ayrı ayrı değerlendirmek amacıyla pulpa dokuları çıkartılırken, bisturi yardımı ile mine-sement seviyesinden referans alınarak kron ve kök olmak üzere iki parçaya bölündü.

3.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskop Doku Takibi İşlemleri

Araştırmanın transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirilen ilgili pulpa dokusu örneklerinin doku takibi işlemleri ve incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dallarına ait Elektron Mikroskobu Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

1. Çıkartılan pulpa dokuları primer fiksasyon için %2.5'lik gluteraldehit içinde 4°C'de 24 saat bekletildi.

2. Dokular 0.1M fosfat tampon solusyonuyla yıkandıktan sonra sekonder fiksasyon işlemi %1'lik osmium tetraoksit ile 60-90 dakikada oda ısısında karanlık ortamda gerçekleştirildi.

3. 0.1M fosfat tampon solusyonuyla yıkama işlemi tekrarlandı.

4. Dokularda birer kez sırasıyla %50-%60-%70-%80-%90 etil alkol ile 10 dakika, daha sonra %96 etil alkol ile ikişer kez 15 dakika ve %100 etil alkol ile ikişer kez 20 dakikalık sürelerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi.

5. Dehidratasyon işlemi takiben doku örnekleri ikişer kez 15 dakika propilen oksit ile muamele edildi.

6. Sudan kurtulan doku parçaları bloklanmadan önce dörtlü plastik karışımda gömme materyaline alıştırıldı. Alıştırma yaparken dokular 1 saat 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, 1 saat 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, bir gece 1

ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımında, 2 saat dörtlü plastik karışımında tutularak infiltrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Takiben örnekler dörtlü plastik karışımla bloklandıktan sonra etüvde 60°C'de 48 saat polimerize edildi.

7. Oluşturulan bloklardan piramidom (LKB 11800, Germany) ile alınan yarı ince kesitler %1'lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi-Azur II karışımında boyandı.

8. Ultramikrotom (Leica Ultracut-R, Germany) ile cam bıçak kullanılarak 70 nm kalınlığında elde edilen ince kesitler bakır gridler üzerine alındı.

9. Alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ağır metal boyaları ile kontrastlandı.

3.2.3. Kesitlerin İncelenmesi

Yarı ince kesitler ışık mikroskopunda (Leica DMR, Germany) incelendi. Uygun alanlar belirlendikten sonra ultramikrotom ile 70 nm kalınlığında alınan kesitlerde kron ve kök pulpa bağ dokusundaki hücreler ve odontoblast tabakası 80 KV'de transmisyon elektron mikroskobu (JEOL-JEM 1011, Japan) (Resim 4) ile incelenerek fotoğraflandı.



Resim 4. JEOL-JEM 1011 transmisyon elektron mikroskobu.

4. BULGULAR

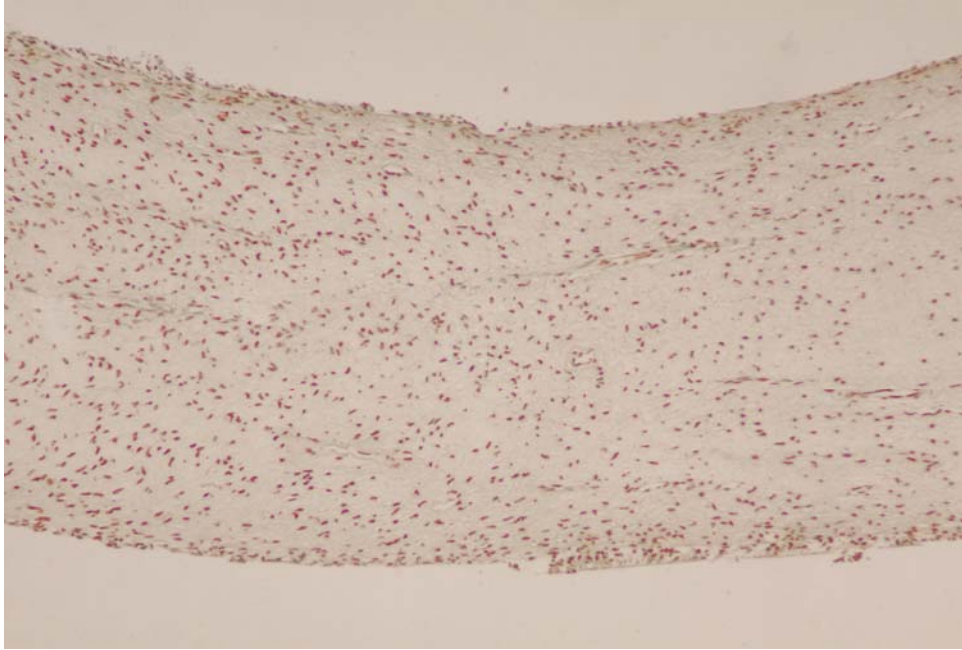
4.1. TUNEL Yöntemi Bulguları

Çalışma grupları içinde yer alan ve 16 adet süt dişi pulpa dokusu örneğinden oluşan ilerlemiş düzeyde rezorpsiyon gösteren gruba ait 5 adet pulpa dokusu örneği, TUNEL yöntemi sırasında uygulanan işlemlere bağlı olarak doku kayıplarının oluşması ve teknik aksaklıklar gibi nedenlerle değerlendirme dışı bırakıldı.

Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu, ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi ve genç daimi diş gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinde apoptotik hücrelerin varlığının araştırıldığı bu çalışmada, açık renkteki metil green ile boyama sonucunda oluşan zemin üzerindeki koyu kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler ApopTag pozitif olarak değerlendirildi. Genel olarak, örneklerde hücrelerdeki boyanmanın koronal ve radiküler pulpada benzer olduğu, hemen hemen homojen bir dağılım sergilediği izlendi. Aynı şekilde santral ve periferel pulpa hücrelerinde de boyanma farklılığı olmadığı gözlemlendi (Resim 5a, 5b).

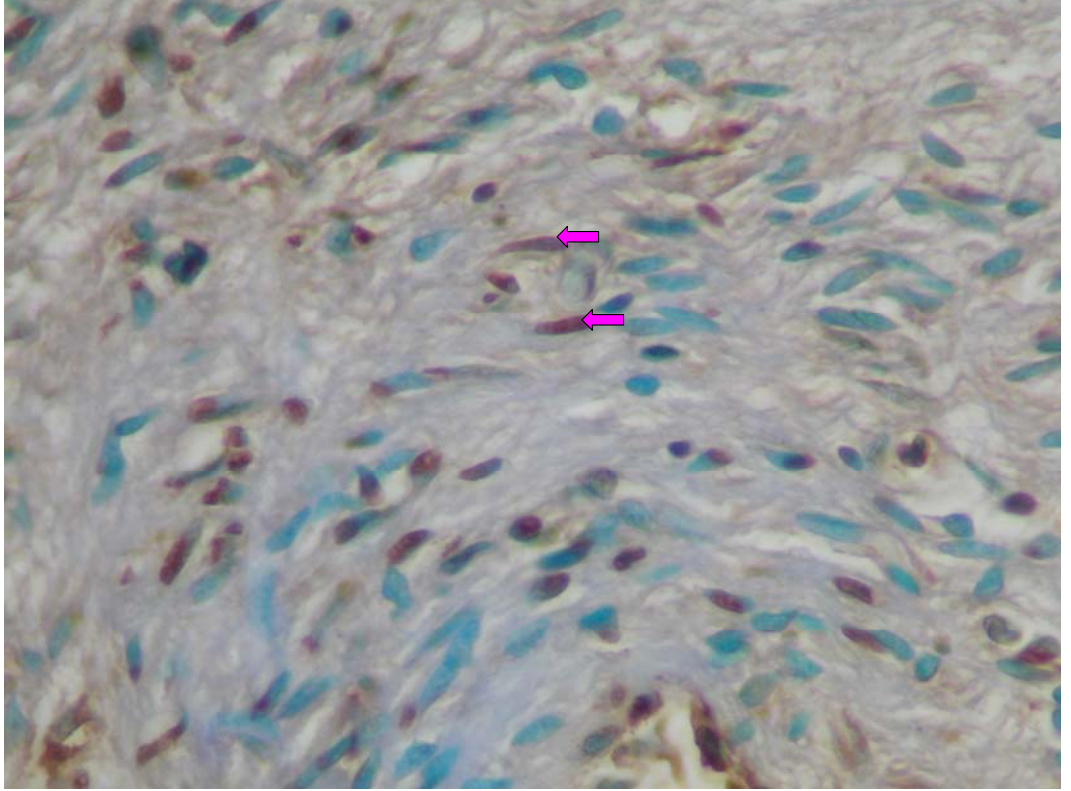


Resim 5a. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde TUNEL yöntemi ile yapılan boyama sonucunda pulpada yer alan hücrelerde homojene yakın dağılım gösteren boyanma (TUNEL yöntemi, X40).

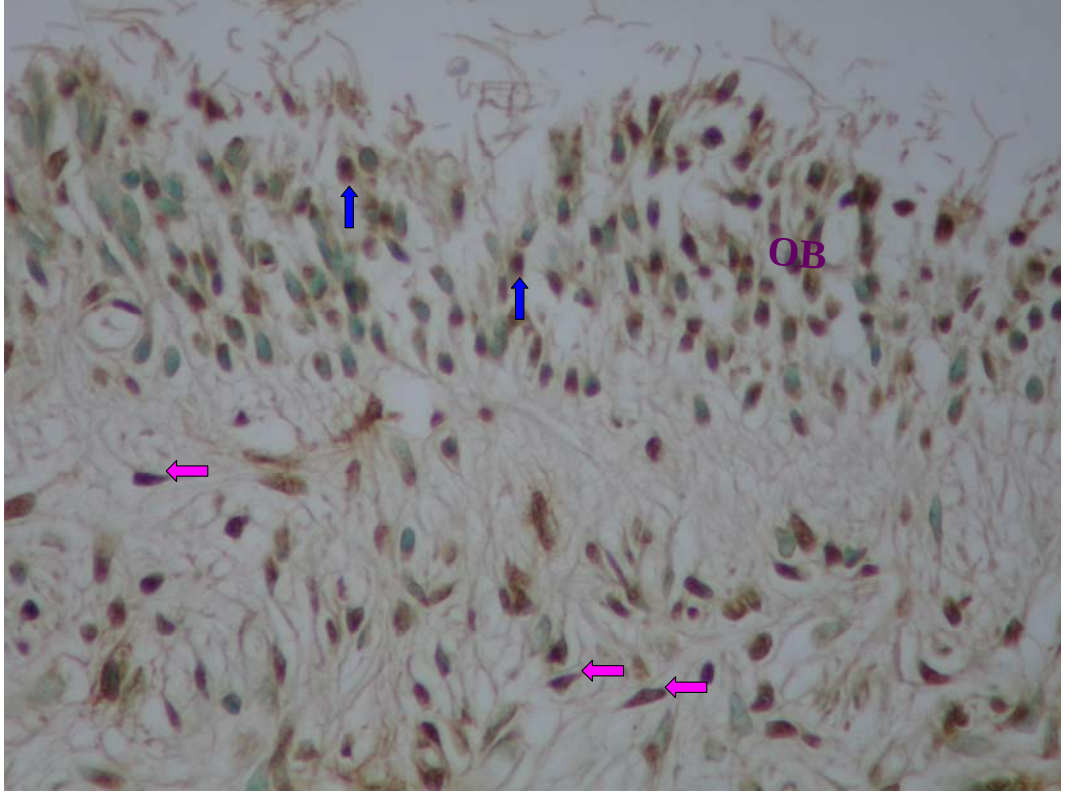


Resim 5b. Aynı örnekte, santral ve periferel pulpada yer alan hücrelerde görülen homojene yakın boyanma (TUNEL yöntemi, X100).

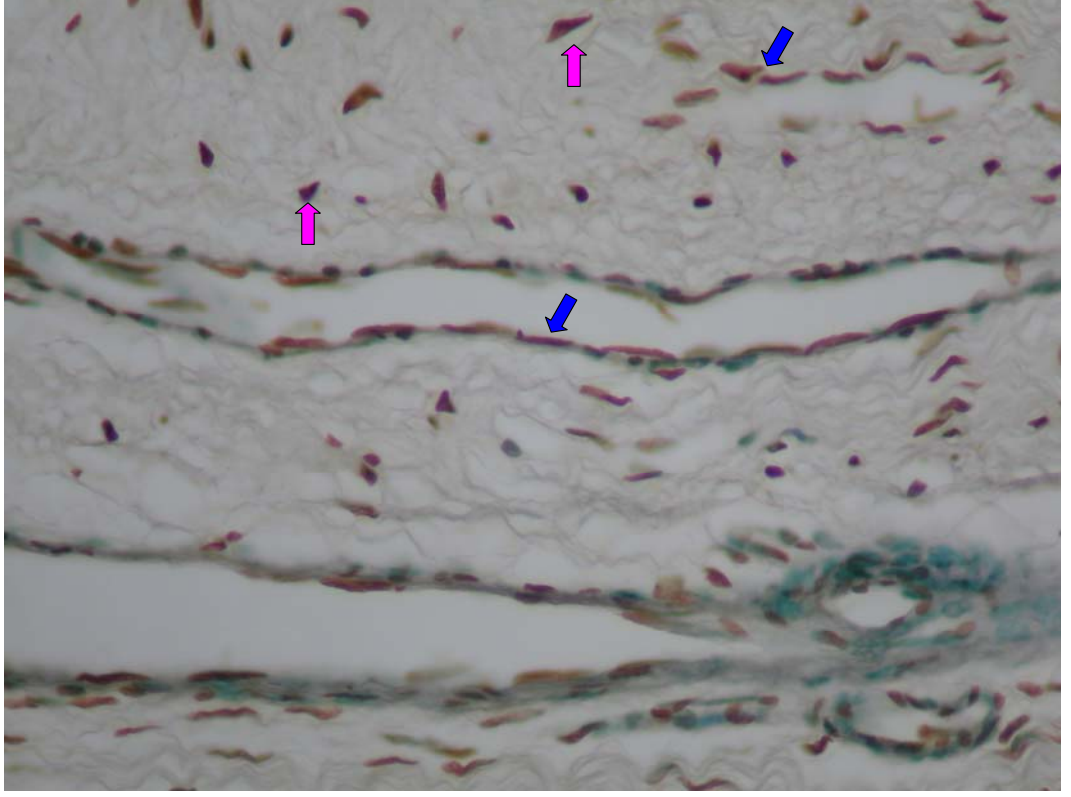
Pulpa bağ dokusunda TUNEL yöntemi ile yapılan boyama sonucunda apoptozis açısından esas olarak değerdendirdiğimiz hücreler, pulpa dokusunun temel hücreleri olan fibroblastlardır (Resim 6, 7, 8).



Resim 6. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast hücreleri () (TUNEL yöntemi, X600).

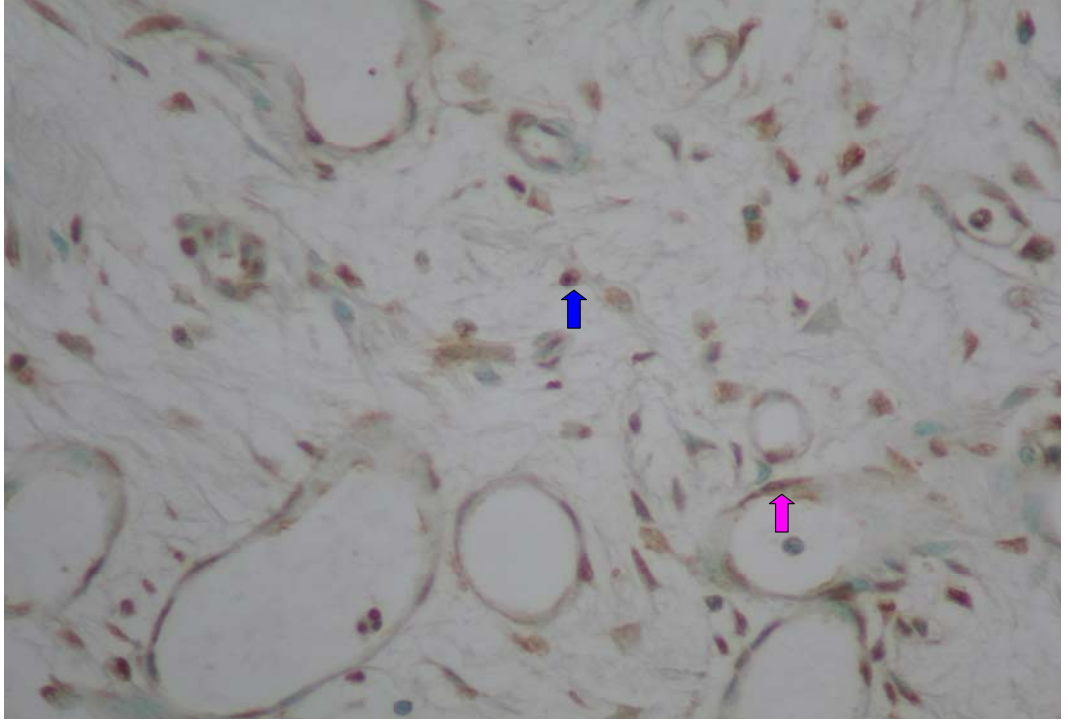


Resim 7. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast () ve orta derecede ApopTag pozitiflik gözlenen odontoblast (QB) tabakasında ApopTag pozitif odontoblast hücreleri () (TUNEL yöntemi, X400).

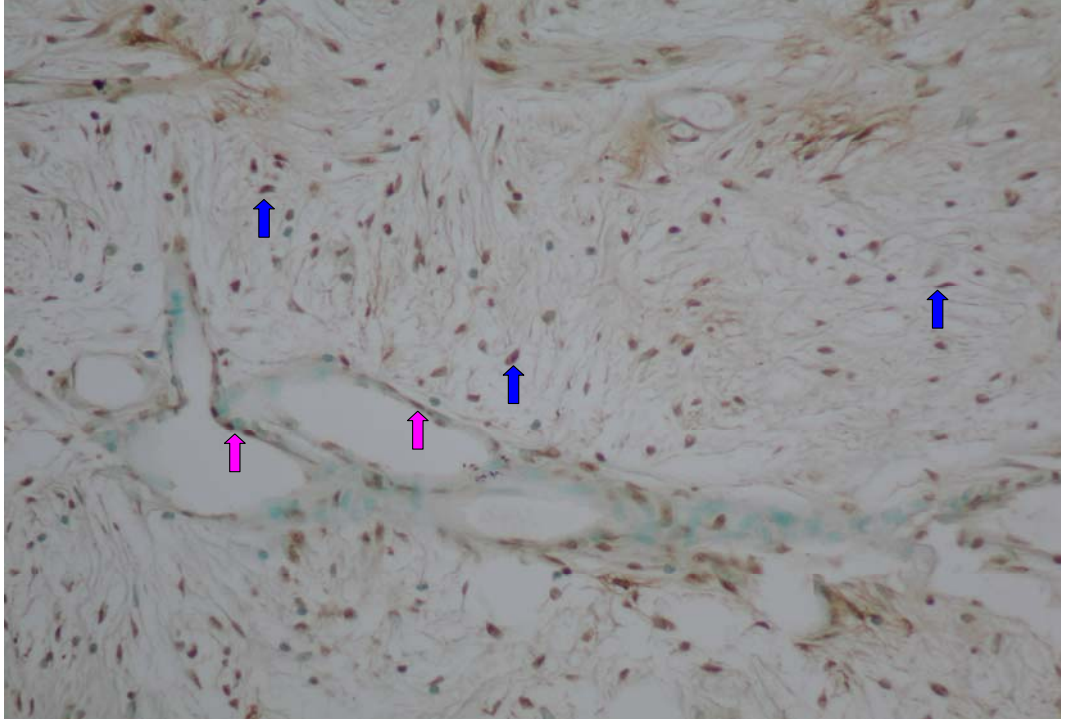


Resim 8. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif fibroblast hücreleri (↑) ve perivasküler alanda izlenen ApopTag pozitif endotelial hücreler (↓) (TUNEL yöntemi, X400).

Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait 4 adet ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneklerinden 5 adet, ayrıca genç daimi diş pulpa dokusu örneklerinden 4 adet kesitte vasküler endotelial hücrelerde de apoptozise rastlandı (Resim 8, 9, 10).



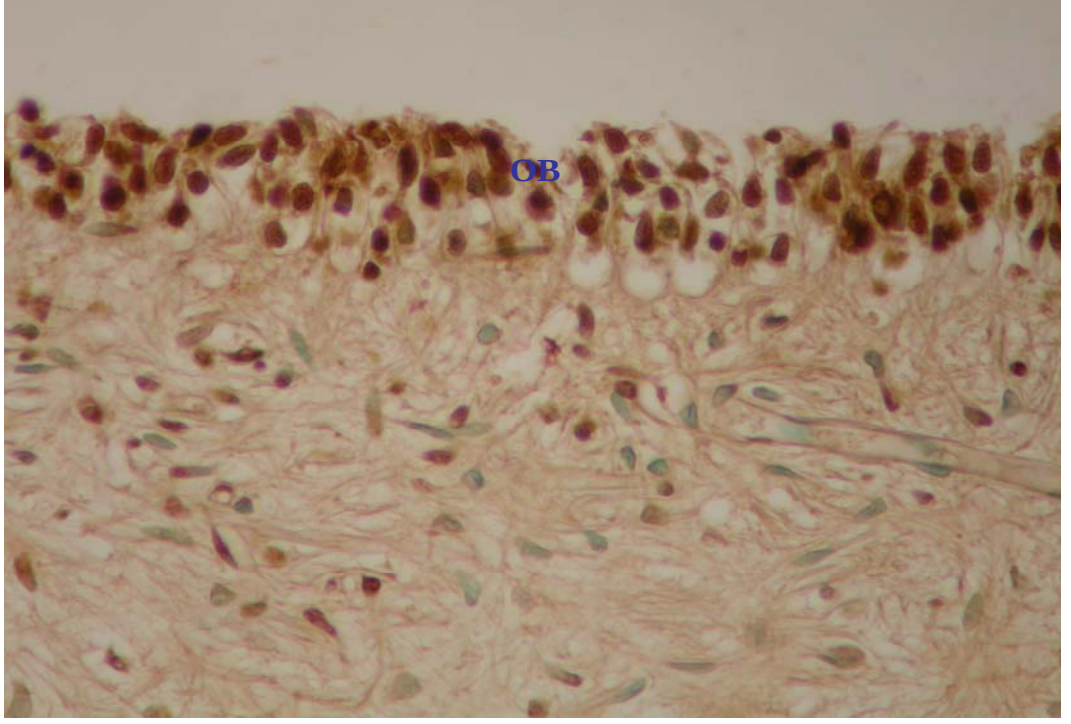
Resim 9. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, ApopTag pozitif vasküler endotelial () ve mononükleer inflamatuvar hücreler () (TUNEL yöntemi, X400).



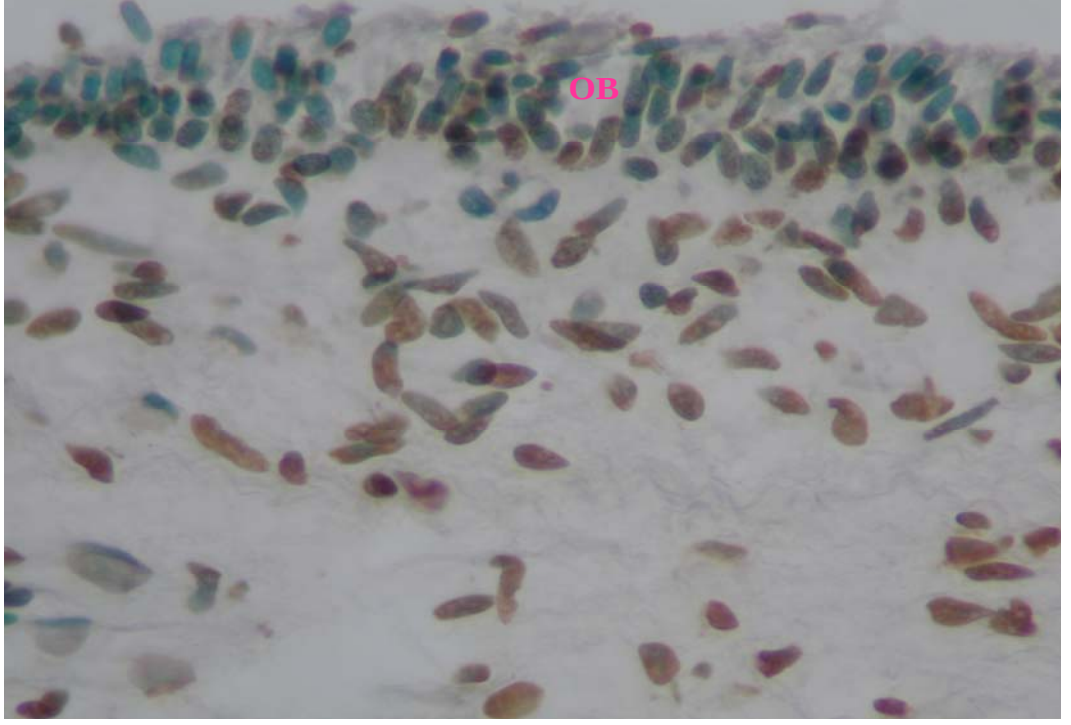
Resim 10. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, bağ dokusu genel görünümü, ApopTag pozitif fibroblast (↑) ve vasküler endotelial hücreler (↑) (TUNEL yöntemi, X200).

Çalışmada esas olarak incelenen hücreler fibroblastlar olmakla birlikte, örnekler sadece pulpa dokusu içerdiğinden diş sert dokusu içeren kesitlerle kıyaslandığında odontoblastik tabaka kron ve kök pulpası boyunca tam olarak mevcut olmasa da pulpa bağ dokusu ile devamlılık gösteren ve en azından 1 mikroskop alanını (X200) kaplayacak şekilde bulunan odontoblastik tabakanın izlendiği kesitler değerlendirme kapsamına alındı. Pulpa dokusu örneklerinde, başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait 9 kesitte (5 adet zayıf, 1 adet orta düzeyde, 3 adet güçlü ApopTag pozitifliği), ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait 6 kesitte (4 adet zayıf, 2 adet orta düzeyde ApopTag pozitifliği) ve genç daimi diş pulpa dokusu örnekleri içeren gruba ait 5 kesitte (4 adet zayıf, 1 adet orta düzeyde

ApopTag pozitifliği) odontoblastik tabakada değişen düzeylerde ApopTag pozitif odontoblast hücreleri gözlemlendi (Resim 7, 11, 12).

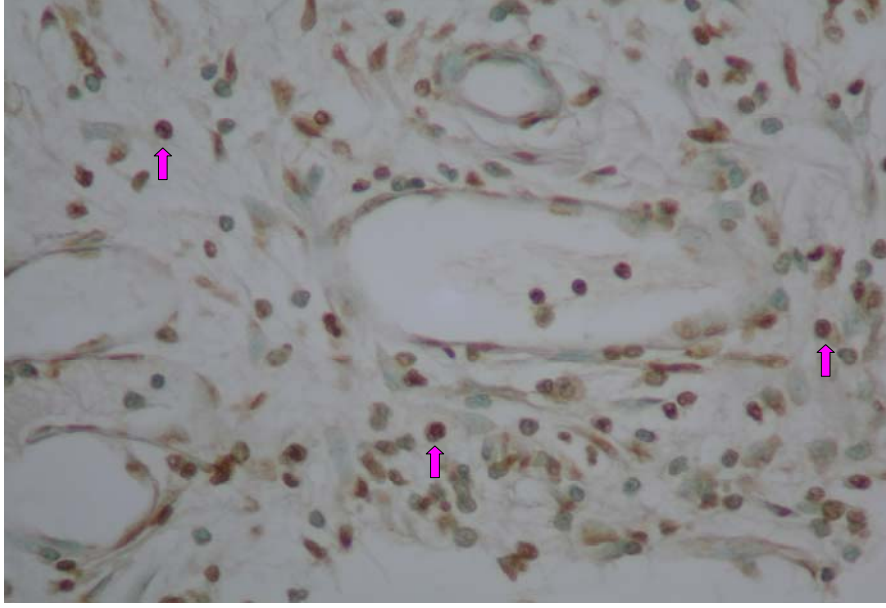


Resim 11. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, odontoblast (OB) tabakasında gözlenen güçlü ve diffüz ApopTag pozitifliği (TUNEL yöntemi, X400).



Resim 12. Genç daimi diş grubuna ait pulpa dokusu örneğinde, odontoblast (OB) tabakasında gözlenen zayıf ve fokal ApopTag pozitifliği (TUNEL yöntemi, X600).

Çalışma gruplarından başlangıç düzeyinde rezorpsiyon aşamasındaki örneklerden 3 kesitte, ilerlemiş rezorpsiyon aşamasındaki örneklerden 4 kesitte ve genç daimi diş pulpa dokusu örneklerinden oluşan gruba ait 1 kesitte, damar içerisinde ya da çevresinde minimal/orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücreler gözlemlendi. Bunun yanı sıra ilgili kesitlerin genç daimi diş pulpa dokusu örneklerinden oluşan gruba ait 1 örnekte, başlangıç düzeyinde rezorpsiyon gösteren 3 örnekte ve ilerlemiş düzeyde rezorpsiyon gösteren 1 örnekte inflamatuvar hücrelerde de apoptozis tespit edildi (Resim 9, 13).



Resim 13. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren gruba ait süt dişi pulpa dokusu örneğinde, perivasküler alanda orta düzeyde gözlenen inflamatuvar hücreler ve bu hücrelerde görülen ApopTag pozitiflik (TUNEL yöntemi, X400).

Çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinde fibroblastlar baz alınarak hesaplanan apoptotik indeks (AI) değerleri Tablo III'te sunulmuştur.

Tablo III. Çalışma gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.

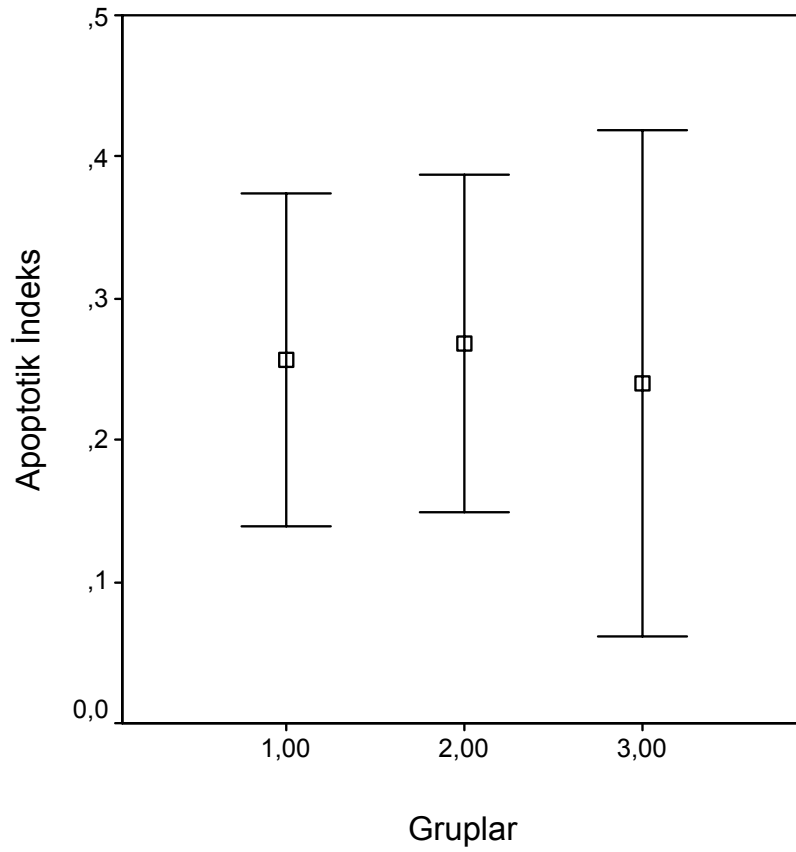
GRUPLAR		
Grup I (Rezorpsiyon kök uzunluğunun 0-1/3 seviyesinde) (n=14)	Grup II (Rezorpsiyon kök uzunluğunun 1/3-2/3 seviyesinde) (n=11)	Grup III (Genç daimi diş) (n=10)
0,0534	0,0366	0,1231
0,1477	0,2372	0,1876
0,4288	0,2629	0,0594
0,3201	0,3767	0,3099
0,4207	0,2958	0,0720
0,2449	0,1802	0,1711
0,3697	0,1703	0,0886
0,3338	0,4502	0,4982
0,2231	0,4230	0,3351
0,2816	0,2262	0,5581
0,2609	0,2903	
0,2260		
0,2386		
0,0465		

Çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinden elde edilen ortalama AI değerleri Tablo IV’te ve Grafik 1’de sunulmuştur.

Tablo IV. Çalışma gruplarına ait ortalama AI değerleri ve diğer istatistiksel veriler.

Gruplar	n	Ort. AI Değeri	Min. AI Değeri	Maks. AI Değeri	Std. Sapma	Std. Hata
Grup I	14	0,2568	0,0465	0,4288	0,1176	0,0314
Grup II	11	0,2681	0,0366	0,4502	0,1199	0,0366
Grup III	10	0,2403	0,0594	0,5581	0,1784	0,0564

p>0.05



Grafik 1. Çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinin ortalama AI değerleri.

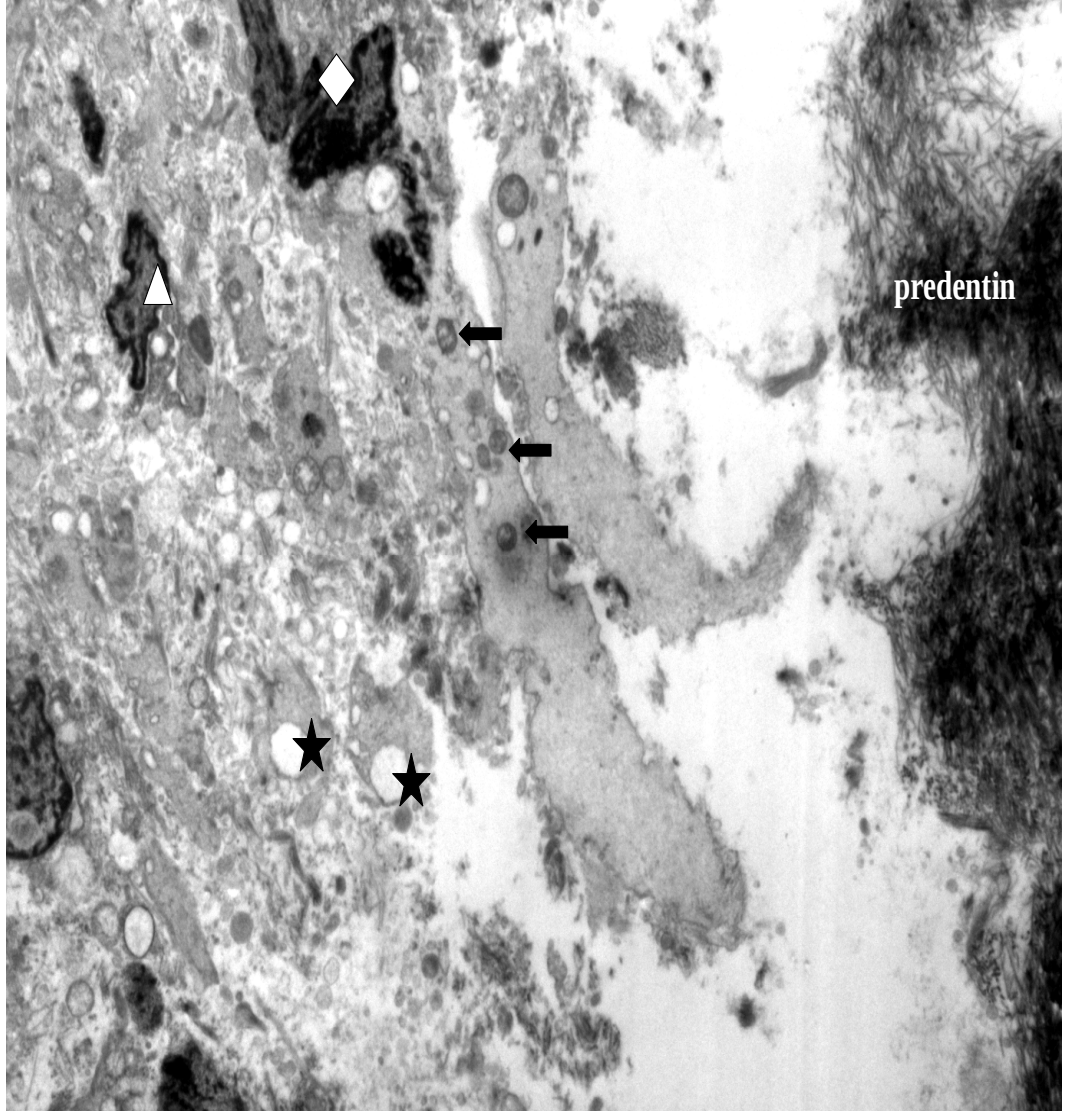
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, başlangıç düzeyinde ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi ile genç daimi diş gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinin ortalama Al değerlerinin birbirlerine çok yakın sonuçlar sergilediği tespit edildi. İlerlemiş düzeyde rezorpsiyon gösteren süt dişi grubuna ait pulpa dokusu örneklerinin ortalama Al değeri, diğer gruplara göre artış gösterse de, tüm gruplar birbiriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo IV, Grafik 1).

4.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu Bulguları

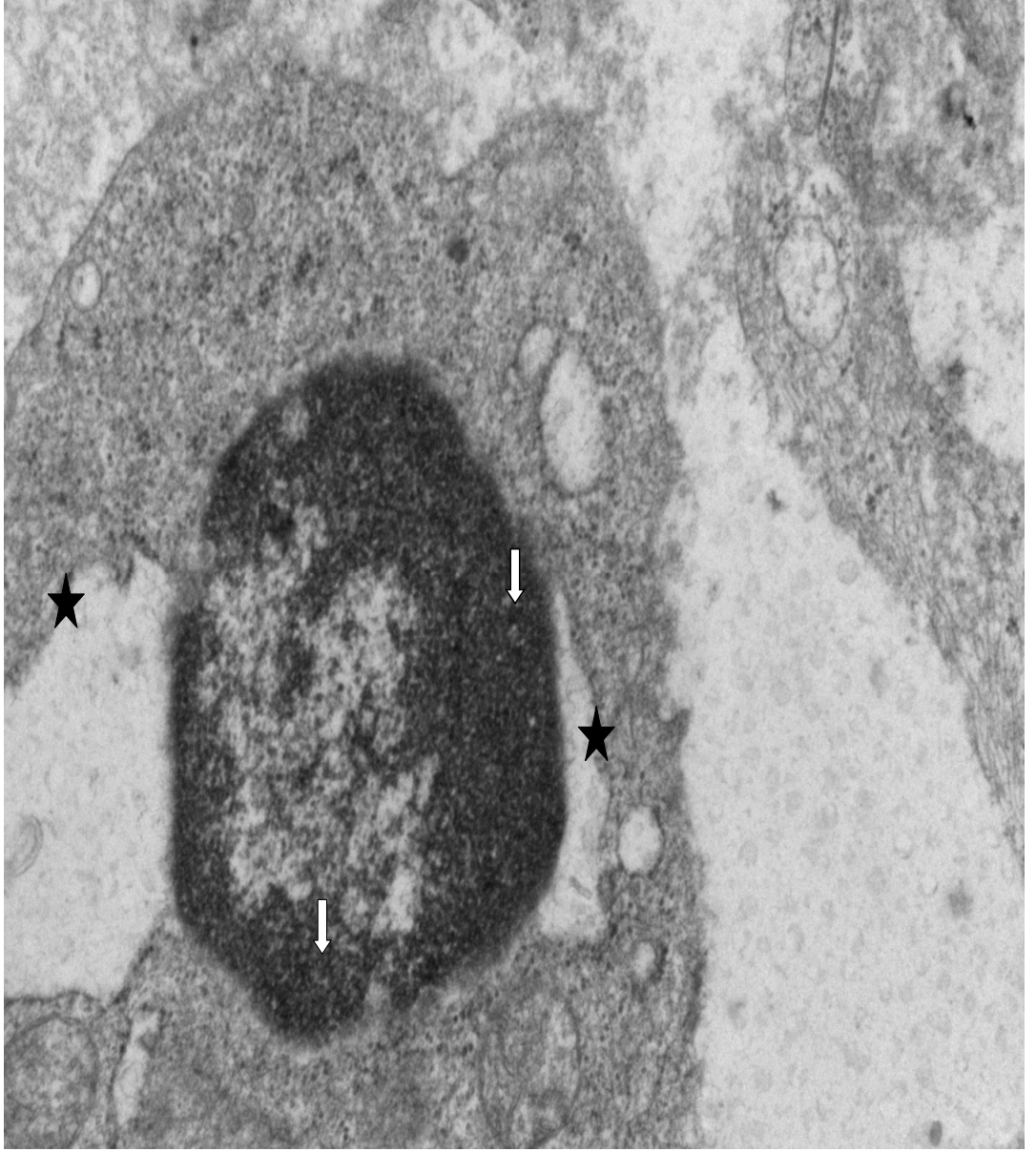
Transmisyon elektron mikroskobunda değerlendirilen başlangıç düzeyinde ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişleri ile genç daimi dişlere ait pulpa dokusu örneklerinde, apoptozisin farklı safhalarında olan apoptotik fibroblast ve odontoblast hücrelerinin varlığı tespit edildi (Resim 14 -19). Pulpa dokusu örneklerinde tespit edilen apoptotik hücrelerde karakteristik görünüm olan kromatin kondensasyonu izlenirken, bazı örneklerde apoptotik hücrelerde yer alan sağlıklı mitokondrilerin varlığı da saptandı (Resim 15, 17). Örneklerle ait kron ve kök pulpa dokuları arasında apoptotik hücre dağılımı açısından fark gözlenmedi. Değerlendirilen tüm pulpa dokusu örneklerinde apoptotik pulpa hücrelerinin varlığına az rastlandı. İlerlemiş düzeyde rezorpsiyon gösteren süt dişi pulpa dokusu örneğinde ise apoptotik cisimcik gözlemlendi (Resim 17).



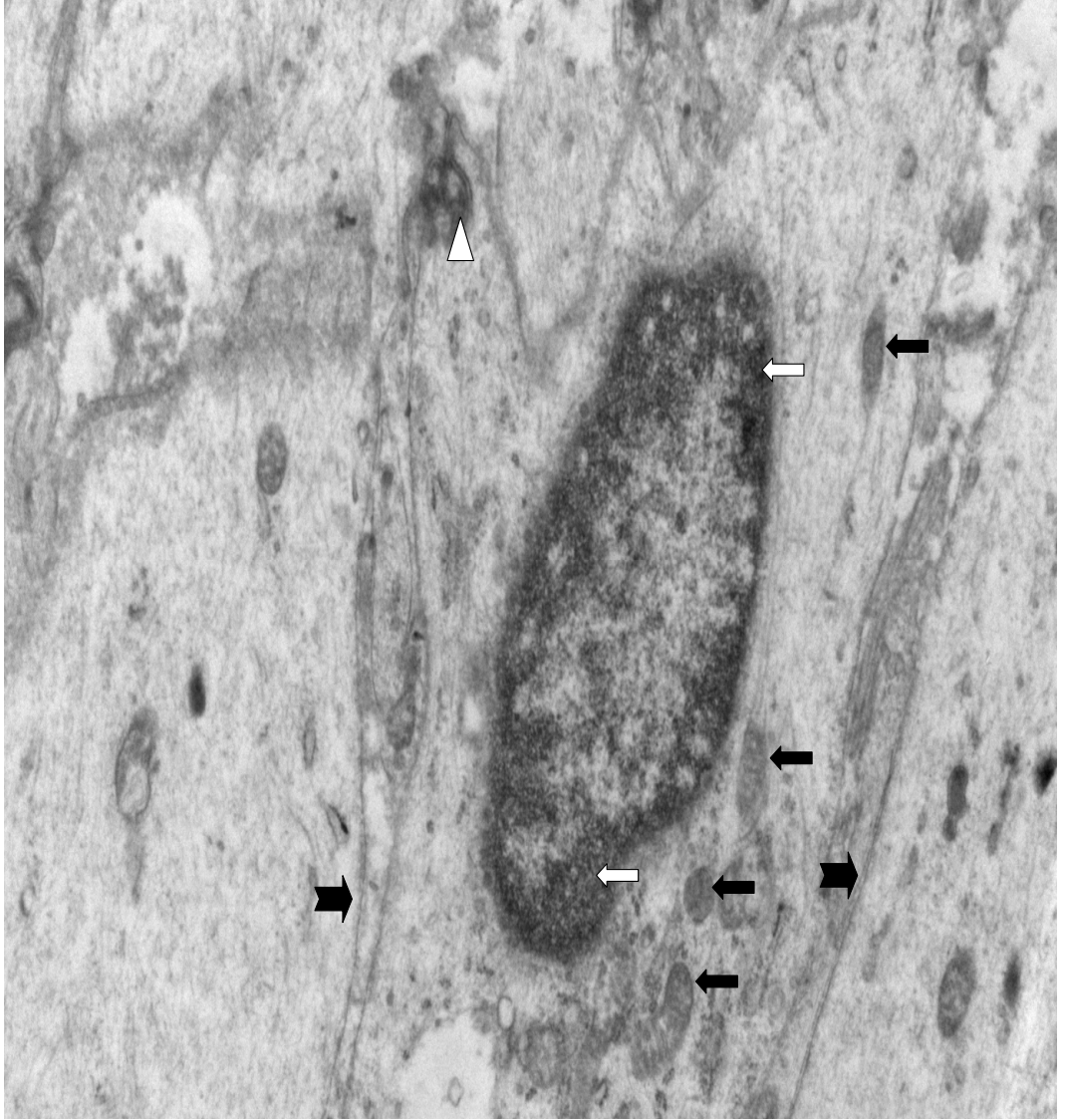
Resim 14. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, normal kollajen yapısı, başlangıç evresinde olan apoptotik fibroblast hücresinde izlenen perinükleer halo varlığı () ve sınırlı kromatin kondensasyonu () (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X10000).



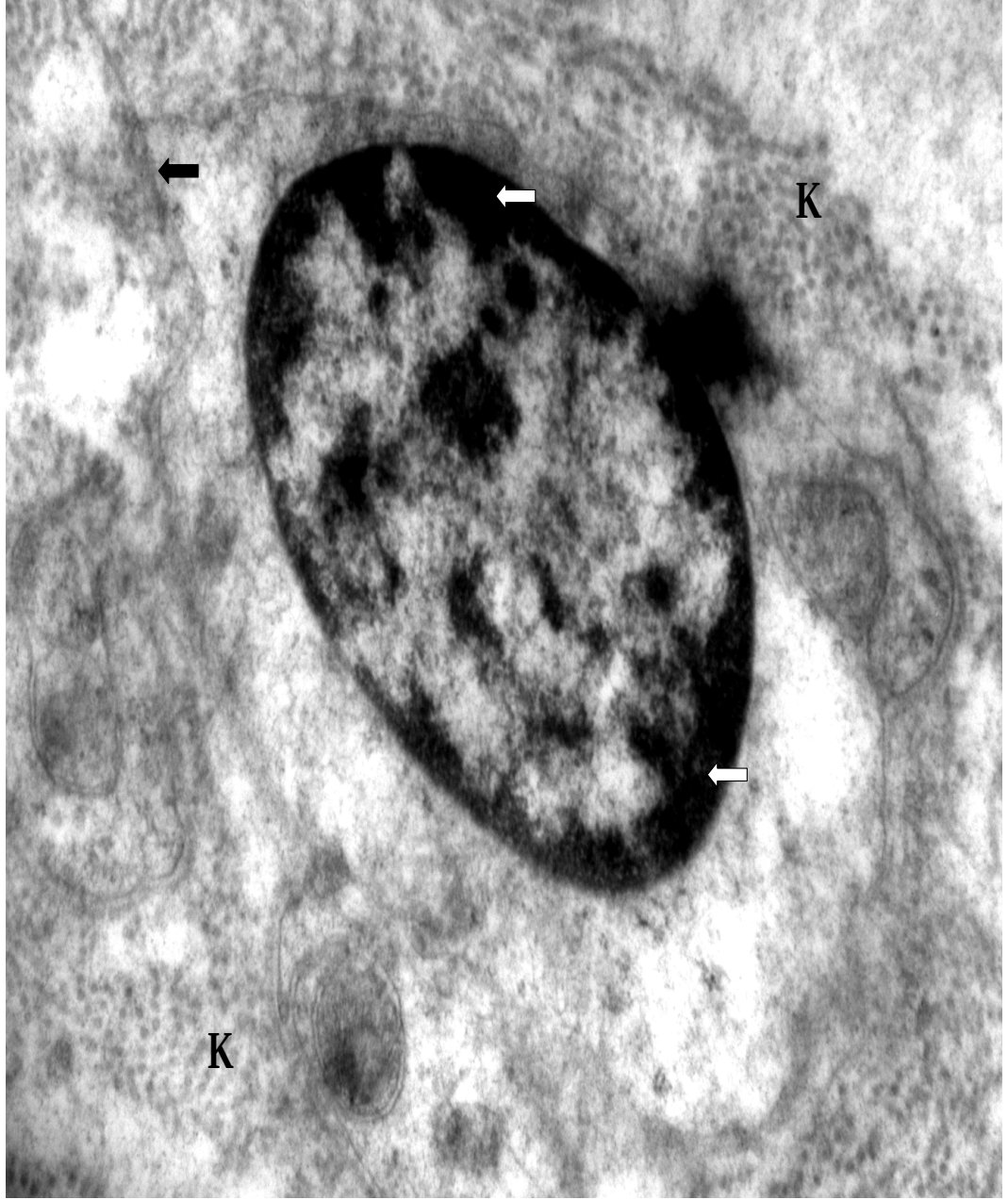
Resim 15. Başlangıç düzeyinde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kök pulpa dokusu örneğinde, hücre zarı ayırt edilemeyen ve hücreler arası bağlantıları izlenemeyen odontoblastlar. Başlangıç evresinde olan apoptotik odontoblast hücresinde sınırlı kromatin kondensasyonu (△) ve sitoplazmada izlenen vakuolizasyon (★). İleri evrede olan apoptotik odontoblast hücresinde kromatin kondensasyonu (◇) ve sitoplazmada izlenen sağlıklı mitokondriler (←) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X5000).



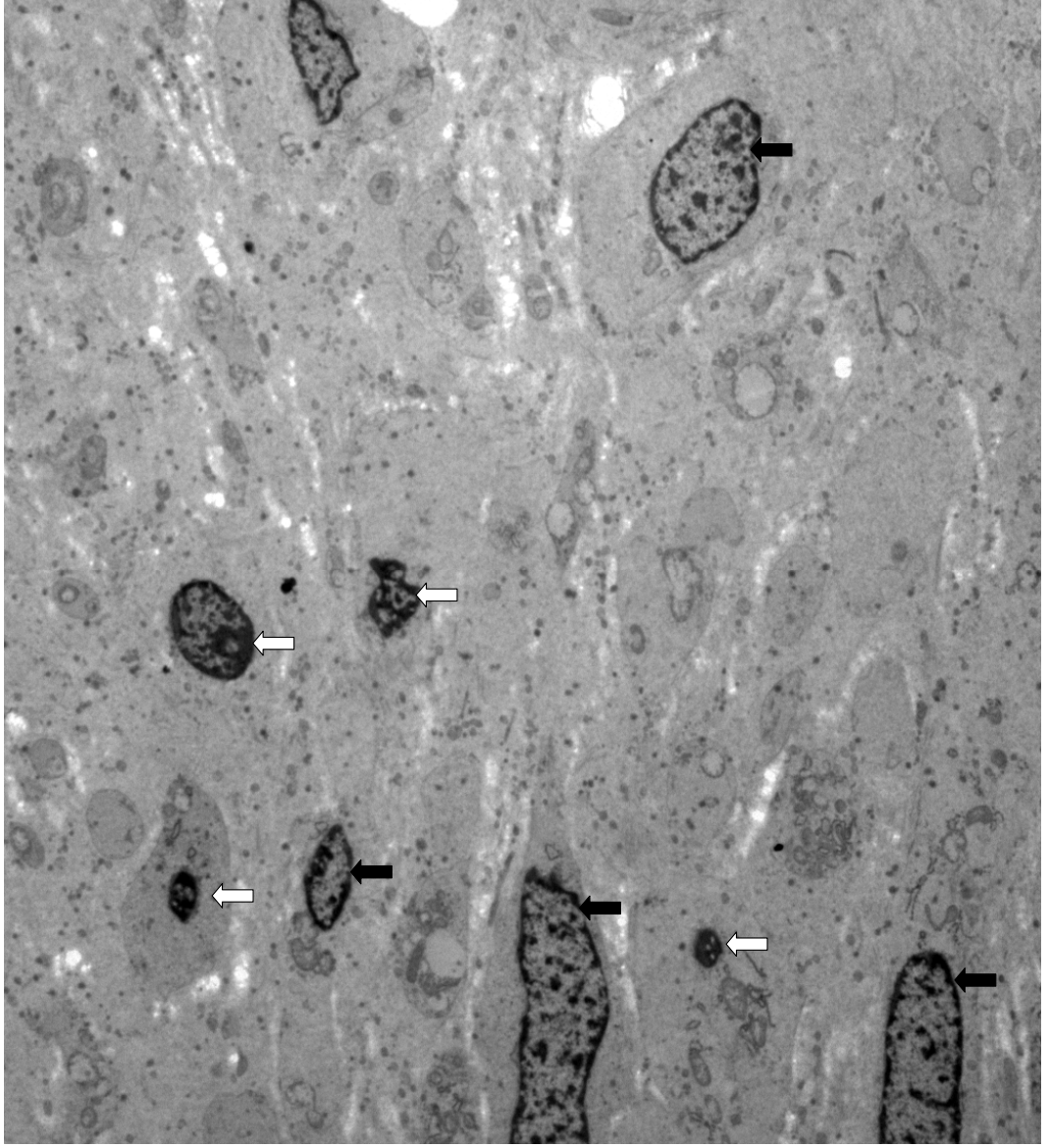
Resim 16. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, ileri evrede olan apoptotik fibroblast hücresinde genişlemiş perinükleer sisterna varlığı (★) ve tipik kromatin kondensasyonu (↓) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X30000).



Resim 17. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, hücre membranı (➡) izlenen başlangıç evresindeki apoptotik odontoblast hücresinde kromatin kondensasyonu varlığı (⇐), sitoplazmasında yer alan sağlıklı mitokondriler (←) ve dokuda izlenen apoptotik cisimcik (△) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X12000).

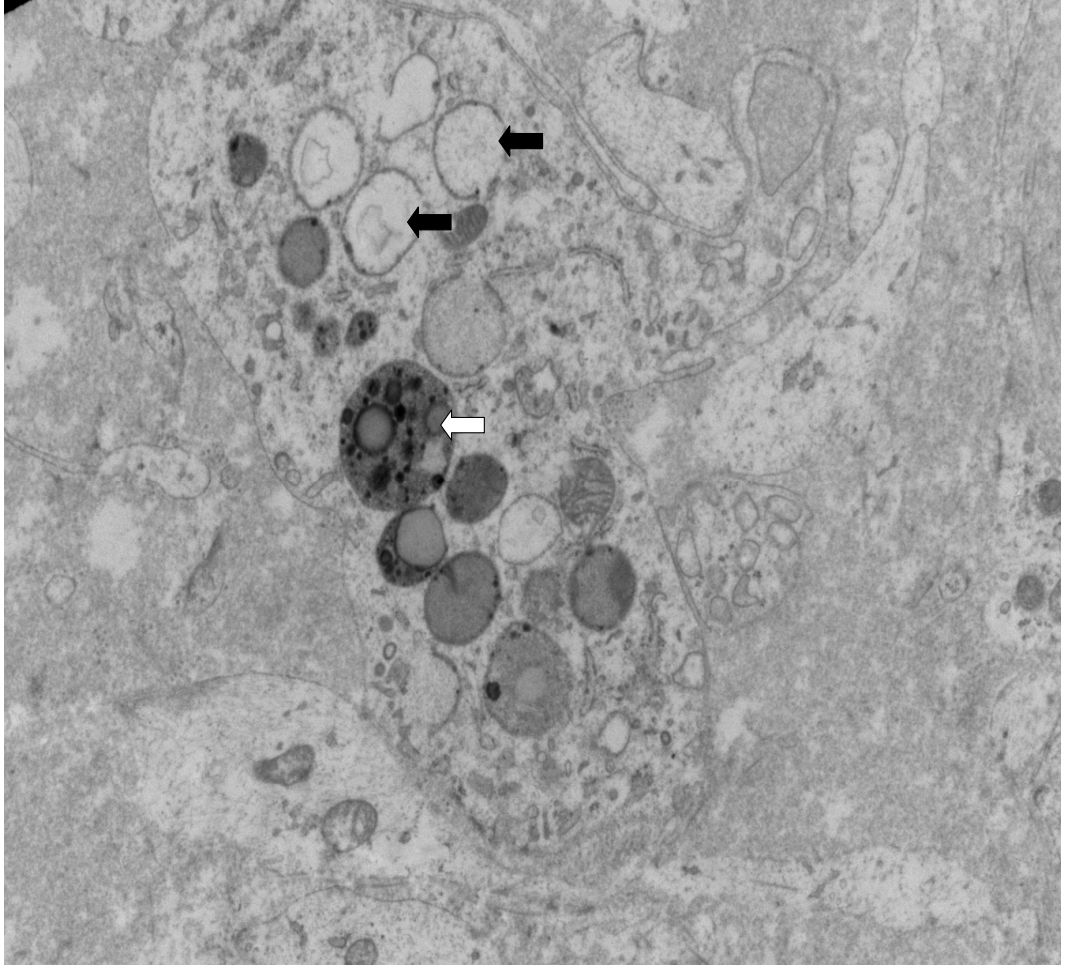


Resim 18. Genç daimi diş kron pulpa dokusu örneğinde, başlangıç seviyesinde apoptozise uğramış hücre membranı () izlenmekte olan fibroblast hücresinde sınırlı kromatin kondensasyonu varlığı () ve çevrede kollajen fibriller (K) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X25000).

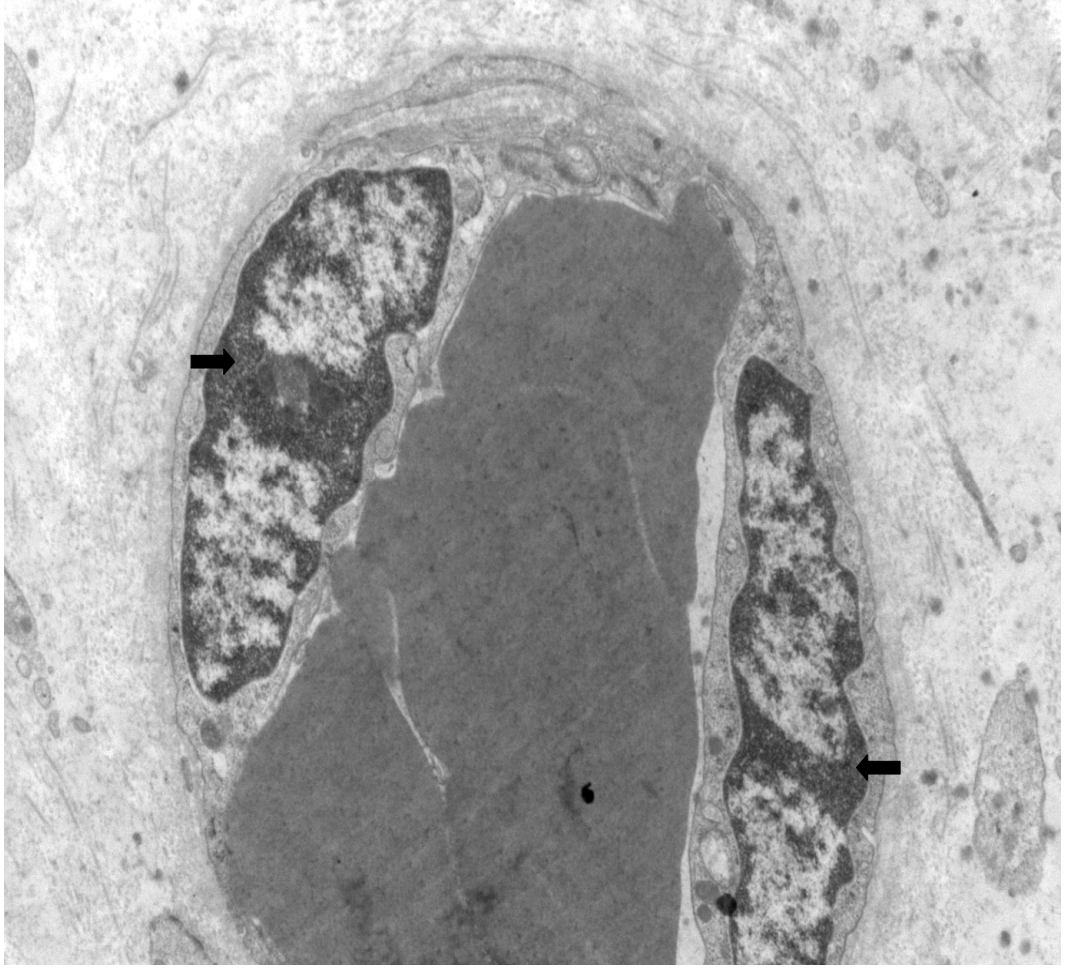


Resim 19. Genç daimi diş kök pulpa dokusu örneğinde, odontoblastik tabakada hücreler arası bağlantıda bozulma, kromatin kondensasyonu izlenen ileri evredeki apoptotik odontoblastlar (↔) ve başlangıç evresinde olan apoptotik odontoblast hücreleri (←) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X3000).

Başlangıç düzeyinde ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi ile genç daimi diş pulpa dokusu örneklerinde az sayıda mononükleer inflamatuvar hücrelere ve apoptotik vasküler endotelial hücrelere de rastlandı (Resim 20, 21).



Resim 20. İlerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi kron pulpa dokusu örneğinde, kendi organellerinin yanısıra fagosite ettiği apoptotik cisimciği ($\blacktriangleleft$) içermekte olan makrofaj hücresinde granüllü endoplazmik retikulumda genişleme ($\blackleftarrow$) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X10000).



Resim 21. Genç daimi diş kök pulpa dokusu örneğinde, başlangıç düzeyinde olan apoptotik vasküler endotelial hücrelerde izlenen periferik kromatin yoğunlaşması (◀) (Uranil asetat ve kurşun sitrat, orijinal büyütme X12000).

5. TARTIŞMA

Günümüze kadar süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu ile ilgili yapılan çalışmaların sonucunda varılan ortak nokta diş sert dokularının yıkımında metabolik aktiviteleri çok yüksek olan ve dev hücreler olarak bilinen odontoklastların majör rol oynadığıdır^{1,3-11}. Rezorpsiyonun belirli bir süre ilerledikten sonra kök pulpasına yaklaştığı ve kök pulpasındaki ilkel bağ dokusu hücrelerinin de odontoklastlara dönüşerek pulpa yönünden de rezorpsiyona katıldığı ifade edilmektedir^{4,10,48}. Süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında sert ve yumuşak dokuların yıkımında odontoklastların yanı sıra mezenşimal hücrelerin, fibroblastların, sementoblastların ve mononükleer monositlerin de (makrofajların) rol aldığı bildirilse de⁴³, bu hücrelerin fizyolojik kök rezorpsiyonundaki fonksiyonel rolleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır^{3,11,50}.

Sayırsız kan damarı, fibroblast ve makrofaj tarafından desteklenen ve odontoklastlarca gerçekleştiği kabul edilen diş sert dokularında gözlenen fizyolojik rezorpsiyon olayı kısmen açıklığa kavuşturulmuş olmakla birlikte, pulpa ve periodontal ligament gibi yumuşak dokuların rezorpsiyon mekanizması hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir^{3,8,10,36}. Bununla birlikte, periodontal ligament rezorpsiyonunda, kollajen yıkımının yanı sıra, fizyolojik olaylarla tetiklenen apoptotik hücre ölümünün de görev aldığı bildirilmektedir³.

Süt dişi pulpa dokusunun rezorpsiyondaki rolü hakkında tartışmalı görüşler mevcuttur. Sahara ve arkadaşları⁷⁰, aktif rezorpsiyon sırasında süt dişi kök yüzeyinde gözlenen yoğun odontoklastik hücre aktivitesine rağmen, süt dişi pulpasının normal yapısını koruduğunu, odontoblastların fonksiyon görmeye devam ettiğini ve odontoklastik aktivitenin öncelikle pulpanın apikal yönünde başladığını bildirmişlerdir.

Kök rezorpsiyonunun ileri evrelerinde ise periodontal doku yıkımından kaynaklanan monosit, makrofaj ve lenfositler gibi inflamatuvar hücrelerin pulpaya infiltre olduğu, odontoblast tabakasının dejenere olmaya başladığı ve bunu odontoklastların ortaya çıkmasının takip ettiği öne sürülmektedir^{4,10,29,37,50,51,70,74}.

Fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında süt dişi pulpa dokusundaki kollajenolitik aktivite, mukopolisakkaridaz aktivitesi ve prostoglandin benzeri aktivite gibi çeşitli enzim aktivite düzeylerini değerlendiren bazı araştırmacılar ise, tespit edilen artmış aktivitelerin, pulpanın süt dişinin düşme sürecinde rol oynadığının göstergesi olabileceğini düşünmüşlerdir^{28,69,78}. Aynı fikir doğrultusunda Eronat ve arkadaşları⁷⁶ süt dişi rezorpsiyonunun ilerlemesiyle birlikte pulpa hücrelerinin nükleuslarındaki metabolik aktivitenin anlamlı şekilde artmış olmasına ve pulpanın rezorpsiyon sürecindeki rolüne dikkat çekmişlerdir.

Rezorpsiyonun son aşamalarında ise, pulpa dokusunun yerini tamamen granülasyon dokusuna bıraktığı gözlenmiştir^{4,10,33,37,51,73,74}.

Vermelin ve arkadaşları¹⁷, sağlıklı insan ve rat daimi diş pulpa dokusunda apoptozisin pulpa hücre popülasyonunun regülasyonunda görev aldığını öne sürmüşlerdir. Apoptozisin nekrozdan farklı birtakım morfolojik ve biyokimyasal özellikler taşıyan, doku regülasyonunda hasarlı veya işlevini tamamlamış hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan, çeşitli hücresel moleküler olaylar içerdiği ve genetik olarak düzenlendiği bilinmektedir^{12,16,84,145}. Literatür incelemesi yapıldığında; apoptozisin genetik olarak düzenlenmiş bir süreç içinde meydana geldiği belirtilen süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonu⁸ sırasında pulpada meydana gelen değişikliklerle ilişkisini inceleyen ya da bu

dönemde pulpa dokusunda apoptotik hücrelerin kantitatif değerlendirmesini yapan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığında, sunulan çalışmada, fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç ve ilerlemiş düzeyde olduğu süt dişleri ile genç daimi dişlerden elde edilen pulpa dokularında apoptotik mekanizma açısından pulpa fibroblastlarında kantitatif inceleme yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca süt dişi pulpa dokusunda apoptozisin fizyolojik kök rezorpsiyonunda olası rolü değerlendirilerek, bu süreç içerisinde mekanizması tam olarak anlaşılamamış diş yumuşak dokularından pulpanın rezorpsiyonuna yeni bir bakış açısının getirilebilmesi düşünülmüştür.

Bu doğrultuda çalışma grupları oluşturulurken, ortodontik ve protetik amaçla çekim endikasyonu konulmuş, radyografik muayene sonucu fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç düzeyinde ve ilerlemiş düzeyde olduğu saptanan çürüksüz süt dişleri çalışma kapsamına alınmıştır. Rezorpsiyonun başlama yaşındaki olası varyasyonlar göz önünde tutularak kronolojik yaş direkt olarak dikkate alınmamıştır. Kök boyu ölçümleri, ortodontik teşhiş cetveli kullanılarak yapılmıştır. Rezorpsiyon derecesi, Kramer ve Ireland'ın¹⁹¹ süt dişi kök boyu ile ilgili tablosu kriter alınarak sınıflandırılmıştır.

Süt dişlerinin sürmesinden kök ucunun kapanmasına kadar geçen süre, süt dişinin gençlik dönemi, kök formasyonunun tamamlanmasından fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlamasına kadar geçen süre ise süt dişinin olgunluk dönemi olarak kabul edilmektedir³³. Araştırmacılar klinik olarak fizyolojik kök rezorpsiyonu görülmeyen olgun süt dişi pulpasının genç daimi diş pulpasıyla benzer histofizyolojik özelliklere sahip olduğunu bildirmektedir^{32,190} Bununla birlikte, Hobson³⁰

fizyolojik kök rezorpsiyonunda, rezorpsiyon düzeyinin 1/2 seviyesini aşmadığı sağlıklı süt dişi pulpasının, genç daimi dişler için tanımlanan gevşek yapıdaki pulpa bağ dokusu özelliklerine ve hücrelerine sahip olduğunu bildirirken, Aras ve Ergün²⁹, kök rezorpsiyonu henüz başlamış süt dişi pulpasının histolojik özelliklerinin, tipik pulpa görüntüsüyle aynı olduğunu ifade etmektedir. Alexander²⁸ rezorpsiyonun %50-75 düzeyine ulaştığı durumlarda dahi süt dişi pulpa histolojisini, sürekli birinci küçük azılarla benzer bulduğunu belirtmektedir. Gençlik ya da olgunluk döneminde yer alan sağlıklı bir süt dişinin çekimi etik açıdan mümkün olmadığından, bu bilgilerin doğrultusunda rezorpsiyonun başlamadığı dönemdeki pulpa dokusunda apoptotik mekanizmayı değerlendirebilmek için ortodontik amaçlı çekim endikasyonu konulan çürüksüz, apeksi tamamlanmak üzere olan genç daimi dişler kullanılmıştır.

Çürük lezyonundaki bakteri toksinlerinin pulpaya penetre olmasıyla, pulpada yapısal ve fonksiyonel değişiklikler olduğu bilinmektedir¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Wang ve arkadaşları¹⁹⁸, *Streptococcus mutans*'ın ürettiği lipoteişoik asitin insan süt dişi pulpa hücrelerinde apoptozise neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, sağlıklı pulpa dokusunda apoptozisi değerlendirebilmek amacıyla klinik ve radyografik olarak sağlıklı, çürüksüz süt ve genç daimi dişlerden elde edilen pulpa dokuları kullanılmıştır.

Pulpa doku örneklerinin elde edilmesi sırasında, birçok çalışmada kullanılan teknik ile dişlerin mesial ve distal yüzeyleri boyunca açılan iki longitudinal yiv sayesinde dişler ikiye ayrılarak pulpa dokusu steril ve keskin bir ekskavatör yardımıyla kron ve kök pulpası bir bütün halinde olacak şekilde dikkatlice çıkarılmıştır^{195,197,199-201}. Sunulan araştırmada ortodontik ve protetik amaçlı çekim endikasyonu konulan dişler kullanıldığı için, pulpa dokusunun ekstirpe edilerek çıkartılması

düşünülmemiştir. Böylece ektirpasyon işlemi sırasında ortaya çıkabilecek doku kaybı olasılığı da elimine edilmiş ve doku bütünlüğü korunmuştur.

Pulpa dokusu örneklerinde gözleyebileceğimiz apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonlarının *in situ* olarak tanınması amacıyla TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi aracılığıyla sarmallarda meydana gelmiş DNA fragmentasyonlarının ekspozite olan 3'-OH uçlarına nükleotidler bağlanmakta ve nükleotidler ile işaretlenen DNA fragmentasyonları daha sonra sekonder antibody ile bağlanarak görünür hale gelmektedir¹⁸⁶. DNA fragmentasyonu morfolojik yönden apoptotik hücre olarak tanımlanan hücrelerde görüldüğü gibi, apoptotik sürece girmiş fakat morfolojik olarak normal tanımlanan hücrelerde de meydana gelebilmektedir²⁰². Bu noktada TUNEL yöntemi standart boyama tekniklerinden daha hassas bir yöntem olup, hücresel ve nükleer morfoloji ile kıyaslama yapılarak değerlendirilmesi önerilmektedir^{186,203}.

DNA fragmentasyonu apoptozisin en karakteristik görünümü olarak kabul edilmekle birlikte²⁰⁴, TUNEL yöntemi ile sadece apoptozise bağlı DNA fragmentasyonlarının değil, toksik bileşiklere ve diğer etkenlere bağlı nekrotik hücre ölümü sonucunda oluşan hasarlı DNA'ya sahip ve aktif DNA tamiri yapmakta olan hücrelerin de boyandığı bildirilmektedir²⁰⁵. Çalışmamızda çürüksüz dişler yer aldığından sağlıklı pulpa dokusundaki hücreler değerlendirilmiş, nekrotik hücre ölümüne bağlı yanlış pozitif boyanmalar söz konusu olmamıştır. Aktif DNA tamiri yapan hücrelerin varlığı tüm pulpa dokusu örneklerinde söz konusu olsa bile, bu hücreleri elimine etmek mümkün olmamaktadır. Preapoptotik hücrelerin dahi boyanması nedeniyle sensitivitesi yüksek bir teknik olarak kabul edilen TUNEL yönteminin apoptozis değerlendirilmesinde standart yöntem haline

gelmiş olması¹⁸⁵, bu olasılığın göz ardı edilebileceğini ve sonuçları olumsuz etkilemediğini düşündürmektedir.

Apoptotik hücreleri tespit edebilmek için DNA fragmentasyonunu baz alarak hücrelerdeki değişikliklerin saptandığı tüm çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örnekleri formol ile fikse edilerek ve ApopTag Plus Peroksidaz *In Situ* Apoptosis Detection Kit kullanılarak TUNEL yöntemi ile boyama yapılarak analiz edilmiştir. TUNEL yöntemiyle değerlendirilmek üzere kullanılan pulpa dokusu örnekleri üretici firmanın önerdiği doğrultuda taze hazırlanmış %10 formol solusyonunda fikse edildikten sonra parafine gömülmüştür. Fiksasyon işleminin +4°C'de 1-24 saat arasında gerçekleştiği ve 3-5 hafta gibi daha uzun süreli fiksasyon işlemlerinin kitin duyarlılığını azalttığı belirtilmektedir²⁰⁶. TUNEL yönteminin hem dondurulmuş hem de formol ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda kullanılabileceği bildirilmektedir¹⁸⁶. Üretici firma da formol ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokularda ApopTag kitin iyi sonuçlar verdiğini belirtmektedir. Çalışmamızda, fiksasyon işlemi Vermelin ve arkadaşlarının¹⁷ da uyguladığı şekilde pulpa dokusunun %10 formol solusyonu içinde 4°C'de 24 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

TUNEL yöntemi ile boyama işleminden geçmiş kesitlerdeki apoptotik hücreler, birçok araştırmacının çalışmalarında^{17,135,192,207-210} kullandığı gibi ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir

ApopTag kitin üretici firmasının önerdiği büyütme değerleri (X400-X1000) doğrultusunda ve farklı dokularda kantitatif olarak apoptotik hücreleri değerlendiren çalışmalarda^{192,193,203,211-213} olduğu gibi, çalışmamızda da pulpa dokusu örneklerinde pozitif boyanma gösteren hücreler X400 büyütmede değerlendirilmiştir. Standardizasyon için, oküler grid (10X10mm) yardımıyla 5 farklı mikroskobik alan içine düşen ApopTag

pozitif ve negatif hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiş ve apoptotik indeks değerleri hesaplanmıştır.

Apoptotik süreç saatler içerisinde geliştiğinden, bu dönemdeki hücreleri morfolojik olarak tanımlamak ve kantifiye etmek zor olmaktadır. Çalışmaların güvenilirliğini arttırmak amacıyla birden fazla yöntemin bir arada kullanılması önerilmektedir^{180,181}. Çalışmamızda pulpa dokusu örneklerinde, dokularda apoptozisin belirlenmesinde en çok kullanılan teknik olan TUNEL yöntemi²¹⁴ ile değerlendirmenin yanı sıra apoptotik hücreleri saptayabilmek için morfolojik görüntüleme yöntemlerinden biri olan ve apoptozisin değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilen elektron mikroskobu^{183,184} ile de inceleme yapılmıştır.

Transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirilecek olan pulpa dokusu örnekleri farklı dokularda gerçekleştirilen çoğu araştırmada^{17,210,215-219} olduğu gibi, tüm fiksatifler arasında en yaygın olarak kullanılan ve hücre yapısını en az etkileyen yöntem olarak kabul edilen, önce gluteraldehit ardından osmium tetraoksit fiksasyonu içermekte olan çift fiksasyon yöntemine tabii tutulmuştur²²⁰.

Değerlendirilen pulpa dokusu örneklerinde TUNEL yönteminde formol, transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirmede ise gluteraldehit-osmium tetraoksit ile fiksasyon gerekliliği, aynı dokunun seri kesitlerinde iki metodu birden uygulama imkanı tanımamakta ve bu seri kesitler üzerinde tekniklerin kıyaslanması mümkün olmamaktadır¹⁷. Çalışmamızda tüm gruplara ait pulpa dokusu örneklerinde her iki teknikle de apoptotik hücrelerin varlığı ve dağılımı tespit edilmiştir.

Sunulan çalışmada TUNEL yöntemi ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç ve ilerlemiş

aşamalarındaki süt dişleri ile genç daimi dişlere ait pulpa dokusu örneklerinde pulpa fibroblast hücrelerinde ve pulpa dokusuna ait diğer hücrelerde apoptozis tespit edilmiş olup, fibroblast hücreleri baz alınarak hesaplanan apoptotik indeks değerlerinin tüm gruplarda birbirine çok yakın seyrettiği görülmüştür. Apoptotik hücre sayısı, programlı bir olay olan süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyon derecesine bağlı olarak artış göstermemiştir. Literatür incelemesi yapıldığında, süt dişi pulpa dokusunda apoptozisi değerlendiren ya da farklı rezorpsiyon aşamalarında bulunan süt dişlerine ait pulpa dokusu örneklerinde kantitatif olarak apoptotik mekanizmayı değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlamadığımızdan bu yönde bir karşılaştırma yapamamaktayız. Apoptozis organizmada embriyogenez, gelişim, rejenerasyon ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunması ve organların patofizyolojisindeki kritik rolünün yanı sıra, proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında etkili olarak dokulardaki hücre homeostazının sağlanmasında rol oynamaktadır^{13,14}. Çalışmamızda, bundan yola çıkarak süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonun başlangıç ve ilerlemiş dönemlerinde pulpa hücre popülasyonunun regülasyonunun devam ettiği, rezorpsiyonun görülmediği genç daimi dişlerin pulpa hücrelerinin homeostazından bir farklılık sergilemediği düşünülmektedir. Klinik olarak rezorpsiyon görülmeyen olgun süt dişi pulpasının genç sürekli diş pulpasıyla benzer histofizyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir^{32,190}. Ayrıca, Hobson³⁰ ve Alexander²⁸'in çalışmalarında belirttikleri üzere fizyolojik kök rezorpsiyonunda, rezorpsiyon düzeyinin 1/2 seviyesini aşmadığı, hatta rezorpsiyonun %50-75 düzeyine ulaştığı durumlarda dahi sağlıklı süt dişi pulpa histolojisi, genç sürekli dişlerin pulpa dokusuyla benzer özellikler göstermektedir. Sarı ve arkadaşları³¹ kök rezorpsiyonunun başlangıç aşamasında olup rezorpsiyon düzeyi 1/3 kök boyunu geçmemiş süt dişlerinin pulpaları ile rezorpsiyonun kök boyunun 2/3'üne kadar ulaştığı ileri derecede rezorbe süt dişi pulpaları arasında polarize ışık mikroskobu ile gözlenebilir bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Bizim bulgularımız da araştırmacıların

bulgularını destekler niteliktedir. Farklı rezorpsiyon dönemlerine ait süt dişi ile genç daimi diş pulpa dokusu örneklerimize ait apoptotik indeks değerlerinin çok yakın seyretmesi nedeniyle süt dişinin fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlamadığı olgunluk döneminden rezorpsiyonun ilerlemiş evrelerine kadar pulpa dokusunda apoptotik mekanizmanın varolduğunu söyleyebiliriz.

Pulpa dokusundaki hücrelerde apoptotik mekanizmayı değerlendiren çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. TUNEL yöntemi ile pulpa fibroblastlarıyla birlikte çeşitli pulpa hücrelerinde de apoptozisi saptayan Vermelin ve arkadaşları¹⁷, sağlıklı insan ve rat daimi diş pulpa dokusunda apoptozisin pulpanın apikal kısmından çok insizal/okluzal kısmında meydana geldiğini ve pulpa hücre popülasyonunun regülasyonunda görev aldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada sağlıklı pulpada apoptotik hücrelerin periferde ve odontoblastik tabakadan daha çok subodontoblastik tabakayla ilişkili olarak gözlendiği ifade edilmektedir. Çalışmamızda ise, tüm çalışma gruplarındaki kesitlerde hem koronal hem de apikal pulpada apoptotik hücrelerin hemen hemen homojen bir dağılım sergilediği görülmüştür. Bununla birlikte, gruplarımız genel olarak değerlendirildiğinde apoptotik pulpa hücreleri dağılım açısından perifer ve santral pulpada farklılık ya da spesifik bir lokalizasyon göstermemiştir. Çalışmamızdaki apoptotik hücre dağılımı ile aynı doğrultuda olmak üzere, Cohen⁸⁶ de timus dokusunda yaptığı çalışmasında, apoptotik hücrelerin sağlıklı doku içinde dağılmış bir şekilde bulunduğunu ifade etmiştir.

Sunulan çalışmada esas olarak fibroblastlar değerlendirilmekle birlikte, kesitler sert doku içermediğinden pulpa dokusu boyunca odontoblastik tabaka değerlendirilememiş ve belli kesitlerde pulpayla bütünlük gösteren odontoblastik tabakada yer alan odontoblast hücrelerinde de apoptozis varlığı gözlenmiştir. Sınırlı sayıda odontoblastın

boyandığını bildiren Vermelin ve arkadaşlarının¹⁷ bulgularına zıt olarak, çalışmamızda odontoblastik tabakayı değerlendirebildiğimiz örneklerde değişen düzeylerde ve daha fazla oranda ApopTag pozitif hücreler gözlenmiştir. Franquin ve arkadaşları¹⁸ ise odontoblastlar üzerinde yaptıkları immünohistokimyasal çalışmada, kesitlerde sınırlı bir alanda birkaç odontoblastın boyandığını ve apoptotik odontoblastların varlığının insan pulpasındaki yaşam siklusunu tamamlamış yaşlı odontoblastların programlı hücre ölüm mekanizmasıyla ortadan kaldırıldıklarını, bir başka deyişle hücre sayısındaki azalmadan apoptozisin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz pulpa dokuları daha çok ortodontik amaçlı çekilen dişlerden elde edilmiştir. Bu diş dokuları malokluzyonlu bireylerde çiğneme ve parafonksiyonel alışkanlıklara bağlı oluşan ve sağlıklı bir okluzyonla kıyaslandığında dişlere dengeli bir biçimde dağılamayan düşük düzeyli travmatik kuvvetlere maruz kalabilmektedir. Çalışmamızda, odontoblastik tabakayı değerlendirebildiğimiz bazı örneklerde ApopTag pozitifliğin diğer çalışmalardaki^{17,18} ApopTag pozitifliğe oranla fazla olmasının nedeni, odontoblastlarda bu düşük düzeyli travmatik kuvvetlerin etkisiyle oluşabilecek hücre hasarı kaynaklı apoptozis meydana gelmesi ve fonksiyon göremeyen odontoblastların ortamdan uzaklaştırılarak pulpa işlevinin devam ettirilmesi olabilir.

Araştırmalarda, pulpa dokusunda fibroblastların ve odontoblastların yanısıra, perivasküler endotelial hücrelerde ve damar çevresinde ya da içinde yer alan mononükleer hücrelerde de apoptozise rastlandığı bildirilmektedir^{17,18}. Çalışmamızın bulguları da bu sonuçlarla uyumludur. Gruplarımıza ait pulpa dokusu örneklerinin bazılarında mononükleer inflamatuvar hücreler ve vasküler endotelial hücreler de ApopTag pozitif olarak tespit edilmiştir. Apoptozisin, pulpa bağ dokusundaki farklı tipteki hücrelerin regülasyonunda da yer alan bir mekanizma olduğunu söyleyebiliriz.

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile değerlendirdiğimiz çalışma gruplarına ait pulpa dokusu örneklerinde apoptozisin farklı evrelerinde olan çeşitli apoptotik pulpa hücrelerinin varlığı saptanmıştır. Vermelin ve arkadaşlarının¹⁷ pulpa dokusunda TUNEL yöntemi ile birlikte TEM kullanarak apoptozisi değerlendirdikleri çalışmalarında olduğu gibi, araştırmamızda elektron mikroskobu ile apoptotik hücrelerde tipik kromatin kondensasyonu izlenmiş, ayrıca yine bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde bir örnekte apoptotik cisimcik tespit edilmiştir. Apoptotik cisimciklerin yaşam ömürlerinin sınırlı olduğu, kısa bir zaman dilimi içinde fagositozla ortamdan uzaklaştırıldığı ifade edilmektedir²²¹. TUNEL yöntemi ile saptadığımız apoptotik hücrelerin yoğunluğunun transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirdiğimiz apoptotik hücrelerden oldukça fazla olduğu görülmüştür. Elektron mikroskobunda saptanan apoptotik hücrelerin varlığının az olması, bu teknikle geç dönem nükleer ve sitoplazmik morfolojik değişikliklerin saptanmasının mümkün olması ve erken dönemde meydana gelen biyokimyasal değişikliklerin morfolojik olarak saptanamamasına bağlanmaktadır. Bir başka deyişle, apoptozise giden bazı hücreler nükleer biyokimyasal olaylar başladıktan bir süre sonra dahi morfolojik olarak normal bir görünüm sergilemekte ve tanımlanamamaktadır²²². TUNEL yöntemi ise apoptotik morfolojik bulgular oluşmadan önce DNA fragmentasyonuna uğramış hücrelerin ve morfolojik olarak klasik apoptotik hücre karakteristiğini yansıtmayan hücrelerin erken dönemde teşhisine imkan sağlamaktadır²²³. Apoptotik hücrelerin tanımlamasında biyokimyasal tekniklerin kullanımının apoptotik hücre temsilcilerini daha iyi ve daha fazla sayıda tanımlanmasına izin verdiği de ifade edilmektedir²²². Bununla birlikte, çalışmamızda TUNEL yöntemi ile saptanan apoptotik hücre sayısının bazı örneklerde fazla olmasının nedeni, üretici firmaya göre aynı dokunun donmuş kesitlerine oranla parafinizasyon işlemi uygulanan dokularda var olan apoptotizisin artış gösterebilmesine bağlanabilir. Ancak, bazı araştırmacılar tarafından bu bilginin geçerli

olmadığı da gösterilmiştir²²⁴. Ayrıca Saraste²²⁵, TUNEL tekniğinin uygulanması sırasında belirleyici ajan konsantrasyonu, dokunun fiksasyonu ve proteoliz süresinin uzun tutulması gibi nedenlerin yanlış pozitif ya da negatif bulguların ortaya çıkmasında rol oynadığını bildirirken, aktif RNA sentezinin ve nekrotik hücrelerdeki DNA hasarının da spesifik olmayan boyanmalara sebep olabileceğini belirtmektedir. Güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için TUNEL tekniğinin standardizasyonunda apoptozisin pozitif kontrolü olarak DNAaz ile muamele edilmiş doku kesitlerinin kullanımının gerekli olduğu ifade edilirken, apoptozisin kantitatif olarak değerlendirilmesinde yeterli sayıda mikroskopik alanın incelenmesinin ve apoptozise giden hücre tipinin tanımlanmasının da büyük önem taşıdığı bildirilmiştir. Araştırmacı, TUNEL tekniği ile elde edilen bulguların doğrulanması amacıyla, apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonu ya da morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesine dayalı diğer tekniklerle birlikte TUNEL tekniğinin kullanımını önermektedir. Araştırmamızda, belirtildiği şekilde pozitif kontrol dokusu kullanımı, deneyimli bir patolog tarafından apoptozise giden hücre tipinin tanımlanması ve kesitlerde en az 5 mikroskopik alanda apoptotik hücre değerlendirilmesi gibi noktalara hassasiyet gösterilerek TUNEL tekniği uygulanmıştır. Ayrıca, transmisyon elektron mikroskobu bulgularımız farklı rezorpsiyon aşamalarındaki süt dişi ve genç daimi diş pulpa dokusunda yer alan apoptotik pulpa hücrelerinin varlığını ve bu dokularda apoptotik hücrelerin aynı yoğunlukta bulunduklarını kanıtlayarak TUNEL tekniği ile elde ettiğimiz bulguları desteklemiştir.

Çalışmamızda TUNEL yöntemi ve transmisyon elektron mikroskobu ile elde ettiğimiz bulguları birlikte değerlendirdiğimizde, apoptozisin süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonundan bağımsız olarak pulpa hücre popülasyonunun regülasyonunda görev aldığını düşünmekteyiz. Dişler yaşam süreçleri boyunca ağız ortamı içinde termal etkenler, çiğneme kuvvetleri, parafonksiyonel alışkanlıklara bağlı oluşan kuvvetlerin

etkisi altındadırlar. Kronik olarak düşük düzeydeki bu kuvvetlerin ve etkenlerin pulpa hücreleri üzerinde oluşturabileceği hasar sonucu hücrelerin apoptotik mekanizma ile dokunun işlevselliğinin korunması adına, komşu hücrelere zarar vermeden ve inflamasyona neden olmaksızın eliminasyonlarını gerçekleştirdikleri söylenebilir. Çoğu bağ dokusunda fizyolojik koşullarda da kollajen remodelasyon ve turnover döngüsünün meydana geldiği belirtilmektedir^{226,227}. Pulpa bağ dokusunda da bu döngünün gerçekleştiği gözönüne alınırsa; bu döngüden sorumlu bağ dokusunun ana hücreleri olan fibroblastların yaşam süreçlerinde belli bir noktada hücre içi veya hücre dışı stimuluslarla oluşabilecek hücre hasarına bağlı olarak fonksiyon göremedikleri ve yaşam süreçlerinin sonlanması gerektiği durumlar ortaya çıkabilir. Bu durumlarda hasarlı hücrelerin apoptotik mekanizma ile elimine edildikleri, inflamasyon gelişmeksizin ortamdan uzaklaştırıldıkları, böylece pulpa dokusunun yapı ve işlevselliğinin korunduğu düşünülebilir. Ten Cate⁸ de, özellikle hücreden zengin tabakada yer alan pulpa fibroblastlarında gerçekleşen apoptotik hücre ölümü ile fibroblastlarda belli bir oranda turnover meydana geldiğini ifade etmiştir. Yine fizyolojik stimuluslara bağlı olarak dişin yaşam süreci boyunca sekonder dentin yapımını sürdüren odontoblastların da ömrünü tamamlayarak veya stimuluslara bağlı olarak apoptozis ile ortadan kaldırılması hücre regülasyonunun sağlanmasında yer alan mekanizmalardan biri olabilir. Apoptotik indeks değerlerinin fizyolojik rezorpsiyonun başlangıç ve ilerlemiş dönemlerinde yakın değerler sergilemesi, genç daimi diş pulpa dokusu örneklerine ait apoptotik indeks değerlerinden farklılık göstermemesi, süt dişi pulpa dokusunun fizyolojik rezorpsiyon proçesinde apoptotik mekanizmanın yer almadığına işaret etmektedir.

Süt dişi pulpa dokusunun kök rezorpsiyonunun ileri aşamalarında granülasyon dokusuna dönüşüp, rezorpsiyona aktif olarak katıldığı belirtilmektedir⁷⁴. Fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında ileri

evrelerde süt dişi pulpa dokusunda gözlenen inflamatuvar hücreler tarafından salınan çeşitli sitokin ve komplemanların, odontoblastik dejenerasyona sebep olabileceğı ve odontoklastları stimule edebileceğı öne sürülmektedir⁵⁰. Fizyolojik kök rezorpsiyonu başlamış süt dişlerinin pulpa ve periodontal dokularında spesifik enzimatik aktivitenin varlığını gösteren çalışmalar^{28,59,69}, rezorpsiyonun pulpanın bir aktivitesi olabileceğini göstermektedir. Eronat ve arkadaşları⁷⁶ kök rezorpsiyonu ilerlemiş süt dişi pulpa hücrelerinde artmış nükleolar aktiviteye dikkat çekmiştir. İnsan ve fare hücre kültür ortamında pulpa hücrelerini de içeren mezenşimal dental hücrelerin osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunu regüle eden osteoklastogenez inhibe edici faktör/osteoprotegerin, osteoklast diferensiasyon faktörü ve makrofaj koloni stimule edici faktör gibi mediatörleri eksprese ettikleri bildirilmektedir^{228,229}. Bu mediatörlerin mineralize diş dokularının rezorpsiyonunu da regüle edebileceğı öne sürülmektedir²²⁸. Süt dişi pulpasının fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç ve ilerlemiş dönemlerindeki metabolik aktivitesinin daha fazla sayıda çalışma ile değerlendirilmesi ve farklı rezorptif aşamalardaki pulpa dokusunda metabolik aktivite, olası mediatör ekspresyonu varlığının kantitatif olarak çalışılarak daha net sonuçlara ulaşılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Sunulan çalışmanın sonuçları tümüyle değerlendirildiğinde, başlangıç ve ilerlemiş kök rezorpsiyonu aşamasındaki süt dişlerinin genç daimi diş pulpa dokusundan farklı bir apoptotik mekanizma sergilemediğı, farklı rezorpsiyon evrelerindeki süt dişi pulpa dokusunda apoptozisin fizyolojik ve programlı bir olay olan süt dişi kök rezorpsiyonundan bağımsız olarak gerçekleştiğı, süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyon süreci içinde gerçekleşen diş yumuşak dokularından pulpanın rezorpsiyonunda apoptotik mekanizmanın yer almadığı, apoptozisin pulpa bağ dokusundaki fibroblast, odontoblast, vasküler endotelial ve mononükleer inflamatuvar hücre popülasyonunun regülasyonunda yer alan bir mekanizma olduğu

ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik kök rezorpsiyonun başlamadığı dönemdeki süt dişi pulpa dokusunun genç daimi diş pulpa dokusuyla benzer özelliklere sahip olduğu, hatta rezorpsiyonun başlangıç ve ilerlemiş dönemlerinde bile yapısal olarak farklılık sergilemediğinin öne sürülmesi, bizim de çalışmamızda farklı evrelerdeki süt dişi pulpa dokusunda apoptotik mekanizma açısından fark olmadığını saptamamız; süt dişi pulpa dokusunun fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında pulpa kompleksinin rezorpsiyonun ileri dönemlerine kadar yapısını koruduğuna ve fonksiyonlarına devam ettiğine işaret etmektedir. Süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda pulpa dokusunun fonksiyonu ve rolü hala net olarak açıklanamamaktadır. Süt dişi pulpa dokusunun fizyolojik kök rezorpsiyonunda yapı ve fonksiyonunu koruması, bu süreç içinde belli mediatörler aracılığıyla olası etkinliğinin de araştırılması gerektiğine işaret etmektedir. Pulpada gerçekleşen apoptotik mekanizmada yer alan aracı moleküllerin tam olarak ortaya konması ve süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda lokal olarak osteo/odontoklastik aktivite üzerine etkili olabilecek olası mediatör varlığının aydınlatılabilmesi için moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

6. SONUÇ

Başlangıç ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişleri ile genç daimi diş pulpa dokusunda TUNEL yöntemi ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak apoptotik hücre ölümünün araştırıldığı, süt dişi fizyolojik kök rezorpsiyonunda apoptozisin rolünün değerlendirildiği bu çalışmada;

1. Fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç ve ilerlemiş aşamalarındaki süt dişleri ile genç daimi dişlere ait pulpa dokusu örneklerinde; fibroblast hücrelerinde ve pulpa dokusuna ait diğer hücrelerde apoptozis tespit edilmiş olup, fibroblast hücreleri baz alınarak hesaplanan apoptotik indeks değerlerinin tüm gruplarda birbirine çok yakın seyrettiği tespit edilmiştir.

2. Genç daimi dişlerin pulpa dokularının histofizyolojik özelliklerinin süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlamadığı dönemdeki pulpa dokusuyla benzer olduğu, ve süt dişi pulpa dokusunun fizyolojik rezorpsiyonun ileri evrelerine kadar yapısını koruduğu düşünülürse; apoptotik mekanizmanın süt dişlerinin gençlik ve olgunluk döneminde de mevcut olduğu, başlangıç ve ilerlemiş rezorpsiyon dönemlerindeki pulpa dokusunun da apoptotik mekanizma açısından farklılık sergilemediği ortaya çıkmaktadır.

3. Süt dişi pulpa dokusunda apoptotik fibroblast hücre sayısının, fizyolojik kök rezorpsiyon derecesine bağlı olarak artış göstermediği, farklı rezorpsiyon evrelerindeki süt dişi pulpa dokusunda apoptozisin fizyolojik ve programlı bir olay olan süt dişi kök rezorpsiyonundan bağımsız olarak gerçekleştiği saptanmıştır.

4. Apoptozisin pulpa bağ dokusundaki fibroblastların yanı sıra, odontoblast, vasküler endotelial ve mononükleer inflamatuvar hücrelerde de saptanması, apoptotik mekanizmanın bu hücre topluluklarının regülasyonunda da yer aldığını göstermektedir.

5. Daha önce yapılan çalışmalarda süt dişı fizyolojik kök rezorpsiyonunun başlangıç ve ilerlemiş dönemlerindeki pulpa yapılarının histofizyolojik yönden benzer olduğunu öne sürölmesi, bizim de apoptotik mekanizma açısından farklı rezorpsiyon evrelerindeki süt dişı pulpa dokusunda farklılık olmadığını bulgulamamız, süt dişı fizyolojik kök rezorpsiyonunun ileri dönemlerine kadar pulpa kompleksinin yapı ve fonksiyonunu koruduğuna işaret etmektedir.

6. Süt dişı fizyolojik kök rezorpsiyonunun farklı evrelerindeki pulpa dokusunda apoptotik fibroblast sayısının benzer olması, fizyolojik kök rezorpsiyon süreci içinde gerçekleşen süt dişı yumuşak dokularından pulpanın rezorpsiyonunda apoptotik mekanizmanın yer almadığını göstermektedir.

7. ÖZET

Süt Dişı Fizyolojik Kök Rezorpsiyonunda Apoptozisin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada başlangıç ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişı ile genç daimi diş pulpa dokusunda apoptotik hücre ölümü ve süt dişı fizyolojik kök rezorpsiyonunda apoptozisin rolü değerlendirildi.

Yaşları 7-12 arasında değişen, sistemik olarak sağlıklı 46 çocuğun ortodontik ve protetik amaçlı çekilmiş 34 adet çürüksüz, başlangıç ve ileri rezorpsiyon aşamalarındaki süt dişine ve 12 adet çürüksüz genç daimi dişe ait pulpa dokusu örnekleri çalışmada yer aldı. Pulpa dokularında apoptotik hücreleri saptayabilmek için TUNEL yöntemi ve transmisyon elektron mikroskobu kullanıldı. TUNEL yöntemi ile saptanan apoptotik fibroblast hücreleri baz alınarak çalışma gruplarına ait apoptotik indeks (AI) değerleri elde edildi.

TUNEL yönteminde AI değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Pulpa bağ dokusunda odontoblastlar, vasküler endotelial hücreler ve mononükleer inflamatuvar hücrelerde apoptozis gözlemlendi. Elektron mikroskobunda değerlendirilen pulpa dokusu örneklerinde, apoptozisin farklı safhalarında olan çeşitli apoptotik pulpa hücrelerinde karakteristik görünüm olan kromatin kondensasyonu izlendi.

Başlangıç düzeyinde ve ilerlemiş düzeyde fizyolojik kök rezorpsiyonu gösteren süt dişı gruplarına ait AI değerlerinin genç daimi diş

grubuna ait değerlerden farklılık göstermemesi, apoptozisin fizyolojik ve programlı bir olay olan süt dişi kök rezorpsiyonundan bağımsız olarak pulpa hücre popülasyonunun regölasyonunda yer alan bir mekanizma olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Apoptozis, süt dişleri, diş pulpası, fizyolojik kök rezorpsiyonu, TUNEL yöntemi, transmisyon elektron mikroskopu.

8. SUMMARY

Evaluation of Apoptosis in Deciduous Teeth Physiological Root Resorption

In this study, the apoptotic cell death in the physiological root resorption in the early and advanced level in deciduous and young permanent teeth and the role of apoptosis in deciduous teeth physiological root resorption was evaluated.

Pulps of 34 deciduous teeth with root resorption in the early and advanced level and 12 young permanent human teeth showing no clinical signs of caries were extracted for orthodontic and prosthetic purposes from 46 systemically healthy children ranging in age from 7 to 12 year took place in the study. To detect apoptotic cells in pulp tissues, TUNEL technique and transmission electron microscopy were used. Apoptotic Index (AI) values of the study groups were determined mainly by counting apoptotic fibroblast cells detected by TUNEL technique.

In TUNEL technique there wasn't a statistically significant difference between AI values of the study groups ($p>0.05$). Apoptosis was detected in odontoblasts, vascular endothelial cells and mononuclear inflammatory cells of pulp connective tissue. In the pulp tissues evaluated by electron microscopy, different types of apoptotic pulp cells at different stages of apoptosis, with the characteristic appearance of chromatin condensation were observed.

The similarity between AI values of deciduous teeth groups in the early and advanced phase of physiological root resorption and

young permanent teeth, showed that apoptosis was a mechanism in the regulation of the pulp cells population which was not related with physiological and programmed process of deciduous teeth root resorption.

Key Words: apoptosis, deciduous teeth, dental pulp, physiological root resorption, TUNEL method, transmission electron microscopy.

9. KAYNAKLAR

- 1.** Sasaki T, Motegi N, Suzuki H, Watanabe C, Tadokoro K, Yanagisawa T et al. Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. *Am J Anat* 1988;183:303-315.
- 2.** Prove SA, Symons AL, Meyers IA. Physiological root resorption of primary molars. *J Clin Pediatr Dent* 1992;16:202-206.
- 3.** Ten Cate AR, Anderson RD. An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. *J Dent Res* 1986;65:1087-1093.
- 4.** Furseth R. The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1968;13:417-431.
- 5.** Morita H, Yamashiya H, Shimizu M, Sasaki S. The collagenolytic activity during root resorption of bovine deciduous tooth. *Arch Oral Biol* 1970;15:503-508.
- 6.** Jones SJ, Boyde A, Ali NN. The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. *Anat Embryol (Berl)* 1984;170:247-256.
- 7.** Cahill DR. Histological changes in the bony crypt and gubernacular canal of erupting permanent premolars during deciduous premolar exfoliation in beagles. *J Dent Res* 1974;53:786-791.
- 8.** Ten Cate AR. Physiologic tooth movement: eruption and shedding. In: Ten Cate AR, editor. *Oral histology development, structure, and function*. St. Louis, Baltimore, Boston: Mosby; 1998. p. 150-196, 289-314.
- 9.** Jenkins GN. *The physiology and biochemistry of the mouth*. Oxford, London: Blackwell Scientific Publications; 1978.
- 10.** Bhaskar SN. In: Bhaskar SN, editor. *Oral histology and embryology*. St. Louis: Mosby Yearbook; 1991. p. 139-179, 386-405.
- 11.** Sasaki T, Takahashi N, Watanabe C, Suzuki H, Higashi S, Suda T. Cytodifferentiation of odontoclasts in physiologic root resorption of human deciduous teeth. In: Davidovitch Z, editor. *The biological mechanisms of*

tooth eruption and root resorption. Birmingham, Columbus, Ohio: EBSCO Media; 1988. p. 321-328.

12. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

13. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyol Derg* 2002;4:323-329.

14. Turgut B, Demir T, Çeliker Ü. Oftalmolojide apoptoz. *Fırat Tıp Derg* 2006;11:6-11.

15. Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. Death in the life of a tooth. *J Dent Res* 2004;83:11-16.

16. Satchell PG, Gutmann JL, Witherspoon DE. Apoptosis: an introduction for the endodontist. *Int Endod J* 2003;36:237-245.

17. Vermelin L, Lecolle S, Septier D, Lasfargues JJ, Goldberg M. Apoptosis in human and rat dental pulp. *Eur J Oral Sci* 1996;104:547-553.

18. Franquin JC, Remusat M, Abou Hashieh I, Dejou J. Immunocytochemical detection of apoptosis in human odontoblasts. *Eur J Oral Sci* 1998;106 Suppl 1:384-387.

19. Camp JH, Fuks AB. Pediatric endodontics: Endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. *Pathways of the pulp*. St. Louis: Mosby; 2006. p. 822-881.

20. Alaçam T. Endodonti. Ankara: Barış Yayınları; 2000.

21. Nicholson J. Biologic considerations. In: Schwartz R, Summitt J, Robins J, editors. *Fundamentals of operative dentistry: a contemporary approach*. IL: Quintessence Publishing Co.; 1996. p. 1-26.

22. Okiji T. Pulp as a connective tissue. In: Hargreaves KM, Goodis H, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp*. IL: Quintessence Publishing Co.; 2002. p. 95-122.

23. Pashley D, Liewehr F. Structure and functions of the dentin-pulp complex. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. *Pathways of the pulp*. St. Louis: Mosby; 2006. p. 466-513.

- 24.** Fitzgerald M, Chiego DJJ, Heys DR. Autoradiographic analyses of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. Arch Oral Biol 1990;35:707-715.
- 25.** Fuks AB. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. Dent Clin North Am 2000;44:571-596.
- 26.** Mjör I. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. IL: Quintessence Publishing Co.; 2002.
- 27.** Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:13-27.
- 28.** Alexander SA. Collagenolytic activity from human deciduous pulps. J Endod 1981;7:418-420.
- 29.** Aras Ş, Ergun E. Fizyolojik kök rezorpsiyonu esnasında süt dişlerinin pulpa ve kök dokularının histolojik olarak incelenmesi. A. Ü. Diş Hek Fak Derg 1983;10:57-67.
- 30.** Hobson P. Pulp treatment of deciduous teeth. 1. Factors affecting diagnosis and treatment. Br Dent J 1970;128:232-238.
- 31.** Sari S, Aras S, Gunhan O. The effect of physiological root resorption on the histological structure of primary tooth pulp. J Clin Pediatr Dent 1999;23:221-225.
- 32.** Dard M, Kerebel LM, Kerebel B. A transmission electron microscope study of fibroblast changes in human deciduous tooth pulp. Arch Oral Biol 1989;34:223-228.
- 33.** Gülhan A. Pedodonti. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Basımevi; 1994.
- 34.** Permar D. In: Permar D, editor. Oral embryology and microscopic anatomy. Philadelphia: Lea&Febiger; 1972. p. 152-158.
- 35.** Gotz W, Kruger U, Ragotzki S, Lossdorfer S, Jager A. Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor-system in human deciduous teeth. Connect Tissue Res 2001;42:291-302.

- 36.** Sasaki T, Shimizu T, Suzuki H, Watanabe C. Cytodifferentiation and degeneration of odontoclasts in physiologic root resorption of kitten deciduous teeth. *Acta Anat (Basel)* 1989;135:330-340.
- 37.** Obersztyn A. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. *J Dent Res* 1963;42:660-674.
- 38.** Davidovitch Z, Lynch P, Shanfeld JL. Immunohistochemical localization of interleukins in dental and paradental cells during tooth eruption and resorption in kittens. In: Davidovitch Z, editor. *The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. Birmingham, Columbus, Ohio: EBSCO Media; 1988. p. 355-364.
- 39.** Finn SB. In: Finn SB, editor. *Clinical pedodontics*. Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company; 1973. p. 45-70.
- 40.** Rune B, Sarnas KV. Root resorption and submergence in retained deciduous second molars. A mixed-longitudinal study of 77 children with developmental absence of second premolars. *Eur J Orthod* 1984;6:123-131.
- 41.** Sahara N, Ashizawa Y, Nakamura K, Deguchi T, Suzuki K. Ultrastructural features of odontoclasts that resorb enamel in human deciduous teeth prior to shedding. *Anat Rec* 1998;252:215-228.
- 42.** Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence Int* 1999;30:9-25.
- 43.** Sasaki T, Shimizu T, Watanabe C, Hiyoshi Y. Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. *J Dent Res* 1990;69:67-74.
- 44.** Marks SC, Jr., Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec* 1996;245:374-393.
- 45.** Domon T, Osanai M, Yasuda M, Seki E, Takahashi S, Yamamoto T et al. Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts. *Anat Rec* 1997;249:449-457.

- 46.** Sasaki T, Watanabe C, Shimizu T, Debari K, Segawa K. Possible role of cementoblasts in the resorbant organ of human deciduous teeth during root resorption. *J Periodontal Res* 1990;25:143-151.
- 47.** Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkappaB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 2001;264:305-311.
- 48.** Marks SC, Schroder HE, Andreasen JO. Theories and mechanisms of tooth eruption. In: Andreasen JO, Peterson DS, editors. Textbook and color atlas of tooth impactions. Munksgaard, Copenhagen: Mosby; 1997. p. 20-43.
- 49.** Avery JK. Eruption and exfoliation of teeth. In: Steele PF, editor. Essential of oral histology and embryology: a clinical approach. St. Louis: Mosby Yearbook; 1992. p. 105-122.
- 50.** Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentine in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 1994;277:19-26.
- 51.** Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* 1996;244:33-49.
- 52.** Boyde A, Ali NN, Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 1984;156:216-220.
- 53.** Sasaki T, Takahashi N, Higashi S, Suda T. Multinucleated cells formed on calcified dentine from mouse bone marrow cells treated with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 have ruffled borders and resorb dentine. *Anat Rec* 1989;224:379-391.
- 54.** Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* 2003;61:483-495.

- 55.** Pierce AM, Lindskog S, Hammarstrom L. Osteoclasts: structure and function. *Electron Microsc Rev* 1991;4:1-45.
- 56.** Nilsen R. Electron microscopy of induced heterotopic bone formation in guinea pigs. *Arch Oral Biol* 1977;22:485-493.
- 57.** Freilicht LS. Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoclasts: effect of parathyroid extract. *J Dent Res* 1971;50:1047-1055.
- 58.** Gotz W, Quondamatteo F, Ragotzki S, Affeldt J, Jager A. Localization of cathepsin D in human odontoclasts. a light and electron microscopical immunocytochemical study. *Connect Tissue Res* 2000;41:185-194.
- 59.** Sasaki T, Ueno-Matsuda E. Immunocytochemical localization of cathepsins B and G in odontoclasts of human deciduous teeth. *J Dent Res* 1992;71:1881-1884.
- 60.** Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Localization of cathepsin K in bovine odontoclasts during deciduous tooth resorption. *Calcif Tissue Int* 2002;70:127-133.
- 61.** Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. *Bone* 2002;31:472-478.
- 62.** Linsuwanont-Santiwong B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of MT1-MMP during deciduous tooth resorption in odontoclasts. *J Bone Miner Metab* 2006;24:447-453.
- 63.** Lasfargues JJ, Saffar JL. Inhibition of prostanoid synthesis depresses alveolar bone resorption but enhances root resorption in the rat. *Anat Rec* 1993;237:458-465.
- 64.** Birkendal-Hansen H. Osteoclastic resorption of ³H-proline labelled bone, dentine and cementum in the rat. *Calc Tiss Res* 1974;15:77-80.
- 65.** Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Comparative effects of parathyroid hormone on osteoblasts and cementoblasts. *J Clin Periodontol* 1987;14:386-389.

- 66.** Rosenberg EH, Guralnick WC. Hyperparathyroidism: A review of 220 proved cases, with special emphasis in the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962;15:84-94.
- 67.** Takada K, Kajiya H, Fukushima H, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. Calcitonin in human odontoclasts regulates root resorption activity via protein kinase A. *J Bone Miner Metab* 2004;22:12-18.
- 68.** Matsuda E. Ultrastructural and cytochemical study of the odontoclasts in physiologic root resorption of human deciduous teeth. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1992;41:131-140.
- 69.** Alexander SA, Swerdloff M. Identification and localization of a mucopolysaccharidase in human deciduous teeth. *J Dent Res* 1980;59:594-601.
- 70.** Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Yagasaki H, Deguchi T et al. A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. *J Dent Res* 1993;72:634-640.
- 71.** Okamura T, Shimokawa H, Takagi Y, Ono H, Sasaki S. Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in situ hybridization. *Calcif Tissue Int* 1993;52:325-330.
- 72.** Haralabakis NB, Yiagtzis SC, Toutountzakis NM. Premature or delayed exfoliation of deciduous teeth and root resorption and formation. *Angle Orthod* 1994;64:151-157.
- 73.** Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cementum-like tissue deposition on the resorbed pulp chamber wall of human deciduous teeth prior to shedding. *Acta Anat (Basel)* 1993;147:24-34.
- 74.** Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Suzuki I, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shedding of human deciduous teeth. *Arch Histol Cytol* 1992;55:273-285.
- 75.** Fuks AB, Bimstein E, Klein H. Assessment of a 2% buffered glutaraldehyde solution in pulpotomized primary teeth of school children: a preliminary report. *J Pedod* 1986;10:323-330.

- 76.** Eronat C, Eronat N, Aktug M. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using Ag-NOR staining method. *Int J Paediatr Dent* 2002;12:207-214.
- 77.** Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003;111:346-352.
- 78.** Aras Ş. Prostaglandin benzeri aktivitenin süt dişı köklerinin fizyolojik kök rezorpsiyonundaki etkinliğinin araştırılması. Doçentlik Tezi. Pedodonti Anabilim Dalı. Ankara: A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 1982.
- 79.** Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. Immunocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* 2004;49:29-36.
- 80.** Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004;271:1638-1650.
- 81.** Balla A, Toth B, Timar G, Bak J, Krajcsi P. Molecular targets for pharmacological cytoprotection. *Biochem Pharmacol* 2001;61:769-777.
- 82.** Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67-77.
- 83.** Fleisher TA. Apoptosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;78:245-249; quiz 249-250.
- 84.** Balcı Ekmekçi Ö, Donma O, Ekmekçi H. Programlı hücre ölümü: Apoptozis. *Sendrom* 2004;16:14-23.
- 85.** Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 1976;119:159-166.
- 86.** Cohen J. Apoptosis: the physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993;15:35-43.
- 87.** Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
- 88.** Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.

- 89.** Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:88-101.
- 90.** Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995;6:3-16.
- 91.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
- 92.** Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003;348:1365-1375.
- 93.** Rutledge SE, Chin JW, Schepartz A. A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:479-485.
- 94.** Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 95.** Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000;53:55-63.
- 96.** Barinaga M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 1998;281:1303-1304.
- 97.** Gibson RM. Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *Bmj* 2001;322:1539-1540.
- 98.** Savinov AY, Tcherepanov A, Green EA, Flavell RA, Chervonsky AV. Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:628-632.
- 99.** Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
- 100.** Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139:122-127.
- 101.** Polverini PJ, Nor JE. Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:139-152.
- 102.** Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 1988;13:18-54.

- 103.** Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 2002;21:165-170.
- 104.** Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
- 105.** Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.
- 106.** D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 2001;114:3771-3778.
- 107.** Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 2001;108:1291-1298.
- 108.** Fishelson Z, Attali G, Mevorach D. Complement and apoptosis. *Mol Immunol* 2001;38:207-219.
- 109.** Koukoulis GK, Shen J, Karademir S, Jensen D, Williams J. Cholangiocytic apoptosis in chronic ductopenic rejection. *Hum Pathol* 2001;32:823-827.
- 110.** Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001;306:347-361.
- 111.** Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-537.
- 112.** Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* 2000;25:1859-1866.
- 113.** Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;200:107-121.
- 114.** Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 2001;32:1029-1038.

- 115.** Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S99-103.
- 116.** Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, Tsuruo T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 1998;17:1295-1304.
- 117.** Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 1999;58:167-190.
- 118.** Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998;78:893-913.
- 119.** Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF et al. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:217-236.
- 120.** Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T et al. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;187:587-600.
- 121.** Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
- 122.** Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997;11:457-465.
- 123.** Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;94:695-698.
- 124.** Hetz CA, Torres V, Quest AF. Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem Cell Biol* 2005;83:579-588.
- 125.** Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
- 126.** Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.

- 127.** Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:422-429.
- 128.** Bates S, Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:28-37.
- 129.** Oren M, Rotter V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:9-11.
- 130.** Setkova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Tucker AS. Primary enamel knot cell death in Apaf-1 and caspase-9 deficient mice. *Arch Oral Biol* 2007;52:15-19.
- 131.** Vaahtokari A, Aberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 1996;122:121-129.
- 132.** Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. Apoptosis in the early involuting stellate reticulum of rat molar tooth germs. *Anat Embryol (Berl)* 1999;200:49-54.
- 133.** Matalova E, Setkova J, Blackburn J, Misek I, Sharpe PT. CD 95 mediated apoptosis in embryogenesis: implication in tooth development. *Orthod Craniofac Res* 2006;9:123-128.
- 134.** Kondo S, Tamura Y, Bawden JW, Tanase S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 2001;46:557-568.
- 135.** Bronckers AL, Lyaruu DM, Goei W, Litz M, Luo G, Karsenty G et al. Nuclear DNA fragmentation during postnatal tooth development of mouse and hamster and during dentin repair in the rat. *Eur J Oral Sci* 1996;104:102-111.
- 136.** Kaneko H, Ogiuchi H, Shimono M. Cell death during tooth eruption in the rat: surrounding tissues of the crown. *Anat Embryol (Berl)* 1997;195:427-434.

- 137.** Joseph BK, Harbrow DJ, Sugerman PB, Smid JR, Savage NW, Young WG. Ameloblast apoptosis and IGF-1 receptor expression in the continuously erupting rat incisor model. *Apoptosis* 1999;4:441-447.
- 138.** Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Yamashita Y. A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Arch Oral Biol* 1995;40:677-680.
- 139.** Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono M. Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res* 1999;298:95-103.
- 140.** Cerri PS, Freymuller E, Katchburian E. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec* 2000;258:136-144.
- 141.** Funato N, Moriyama K, Baba Y, Kuroda T. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *J Dent Res* 1999;78:1511-1517.
- 142.** Koulouri O, Lappin DF, Radvar M, Kinane DF. Cell division, synthetic capacity and apoptosis in periodontal lesions analysed by in situ hybridisation and immunohistochemistry. *J Clin Periodontol* 1999;26:552-559.
- 143.** Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1997;26:170-175.
- 144.** Bloor BK, Malik FK, Odell EW, Morgan PR. Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:187-195.
- 145.** Loro L, Vintermyr OK, Johannessen AC. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. *Oral Dis* 2005;11:274-287.
- 146.** Muraki Y, Yoshioka C, Fukuda J, Haneji T, Kobayashi N. Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia. *J Oral Pathol Med* 1997;26:57-62.
- 147.** Kaur J, Kaur J, Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. *Int J Cancer* 2000;85:1-5.

- 148.** Ravindranath NM, Nishimoto K, Chu K, Shuler C. Cell-surface expression of complement restriction factors and sialyl Lewis antigens in oral carcinoma: relevance to chemo-immunotherapy. *Anticancer Res* 2000;20:21-26.
- 149.** Regezi JA, McMillan A, Dekker N, Daniels TE, Silverman S, Jr., Schoelch M et al. Apoptosis-associated proteins in oral lymphomas from HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:196-202.
- 150.** Honma T, Saito T, Fujioka Y. Possible role of apoptotic cells of the oral epithelium in the pathogenesis of aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:379-387.
- 151.** Ishimaru N, Yoneda T, Saegusa K, Yanagi K, Haneji N, Moriyama K et al. Severe destructive autoimmune lesions with aging in murine Sjogren's syndrome through Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2000;156:1557-1564.
- 152.** Heidenreich S, Otte B, Lang D, Schmidt M. Infection by *Candida albicans* inhibits apoptosis of human monocytes and monocytic U937 cells. *J Leukoc Biol* 1996;60:737-743.
- 153.** Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997;138:3849-3858.
- 154.** Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13:793-802.
- 155.** Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 1999;134:222-231.
- 156.** Rana MW, Pothisiri V, Killiany DM, Xu XM. Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:516-521.

- 157.** Usherwood EJ, Crowther G, Woodland DL. Apoptotic cells are generated at every division of in vitro cultured T cell lines. *Cell Immunol* 1999;196:131-137.
- 158.** Onishi Y, Tanimoto Y, Kizaki H. Inflammation and apoptosis. *Bull Tokyo Dent Coll* 1997;38:65-76.
- 159.** Niederman R, Zhang J, Kashket S. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:269-290.
- 160.** Yamamoto M, Fujihashi K, Hiroi T, McGhee JR, Van Dyke TE, Kiyono H. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res* 1997;32:115-119.
- 161.** Sorkin BC, Niederman R. Short chain carboxylic acids decrease human gingival keratinocyte proliferation and increase apoptosis and necrosis. *J Clin Periodontol* 1998;25:311-315.
- 162.** Goldberg M, Lasfargues JJ, Legrand JM. Clinical testing of dental materials--histological considerations. *J Dent* 1994;22 Suppl 2:S25-28.
- 163.** Adams AM, Soames JV, Searle RF. Ultrastructural changes in cultured human periodontal ligament cells exposed to dental materials. *J Biomed Mater Res* 1995;29:999-1004.
- 164.** Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinsasser N et al. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Arch Toxicol* 2006;80:370-377.
- 165.** Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater* 2006;22:630-640.
- 166.** Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod* 2004;30:527-533.

- 167.** Cillari E, Milano S, D'Agostino P, Di Bella G, La Rosa M, Barbera C et al. Modulation of nitric oxide production by tetracyclines and chemically modified tetracyclines. *Adv Dent Res* 1998;12:126-130.
- 168.** Vernillo AT, Rifkin BR. Effects of tetracyclines on bone metabolism. *Adv Dent Res* 1998;12:56-62.
- 169.** Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Ciavarelli L, De Fazio P. bcl-2, p53, and MIB-1 in human adult dental pulp. *J Endod* 2000;26:225-227.
- 170.** Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Toyoshima K, Terashita M. Primary and secondary induction of apoptosis in odontoblasts after cavity preparation of rat molars. *J Dent Res* 2001;80:1530-1534.
- 171.** Nishikawa S, Sasaki F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II-expressing dendritic cells. *J Histochem Cytochem* 1999;47:303-312.
- 172.** Ihbe A, Baumann G, Heinzmann U, Atkinson MJ. Loss of the differentiated phenotype precedes apoptosis of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 1998;63:208-213.
- 173.** Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and disease. *Mol Pathol* 1997;50:132-137.
- 174.** Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Koji T, Urayama S et al. Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 1997;12:1637-1646.
- 175.** Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998;188:997-1001.
- 176.** Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci* 1999;65:1087-1102.
- 177.** van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res* 1997;12:1797-1804.

- 178.** Lorget F, Kamel S, Mentaverri R, Wattel A, Naassila M, Maamer M et al. High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:899-903.
- 179.** Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107:489-506.
- 180.** McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;36:259-278.
- 181.** Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO et al. Apoptosis: a general comment. *Faseb J* 1991;5:2127-2128.
- 182.** Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995;7:61-64.
- 183.** Antar V. Bir genel kaspaz inhibitörü olan QVD-OPH'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
- 184.** Allen RT, Hunter WJ, 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215-228.
- 185.** Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998;152:885-888.
- 186.** Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)* 1999;200:1-18.
- 187.** Li X, James WM, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Application of biotin, digoxigenin or fluorescein conjugated deoxynucleotides to label DNA strand breaks for analysis of cell proliferation and apoptosis using flow cytometry. *Biotech Histochem* 1995;70:234-242.

- 188.** van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* 2000;45:549-559.
- 189.** Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029-4035.
- 190.** Fox AG, Heeley JD. Histological study of pulps of human primary teeth. *Arch Oral Biol* 1980;25:103-110.
- 191.** Kramer WS, Ireland RL. Measurements of the primary teeth. *J Dent Child* 1959;26:252-261.
- 192.** Tokman B, Gultekin SE, Sezer C, Alpar R. The expression of p53, p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Correlation with mode of invasion grading system. *Saudi Med J* 2004;25:1922-1930.
- 193.** Merchant SH, Gonchoroff NJ, Hutchison RE. Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2001;46:28-32.
- 194.** Lin L, Langeland K. Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;51:292-316.
- 195.** Hahn CL, Falkler WA, Jr., Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 1989;15:20-26.
- 196.** Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:179-200.
- 197.** Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M. Class II antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. *Int Endod J* 1991;24:8-14.
- 198.** Wang PL, Shirasu S, Daito M, Ohura K. Streptococcus mutans lipoteichoic acid-induced apoptosis in cultured dental pulp cells from human deciduous teeth. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:957-961.

- 199.** Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res* 1987;66:1149-1153.
- 200.** Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J Dent Res* 1988;67:1263-1266.
- 201.** Jontell M, Jiang WH, Bergenholtz G. Ontogeny of class II antigen expressing cells in rat incisor pulp. *Scand J Dent Res* 1991;99:384-389.
- 202.** Umansky SR. The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol* 1982;97:591-602.
- 203.** Berrebi D, Sautet A, Flejou JF, Dauge MC, Peuchmaur M, Potet F. Ticlopidine induced colitis: a histopathological study including apoptosis. *J Clin Pathol* 1998;51:280-283.
- 204.** Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2353-2362.
- 205.** Loo DT. TUNEL assay: an overview of techniques. In: Didenko VV, editor. *In situ detection of DNA damage: methods and protocols*. Totawa: Humana Press; 2002. p. 21-30.
- 206.** Davison FD, Groves M, Scaravilli F. The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by in situ end-labelling of DNA. *Histochem J* 1995;27:983-988.
- 207.** Hirota Y, Habu M, Tominaga K, Sukedai M, Matsukawa A, Nishihara T et al. Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 2006;35:91-98.
- 208.** Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodontal Res* 2005;40:365-372.

- 209.** Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A et al. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2003;30:616-623.
- 210.** Sasaki C, Sato T, Kozawa Y. Apoptosis in regressive deciduous tooth germs of *Suncus murinus* evaluated by the the TUNEL method and electron microscopy. *Arch Oral Biol* 2001;46:649-660.
- 211.** Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S et al. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *Br J Dermatol* 2004;150:56-63.
- 212.** Qin ZH, Wang Y, Nakai M, Chase TN. Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol Pharmacol* 1998;53:33-42.
- 213.** Selleri C, Maciejewski JP, Pane F, Luciano L, Raiola AM, Mostarda I et al. Fas-mediated modulation of Bcr/Abl in chronic myelogenous leukemia results in differential effects on apoptosis. *Blood* 1998;92:981-989.
- 214.** Catrina AI, Ulfgren AK, Lindblad S, Grondal L, Klareskog L. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 2002;61:934-936.
- 215.** Takahashi S, Shinzato K, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M. Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. *J Oral Pathol Med* 2004;33:23-29.
- 216.** Bayar Muluk N, Kaymaz FF, Cakar AN. Effects of topotecan treatment on nasal, buccal, and lingual mucosa in the rabbit: light and transmission electron microscopic evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:197-203.
- 217.** Duygulu F, Karaoglu S, Zeybek ND, Kaymaz FF, Gunes T. The effect of subcutaneously injected nicotine on achilles tendon healing in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006;14:756-761.

- 218.** Coskun B, Comelekoglu U, Polat A, Kaymaz FF. Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;57:220-225.
- 219.** Kaymaz FF, Dağdeviren A. Thymic nurse cells determined in situ at the light and electron microscopic level. *Turk J Vet Anim Sci* 2002;26:1171-1175.
- 220.** Glauert AM, Lewis PR. Fixatives. In: Glauert AM, Lewis PR, editors. *Biological specimen preparation for TEM*. London: Portland Press; 1998. p. 21-75.
- 221.** Bursch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990;68:1071-1074.
- 222.** Saunders MW, Birchall MA. Apoptosis, matters of life and death. *J Laryngol Otol* 1998;112:822-826.
- 223.** Sanders EJ, Wride MA. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem J* 1996;28:275-281.
- 224.** Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, Kenjo T, Tsutsumi Y. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 1995;58:185-190.
- 225.** Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 1999;24:189-195.
- 226.** Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-9.
- 227.** Everts V, van der Zee E, Creemers L, Beertsen W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J* 1996;28:229-245.
- 228.** Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486-1492.

229. Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:145-152.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Yeşim

Soyadı Turan Özdoğan

Doğum Yeri ve Tarihi Ankara - 28.03.1977

Eğitimi

2001 - 2007 Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Doktora Programı

1995 - 2000 Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

1989 - 1995 Ankara Atatürk Anadolu Lisesi

1988 - 1989 TED Ankara Koleji

1983 - 1988 Halide Edip Adıvar İlkokulu

Yabancı Dili İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Pedodonti Derneği

Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

- G.Ü. BAP 03/2002 -14 Süt Dişi Rezorpsiyonunda Apoptozisin Değerlendirilmesi
- G.Ü. BAP 03/2006-25 Dört Farklı Cam Fiber Postun İn Vitro Bükülme Dirençlerinin ve Sonlu Elemanlar Metodu ile Stres Dağılımlarının Analizi ve 1 Yıllık Klinik Değerlendirilmesi

Yayınlar:

- Çocuklarda Postoperatif Ağrı Oluşumu ve Analjezik Kullanımı (On Dokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisinde yayınlanmak üzere kabul edildi.)

Kongre ve Sempozyumlar:

2006 Türk Pedodonti Derneği VI. Ulusal Sempozyumu

- Endodontik Tedavi Uygulanmış Süt Dişlerinde Üç Farklı Materyalin İntrakoronal Sızıntı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi (Poster Sunumu)
- Farklı Kalınlıklarda Uygulanan Mineral Trioxide Aggregate (MTA)'ın İntrakoronal Sızıntı Üzerindeki Etkiliğinin Değerlendirilmesi (Poster Sunumu)

2005 Türk Pedodonti Derneği 14. Ulusal Kongresi

- Retine Süt Molar Dişlerin MTA ile Kök Kanal Tedavilerinin Yapıldığı Bir Olgu Sunumu (Poster Sunumu)

2004 Türk Pedodonti Derneği V. Ulusal Sempozyumu

- Çocuklarda Postoperatif Ağrı Oluşumu ve Analjezik Kullanımı (Poster Sunumu)

Sertifikalar:

- 2006 Dentsply Maillefer Endodontic Rotary System Kursu
- 2006 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Transmisyon Elektron Mikroskobu Kursu