T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT DİŞİ PERİODONTAL LİGAMENTİ VE PULPASINDA OSTEOPROTEGERİN VE RANKL PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONUNUN ENZİM İMMÜNO HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Sibel YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

KONYA-2008

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜT DİŞİ PERİODONTAL LİGAMENTİ VE PULPASINDA OSTEOPROTEGERİN VE RANKL PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONUNUN ENZİM İMMÜNO HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Sibel YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06102030 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2008

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na Yardımcı Doçent kadrosuyla öğretim üyesi olarak atanmamın hemen ardından, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından desteklenen projelerim neticesinde, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nde, Türkiye'nin dişhekimliği fakültelerindeki ilk çok disiplinli Araştırma Merkezinin, Dental Histoloji birimini kurmamla birlikte başlamıştır. Bu ağır sorumluluğun altından, bir dişhekimi olarak aldığım eğitimin tamamıyla dışında olan histoloji eğitimini alarak ve bir dental histolog olarak başlangıç niteliğindeki araştırmaları yapabilecek hale gelerek kalkabileceğimi düşündüğümden, bu ikinci doktoraya başlamayı bir yükümlülük addettim. Kendi doçentliğimden önce iki doktorant mezun etmek, ardından doçentlik sınavını geçmek ve ardından bir doktorant daha mezun etmekle şimdi sırası gelen doktora tezimi gerçekleştirmemde emeği geçen herkese içten teşekkürü bir borç bilirim. Özellikle Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nin var olması ve yaşatılmasında emeği geçen herkese.

Araştırmalarımda beni yönlendiren danışmanın Prof. Dr. İlhami Çelik'e, tez çalışmamı (06102030) ve Araştırma Merkezimiz Dental Histoloji biriminin kurulmasına sebep olan 2002/107 ve 2002/191 no'lu projelere destek veren Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne, Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Emrah Sur ve Yrd. Doç. Dr. Yasemin Öznurlu'ya ve Araştırma Görevlisi Vet. Tuğba Telatar'a doktoram boyunca benden hiçbir yardımı ve paylaşımı esirgemedikleri için, Araştırma Merkezimiz teknisyenleri Sayın Niyazi Dündar'a ve Buket Bozkurt'a titiz ve fedakar çalışmaları ve bilimsel heyecanları nedeniyle, tezimin istatistiksel analizlerinde ve aslında her türlü çıkmazımda bana destek veren Selçuk Üniversitesi İletişim Fakültesi öğretim üyesi İletişim Sosyoloğu Sayın Doç. Dr. Abdullah Koçak'a, manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Tümleniş aileme ve aileme ve bu yola çıkmamda teşvikini ve desteğini esirgemeyen, dişhekimliği temel bilimlerinin idealini her an diri tutan Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Gazi Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Tülin Oygür'e gönülden teşekkür ederim. Bu tezin ülkemiz dişhekimi araştırmacılarına ışık tutmasını dilerim.

İÇİNDEKİLER Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR iii
1. GİRİŞ 1
1.1 Diş Sistemi ve Okluzyonun Gelişimi 2
1.2 Süt Dişlerinde Kök Rezorpsiyonu 4
1.3 Süt Dişi Kök Rezorpsiyonunun Histolojik Özellikleri 5
1.4 Süt Dişi Kök Rezorpsiyonunun Biyolojik Mekanizmaları 7
1.5 Odontoklastik Rezorpsiyon Mekanizmaları 8
1.6 Süt Dişinin Fizyolojik Rezorpsiyonunda Yer Alan Hücresel Mekanizmalar 12
1.7 Odontoklastogeneziste Rol Oynayan Moleküller 13
1.8 RANKL 20
1.9 OPG 26
1.10 RANKL/OPG Oranı ve Aktiviteleri 30
1.11 Osteoimmünolojide RANKL ve OPG'nin Rolü 32
1.12 Fizyolojik ve Patolojik Kemik Rezorpsiyonunda RANKL ve OPG'nin rolleri 34
2. GEREÇ VE YÖNTEM 40
2.1 Histolojik Takip İşlemleri 41
2.2 Boyama 44
2.3 Kontrol boyamaları 45
2.5 İstatistik Analizleri 46
3. BULGULAR 48
3.1 Histolojik Değerlendirmeler 48
3.2 TRAP Histokimyası 59
3.3 RANKL İmmunohistokimyası 62
3.4 OPG İmmunohistokimyası 65
3.5 Kontroller 65
4. TARTIŞMA 68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 84
6. ÖZET 87
7. SUMMARY 90
8. KAYNAKLAR 89
9. ÖZGEÇMİŞ 101

KISALTMALAR

AP: Activator protein

cAMP: cyclyc AMP

Cbfa-1: core-binding factor a1 (AML-3, Pebp2aA, Runx2)

CREB: cyclic AMP response element-binding protein

IFN: Interferon

IL: Interleukin

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JNK: Jun N-terminal kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

M-CSF: Macrophage-colony stimulating factor

NF: Nuclear factor

NFAT: Nuclear factor of activated T cell

OPG:Osteoprotegerin

PKA: Protein kinase A

PTH: Paratiroid hormone

PTHrP: Paratiroid hormone related peptid

RANK: Receptor activator of nuclear factor κB

RANKL:Receptor activator of nuclear factor κB ligand

TNF:Tumor necrosis factor

TRAF: TNF receptor-associated factor

1. GİRİŞ

Süt dişleri çiğneme, konuşma ve yüz estetiğinde çok önemlidirler ve bunların tümü çocuğun hayatının kalitesi ve yetişkin bir birey olarak sağlıklı yaşamı için kritik konulardır. Çiğneme fonksiyonunun kaybedilmesi baş, yüz ve çene kemiklerinde ağrıya sebep olabilirken, dişlerin kapanış problemleri yetişkin dönemde alt ekstremitenin dinamik dayanıklılığı, çeviklik ve denge fonksiyonu ile bile yakından ilişkilidir (Yamaga ve ark. 2002, AB Dişhekimliği Pratiği 2004, Miura ve ark. 2005, Siccoli ve ark. 2006). Toplumumuzda çok küçük yaşlardan itibaren gözlenmeye başlanan ağız-diş problemleri, normal yaşam düzenindeki aksaklıkların yanı sıra pahalı tedavilerinin getirdiği maddi yük ile ülkemiz için önemli bir problemdir.

Süt dişleri, okluzal mekanik travma, enfeksiyöz ve iltihabi pulpal/periapikal ve/veya periradiküler süreçler sonucunda patolojik kök rezorpsiyonu ile erken kaybedilebilmektedirler. Diğer taraftan yerel veya sistemik karakterdeki bilinen ve bilinmeyen pek çok sebeple süt dişlerinin erken kaybı veya düşmelerinde gecikme sık gözlenen bir durumdur (Kuşgöz, 2005). Süt dişlerinin ağızda kalma süreleri ve bu sürede işgal ettikleri konumdaki bu tarz değişiklikler, stomatognatik sistemi bir bütün olarak etkileyen en önemli etiyolojik faktördür (Bolan ve de Carvalho Rocha 2007).

Diğer taraftan insan süt dişlerinin dökülmesine neden olan fizyolojik kök rezorpsiyonu mekanizmaları açısından, diş sürmesi kadar ilginç bir olaydır. Dökülme, fizyolojik bir olay olmakla birlikte, her türlü kök rezorpsiyonunun odontoklastlar adı verilen osteoklast benzeri hücrelerce yürütüldüğüne dair veriler, osteoklastlar ve odontoklastlar arasında histokimyasal ve moleküler özellikler açısından bir farklılık olmadığını ifade etmektedir. Bu durumda süt dişi kök rezorpsiyonu gerek dişhekimliğinde, gerekse tıbbın kemik sağlığı ile ilgili pek çok alanında önemli bir çalışma modeli oluşturmaktadır. Bununla birlikte fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında insan odontoklastlarının rezorbe edici aktiviteleri ve farklılaşmalarında (odontoklastogenezis) yer alan işlevsel faktörlerin belirlenmesi çabalarının geçmişi oldukça yenidir. Yakın zamanda osteoklastogenezisin moleküler mekanizmalarının işletilmesinde yer alan üç ayrı sitokin-benzeri molekül tanımlanmıştır. Bu moleküllerden ilki olan nükleer faktör kappa B'nin reseptör

aktivatörü olan RANK (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B) ilk olarak dendritik hücre cDNA kütüphanesinde tanımlanan bir tip 1 membran reseptörü olarak karakterize edilmiştir (Anderson ve ark. 1997). RANK'ın fizyolojik ligandı RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand) birincil olarak lenfoid dokularda ve T hücre hatlarında eksprese olan bir tip II transmembran proteinidir (Yasuda ve ark. 1998). Üçüncü protein ise RANKL'ın biyolojik etkilerini sınırlayan bir tür tuzak (decoy) reseptör olarak fonksiyon gören osteoprotegerindir (OPG) (Tsuda ve ark. 1997). OPG ve RANKL ikilisi osteoklast formasyonu ve fonksiyonunun anahtar düzenleyicileri olarak ifade edilmektedirler. Tüm genetik ve fonksiyonel çalışmalar RANKL-RANK sinyallemesi ve biyolojik olarak aktif OPG seviyesi arasındaki dengenin osteoklastların gelişimi ve aktivasyonunuyla ve kemik metabolizmasını düzenlediğini göstermektedir (Wittrant ve ark. 2004).

Tüm bu sebeplerle bu tez kapsamında, odontoklastik hücreler üzerinde *in situ* çalışma fırsatı sağlayan fizyolojik veya patolojik kök rezorpsiyonuna uğrayan insan süt dişleri kullanılarak OPG ve RANKL'ın rezorpsiyon süreçlerindeki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla OPG ve RANKL'ın rezorbe olan süt dişi dokularındaki spesifik lokalizasyonları çeşitli endikasyonlarla çekilmiş dişlerin dokuları üzerinde enzim ve immünhistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi öngörülmüştür.

1.1. Diş Sistemi ve Okluzyonun Gelişimi

İnsanda genetik olarak programlanmış iki dentisyon bulunmaktadır. Bu dentisyonlardan ikincisi olan daimi dentisyon yüksek oranda farklılaşmış bir fizyolojik fenomenle süt dentisyonunun yerini almaktadır. Bu değişiklik, süt dişlerinin köklerinin fizyolojik rezorpsiyonu ile başlamaktadır. Bu süreç sonunda süt dişleri yerlerini, altlarından eş zamanlı olarak süren daimi dişlere bırakmaktadırlar. Bu durumda insanda dentisyon, süt, karma ve daimi olmak üzere üç evreden geçmektedir (Bolan ve de Carvalho Rocha 2007).

Dişlerin yer alacağı diş kavisleri gelişimine doğum öncesi dönemde başlar. Ondört haftalık bir fetüste dişeti kavsi tamamlanmış durumdadır. Çene kemiği içinde dişler doğum öncesi gelişimine başlamıştır. Doğum anında gerek üst gerekse alt çene

içinde değişik gelişim safhalarında dişler bulunmaktadır. Bu dişlerin kalsifikasyon safhaları intrauterin hayatın 4-6. haftalarında başlar (Gülhan 1994, McDonald ve Avery 1994).

Çocuk süt dişlerini çıkarmaya başladığı ilk 6 aylık döneme kadar dişsizdir. Diş kavisleri üzerinde ilk süren dişler alt orta kesicilerdir ve sonra sol orta kesici, üst yan, alt yan kesiciler sırasıyla sürerler. Birinci yıl sonunda bütün süt dişi kron gelişimleri tamamlanmıştır. Ayrıca 1. yılda daimi 1. azı kronları gelişmiştir. Dişler okluzyon hattına hareket etmeye başlamıştır. Yaklaşık 15. ayda alt çenede sürmeye başlarlar; 3-5 ay sonra da süt kaninler sürerler. İki yaşında süt dişi dizisini tamamlamak üzere 2. süt azılar sürmeye başlamıştır. Bu yaşta süt kesicileri kök formasyonu tamamlanmıştır. Süt kanin ve 1. azıların da kök formasyonları hemen hemen tamamlanmak üzeredir. Bu dönemde, yani 2. üst azılar sürerken, bazı çocuklarda 2. daimi azıların gelişen germleri görülebilir. İki buçuk-üç yaş civarında süt dişlerinin sürmeleri tamamlanır ve dişler tamamen fonksiyona girerler. Altı-yedi yaş arası dönemde 1. daimi azılar sürerler. Karışık dişlenmeye geçişte 6 yaş dişlerini süt dişlerinin yerini alacak olan diğer daimi dişler takip eder (Avery 2000, Alaçam 2000, Gökalp 2000, Gülhan 1994, Hall 1994).

Süt dişleri fonksiyonda oldukları süre zarfında gençlik, olgunluk ve yaşlılık dönemlerinden geçmektedirler. Buna göre bir süt dişinin gençlik dönemi, sürmeden, kökün tamamlanmasına kadar olan süreyi tanımlar. Genelde süt dişlerinin kökleri ağızda dişler göründükten sonra bir yıl içerisinde tamamıyla kapanmaktadır. Olgunluk dönemi, kök formasyonunun bitiminden, fizyolojik rezorpsiyonun başladığı zamana kadar olan süreyi içermektedir. Yaşlılık dönemi ise fizyolojik rezorpsiyonun başlangıcından daimi dişin sürmesine kadar olan süreyi ifade etmektedir. Süt dişlerinin ağız içindeki görevleri, süt kesicilerin 6-7 yaş, birinci süt azıların 9-10 yaş, süt kaninlerin 10-12 yaş ve ikinci süt azıların 10-12 yaşlar arasında eksfoliye olmalarıyla (dökülmeleriyle) tamamlanmaktadır. Böylece süt dentisyonunun 2-8 yaşlar arasında fonksiyon görmesini takiben, 8-12 yaşlar arasındaki karma dişlenme evresi, süt dişlerinin köklerinin bir kısmının rezorbe olurken daimi diş köklerinin bir kısmının formasyon safhasında olduğu ilginç bir evre olarak karşımıza çıkmaktadır. Böylece 4 sene kadar bir dönemde çenelerde

yaklaşık 50 adet diş mevcuttur (Avery 2000, Alaçam 2000, Gökalp 2000, Gülhan 1994, Hall 1994).

1.2. Süt Dişlerinde Kök Rezorpsiyonu

Süt dişlerinin dökülmesine yol açan kök rezorpsiyonu, altlarında gelişmekte olan daimi dişlerin ağız boşluğuna sürmesiyle sonuçlanan fizyolojik bir olgudur. Süt dişinin kök rezorpsiyonu kökün daimi dişe en yakın olduğu yerden başlar. Örneğin ön dişlerde süt dişinin altındaki daimi dişin kronu, üzerindeki süt dişinin kökünün apikal üçlüsünün lingualinde yer alır. Daimi dişin sürme hareketi labial ve insizal doğrultudadır ve bu sebeple ilk önce, süt dişi kökünün apikal üçlüsünün lingual yüzeyinin rezorpsiyonuna sebep olur. Labial yüzey de rezorbe olduğunda, daimi diş süt dişi kökünün altındadır. Bu andan sonra, rezorpsiyon insizal doğrultuda horizontal olarak ilerler; sonunda süt dişi düşer ve daimi diş oral kaviteye sürer. Bazı durumlarda, daimi alt kesiciler sürme sırasında labiale doğru yeterince ilerlemezler ve ağızda bu şekilde belirirler. Bu durum, süt kesicilerin köklerinde tam olmayan veya gecikmiş rezorpsiyona yol açar ve daimi kesicilerin hala ağızda yer alan süt kesicilerin lingualinde sürmesine yol açar (Harokopakis-Hajishengalis 2007, Avery 2000).

Süt büyük azı alanında gelişmekte olan daimi dişler de aynı şekilde üstlerindeki süt dişinin lingualinde yer alırlar. Büyüme ilerlerken, gelişmekte olan daimi diş, süt dişlerinin geniş açılı kökleri altına yerleşir. Follikülün pozisyonu ve boyutları kök rezorpsiyonu modelini etkiler. Süt dişi köklerinin birinde veya birkaçında herhangi bir anda %36 oranında düzensiz rezorpsiyon görülmektedir. Alt süt ikinci büyük azının kökleri oldukça kavisli ve ıraksaktır; kökler arası uzaklık altındaki follikülün boyutundan daha geniştir. Follikülün pozisyonuna bağlı olarak kökler farklı etkiler altında kalabilir. Bu durum alt ikinci büyük azıların üçte birinde görülen düzensiz kök rezorpsiyonunu açıklayabilir. Üst süt azılarının %56'sında palatal kök rezorpsiyonu diğer köklere göre daha az rezorpsiyon gösterir. Düzensiz kök rezorpsiyonu insidansı süt birinci azılar için daha düşüktür ve bu durumun muhtemel nedeni olarak kökler arası mesafenin daimi diş kronu boyutuyla uyumlu olması gösterilmektedir (Harokopakis-Hajishengalis 2007, Avery 2000, Prove ve ark. 1992).

Süt dişi kök rezorpsiyonuna başlangıçta, daimi diş follikülünün etrafındaki kemik tavanının iç tarafındaki rezorpsiyona, tavanın dış duvarında apozisyonla cevap gelmektedir. Bununla birlikte rezorpsiyonun hızı apozisyondan fazla olduğunda, süt ve daimi dişler arasındaki kemik bölme gittikçe incelmekte ve ortadan kalkmaktadır. Kemiğin ortadan kalkması ile yerini bir granülasyon dokusu almaktadır. Böylece daimi dişin kuronu, süt dişinin kökü ile ilişkiye geçmektedir. Süt dişi kökünün fizyolojik rezorpsiyonu tam olarak bu evrede başlamaktadır (Avery 2000, Gülhan 1994).

1.3. Süt Dişi Kök Rezorpsiyonunun Histolojik Özellikleri

İnsan süt dişinin eksfoliasyonu sırasındaki fizyolojik rezorpsiyonla ilgili histolojik değişiklikler oldukça ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Hopewell-Smith 1930, Kronfeld 1932, Furseth 1968, Rölling 1981, Sasaki ve ark. 1988).

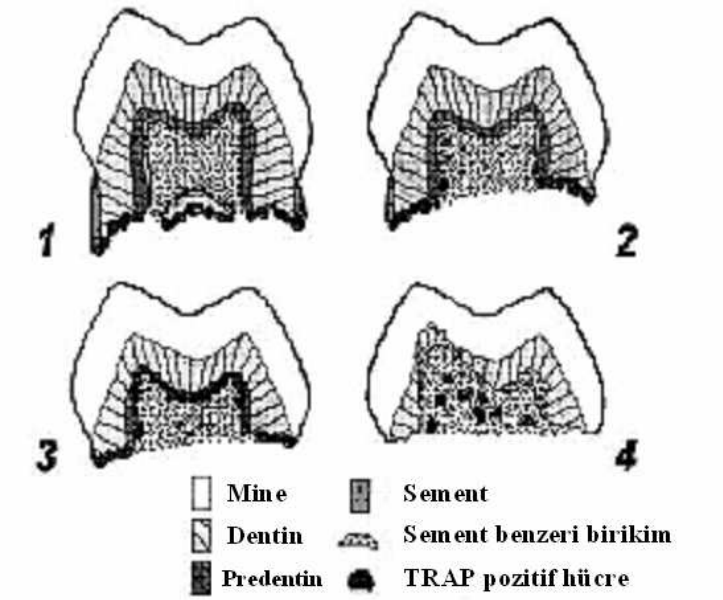
Süt dişlerinde kök rezorpsiyon süreci 4 evrede incelenmektedir:

1. Aktif kök rezorpsiyonu evresinde içinde odontoklastların bulunduğu bir Howship lakününü çevreleyen dentinde, 0.5 µm derinliğine inen bir demineralizasyon alanı oluşmaktadır. Bu bölgede, organik matriksin tamamen yıkıldığı görülmektedir. Bu durum dentinin organik ve inorganik kısımlarının aynı zamanda yıkıldığını kanıtlamaktadır. Bu yıkım bölgesi çevresindeki dentinde de birtakım değişiklikler gözlenmektedir (Manisalı ve Koray 1982, Sasaki 1990, Avery 2000).

2. Dinlenme evresinde odontoklastların ortadan kalkmasını takiben diğer genç odontoklastlar hemen belirmemektedir. Rezorpsiyon olayının durduğu ve ortamda odontoklastların bulunmadığı bu ara dönemde, rezorpsiyon sırasında açığa çıkan doku kristalleri ya da iyonlar daha derin tabakaların dentin kanalları içine yeniden tuz kompleksleri olarak çökelmekte ve bu kanalları tıkamaktadırlar. Böylece pulpa dokusu dış etkenlerden korunmuş olmaktadır (Manisalı ve Koray 1982, Sasaki 1990).

3. Hücresel sement oluşumu ile karakterize kök tamirinin gözlendiği evrede rezorpsiyon durduğundan, sementoblastlar presement olarak adlandırılan ve çok hafif mineralizasyon gösterebilen bir doku salgılama fırsatını yakalarlar (Sasaki 1990). Bu verilerden süt dişi kök rezorpsiyonunun sürekli olmayıp dinlenme periyotlarına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Rezorpsiyon ilerlerken bir taraftan da onarım gerçekleşmektedir. Bu iki proses arka arkaya değil aynı zamanda meydana gelmektedir. Bu iki farklı olay odontoklast hücresinin ömrü ile ilgilidir. Bir odontoklast hücresi 24 saatten birkaç güne kadar yaşar. Odontoklast hücresinin ölümü ile de o noktadaki rezorpsiyon duraklar ve bu evrede rezorbe kök yüzeyinde sementum depolanması gözlenir (Yawaka ve ark. 2003).

4. Son evre olan dördüncü evrede eksfoliye olmaya yakın süt dişlerinde rezorpsiyon süreci söz konusudur. Histolojik kriterlere göre eksfoliye olmaya yakın bir süt dişinde ise şu evreler görülmektedir (Sahara ve ark. 1992a) (Şekil 1.1):



Şekil 1.1. Eksfoliye olmaya yakın süt dişlerinde rezorpsiyon süreçleri. Tartrata dayanıklı asit fosfataz (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP) enzimi odontoklastların ve öncüllerinin histokimyasal olarak teşhis edilebilmesi için kullanılan özel bir belirleyicidir. TRAP pozitif hücrelerin varlığı, o bölgede rezorpsiyonun başladığı anlamına gelmektedir. (Sahara ve ark.1992a).

Rezorpsiyon öncesi evre: Pulpa odasının duvarları odontoblast tabakası ile kaplıdır ve çok çekirdekli odontoklastlar pulpa odasında bulunmamaktadırlar.

Erken rezorpsiyon evresi: Çok çekirdekli odontoklastlar pulpa odası duvarında bulunmaktadır. Fakat pulpa odasının geri kalan yüzeyi odontoblast tabakası ile kaplıdır.

Geç rezorpsiyon evresi: Odontoblast tabakası kalkmıştır ve pulpa odasının tüm yüzeyi çok çekirdekli odontoklastlar ile çevrilidir.

Final rezorpsiyon evresi: Pulpa odasının rezorbe dentin yüzeyi kısmen veya tamamen sement benzeri doku ile tamir edilmektedir (Sahara ve ark.1992a).

Kök rezorpsiyonu tamamlanan süt dişi, alttaki daimi dişin itmesi ve çiğneme baskısı ile aşırı sallanmaya başlar ve kısa bir süre sonra eksfoliye olur (Avery 2000, Gülhan 1994, Sahara 1992b). Düşen süt dişinin yerinde spontan olarak bir fizyolojik yara meydana gelir. İnsan süt dişi doğal olarak döküldüğünde dişetinde çok az bir kanama görülür ve bu alandaki iyileşme, diş çekiminden sonraki iyileşmeden daha hızlıdır (Sahara ve ark. 1993).

Sahara ve ark. (1993) insan süt dişlerinde, dişeti epiteli ve diş-dişeti birleşiminin süt dişi dökülmesinde önemli bir rol oynayabileceğini önermişlerdir. Süt dişi kökleri bütünüyle rezorbe olunca dişeti oluğu epiteli rezorbe yüzeyler boyunca içeri doğru prolifere olarak ve rezorbe diş yüzeyini alttaki osteoklast kapsayan rezorbe edici bağ dokusundan ayırır. Böylece süt dişi kronu, araya epitel dokusunun girmesi ile oral kaviteden ayrılır ve düşer. Bu epitelize yüzey kısa sürede komşu dişeti dokusunun marjinal epitelyal elemanlarının proliferasyonu ile kuvvetlenir. Genellikle dişin düşmesinden 1-2 gün gibi çok kısa bir süre sonra bu kısımda daimi diş belirir (Gülhan 1994).

1.4. Süt Dişi Kök Rezorpsiyonunun Biyolojik Mekanizmaları

Süt dişlerinin eksfoliye olma zamanlamaları ile daimi dişlerin ağızda görülmeleri açısından ağzın sağı ve solu arasındaki simetri ve uyum gerçekten büyüleyicidir. Süt dişlerinin düşmesi ve daimi dişlerin sürmesinin birbirinin eşi olan programlanmış olaylar oldukları düşünülmektedir (Harokopakis-Hajishengalis 2007).

Süt dentisyonunda kök rezorpsiyonu, süt dişlerinin düşmesiyle sonuçlanan fizyolojik bir olaydır. Bu süreci etkileyen faktörlere ilişkin pek çok teori önerilmiş olsa da hiçbiri sebep ve sonuç ilişkisini açık bir şekilde ortaya koyamamıştır. Sürmekte olan daimi dişin sebep olduğu basınç, mekanik okluzal travma ve iltihabi süreçlerin tümü bu süreçteki rolleri açısından değerlendirilmiştir (Obersztyn 1963, Furseth 1968).

1.4.1. Sürmekte Olan Daimi Dişin Basıncı

Sürmekte olan daimi dişin basıncının rezorpsiyonu ateşlediğine inanılmaktadır, bununla birlikte daimi dişin varlığı bu sürecin oluşmasında gerekli değildir. Altında daimi diş olmayan süt dişleri eksfoliasyon zamanları normalden geç de olsa nihayetinde rezorbe olmaktadırlar. Bu durum süt dişi altındaki daimi dişlerin rezorpsiyon prosesinde direkt bir etkileri olmadığını göstermekle birlikte daimi dişin sürme hareketi süt dişi rezorpsiyonunun doğrultusunun saptanmasında en önemli rolü oynamaktadır (Manisalı ve Koray 1982, Gülhan 1994).

1.4.2. Endokrin Fonksiyonların veya Beslenmenin Rolü

Daimi dişin erüpsiyon süreci endokrin bezlerinin (hipofiz, timus, tiroid bezleri) fonksiyonlarından veya yetersiz beslenmeden (kalsiyum ve magnezyum, vitamin A, C ve D eksikliği) etkilenmektedir ve bu sebeple bu faktörlerin süt dişi kökünün rezorpsiyon süreci üzerinde dolaylı etkileri vardır. Hipotiroidizm, hipofizyal cücelik ve kronik beslenme yetersizliği durumları, muhtemelen daimi dişin erüpsiyonunda engelleme yarattıklarından süt dişinin düşmesini geciktirebilirler (Gülhan 1994, Alaçam 2000, Kjellberg 2000, Harokopakis-Hajishengalis 2007).

1.5. Odontoklastik Rezorpsiyon Mekanizmaları

1.5.1. Odontoklastların Hücresel Özellikleri

Süt dişinin eksfoliasyonu ile ilgili pek çok soru halen yanıtlanamamış durumdadır. Rezorpsiyon, sert dokuların yıkımı ve yıkılan maddelerin hücresel elemanlar tarafından ortadan kaldırılmasına dayanan dinamik bir olaydır. Fizyolojik,

patolojik ve idiyopatik olarak gelişebilen rezorpsiyon olayında süt dişi kökü rezorpsiyonu tamamen fizyolojik bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır. Süt dişi kökü ile gelişen ve süren daimi diş arasındaki kemiği rezorbe eden dokular, yüzeylerinde yapısal olarak osteoklastlara benzeyen çok çekirdekli dev hücreleri içerirler (Ne ve ark 1999, Rani ve MacDoughall 2000). Bu dev hücreler yıktıkları sert dokunun adı ile anıldıklarından ve süt dişi kök rezorpsiyonunda yıkılan doku dentin olduğundan burada söz konusu olan dev hücrelere odontoklast adı verilmektedir. Çok çekirdekli dev hücre odontoklast, süt dişlerinde kök rezorpsiyonunun ve dişlerin mineralize matriksinin rezorpsiyonunun hücresel aracısıdır (Furseth 1968, Freilich 1971, Manisalı ve Koray 1982, Ten Cate ve Anderson 1986, Sasaki ve ark. 1988).

Odontoklastların osteoklastlarla benzer yapı özelliklerine sahip oldukları gösterilmiştir (Furseth 1968, Freilich 1971). Her iki hücre tipi de pek çok mitokondri ve lizozom ile TRAP ve kalsitonin reseptörleri için pozitif olan pleomorfik çok çekirdekli hücreler olarak tanımlanırlar (Nicholson 1986). Bununla birlikte fizyolojik kök rezorpsiyonunun kemik remodelinginden daha farklı bir mekanizma ile düzenleniyor olma olasılığı söz konusudur. Ayrıca bu iki hücre tipi sadece değişik rezorpsiyon substratları nedeniyle birbirlerinden farklı görüldüklerinden olgunlaşma süreçlerinin benzer olduğu farz edilmektedir (Sasaki ve ark. 1988).

Kök rezorpsiyonu sadece fizyolojik bir olay olmayıp ortodontik tedavi, mekanik okluzal kuvvetler ve iltihap nedeniyle de oluşmaktadır (Obersztyn 1963). Bu şartlar altında, mononükleer öncü hücrelerin, dentin ve sementi rezorbe eden fonksiyonel odontoklastlara farklılaşma mekanizmaların belirlenmesi önem taşımaktadır ve günümüzde bu süreçle ilgili pek az bilgi mevcuttur. Odontoklastların sitodiferansiyasyonunun multinükleasyonu, sitoplazmik polarizasyonu, hücre-matriks tanınmasını, kıvrımlı kenar (*ruffled border)* gelişimini ve mineralize matriksin rezorpsiyonunu içerdiği düşünülmektedir (Sasaki ve ark. 1989).

Osteoklastların kökeni ve farklılaşmasına ilişkin pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonucu bildirilmiş olmasına rağmen odontoklast öncüleri ve bunların fonksiyonel odontoklastlara farklılaşmasına ilişkin çok az veri bulunmaktadır (Sahara ve ark. 1996). Osteoklastların hematopoietik hücrelerin füzyonu ve

farklılaşması ile şekillendiği iyi bilinmektedir. Bu sebeple odontoklastların da osteoklastların kaynağı olan hematopoietik hücrelerden türeyebileceklerine inanılmaktadır (Sasaki ve ark. 1988). Odontoklast ve osteoklast öncülerinin benzer ultrastrüktürel özelliklere sahip olmaları bu savı kuvvetlendirerek, odontoklastların pulpa odasına dolaşımla geldiklerini düşündürmektedir. Nitekim Sahara ve ark. (1996) pulpa odasında gözledikleri TRAP-pozitif tek çekirdekli hücrelerin görülmesinin genellikle kan damarları ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Sahara ve ark. (1996), odontoklast ve öncülerinin farklılaşmalarının ve fonksiyonlarının takip edilmesinde enzim histokimyasal ve sitokimyasal teknikleri uygulamışlar ve insan süt dişlerinin dökülmeden hemen önceki aşamalarında gözlenen koronal internal rezorpsiyonda odontoklastların hücresel farklılaşmalarının aşamalarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar internal rezorpsiyonda, rezorpsiyondan hemen önceki evrede, pulpa odasında TRAP-pozitif hücrelere rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bir önceki evrede ise predentin yüzeyinde TRAP-pozitif çok çekirdekli odontoklastlar tespit edilmeden önce, TRAP-pozitif tek çekirdekli hücrelerin görüldüğünü bildiren Sahara ve ark. (1996), predentin yüzeyiyle temasın bu tek çekirdekli hücrelerin çok çekirdekli odontoklastlara dönüşümünü sağlamış olabileceğini, dolayısıyla odontoklastların öncüleri olabileceklerini iddia etmişlerdir. Araştırmacılara göre bu tek çekirdekli hücrelerin ultrastrüktürel karakteristikleri preosteoklastların karakteristikleriyle benzemektedir (Sahara ve ark. 1993, 1996).

Bununla birlikte Sasaki ve ark. (1989) preodontoklastların çok çekirdekli hale gelmesinin dentin yüzeyinden uzakta gerçekleştiğini iddia etmektedirler. Nitekim yakın zamanda osteoklastların sadece rezorbe olmakta olan kemik yüzeylerinde de çok çekirdekli hale gelmedikleri, osteoklast benzeri hücrelerin, mineral matriks yokluğunda 1α, 1,25 dihidroksi vitamin D_3 ile muamele edildiklerinde çok çekirdekliliğin indüklendiğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (Sasaki ve ark. 1988). Tüm bu sonuçlar, odontoklastların çok çekirdeki hale gelmesinin mineralize matriks varlığında indüklenmeyip, muhtemelen bazı sitokinlerce düzenlendiğini düşündürmektedir (Sasaki ve ark. 1989).

1.5.2. Odontoklastik Rezorpsiyon

Odontoklast rezorpsiyon lakünalarında, süt dişlerinin rezorpsiyonuna yol açan kesin mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Fakat, insan süt dişi rezorpsiyonunda osteoklastik kemik rezorpsiyonunda olduğu gibi iki farklı sürecin geçerli olduğu bilinmektedir: diş sert dokusunun temel maddesi olan apatit kristallerinin ortadan kaldırılması ve ardından organik matriksin ayrıştırılması ve rezorpsiyonu (Obersztyn 1963, Furseth 1968, Freilich 1971, Ten Cate ve Anderson 1986, Sasaki ve ark. 1988). Bu durumda rezorpsiyon kemiğin organik ve inorganik matriksinin yıkımının görüldüğü ekstrasellüler faz ve yıkım ürünlerinin sindirildiği intrasellüler faz olmak üzere iki evrede gerçekleşmektedir (Jones ve ark. 1984).

Kıvrımlı kenara sahip odontoklastlarla dentinin rezorbe edilme sürecinde, dentin yüzeyindeki apatit kristallerinin kısmi demineralizasyonu ve ortama salınmaları ardından, kıvrımlı kenar ve endositik vakuoller yoluyla sülfatlanmış organik materyal ile serbestleşmiş apatit kristallerinin rezorpsiyonu gerçekleşmektedir. Osteoklastların kemik rezorbe edici davranışlarını başlatan uyaranlardan biri, kemiğin mineralize matriksiyle temaslarıdır. Araştırmalar, *in vitro* şartlarda, osteoblastların mineralize olmayan osteoid tabakasının kaldırılarak osteoklastik rezorpsiyon için mineralize kemik yüzeyini rezorpsiyona maruz bıraktığını göstermiştir (Chambers ve ark. 1984). *In vivo* şartlarda osteoblastlar için bu bulguların kanıtlanamamasına paralel olarak, Sahara ve ark. (1994) da odontoblastların, benzer şekilde, koronal dentin rezorpsiyonunun başlangıç fazında predentinin kaldırılmasında veya mineralizasyonunda herhangi bir rol oynamadığını göstermişlerdir. Bununla birlikte odontoblastların bozulması veya ortadan kaybolmasının, odontoklastların veya öncülerinin predentin yüzeyi ile başlangıç kontağından bağımsız olabileceği düşünülmektedir. Odontoblastlar birbirleriyle sıkı kontaktlarla ilişkide olduklarından, odontoklastların veya öncülerinin predentine ulaşabilmeleri için bu sıkı bağları kırmaları gerekmektedir. Bununla birlikte yapılan araştırmalarda, monosit, makrofaj ve lenfositlerden oluşan iltihap hücrelerinin pulpaya infiltrasyonunun çok çekirdekli hücrelerin predentin yüzeylerinde görülmesinden önce oluştuğu ve bu iltihap hücrelerinden bazılarının odontoblastlarla yakın temasta oldukları görülmüştür (Sasaki ve ark. 1992). Bu iltihabi hücrelerden salınan sitokinler, kompleman veya diğer faktörlerin odontoblastik dejenerasyona ve

ardından odontoklast farklılaşmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu bulguları destekleyerek Sasaki ve ark. (1992) pek çok sayıda çok çekirdekli odontoklastın mineralize olmayan predentin yüzeyinde lokalize olduklarını ve bu hücrelerin aktif olarak dentini rezorbe eden odontoklastlarla aynı ultrastrüktürel karakteristiklere sahip olduklarını göstermiştir.

Odontoklastların sağlam dentinle etkileşmeyip, sadece serbestleşmiş apatit kristallerine tutunma yeteneğine sahip olmaları nedeniyle, organik matriksten ekstrasellüler ortama apatit kristallerinin kısmi yer değiştirmesi ve/veya salınımı, bundan sonra gerçekleşecek olan hücresel rezorpsiyon için zorunlu bir süreçtir (Sasaki ve ark. 1988). Osteoklastik kemik rezorpsiyonu üzerinde daha önce yapılan immüno histokimyasal ve enzim histokimyasal çalışmalarda da, benzer şekilde, rezorbe olmakta olan kemik yüzeylerinden apatit kristallerini çözmede işlev gören asit fosfatazların salınımı ve ekstrasellüler ortamın asidifikasyonu için osteoklast-aracılı bir mekanizmanın bulunduğu gösterilmiştir (Baron ve ark. 1986). Bununla birlikte rezorbe olan alanda odontoklastların bir asit mikro-çevre üretmelerinin mekanizması henüz belirlenememiş olmasına rağmen, kökleri periodontal yüzeyden rezorbe olmaya başlayan süt dişi dentininin rezorpsiyon yüzeylerinde gevşek şekilde dizilmiş apatit kristallerinin bulunması, odontoklastların rezorpsiyon sahasında asidik pH'ya sahip lokalize bir alan oluşturabilmesine imkan sağladığı düşünülmektedir. Odontoklastların, insan süt dişlerinin dentininde fizyolojik kök rezorpsiyonu boyunca kısmi ekstrasellüler yıkıma yol açtıkları ve takiben serbest kalan apatit kristallerinin çözünmesini ve rezorpsiyonunu ayarladıkları düşünülmektedir (Sasaki ve ark. 1988).

1.6. Süt Dişinin Fizyolojik Rezorpsiyonunda Yer Alan Hücresel Mekanizmalar

Kemiği rezorbe eden osteoklastların farklılaşması ve aktivitesi sitokinleri ve büyüme faktörlerini içeren çok sayıda faktörle düzenlenmektedir (Lerner 2000, Titelbaum 2000, Vaananen 2000). Bununla birlikte odontoklastların kök rezorpsiyonunu düzenleyen birtakım faktörleri üretip üretmedikleri bilinmemektedir. Ayrıca, perikoronal follikülde üretilen maddeler, apoptozis olayı, kemik multisellüler üniteleri, süt dişi periodontal ligamenti ve/veya alveol kemiği tarafından üretilen moleküller ve süt dişi pulpası tarafından üretilen maddeler de süt dişi

rezorpsiyonundaki olası rolleri açısından araştırılmaktadır. Bu anlamda üzerine en fazla rol atfedilen etmenler arasında periodontal ligament hücrelerinin davranışı, süt dişi pulpasının olası rolleri ve kök rezorpsiyonunu stimule veya inhibe eden moleküller yer almaktadır.

1.7. Odontoklastogeneziste Rol Oynayan Moleküller

1.7.1. Odontoklastogenezise Bir Model Olarak Osteoklast Formasyonu ve Aktivasyonunun Düzenlenmesi

1.7.1.1. Osteoklast Farklılaşması ve Fonksiyonunun Moleküler Mekanizmaları

Dişler, tendonlar ve kıkırdak gibi diğer dayanıklı yapılardan farklı olarak kemik, remodeling süreci ile sürekli olarak yenilenir. Yetişkin iskeletinde herhangi bir anda en az 1 milyon adet, osteoklastlar tarafından trabeküler ve kortikal kemiğin yüzeyinde oluşturulmuş olan mikroskobik remodeling odakları bulunur. Bu sürecin temel fonksiyonunun normal aşınma ve yaşlanma sonucunda eskimiş ve aşınmış kısımların ortadan kaldırılması ve fizyolojik ihtiyaçlara bir adaptasyon mekanizması olduğu düşünülmektedir. Oldukça düzenli bir devamlılık gösteren bu sürecin başlamasını, ilerlemesini ve kesilmesini kontrol eden moleküler mekanizmalar henüz yeterince anlaşılmamıştır (Boyce ve Xing 2007).

Kemik remodelinginin düzeni, kemik rezorpsiyonunu stimule veya inhibe etme yeteneğinde olan hormonların seviyelerinde değişikliklere yol açan postmenapozal osteoporozda ve romatoid artritte veya çeşitli patolojik şartlarda bozulur. Rodan ve Martin 1980'lerin başlarında osteoblastların osteoklast aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkilerini göstermişlerdir (Rodan ve Martin 1981). Böylece kemik içinde osteoblastlar tarafından eksprese edilen paratiroid hormon (PTH) gibi faktörlerin, kemik rezorpsiyonunun bilinen stimülatörlerine cevaben üretildiği anlaşılmıştır. Daha sonra 1990'ların ortalarında RANKL/RANK/OPG sinyalleme sisteminin tanımlanması bu süreçlerde osteoblastlar tarafından oynanan rolün açıklığa kavuşturulmasında önemli bir adım atılmasına yol açmıştır. Daha yakın zamanda osteoklastların sadece kemik üzerinde küçük çukurlar kazan hücreler

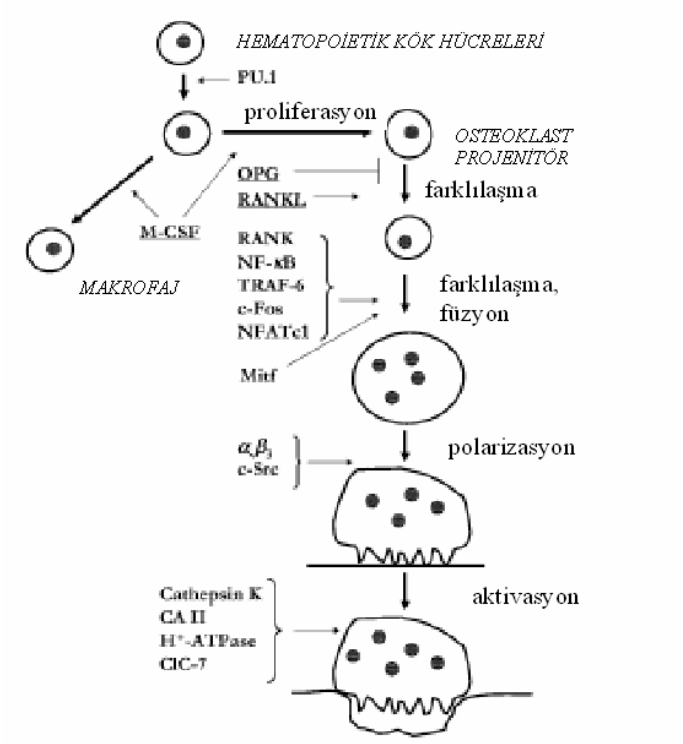
olmayıp, patolojik durumlarda immünomodülatör olarak davranarak önemli düzenleyici fonksiyonlara sahip olabileceği ve aynı zamanda osteoblast fonksiyonlarını da düzenleyebileceği açıklığa kavuşmuştur (Martin ve ark. 2005).

1.7.1..2. Osteoklast farklılaşması

Tek çekirdekli osteoklast ata hücreleri hematopoietik dokularda bulunan kök hücrelerden köken alırlar. Bu hücreler dolaşıma katılan tek çekirdekli öncü hücrelere farklılaşırlar ve ardından bilinmeyen birtakım mekanizmalarla kemik yüzeyini kaplayan periosteum ve endosteuma girerler. Müteakiben, bu öncü hücreler daha ileri düzeyde farklılaşma göstererek nihayetinde kemik yüzeyinde çok çekirdekli osteoklastlara dönüşmek üzere kaynaşırlar. Kemik yüzeylerinde bulunan osteoklastların dolaşım yoluyla kemik iliği içinden kemiğe ulaşıp ulaşmadıkları veya osteoklast öncü hücrelerinin kemik iliği kavitesinden kemik yüzeyine basitçe göç edip etmedikleri tam olarak anlaşılamamıştır. Kemiğin yerel çevresi kemik iliğinin *ex vivo* kültürleriyle veya stromal hücreler/osteoblastların dalak hücreleriyle veya periferal kanın tek çekirdekli lökositleriyle birlikte kültüre edilmeleriyle taklit edilebilir. Bu tür sistemlerde, kültüre edilmiş osteoklast öncü hücreleri farklılaşmak ve ardından fonksiyonel olarak aktif çok çekirdekli osteoklastları oluşturmak için kaynaşmak üzere örneğin paratiroid hormonla veya 1,25$(OH)_2$-vitamin D3 ile uyarılabilir. Farelerde gerçekleştirilen gen delesyon çalışmaları osteoklast ata hücrelerinin fonksiyonel olarak aktif olgun osteoklastlara dönüşümü için transkripsiyon faktörlerinin, hematopoietik sitokinlerin, hücre yüzey reseptörlerinin, proteolitik enzimlerin, fosfatların, reseptör bağlantılı moleküllerin ve kinazların aktive edilmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerden bazıları stromal hücre/osteoblastlar tarafından, diğerleri ise osteoklast öncü hücreleri tarafından eksprese edilmektedir (Şekil 1.2) (Lerner 2000, 2004).

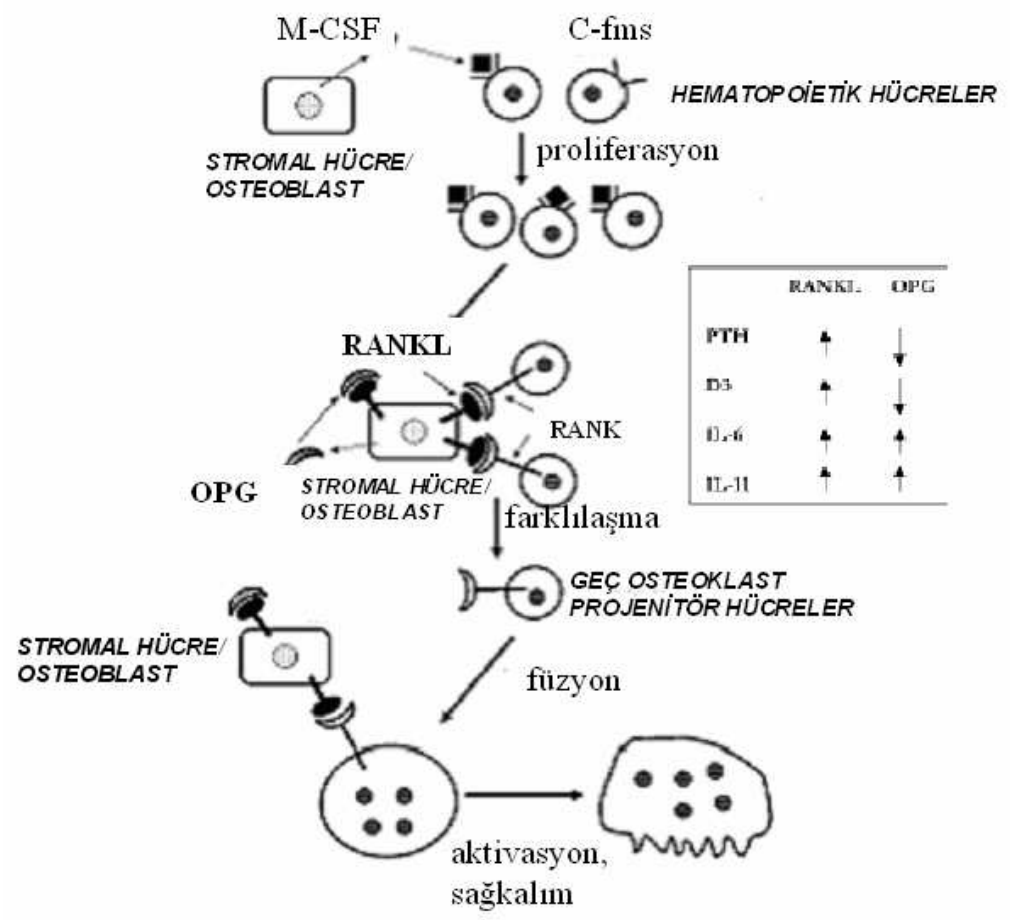
Tek çekirdekli osteoklast ata hücrelerinin olgun osteoklastlara farklılaşması çok çekirdekli hücreleri oluşturmak üzere kaynaşmayı ve kemik yüzeyini örtme kuşağının ve kıvrımlı kenarın gelişmesi için gerekli olan hücre membranının polarizasyonunu gerektirir (Şekil 1.3). Örtme kuşağında osteoklastların kemik ekstrasellüler matriksine yapışmasının F-aktin halkasının varlığıyla ilişkili olduğu ve

tercihen örtme kuşağı alanında eksprese olan integrin αvβ3 ve osteopontin ve kemik sialoproteinindeki RGD sekansı ile ayarlandığı önerilmiştir (Lerner 2004).



Şekil 1.2. Osteoklast öncü hücreleri monosit/makrofajlarla yakından ilişkilidir ve ilk proliferasyon/farklılaşma ortak sinyalleme yolları tarafından kontrol edilir. Bununla birlikte,osteoklast-özgün hattın farklılaşmasında, füzyonunda, polarizasyon ve aktivasyonunda pek çok hücre dışı ve içi sinyalleme molekülleri görev alır. Bu moleküllerden bazıları osteoklastlarda veya ata hücrelerinde (italik olarak gösterilmiştir) ve bazı stromal hücre/osteoblastlarda eksprese edilmektedir (Lerner 2004).

Kemiğe yapışan ve kıvrımlı kenar geliştirerek tam olarak farklılaşmış bir çok çekirdekli osteoklastın kemiği rezorbe etme aktivitesi hidroksiapatit kristallerinin çözünmesi ve kemik matriks proteinlerinin enzimatik olarak ayrıştırılması için mekanizmaları içerir. Bu süreç, kıvrımlı kenardaki vakuoler tip H^+-ATPaz ile ayarlanan proton sekresyonu ile başlar. Bu proton pompası ile, Howship resorpsiyon lakününde yaklaşık 4-5 arasındaki değerlerde bir pH oluşturulur ve kemik minerali çözünür hale gelir. Asit salgısının elektronötralitesi için osteoklastik kıvrımlı kenar membranlarında H^+-ATPaz ile birlikte klorid kanalları da bulunmaktadır (Lerner 2000, 2004).



Şekil 1.3. Osteoklastlar hematopoietik kök hücrelerinden köken alırlar. Osteoklast projenitör hücreleri monosit/makrofaj projenitör hücreleri ile yakından ilişkilidir. Osteoklastogenezis, M-CSF reseptörü olan c-fms'nin aktivasyonuyla indüklenen bir kısım projenitör hücrenin yaygınlaşmasını gereksinir. Osteoklastik hatta dönüş, kemik iliğinde stromal hücreler ve periosteumda osteoblastlar tarafından eksprese edilen RANKL ile aktive edilen RANK reseptöründeki aktivasyona bağlıdır. RANK aktivasyonu tek çekirdekli projenitör hücrelerin farklılaşmasını ve müteakiben çok çekirdekli latent osteoklastların füzyonu ile sonuçlanır. Bu hücrelerde RANK'ın aktivasyonu matür kemik rezorbe edici osteoklastların polarizasyonu ve aktivasyonu için gereklidir. RANK'ın RANKL ile aktivasyonu, stromal hücreler/osteoblastlar tarafından salınan RANK ile ilişkili çözünür reseptör OPG ile inhibe edilebilir. Bu sebeple RANKL/OPG'nin nispi ekspresyonu osteoklastojenik süreçler için sınırlayıcı bir faktördür. Bu moleküllerin ekspresyonu PTH, D3, IL-6 sitokin ailesi gibi sitokinler ve çeşitli hormonlar tarafından kontrol edilir. PTH ve D3 gibi stimülatörler, reseptörlerinin aktivasyonu RANKL'da artışa, OPG'de azalmaya yol açtığından bu durum kemik rezorpsiyonu için özellikle önemlidir. Oysa IL-6 sitokin ailesi üyeleri, RANKL ve OPG ekspresyonu reseptörleriyle indüklendiğinden bu anlamda daha az etkilidirler (Lerner 2004).

Rezorpsiyon lakünündeki demineralize kemik proteolitik enzimlerle ayrıştırılır. Organik matriksin farklı proteinlerinin ayrıştırılmasında rol oynayan enzimlerle ilgili bilgiler oldukça kısıtlıdır. Bununla birlikte sistein proteinazların bu anlamda önemli roller üstlendikleri ve genel olarak sistein proteinaz inhibitörlerinin

kemik rezorpsiyonunun *in vitro* ve *in vivo* şartlarda güçlü inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Katepsin K osteoklastlar tarafından oldukça bol miktarda eksprese edilen kollajenolitik aktiviteye sahip bir sistein proteinazdır. Matriks metalloproteinazların osteoklastik rezorpsiyondaki rolleri katepsin K'ya kıyasla daha az anlaşılmış bir konudur. Yakın zamanda MMP'ların sadece osteoklastların kemik rezorbe edici aktiviteleri yanında osteoklast farklılaşmasında da rol oynadığı gösterilmiştir (Lerner 2004, 2006).

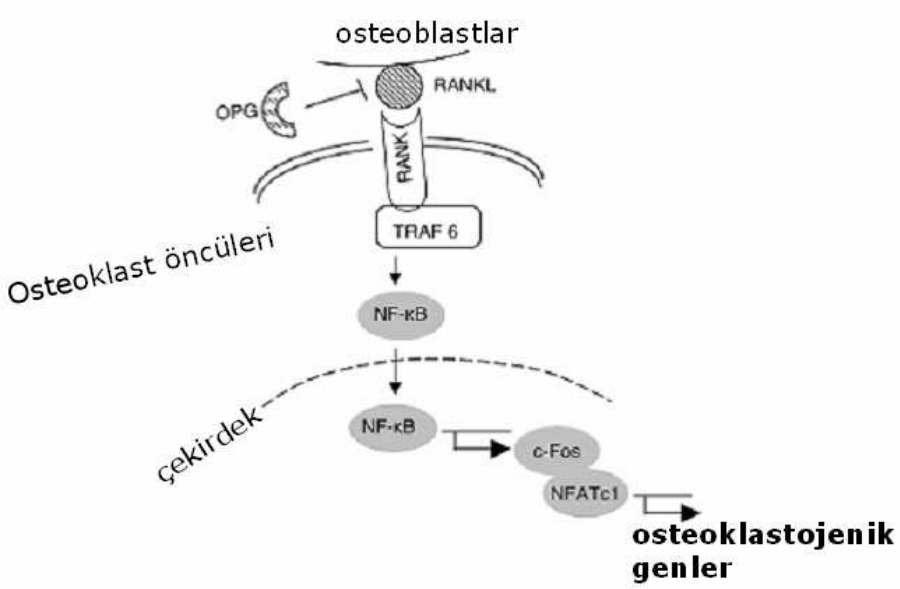
Odontoklastların da kollajenolitik aktivite gösterdikleri ve katepsin B, G ve K gibi proteolitik enzimleri salgıladıkları gösterilmiştir (Sasaki ve ark. 1992, Linsuwanont ve ark. 2002a). MMP'lar ve bunların doku inhibitörleri (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, TIMP) kemik ve bağ dokusunun normal remodelinginde, hastalığın indüklediği matriks döngüsü ve diş erüpriyonunda yer almaktadırlar (Gorski ve Marks 1992). Süt dişi PDL hücreleri tarafından MMP ve TIMP'ların üretildiği gösterilmiştir (Wu ve ark. 1999). Wu ve ark. (1999) süt dişi rezorpsiyonunda TIMP inhibitörlerinin miktarında bir değişiklik olmaksızın kollajenaz üretiminde bir artışla PDL degradasyonun oluşabileceğini tartışmışlardır.

Rezorpsiyon süreçlerinde çeşitli sistein proteinazların rol oynadığı bildirilmiş olmasına rağmen son zamanlarda katepsin K'nın hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda kök rezorpsiyonunda yer aldığı da bildirilmiştir (Linsuwanont ve ark. 2002b, Domon ve ark. 1999). Rezorpsiyon alanında kollajen çözünmesinden sorumlu olan özgün MMP'ın kimliği bilinmemektedir. Bununla birlikte MMP'ler arasında MMP-9 osteoklastlarda en çok bulunan jelatinolitik MMP olarak bildirilmiştir (Linsuwanont ve ark. 2002a). Linsuwanont ve ark. (2002a) sığır odontoklastlarının MMP-9 eksprese ettiğini göstermişler ve bu molekülün süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonunda önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Yakın zamanda bildirilen yeni MMP ailesi üyeleri olan membran tip MMP'larının (MT-MMP) da aktif kök rezorbe edici dokularda mRNA ekspresyonu gösterdiği ve ayrıca bu enzimlerin odontoklastlardaki lokalizasyonları da immüno histokimyasal olarak gösterilmiştir (Linsuwanont ve ark. 2006).

1.7.1.3. Osteoblast/Stromal Hücrelerin Osteoklast Farklılaşmasındaki Önemleri

Stromal hücreler/osteoblastların osteoklast gelişimindeki vazgeçilmez rolleri kemik rezorbe edici hormonlar olan PTH ve Vit D3 reseptörlerinin sadece osteoklast veya öncü hücrelerinde değil, aynı zamanda osteoblastlarda da olduğunun gösterilmesiyle anlaşılmıştır. Birincil olarak stromal hücreler/osteoblastlar ve osteoklast öncü hücrelerinin birlikte kültüre edilmeleriyle stromal hücreler/osteoblastların osteoklastogenezisi desteklemede önemli roller oynadığı ve bu iki hücre tipi arasındaki hücre-hücre temasının gerekli olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.4) (Boyce ve Xing 2007). Bu verilerin analizi stromal hücreler/osteoblastların osteoklastogenezisteki önemini açıkça gösterse de, osteoblastların osteoklastları hangi mekanizmayla kontrol ettiğini açıklayamamaktadır. Genetik olarak osteopetrotik *op/op* farelerde gerçekleştirilen M-CSF'ye ait gözlemler osteoklastların formasyonunda bir osteoblastik molekülün önemine dair ilk veri olmuştur. *op/op* fare çok çekirdekli osteoklastların yokluğu nedeniyle osteopetrotik fenotip sergilemektedir. Bu farelerden elde edilen dalak hücreleri ile doğal farelerden elde edilen osteoblastların bir arada gerçekleştirilen kültürleri D3 tarafından sergilenen osteoklastojenik etkiye hassas iken, doğal farelerin dalak hücreleri ile *ob/ob* osteoblastların bu duruma duyarsız kaldığı gösterilmiş ve bu durum *ob/ob* farelerdeki defektin osteoblastlarda olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu ikincil kültürlerin duyarsızlığı ve *ob/*ob farelerin in *vivo* fenotipi M-CSF eklenmesiyle önlenebilmiştir. Bununla birlikte M-CSF, reseptörü cfms'nin osteoklast öncü hücrelerinde eksprese olduğu bir salgı molekülüdür ve bu sitokinin kritik rolü stromal hücreler/osteoblastlar ile osteoklast öncüleri arasındaki hücre-hücre temasının gerekliliğini açıklayamamaktadır. Hücre-hücre temasının moleküler mekanizması, çok yakın zamanda stromal hücre/osteoblast hücre yüzeyinde eksprese olan RANKL ile ve osteoklast öncü hücre yüzeyinde eksprese olan RANK arasındaki etkileşimin keşfedilmesiyle açıklığa kavuşturulabilmiştir. RANK'ın, RANKL ile aktivasyonu, stromal hücre/osteoblast tarafından salgılanan ve RANK ile sekans homolojisine sahip bir çözünür reseptör olan OPG ile inhibe edilmektedir. RANK'ın osteoklast ata hücrelerindeki aktivasyonu, M-CSF ile hazır hale getirilmiş bir hücre havuzunda olgun osteoklastlara farklılaşmayı sağlamaktadır (Lerner 2004).

RANKL-RANK sinyallemesi sadece osteoklast ata hücreleri için değil aynı zamanda olgun, çok çekirdekli osteoklastların aktivitesi için de gerekmektedir (Boyce ve Xing 2007).



Şekil 1.4. Osteoklastik farklılaşmada osteoblast/stromal hücre-osteoklast etkileşimine ait hücresel mekanizmalar: RANKL/RANK/OPG etkileşimi ve sinyalleme yolu (Boyce ve Xing 2007).

1.7.1.4. RANKL, RANK ve OPG'nin keşfedilmesi

Rodan ve Martin'in (1981) hipotezi, 1981 ve 1990'ların ortaları arasında pek çok çalışmayla desteklendi. Fakat osteoblast/stromal hücreler veya diğer hücreler tarafından eksprese edilen faktörler, farklı yaklaşımlar kullanan dört farklı grup tarafından birbirlerinden bağımsız bir şekilde keşfedilinceye kadar aydınlığa kavuşturulamamıştı (Boyce ve Xing 2007).

Amgen Şirketinden (Thousand Oaks, CA, ABD) Simonet ve ark. (1997), olası terapötik kullanımlar için transjenik farelerde çeşitli TNF reseptörleriyle ilgili cDNA'ların üretebilmek amacıyla yaptıkları çalışmalarda beklenmedik bir şekilde osteoprotegerini (OPG) keşfettiler. Özel bir cDNA'yı aşırı şekilde eksprese eden fareler, kemiklerinde osteoklastları olmadığından belirgin osteoporozis geliştirmişlerdi ve bu gen tarafından kodlanan protein osteoprotegerin (kemik koruyucu) olarak adlandırıldı (Simonet ve ark.1997). Bağımsız bir şekilde Snow Brand Milk Şirketinden (Sapporo, Hokkaido, Japonya) araştırmacılar, standart yaklaşımlarla, insan embriyonik fibroblastlarından osteoklastogenezisi inhibe eden

faktörü saflaştıran Rodan ve Martin'in hipotezini test etmeye çalışırlarken, özdeş bir molekül keşfettiklerini bildirip OPG cDNA'sını klonladılar (Yasuda ve ark. 1998). Her iki grup da hızla OPG'nin ligandını tanımladılar ve sırasıyla OPG ligand ve osteoklast differansiyasyon faktör olarak adlandırdılar (Lacey ve ark. 1998, Yasuda ve ark. 1998). Daha sonra bu ligandın, daha önceki yıllarda RANKL (Anderson ve ark. 1997) ve TNF ile ilişkili aktivasyonu indüklenmiş sitokin (TRANCE) olarak adlandırılan TNF ligand ailesi üyesiyle özdeş olduğu anlaşıldı. Kısa bir süre sonra OPG ligandı olarak belirlenen bu molekülün hücresel reseptörü, insan kemik iliği kökenli miyeloid dendritik hücre cDNA kütüphanesinin sekansını yaparken Anderson ve arkadaşlarının (Anderson ve ark. 1997) keşfettikleri RANK molekülü ile özdeş olduğu anlaşıldı. Anderson ve ark. (1997) TNF reseptörleri süperailesinin bir üyesi olan insan CD40'ının ekstrasellüler parçasının bir kısmı ile RANK arasında bir homoloji olduğunu ve RANK'ın immün sistemde T hücreleri aktivasyonunda yer aldığını buldular. Ardından direkt ekspresyon taraması ile RANKL'ı izole eden araştırmacılar, Wong ve ark. (1997a)'nın da bulduğu gibi, RANKL'ın nahiv T hücre proliferasyonuyla stimüle edilen dendritik hücreleri ve RANK-eksprese eden T hücrelerinin sağkalımını arttırdığını buldular. RANKL'ın osteoklastogeneziste ve T hücresi aktivasyonunda yer aldığını gösteren bu keşifler yeni bir alanı, osteoimmünolojiyi doğurdu (Boyce ve Xing 2007).

1.8. RANKL

Yukarıda bildirilen her iki laboratuar da OPG'yi tanımlamalarının hemen ardından, OPG'yi yüksek bir afiniteyle bağlayan ligandını tanımlamışlar ve TNF sitokin ailesinin bu molekülüne OPG ligand (OPGL) adını vermişlerdi (Lacey ve ark. 1998, Yasuda ve ark. 1998). RANKL'ın klonlanmasıyla birlikte bu yeni molekülün, TNF-α, TNF-ß, CD40 ligand, Fas ligand, CD30 ligand, TRAIL'i içeren bir sitokin ailesi olan TNF-ligand süperailesinin bir üyesi olduğu açığa çıkmıştır (Lerner 2004).

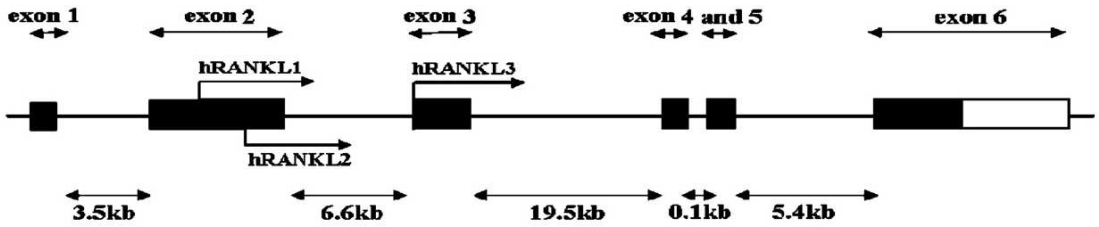
Başlangıçta RANKL dendiritik hücre stimüle edici ajan olarak düşünülmüştür. Sitokinlerin TNF-benzeri ailesinin diğer üyeleri gibi RANKL da geniş bir ekstrasellüler reseptör bağlayıcı bölge, membrana bağlanan bölge ve bağlantı gövdesi ile birlikte membrana gömülü tip II reseptördür (Lerner 2004). RANKL dendritik hücreler ve olgun T hücreleri için sağkalım faktörü olarak hareket

etmekte ve böylece bu hücrelerin proliferasyonlarını düzenlemektedir (Wong ve ark. 1997b). RANKL'ın bu aktiviteleri, membran reseptörü olan RANK'a (TNFRSF11A) bağlandıktan sonra nükleer faktör kappa B (NF-κB) transkripsiyon faktörünün aktivasyonuyla bağlantılıdır (Damay ve ark. 1998).

1.8.1. Yapı

1.8.1.1. Gen

RANKL lokusu insanda 13q14'dedir, genomik DNA'da 36 kb genişliğindedir ve 6 ekson içerir. Üç izoformu vardır; hRANKL1-3. Her 3 izoformun da C-terminal ekstrasellüler alanları özdeştir (Blair ve ark. 2007) (Şekil 1.5).



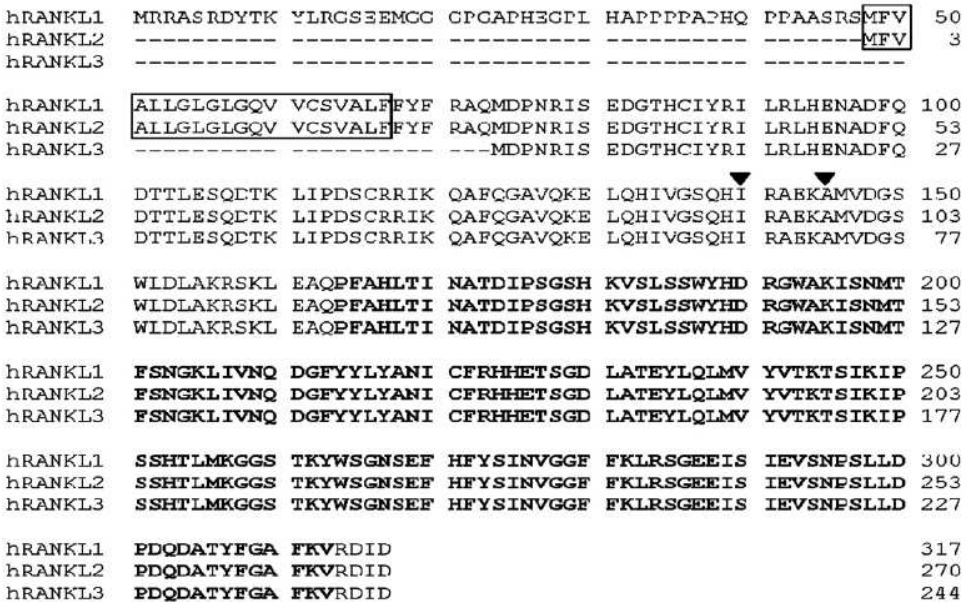
Şekil 1.5. İnsan RANKL geni izoformları (Blair ve ark. 2007).

1.8.1.2. Protein

RANKL, tümör nekroze edici faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir ve oldukça korunmuş bir proteindir: insan proteini, fare RANKL'ı ile %87 homolojiye sahiptir (Lacey ve ark. 1989). İnsan RANKL sekansı, TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) ve Fas ligand ile sırasıyla, yaklaşık %34 ve yaklaşık %28 sekans homolojisi paylaşmasıyla yakından ilişkilidir (Lacey ve ark. 1989, Anderson ve ark. 1997).

RANKL 312 aminoasitlik, 45 kDa (glikolizasyondan önce 35,5 kDa) ağırlığında membran-bağlantılı bir protein olarak, proteolitik ayrılma ile 31 kDa ağırlığında çözünür protein veya hRANKL3 izoformunun ekspresyonu durumunda 39,5 kDa'luk çözünür protein olarak üretilir. Çözünür formlar aynı zamanda biyolojik aktivite sergilerler. Tam uzunluk hRANKL Met^{48} ve Phe^{67} arasındaki 20

aminoasitlik hidrofobik transmembran alanına sahip bir tip II transmembran proteindir. C-terminali, hücre dışı alanı; 171-173 ve 198-200 aminoasiti kapsayan iki N-hatlı glikolizasyon alanı, Ile[140] ve Ala[145] aminoasitlerde iki potansiyel işlemci alanını içeren bir sap alanı ve aktif reseptör bağlayıcı alan içeren bir TNF-ailesi homolog alanı (Pro[164]'ten Val[313]'e) içerir (Şekil 1.6) (Blair ve ark. 2007).



Şekil 1.6. RANKL izoformları protein sekansı (Blair ve ark. 2007).

1.8.2. Ekspresyon

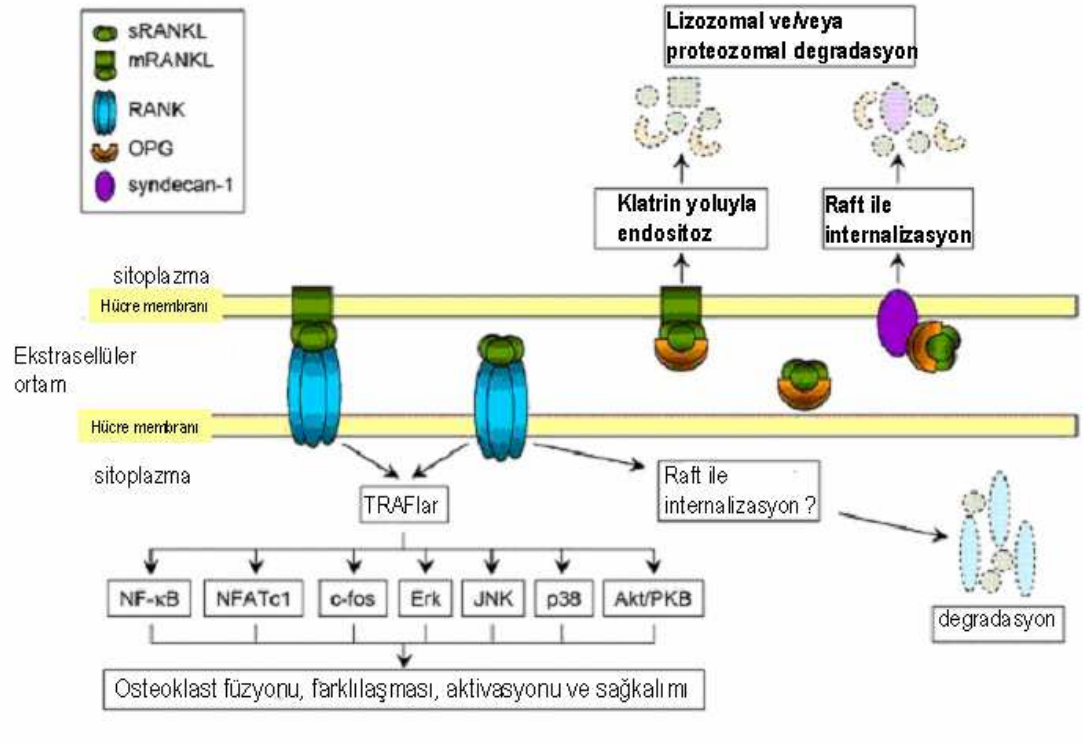
İnsan RANKL ekspresyonu periferal lenf nodlar ve fötal karaciğerde ve bazı osteosarkoma hücre hatlarında tespit edilmiştir. RANKL trabeküler kemikte, kemik iliğinde büyüme plaklarında, periosteum, dalak, timus, lenf nodları ve intestinal lenfoid yamalarda bol miktarda eksprese olur (Lacey ve ark. 1998). İltihaplı eklemlerde sinoviyal hücreler tarafından eksprese edilir ve aktif T hücreleri tarafından salgılanır. Farelerde yapılan preklinik çalışmalar RANKL'ın aynı zamanda hamilelik sırasında meme epitel hücrelerinden de eksprese olduğunu ve meme epitel hücrelerinin laktasyonel hiperplazisi ve süt üretimi için gerekli olduğunu göstermiştir. RANKL ayrıca tümör hücresi proliferasyonunun indüklenmesinde de rol oynayabilir (Boyce ve Xing 2007).

Hücresel seviyede, farklı stromal hücre/osteoblast ve lenfoid hücre hatlarında yüksek RANKL ekspresyon seviyeleri bulunabilir. RANKL ekspresyonu aynı zamanda hipertrofik kondrositlerde de mevcuttur. Stromal hücreler ve osteoblastlardan RANKL ekspresyonu hormonlar, büyüme faktörleri ve peptidler, sitokinler ve diğer faktörler tarafından transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde düzenlenir. RANKL kalsitriol (Vit D), parathormon, TNFα, glukokortikoidler, interlökin (IL)1 ve 11, tiroid hormon, lipopolisakkarit, bakteriyel CpGp-DNA, histamin, FGF-2, IGF-1 ve düşük yerçekimi gibi çeşitli uyaranlara cevaben osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından üretilmektedir (Troen 2003).

RANKL, tamamı siklik AMP/protein kinaz A (PKA) yoluyla etki eden PTH, PGE_2, forskolin ve VDR-tarafından ayarlanan yolla etki eden D3 tarafından indüklenir. İnterlökin (IL)-6 (çözünür IL-6 reseptörü varlığında), IL-11, IL-7 ve IL-17'yi içeren IL-6 ailesi sitokinleri de RANKL'ın osteoblast ve stromal hücrelerdeki ekspresyonunu arttırır. IL-11'in stimülatör etkisi heparin tarafından güçlendirilir. Ayrıca osteoblastlardaki RANKL ekspresyonu histamin veya pürinerjik reseptörlerinin ATP tarafından aktivasyonu ile indüklenir ve melatonin veya mekanik stresler tarafından azaltılır. PTH, D3 ve IL-6 ailesi sitokinlerinin kemik rezorbe edici etkisi, inhibitör tuzak (*decoy*) reseptör OPG tarafından bloke edilmesi artmış RANKL ekspresyonunun bu ajanların kemik rezorbe edici etkisi açısından çok önemli rollere sahip olduklarını göstermiş olur. Ayrıca, IL-1ß ve TNF-α insan osteoblast hücrelerinde RANKL mRNA'sını arttırmaktadır. Farklı transkripsiyon faktörlerinin dominant-negatif formlarının koşullu ekspresyonu, PTH'un RANKL ekspresyonu üzerindeki stimülatör etkisinin siklik AMP cevap elemanına bağlı proteine (CREB) fakat c-fos veya Cbfa-1'e bağlı olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca gp130/STAT-3 sinyalleme yolu da RANKL gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemlidir. *Ionomycin*, *thapsigargin* ve forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)'nın da, kalsiyum PKC yolunun da RANKL ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu gösterir şekilde RANKL mRNA'sını stimüle ettiği gösterilmiştir. Sadece VDR değil diğer steroid hormon reseptörlerinin de RANKL'ı indükleyebileceği ve bu tür bir etkinin varlığı glukokortikoid reseptörleri, retinoid reseptör ve tiroid reseptörü için gösterilmiştir (Hofbauer ve Heufelder 2001, Lerner 2004, Wittrant ve ark. 2004).

1.8.3. Devir

RANKL'ın membran bağlı formu metalloproteinaz-disintegrin tümör nekroze edici faktör α dönüştürücü (TACE) tarafından parçalanabilir ve RANKL'ı çözünür, fakat hala aktif olan bir hale sokar. RANKL-RANK kompleksleri muhtemelen raft'lar tarafından internalize edilip daha sonra lizozomlarda parçalanmaktadır. Yakın zamanda OPG ile kompleks oluşturmuş membran bağlı RANKL'ın klatrin kaplı pit-aracılıklı bir yolla internalize olduğu ve her iki proteinin de lizozom ve proteozomlarla ayrıştırıldığını göstermiştir (Şekil 1.7) (Blair ve ark. 2007).



Şekil 1.7. RANKL/RANK/OPG devri (Blair ve ark. 2007).

1.8.4. Biyolojik fonksiyonlar

RANKL kemik rezorpsiyonunun kritik bir düzenleyicisidir. Osteoblastlar, osteoklast formasyonu ve fonksiyonunu düzenlemek için nispi RANKL ve OPG ekspresyonlarını değiştirirler. Aşırı RANKL, RANK'ın intrasellüler alanında TRAF'ların (TNF reseptör bağlantılı faktör -*TNF receptor-associated factor*-) takviyesine izin vererek osteoklast prekürsörleri üzerindeki RANK'a bağlanır. TRAF 1-3, 5 ve 6 NFκB, mitojen ile aktive edilmiş kinaz yolları [JNK (*Jun N-terminal kinase*), Erk ve p38 yoluyla] ve Ak^{+}/protein kinaz B yollarının stimülasyonunu

içeren pek çok intrasellüler sinyalleme yolunun aktivasyonunda yer alır (Şekil 2.7'de özetlenmiştir). Daha sonra bu yollar osteoklast prekürsörlerinin füzyonu, olgun osteoklastlara farklılaşma ve müteakip aktivasyonları ve sağkalımları düzenler. Aşırı OPG, RANKL'ı bağlar ve osteoklastların sayı ve fonksiyonlarını azaltarak RANK ile etkileşimini önler (Kwan Tat ve ark. 2006, Blair ve ark. 2007).

RANKL, RANK'a bağlanmasıyla indüklenen erken moleküler olaylardan birini teşkil eden NFκB'yi aktive etme yeteneği açısından bu ismi almıştır (Roodman 2006). Diğer TNF reseptörleri ailesinin üyelerine benzer olarak, RANK aktivasyonu ilk olarak RANK'ın intrasitoplazmik alanı ile ilişkili olan TRAF adındaki adaptör proteinini çalıştırır ve oligomerizasyonda yer alır. Ayrıca TRAF 6 da osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu düzenleyen spesifik gen ekspresyonuna yol açan çok önemli bir diğer adaptör gibi davranmaktadır. TRAF6'nın akış aşağı hedefleri NFκB, aktivatör protein-1 (AP-1) ve aktif hücrelerin nükleer faktörü (NFAT- *Nuclear factor of activated T cell*), p38 stres kinazı, c-Jun N terminal kinazı (JNK) ve ropamisinin memeli hedefini (mTO_2) içeren P13K/AKT ve Erk yollarını içerir (Şekil 1.7) (Blair ve ark. 2007).

RANKL geninin promoter alanı, osteoblast farklılaşması ve kemik matriks proteinlerinin ekspresyonu için çok önemli olan *core binding factor a1* (Cbfa-1, aynı zamanda AML-3, Pebp 2aA veya Runx2 olarak da bilinir) için cevap elementi içermektedir. C*bfa-1*$^{-/-}$ fareler, azalmış RANKL mRNA ekspresyonuna sahiptirler. RANKL geninin hedeflenmiş delesyonuyla RANKL eksikliği yaratılmış farelerde RANKL'ın osteoklastogeneziste çok önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu fareler, osteoklastların tamamıyla yokluğundan kaynaklanan osteopetrozisin en şiddetli formlarını sergilerler. Osteopetrozisin birçok diğer formuna benzer şekilde, *RANKL*$^{-/-}$ farelerde de dişler sürmemektedir. RANKL yokluğu aynı zamanda büyüme plaklarında rahatsızlıklara ve kemiklerin normalden kısa olmasına yol açmaktadır. Osteopetrotik fenotip kemik iliği transplantasyonu ile iade edilemez ki bu durum osteoklastların yokluğunun defektif hematopoietik hücreler nedeniyle olmadığını gösterir. Bu ise RANKL'ın stromal hücreler/osteoblastlar tarafından eksprese edildiği ile aynı doğrultuda bir gözlem olarak karşımıza çıkmaktadır. *RANKL*$^{-/-}$ farelerde TRAP-pozitif osteoklast projenitör hücreleri görülemese de normal osteoklast projenitör hücrelerine sahiptirler. Osteoklastlar, makrofajlar ve dendritik

hücreler arasındaki sıkı ilişki göz önüne alındığında, makrofajların ve dendritik hücrelerin diferansiyasyonu ve fonksiyonu RANKL-eksikliği olan farelerde normal olması ilginç bulunmaktadır (Khosla 2001, Lerner 2004, Helfrich 2005).

Osteopetrotik fenotip yanında *RANKL*$^{-/-}$ farelerde T ve B lenfositlerin farklılaşmasından sorun vardır ve lenf nodları mevcut değildir. Bu durumun lenf düğümleri, dalak, timus ve intestinal lenfoid yamalardaki RANKL/TRANCE ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte dalak ve Peyer'in halkaları normaldir. Projesteron, prolaktin ve PTHrP enjeksiyonu ile meme epitel hücrelerinde RANKL ekspresyonu indüklenmektedir, fakat bu etki östrojen enjeksiyonu ile oluşmamaktadır. RANKL'ın hamilelik hormonları ile düzenlenmesi bu sitokinin laktasyon için gerektiği şekilde, meme bezi gelişiminde gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotezle aynı doğrultuda *RANKL*$^{-/-}$ dişi farelerde labulo-alveoler meme yapılarının gelişemediği ve yavruların bu sebeple öldüğü gösterilmiştir (Lerner 2004).

1.9. OPG

Osteoklastik aktivitenin fizyolojik ve patolojik şartlarda kemik rezorpsiyonu süreçleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte osteoklastogenezisin major inhibitörü sadece 1997-1998 yıllarında, eş zamanlı olarak Tsudas ve ark. (Tsuda ve ark. 1997, Yasuda ve ark. 1998) ve Amgen şirketi araştırmacıları (Simonet ve ark. 1997) tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar keşfettikleri bu yeni osteoklast farklılaşmasının negatif düzenleyicisine sırasıyla osteoklastogenezis inhibe edici faktör (OCIF) ve osteoprotegerin (OPG) adlarını vermişlerdir. Tümör nekroze edici faktör (TNF) adlandırmasına göre bu moleküle TNFRSF11B adı verilmiştir (Baud'huin ve ark. 2007). OPG'nin rolü transjenik ve nakavt farelerin geliştirilmesiyle açık bir şekilde gösterilmiştir. OPG nakavt fareler, toplam kemik yoğunluğu ve kemik hacminde güçlü bir azalma, yüksek kırık insidansı ve vertebral deformitelerle ilişkili kuvvetli bir osteoporozis sergilerler (Bucay ve ark. 1998). Tüm bunların yanı sıra, bu indüklü osteoporoz, intravenöz rekombinan OPG enjeksiyonu ile tamamıyla tersine çevrilmiştir (Min ve ark. 2000). OPG transjenik fareler ise, nakavt farelerin tam tersine, yüksek kemik devri ve osteoklastogenezisin inhibisyonuyla karakterize olan belirgin bir osteopetrozis sergilerler (Simonet ve ark.

1997). Bu veriler OPG'nin varlığının fizyolojik durumlarda kemik kütlesinin korunmasında kesinlikle gerekli olduğunu göstermektedir (Baud'huin ve ark. 2007).

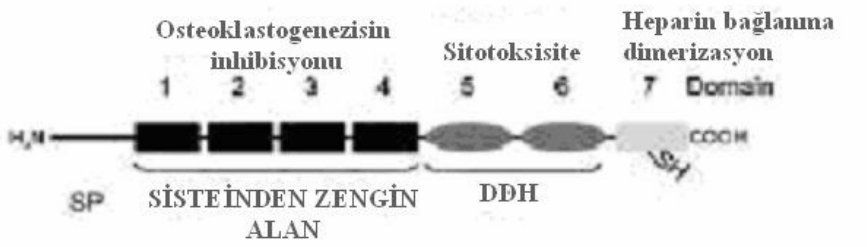
1.9.1. Yapı

1.9.1.1. Gen

İnsanlarda OPG geni kromozom 8g23-24 üzerindedir. Aminoasit dizilimi RANK'ın da içinde olduğu TNFR süper ailesinin pek çok üyesiyle homolojiye sahiptir. İnsan, rat ve fare OPG'leri geniş bir homolojiyi paylaşırlar (%85-95) (Lerner 2004).

1.9.1.2. Protein

İnsan, rat ve farede 7 yapısal alanda düzenlenmiş 401 aminoasit içeren bir temel glikoprotein şeklinde sentezlenir; 21 aminoasitlik sinyal peptidinin ayrılmasından sonra 380 aminoasitlik olgun protein kalır. OPG proteini 60 kDa'luk monomer veya birbirine disülfid bağıyla bağlı olan 120 kDa'luk dimer şeklinde olabilir. 60 kDa'luk OPG proteini pek çok N-glikolizasyon sahası içeren 120 kDa'luk birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlı homodimerleri şekillendirir. OPG N terminal ucunda dört adet sisteinden zengin alan, C terminalinde ise iki adet homolog "ölü alan", bir heparin bağlayıcı alan, homodimerizasyon için gerekli olan sistein içerir, fakat diğer TNFR ailesi üyelerinin tersine transmembran uzanma alanı ve sitoplazmik kuyruğu yoktur. Bu özellikler OPG'yi TNFR süperailesinde eşsiz bir protein olarak sınıflandırır ve diğer üyelerden farklı olarak OPG salınan bir proteindir (Sekil 1.8) (Lerner 2004)



Şekil 1.8. OPG Protein yapısı (Lerner 2004)

OPG'nin biyolojik etkileri dört sistein alanının sağlamlığına bağlıdır. OPG'nin DDH alanı, apoptotik sinyallere aracılık yapan TNFR1 ve FAS'ın "ölü alanlarına" benzer. Bununla birlikte OPG'nin DDH alanının fonksiyonunun anlaşılması zor olmakla birlikte osteoklast formasyonu ve fonksiyonunun üzerine olan inhibisyonda yer almadığı bilinmektedir. Salgılanmış OPG hem membran bağlı hem de çözünür RANKL'a afinitesi dolayısıyla bir "tuzak reseptör" gibi davranır. OPG'nin homodimer olarak bulunması ve RANK ve OPG arasındaki düşük derecedeki dizilim homolojisi nedeniyle OPG'nin RANKL'a bağlanmasının, RANK ve RANKL arasındaki timerik etkileşime benzeyip benzemediği sorgulanmıştır. OPG ile TRAIL arasındaki afinite, OPG ve RANKL arasındaki afiniteye göre önemli oranda daha az olmasına rağmen, OPG, diğer bir TNF ligand süperailesi üyesi olan TRAIL'e bağlanabilir (Lerner 2004).

1.9.2. Ekspresyon

OPG, RANKL'dan daha geniş bir alanda ve daha yüksek oranda eksprese olur. OPG mRNA'sı kemik, kıkırdak, aorta, deri, akciğer, böbrek, karaciğer, beyin ve pek çok diğer dokuda tespit edilmiştir. Hücresel seviyede, OPG osteoblast, stromal hücreler, endoteliyal hücreler, aortik düz kas hücreleri, fibroblastlar, dendritik hücreler ve lenfoid hücre hatlarında eksprese olmaktadır (Lerner 2004).

Osteoklast formasyonu ve aktivasyonunun RANKL-RANK-OPG sistemi ile kritik bir şekilde düzenlendiği ve bu moleküllerin oransal ekspresyonlarının şekillenen osteoklastların sayısını ve nihayetinde iskeletin kemik mineral yoğunluğunu belirlediği bugün çok iyi bilinmektedir. Osteoklastogenezis ve kemik rezorpsiyonunun PTH ve D3 gibi oldukça kuvvetli stimülatörleri, RANKL ekspresyonunu arttırarak, OPG ekspresyonunu ise azaltarak RANKL/OPG oranını arttırırlar. Fakat bu duruma çelişki yaratacak bir şekilde IL-1, TNFα, TGFβ, IL-6, IL-11, OSM, ve LIF gibi kemik rezorpsiyonu stimülatörleri hem RANKL hem de OPG ekspresyonunu arttırmaktadırlar. Bu durum bu sitokinlerin PTH ve D3 ile karşılaştırıldığında kemik rezorpsiyonunu stimüle etmedeki zayıflıklarının olası açıklaması olarak düşünülmektedir. Kemiğin organ kültürlerinde kemik rezorpsiyonunu stimüle eden ve kemik iliği kültürlerinde PTH ve D3'ün osteoklastojenik etkilerine sinerji gösteren glukokortikoidler, osteoblastlarda OPG

ekspresyonunu azaltırlar. PTH'un OPG ekspresyonu üzerine olan baskılayıcı etkisi forskolin tarafından ve çelişkili bir şekilde, transkripsiyon faktörlerinden CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) ve c-fos'a bağlı olmakla birlikte Cbfa-1'e bağlı olmayan PTH ile indüklenmiş RANKL ekspresyonunda taklit edilmektedir. PKC'nin aktivasyonu PTH'ın stimülatör etkisini taklit etmemekte, fakat artmış OPG ekspresyonuna yol açmaktadır (Lerner 2004).

OPG proteinin ekspresyonu ve üretimi çeşitli sitokinler, peptitler, hormonlar ve ilaçlar tarafından ayarlanmaktadır. TNFα, interlökin (IL)-1α, IL-18, *transforming growth factor* (TGF)-β gibi sitokinler, *bone morphogenetic protein*'leri ve 17β-estradiol gibi steroid hormonlarının OPG mRNA seviyelerini düzenlediği bilinmektedir. Tersine, kemik rezorpsiyonunu sağladıkları bilinen glukokortikoidler ve immün baskılayıcı ve osteoporozis ve vasküler hastalığa sebep olma eğilimi olan siklosporin A, PTH, prostoglandin E2 ve bazik fibroblast büyüme faktörü OPG ekspresyonunu baskılamaktadır. Dahası, kemik yüzeyine uygulanan gerilim kuvveti artmış OPG mRNA ekspresyonunu takip ederken, kemik iliği hücreleri tarafından OPG ekspresyonu yaşlanma ile azalmaktadır. Bu iki veri OPG'nin senil osteoporozis açısından önemli bir düzenleyici olduğunu göstermektedir (Schoppet ve ark. 2002, Lerner 2004).

1.9.3. Devir

OPG, OPG heparin bağlayıcı alanla etkileşim yoluyla heparin sülfat yan zincirleriyle bir transmembran proteoglikan olan sindekan-1'e bağlanır ve daha sonra lizozomlarla kısmen parçalanır. Bu yıkılma yolları şekilde özetlenmektedir (Blair ve ark. 2007).

1.9.4. Biyolojik etkiler

Salgılanmış OPG, hem membrana bağlı hem de çözünür RANKL'a olan yüksek afinitesi ve RANK'ın aktivasyonunu önlemesi nedeniyle bir tuzak reseptör olarak davranır. Bu tuzak reseptör fonksiyonu nedeniyle OPG, kemik iliği kültürlerinde, çeşitli hormon ve sitokinlerle stimüle edilmiş olan fetal rat uzun kemik ve yenidoğan kemirgen kalvarya organ kültürlerinde osteoklast formasyonunu inhibe eder. Rat veya farelere OPG enjeksiyonu kemik mineral yoğunluğunda, kemik

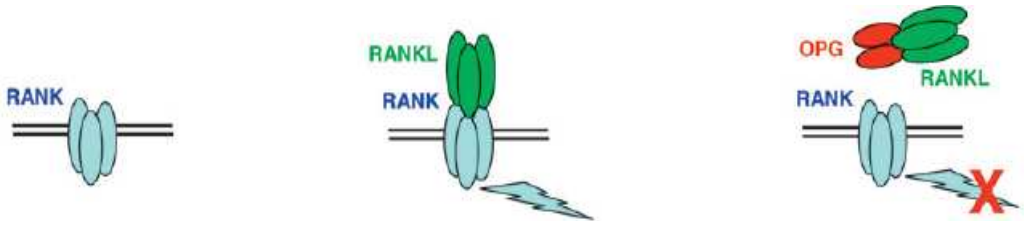
hacminde, trabeküler kemik alanında azalmaya ve osteoklastlar sayısında azalmaya yol açar. Aşırı OPG eksprese eden transjenik farelerde normal görüntü hakimdir fakat kemikler, birincil olarak trabeküler kemikte olmak üzere artmış mineral yoğunluğu ile osteopetrotiktir ve trabeküler osteoklastların sayısında azalma söz konusudur. *RANKL*$^{-/-}$ ve *RANK*$^{-/-}$ farelerin tersine kemiklerin şekilleri ve boyutları normaldir ve diş erüpsiyonunda, lenfosit gelişiminde veya timüs ve lenf nodu organogenezinde anormallikler yoktur (Arko ve ark. 2002, Cheng ve ark. 2004, Lerner 2004).

OPG geninin hedeflenmiş ablasyonu olan fareler hem trabeküler hem de kortikal kemikte kemik yoğunluğunda belirgin bir azalma sergilerler. Bu fenotip post-natal dönemin erken evrelerinde belirgindir ve ilk iki haftada vertebral ve endokondral kemik kırığı riskinde artma söz konusudur. Bu sebeple *OPG*$^{-/-}$ fareler erken başlayan osteopetrozis sinyalleri verirler. Azalmış kemik yoğunluğu iskelette osteoklast sayısındaki artma nedeniyledir. RANKL ve M-CSF tarafından stimüle edilmiş dalak hücresi ve kemik iliği kültürlerinde osteoklast formasyonunun *OPG*$^{-/-}$ ve yabani farelerle benzer olduğunun bulgulanması intrensek defektin osteoklast projenitör hücrelerin sayısıyla sınırlı olmadığını göstermekte ve OPG'nin stromal hücreler/osteoblastlar tarafından salgılandığı görüşünü desteklemektedir (Aubin ve Bonnelye 2000, Arko ve ark. 2002, Lerner 2004).

1.10. RANKL/OPG Oranı ve Aktiviteleri

Çelişkili veriler olmasına rağmen, genelde RANKL'ın *upregulation* (hücre yüzeyinde RANKL reseptörlerinin artması) süreci OPG'nin *down-regulation* süreci ile veya en azından OPG'nin indüksiyonunun düşmesiyle bağlantılıdır ve RANKL/OPG oranı osteoklastogenezisin yönünü belirler. Pek çok bildiri RANKL/OPG oranının kemik kütlesinin en büyük belirleyicisi olduğu iddiasını desteklemektedir. İnsanlarda OPG'nin koruyucu rolü pek çok araştırmayla gösterilmiştir. OPG aynı zamanda, OPG nakavt farelerde görülen renal ve aortik kalsifikasyon gözlemlerinden köken alan şekilde, büyük kan damarlarını medial kalsifikasyondan koruyor görünmektedir (Boyce ve Xing 2007).

Normal kemikte, RANKL'ın spesifik reseptörü RANK osteoklast öncülerinde eksprese olurken RANKL tercihen preosteoblastik hücrelerce eksprese olur. Bu sistemde RANKL osteoklast farklılaşması için gereklidir ve osteoklast öncüleri için sağkalım faktörü olarak davranır. OPG osteoblastik hücreler tarafından üretilen çözünebilir bir faktördür ve bu sebeple, moleküler bağlanma deneyleri ile de teyit edildiği üzere RANKL için sahte bir reseptör gibi davranır. OPG böylece, RANK ve RANKL arasındaki iletişimi önler, osteoklastik farklılaşmanın son evresini ve daha sonra da kemik rezorpsiyonunu inhibe eder (Şekil 1.9.) (Baud'huin ve ark. 2007).



Şekil 1.9. RANK osteoklast zarında eksprese olur ve osteoblast/kemik iliği hücreleri tarafından üretilen RANKL'a bağlanır. OPG tuzak reseptörü gibi davranarak RANKL ve RANK arasındaki etkileşimi bloke eder (Baud'huin ve ark. 2007).

OPG kemik rezorpsiyonu üzerine olan inhibitör etkisini sadece, RANKL için bir tuzak reseptörü gibi davranmasıyla değil, aynı zamanda RANKL yarıömrünü ayarlamasıyla da gösterir. Tersine, RANKL, OPG'nin biyolojik olarak elverişliliğini, hücrenin içine girişini ve yıkımını kontrol etmektedir (Kwan Tat ve ark. 2006). Patofizyolojik durumlarda, OPG ve RANKL'ın bir moleküler denge olarak davranmaları nedeniyle ayrı ayrı ele alınmaları gerektiği bildirilmektedir. Oldukça bol sayıda literatür RANKL ve OPG'nin osteoklastogenezis ve kemik rezorpsiyonunun final etkileyicisi olduklarını göstermektedir (Baud'huin ve ark. 2007).

RANKL/OPG oranı şiddetli malignant osteolitik patolojilerde belirgin şekilde yüksek olduğundan, bu oranın multiple miyelomada gösterildiği gibi hastanın hayatta kalım süresinin tahmininde kullanılabileceği bildirilmektedir. Ayrıca RANKL/OPG oranının, osteoporozis, ankilozan spondilit, romatoid artrit, benign kemik tümörleri, kalça protezi ile ilişkili osteolizis veya kemik kırıkları gibi malign olmayan patolojilerde bir biyolojik teşhis aracı olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Baud'huin ve ark. 2007).

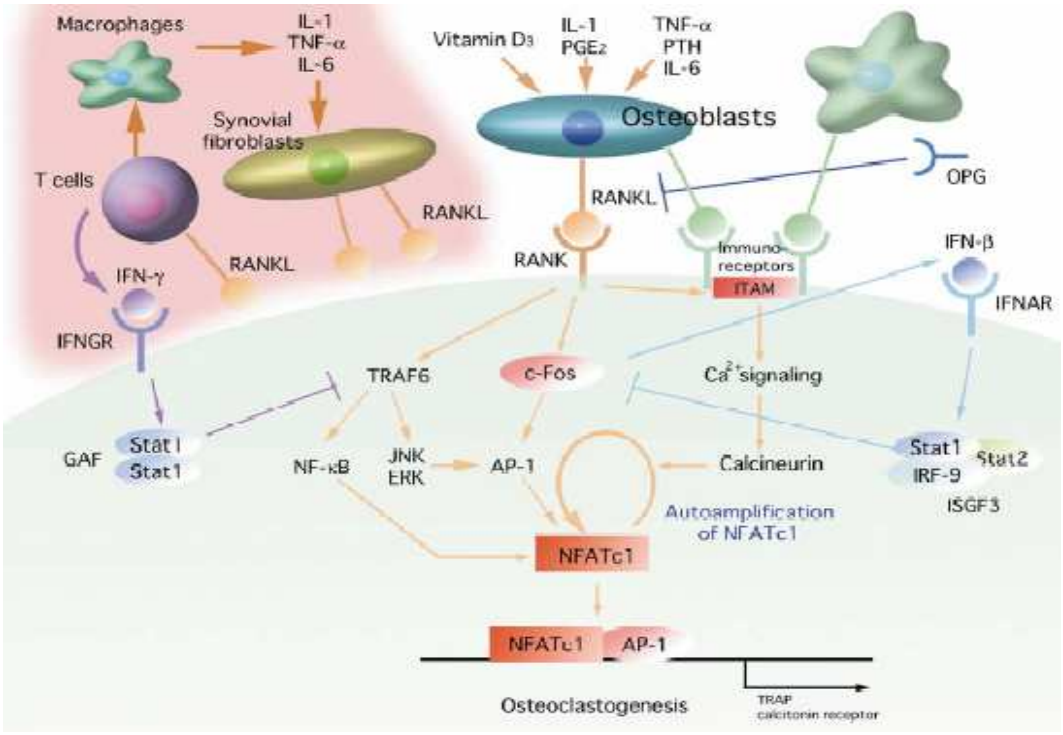
OPG/RANK/RANKL moleküler üçlüsü kemik hastalıkları ve bağlantılı problemler için stratejik terapötik bir hedef teşkil eder. Bu sebeple rekombinan moleküller (OPG-Fc, RANKL-Fc) veya RANKL'a karşı spesifik antikorların benign ve malign patolojilerde başarılı oldukları bildirilmiştir. Seçici bir şekilde RANKL'ı inhibe edip TRAIL aktivitesine karışmayan peptidomimetikler ise tümörle bağlantılı osteolizis tedavisinin yeni terapötik yaklaşımlarını oluşturmaktadır (Baud'huin ve ark. 2007).

1.11. Osteoimmünolojide RANKL ve OPG'nin Rolü

Osteoklastlar kemik matriksini degrade eden monosit/makrofaj orijinli hücrelerdir ve sağlıkta ve hastalıkta kemik metabolizmasının kontrolünde anahtar rol oynarlar. Bir tümör nekroze edici faktör (TNF) ailesi sitokini olan RANKL, *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) varlığında osteoklastların differansiyasyonunu indüklemektedir. RANKL, osteoklastogenezis için ana transkripsiyon faktörü olan aktive T hücrelerinin nükleer faktörünün (*nuclear factor of activated T cells;* NFAT) indüksiyonu ve aktivasyonu için tümü vazgeçilmez olan TRAF6, c-fos ve kalsiyum sinyalleme yollarını aktive eder. *NFATc1* geninin otoamplifikasyonu osteoklast-spesifik genlerin etkili indüksiyonu ile sonuçlanır. c-fos'u da içeren AP-1 transkripsiyon faktör kompleksi bu süreçlerde önemli roller oynar. *İmmüno receptor tyrosine-based activation motif* (ITAM), T-hücresi, B-hücresi, NK-hücresi ve Fc reseptörlerini içeren immün sistemdeki birçok reseptör için önemli bir sinyalleme bileşenidir fakat ITAM'ın iskelet sistemine katkısı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. RANKL-RANK sisteminin keşfi osteoklast differansiyasyonundaki düzenleyici mekanizmaların anlaşılmasına yol açmıştır. (Şekil 1.10) (Takayanagi 2005).

Örneğin RANKL kendi inhibitörü olan IFN-ß'yı indükler ve RANKL sinyallemesinde otoregülatör olarak davranır. Osteoklastogenezis için ana transkripsiyon faktörü olan NFATc1'in tanımlanması osteoklast differansiyasyonunda kalsiyum-kalsinörin sinyallemesinin öneminin anlaşılmasına yol açmıştır. Kalsiyum mobilize edici faktörlerin keşfinde ITAM (*immünoreceptor tyrosine-based activation motif*) ve immünoreseptörlerin kalsiyum sinyallemesi için kritik olduğu bulgulanmıştır. İmmün hücre aktivasyonuna benzer şekilde osteoklast farklılaşmasını da RANK ve c-fms (M-CSF reseptörü)'ne ilave olarak çoklu

reseptörler tarafından düzenlenmektedir. Ligand/reseptör sistemlerinin detaylı analizinin ileride çalışılmasının gerekliliği yanında iskelet sistemindeki çeşitli patolojik durumların ITAM sinyalinin *up*- veya *down*-regülasyonu ile açıklanabilmesi olasıdır. Dolayısıyla NFAT doğrultusuyla aktive olan yardımcı stimülatör sinyaller iskeletsel ve immün hastalıklar için terapötik bir strateji sağlayarak osteoimmünoloji alanında yeni bir çağ açmıştır (Takayanagi 2005, Kim ve ark. 2005).



Şekil 1.10. Osteoimmünolojide immün ve iskelet sistemi arasındaki diyafoni. İmmün ve iskelet sistemi sitokinlerden transkripsyon faktörlerine kadar çeşitli molekülleri paylaşır. İmmünomodülatör faktörler, osteoblastlar gibi mezenşimal hücrelerde RANKL ekspresonunu etkiler ve kompleks sinyalleme diyafonisi ile RANKL sinyallemesini ayarlar. Bu şema osteoimmünolojik etkileşimlerin kuşbakışı bir görünümünü vermektedir (Takayanagi 2005).

1.12. Fizyolojik ve Patolojik Kemik Rezorpsiyonunda RANKL ve OPG'nin rolleri

Aşırı osteoklastik rezorpsiyon, romatoid artrit, gevşemiş eklem protezleri ve periodontitis gibi kronik iltihabi süreçlerin ortak özelliğidir. Pek çok veri bu hastalıklarda RANK aktivasyonunun önemine işaret etmektedir. Fizyolojik kemik remodeling'inde, RANKL-eksprese eden stromal hücreler/osteoblastlar ile RANK-

eksprese eden monosit/osteoklast öncüsü hücreler arasındaki hücre-hücre teması şarttır. İltihabi süreçlerde aktif T-lenfositler RANKL eksprese ederler ve bu sebeple T-lenfositler ile monosit/osteoklast öncüsü hücreler arasındaki hücre-hücre temasının osteoklast şekillenmesinde yer alması olasıdır. B lenfositler de ya RANKL eksprese ederek veya bizzat kendisi osteoklast ata hücresi olarak osteoklast formasyonuna katılabilirler. B hücreleri tarafından aşırı RANKL ekspresyonu multipl miyeloma hastalarındaki kemik kaybında önemli bir rol oynayabilir (Lerner 2004).

Ratlarda deneysel olarak indüklenmiş adjuvan artritinde OPG tedavisinin lokal kemik kaybını ve osteoklast sayısını azalttığı gösterilmiştir (Kong ve ark. 1999). Romatoid artritli hastaların sinovyumunda RANKL-eksprese eden lenfositlerin varlığı gösterilmiştir (Haynes ve ark. 2003). RANKL/RANK-OPG sisteminin romatoid artritteki önemi pek çok yazar tarafından bildirilmiştir (Theill ve ark. 2002, Udagawa ve ark. 2002, Lerner 2004). RANKL-RANK sinyallemesi aynı zamanda eklem protezi gevşemesi ve aşınma-debrisi ile indüklenmiş kemik rezorpsiyonunda da gösterilmiştir (Lerner 2004).

1.13. Dental hastalıklarda RANKL ve OPG rolleri ve dengesi

Fare pulpa ve odontoblast hücre hattında ve insan PDL hücreleri, pulpa hücreleri, odontoblastlar ve dental follikül hücrelerinde OPG ve RANKL mRNA'sı ve proteinleri gösterilmiştir (Sakata ve ark. 1999, Rani ve MacDougall 2000, Wise ve ark. 2000, Wada ve ark. 2001, Hasegawa ve ark. 2002, Lossdörfer ve ark. 2002, Yıldırım ve ark. 2008).

RANKL veya RANK eksikliği (veya aşağı akış yönündeki bazı sinyalleme moleküllerinin eksikliği) olan farelerde dişlerin sürmediğinin gözlenmesiyle diş erüpsiyonunda RANKL-RANK-OPG sisteminin çok önemli rolü olduğu belirgin hale gelmiştir (Wise ve ark. 2002). Wise ve arkadaşları (2000, 2003) ratlarda yaptıkları araştırmalarda dental follikül hücrelerinde OPG gen ekspresyonunun CSF-1 ve PTHrP ile düzenlendiğini ve bu düzenlenmenin PKC yolu (PKC-α izoformu) ile olduğunu önermişlerdir. Fare embriyolarında 1. molarlarda epiteliyal kalınlaşma ve sitodiferansiyasyon evrelerinden, osteojenik mekanizmaların oluşumu ve sert doku formasyonuna kadar olan embriyonik dönemlerde yapılan *in situ* hibridizasyonla

gerçekleştirilen haritalama çalışmaları, odontogenezis ve osteogenezis sırasında RANK, RANKL ve OPG'nin dinamik konum-zaman ekspresyon modelleri sergilediğini göstermiştir. Bu model, RANKL'ın diş gelişiminin erken evrelerindeki kemikleşme merkezinde eksprese olduğunu ve RANK ve OPG'nin ise diş tomurcuğu epiteli ve mezenşiminde eksprese olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen bu veriler diş ve kemik gelişimlerinde birbirlerine ihtiyaç duymamakla beraber, diş germleri ve kemik şekillendirici hücreler arasında erken dönemde bir iletişimin mevcut olduğunu ve bunun muhtemelen dişlerin çenelerde, doğru pozisyonlarda gelişmelerinin sağlanması için bu iki sürecin senkronizasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir (Ohazama ve ark. 2004).

Diğer taraftan diş erüpsiyonunda dişin kemik kriptasından kurtulup sürebilmesi için erüpsiyon yolunun şekillenmesinde alveoler kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesi oldukça kritiktir. Osteoklast formasyonunun inhibitörü olan OPG dental follikül tarafından temel eleman olarak sentezlenmektedir. Osteoblast ve kemik iliği hücrelerinde RANKL'ın sentezlendiği ve alveoler kemikte RANKL varlığı immüno histokimyasal tekniklerle gösterilmiş olmasına rağmen, dental follikülde RANKL ekspresyonu olup olmadığı şüpheli idi. Nispeten yeni bir teknik olan laserle mikrodiseksiyon yöntemi ile yapılan bir çalışmada *Rankl* geninin dental follikülde eksprese olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (Yao ve ark. 2004).

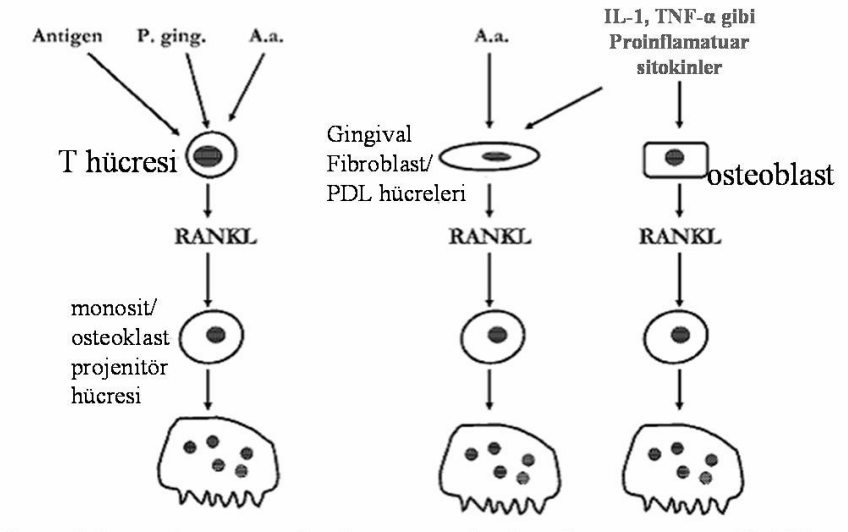
Periodontal ligament ve dental follikül hücrelerinde OPG, normal koşullarda RANKL'dan belirgin oranda daha fazla eksprese olmaktadır (Shimuzu ve ark. 1996, Kanzaki ve ark. 2001). Periodontal hastalık ve diş hareketlerinde PDL hücrelerinde RANKL ekspresyonunun arttığı bulgulanmıştır (Wada ve ark. 2001, Kanzaki ve ark. 2002). Kawamoto ve arkadaşları (2002) RANKL'ın rat periodonsiyumunda değişken bir immünolokalizasyona sahip olduğunu ve bunun osteoklastlarla bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar RANKL'ın periodonsiyumda osteoklastların gelişiminde ve fizyolojik diş erüpsiyonunda kemik rezorpsiyonunun aktivasyonunda önemli rollere sahip olduğunu önermişlerdir (Kawamoto ve ark. 2002).

Periodontal hastalıkta, $CD4^+$ ve $CD8^+$, T-cells ve monosit/osteoklast ata hücrelerini içeren tek çekirdekli lökositlere ait yoğun infiltrasyonun gingivada

bulunduğu gösterilmiştir (Taubman ve ark. 2001, Liu ve ark. 2003). Lerner'e (2004) göre bu sebeple T hücreleri ile monositler/osteoklast ata hücreleri arasındaki hücre-hücre temaslarının periodontitiste osteoklast formasyonunda önemli olması muhtemeldir. Liu ve arkadaşları (2003) RANKL mRNA'sının ekspresyonunun ilerlemiş periodontitisli hastaların gingivasında arttığını, buna karşın OPG mRNA ekspresyonunun ise azaldığını göstermeleri ilginçtir. *In situ* hibridizasyon RANKL'ın esasen lenfositler ve makrofajlarda eksprese olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, insan gingivasından izole edilen fibroblastlarda RANKL mRNA'sının bulunamayışıyla uyumludur (Nagasawa ve ark. 2002, Lerner 2004). OPG mRNA'sı insan gingival fibroblastlarında bol miktarda eksprese olmaktadır ve bu ekspresyon lipopolisakkarit ile artmaktadır ve gingival fibroblastların periodontal hastalıkta osteoklast formasyonunda negatif kontrol olarak davranabileceği düşünülmektedir. Ayrıca iltihabi hücreler tarafından eksprese edilen RANKL'ın periodontitiste önemli olduğuna dair daha ileri kanıtlar $CD4^+$ T hücrelerinin, belli periodontitis formlarıyla ilişkili olan bir Gram-negatif anaerobik bakteri olan *Actinomyces actinomycetemcomitans* (yeni ismiyle *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Nørskov-Lauritsen ve Kilian 2006) ile stimülasyonunun RANKL ekspresyonunu indüklediğinin gösterilmesiyle elde edilmiştir (Teng ve ark. 2000). Bir diğer periodontopatojen olan *Porphyromonas gingivalis* de lenfositlerde RANKL ekspresyonunu indükleyebilmektedir ve dalak hücre kültürlerinde artmış osteoklast formasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Jiang ve ark. 2002). Bu gözlemler, Lerner'e (2004) göre, bakterilerin osteoklast formasyonunu stromal hücreler/osteoblastlar olmaksızın infiltre olan lökositler arasında hücre-hücre etkileşimleriyle direkt olarak stimüle edebilecekleri anlamına gelmektedir.

Romatoid sinoviyumunda, fibroblastların RANKL eksprese ettikleri gösterilmiştir ve benzer şekilde gingival fibroblastlar ve periodontal ligament hücreleri RANKL eksprese etmektedir ve bu ekspresyon IL-1 and TNF-α tarafından arttırılmaktadır (Sakata ve ark. 1999). Bu sebeple sadece RANKL-eksprese eden T hücrelerinin değil aynı zamanda RANKL eksprese eden yerel fibroblastların da periodontal hastalıkla ilişkili osteoklastogenezis ile bağlantılı olmaları muhtemeldir. Yakın zamanda Lerner (2006) gingival fibroblastlar ve periodontal ligament hücrelerindeki RANKL ekspresyonunun Aa'da bulunan sitoletal toksin ile arttırılabileceğini göstermiştir. RANKL-eksprese eden T-hücreleri, gingival

fibroblastlar, periodontal ligament hücreleri ve osteoblastların iltihap ile indüklenmiş kemik rezorpsiyonundaki oransal önem dereceleri bilinmemektedir (Şekil 1.11.), fakat hücre tipinden bağımsız olarak, RANK aktivasyonunun vazgeçilmez bir rol oynaması muhtemeldir ve OPG periodontal hastalıkta kemik kaybının inhibe edilmesinde ilginç bir farmakolojik yaklaşım olacaktır (Lerner 2006).



Şekil 1.11. Periodontitiste, osteoklast formasyonu infiltre olan T hücreleri tarafından eksprese olan RANKL aktivasyonu veya fibroblastlar, periodontal ligament hücreleri (PDL) veya osteoblastlardan indüklenen RANKL ile artabilir (Lerner 2004).

Periodontitis hastalarının gingival cep sıvısında veya gingival dokularında, periodontal olarak sağlıklı bireylerin dokularına göre yüksek oranda RANKL ekpresyonuna dair ciddi kanıtlar bulunmaktadır (Nagasawa ve ark. 2002, Crotti ve ark. 2003, Mogi ve ark. 2004, Vernal ve ark. 2004). Bostanci ve ark. (2007) periodontitis hastalarının gingival cep sıvılarında RANKL ve OPG'nin karşıt şekilde düzenlendiğini göstermişlerdir. Elde edilen pek çok veri RANKL/OPG oranının periodontal hastalıkta potansiyel kemik rezorpsiyonunun en önemli belirleyicisi olduğunu işaret etmektedir (Taubman ve ark. 2007).

Yapılan bir seri klinik çalışmada periodontal hastalıkta RANKL/OPG oranında artış olduğu tespit edilmiştir (Crotti ve ark. 2003, Liu ve ark. 2003). Alveoler kemiğe komşu granülasyon dokusunda RANKL'ın arttığı OPG'nin ise azaldığının gösterilmesi ile osteoklast diferansiyasyonunun OPG/RANKL/RANK

yolunun periodontitisteki kemik kaybının düzenlenmesinde olası hedef olduğunu belirlemektedir (Crotti ve ark. 2003). Benzer veriler apikal periodontitiste de elde edilmiş ve apiektomi sırasında elde edilen ekstraradiküler periapikal doku örneklerinde gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu analizleri ile bu dokularda gösterilen RANKL mRNA ekspresyonu ile, RANKL'ın apikal periodontitis tarafından indüklenmiş kemik rezorpsiyonunda bir rol oynayabileceği önerilmiştir (Sabeti ve ark. 2004).

Ogasawara ve ark. (2004) ratlarda deneysel olarak yaratılan patolojik alveoler kemik rezorpsiyonu ardından, RANKL ve RANK'ın eşzamanlı olarak eksprese olduğunu immüno histokimyasal olarak göstermişler ve fizyolojik veya patolojik şartlar altında osteoklast fonksiyonunun RANKL-RANK tarafından otokrin bir mekanizmayla ayarlandığını bildirmişlerdir.

İnsanda PDL hücrelerinin RANKL eksprese ettiği, osteoklastların ise hem RANKL hem de RANK'ı eksprese ettiği gösterilmiştir Fizyolojik rezorpsiyona uğrayan insan süt dişlerinden elde edilen periodontal ligament hücrelerinde baskın bir şekilde RANKL'ın; rezorbe olmayan süt dişlerinden ve daimi dişlerden elde edilen periodontal ligament hücrelerinde ise OPG'nin oldukça bol miktarlarda eksprese olduğu gösterilmiştir. PDL hücrelerinde RANKL'ın sadece süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonu evresinde eksprese olması odontoklastik hücre membranındaki RANK işe etkileşim neticesinde olduğunu düşündürmüştür (Fukushima ve ark. 2003).

İnsan süt dişi kök rezorpsiyonunda periodontal ligament hücrelerinin kanıtlanan önemli rollerine rağmen bu hücrelerin osteoklastogenezisi nasıl düzenlediği bilinmemektedir. Fukushima ve ark. (2005) insan periodontal ligament hücresi ve dalak hücresi ko-kültüründe PTHrP'in RANKL mRNA ekspresyonunu indüklediğini OPG ekspresyonunu ise hafifçe azalttığını göstermişlerdir. Yapılan bir seri araştırma ile yazarlar PTHrP tarafından osteoklastogenezisi cAMP/PKA'dan bağımsız bir yol ile periodontal ligament hücrelerinde RANKL'ın OPG'ye nispeten ekspresyonunu arttırarak indüklediğini göstermişlerdir (Fukushima ve ark. 2005). Yakın zamanda PTH'un periodontal ligament hücrelerinin prolifere olma,

farklılaşma ve OPG üretme yeteneklerini, PTH uygulamasının tarzına ve hücrelerin farklılaşma evresine bağlı olarak ayarladığı gösterilmiştir (Lossdörfer ve ark. 2005).

İnsan süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonu sırasında RANK ve RANKL proteinlerinin ekspresyon alanlarını araştıran Lossdörfer ve ark. (2002), RANK'ı sadece tek veya çok çekirdekli odontoklastlarda tespit ettiklerini, fakat RANKL ekspresyonunun odontoblastlar, pulpa fibroblastları, PDL fibroblastları ve odontoklastlarda gözlediklerini bildirmişlerdir. Yıldırım ve ark. (2008) ise rezorbe olmuş süt dişlerinin pulpaları ile daimi diş pulpasını karşılaştırdıklarında süt dişi pulpasında anlamlı bir şekilde RANKL mRNA ekspresyonunu yüksek bulmuşlardır. Araştırmacılar bu durumda süt dişi pulpasının kök rezorpsiyonunda ayarlayıcı roller üstlenebileceğini ifade etmişlerdir (Yıldırım ve ark. 2008).

Yukarıda aktarılan bilgiler doğrultusunda, araştırmalarının henüz başlangıç safhasında olan süt dişi kök rezorpsiyonunun moleküler temelleri üzerindeki verilere bir katkı sağlayabilmek amacıyla bu tez kapsamında, osteoimmünolojinin temellerini atan ve osteoklastogenezisin birincil düzenleyicileri olan RANKL ve OPG'nin protein seviyesinde fizyolojik ve patolojik süt dişi kök rezorpsiyonu gösteren süt dişi dokularında enzim immüno histokimyasal yöntemlerle gözlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma kapsamına, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na çeşitli nedenlerle başvuran, yaşları 5-13 arasında değişen, 36'sı kız, 35'i erkek toplam 71 hastadan elde edilen 100 diş alındı. Çalışmaya dahil edilen dişlerin çekildiği hastalara ait uygun kriterler; tıbbi hikayesinde problem olmama, dental travma hikayesi olmama, tamamıyla normal oral görünüm, süt dişlerinin kök yapısını, enfeksiyon durumunu ve altlarındaki daimi dişlerin varlığını yeterince gösteren bitewing ve ortapantogramların varlığı şeklindeydi. Sistemik hastalığı, sendromu, kalıtımsal rahatsızlığı olan ve/veya dental travma geçiren veya oral patoloji tedavisi gören hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Uygun kriterleri taşıyan hastalardan, aşağıdaki endikasyonlara göre diş çekimleri gerçekleştirildi:

-Kökleri tamamen rezorbe olmuş süt dişleri,

-Daimi diş kök formasyonu tamamlanmış kökü rezorbe olmuş süt dişleri,

-Kronu aşırı harap olmuş ve furkasyona kadar ilerlemiş çürüğe sahip olan ve/veya kökler arası bölgede radyografik olarak 1/3'den fazla radyolusensi bulgusuyla enfeksiyona sahip olan süt dişleri,

-Alt daimi santral ve/veya lateral kesicilerin lingualde sürmesi nedeniyle eksfoliye olma zamanı üzerinden 6 ay veya daha fazla zaman geçen alt süt santral ve/veya lateral kesiciler,

-Alt ve üst süt molar dişlerde panaromik radyograflarda tespit edildiği üzere normal eksfoliyasyon zamanından 6 ay veya daha uzun süre geçmiş olan hastalar arasından Angle sınıf 1 yer darlığı nedeniyle ortodonti kliniğinde sürme rehberliği uygulanacak hastalardan çekim endikasyonu konulan süt dişleri,

-Daimi kaninin vestibülden çıkması veya gömülü kalması nedeniyle rezorbe olmayan süt kaninler,

Dişler Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınan izin doğrultusunda ve ebeveynin bilgilendirilmesi ve izninin ardından rutin minör cerrahi prosedürlerle çekildi. Fizyolojik ve patolojik sebeplerle çekilen dişler dıştan belirlenen kriterlerle fizyolojik ve patolojik grup olarak ikiye ayrıldı. Fizyolojik gruptaki dişler çürüksüz veya klinik olarak minimal çürüğe sahiptiler. Klinik ve radyografik olarak pulpa patolojisi işaret ve semptomlarına sahip değillerdi. Patolojik grup ise endikasyonlarda da yer aldığı üzere endodontik tedavinin imkansızlığı

nedeniyle çekilen çürük dişlerden oluşmaktaydı. Kimisinde pulpa ekspoze idi, fistül veya abse mevcuttu. Radyografik olarak periradiküler radyolusent alanlar ve kısmen veya komple, simetrik veya asimetrik kök rezorpsiyonu söz konusuydu. Çoğu vakada bir kısım desmodonsiyum dişe yapışıktı.

Rezorpsiyon evresini belirlemek için her bir dişin boyu ölçüldü ve kök yüzey uzunluğu mine-sement birleşiminden sağlam sement yüzeyinin en apikal kısmı arasındaki mesafe olarak belirlendi (Resim 2.1).



Resim 2.1. Çekimden sonra dişlerin kök boylarının dijital ölçer ile ölçümü.

Pozitif kontrolde kullanılmak üzere insan tonsil dokusu tonsillektomi geçirmiş çocuklardan ebeveyn izniyle elde edildi.

2.1. Histolojik Takip İşlemleri

Dişler çekimin hemen ardından %4'lük fosfat tamponlu (0,1 M, pH 7,4) formal-salinde 24 saat oda sıcaklığında fikse edildi. Ardından, %10'luk EDTA içinde, +4°'Cde, radyolojik kontroller eşliğinde dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyonun tamamlandığı radyografik olarak teyit edildi. Daha sonra dişler ortalarından ikiye

bölündü ve her bir yarım farklı grupta olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Her yarım, doku takip kasetlerine alındıktan sonra 1 gece akar suda yıkandı ve yarımlardan biri sentetik rezin (akrilik), diğer yarımıysa parafinde bloklama amacıyla farklı histolojik yöntemler işlendi ve bloklandı.

2.1.1. Sentetik rezinde bloklama

Bu işlemler sırasında imalatçı firma (Leica microsystems, Heidelberg, Almanya) tarafından hazırlanan ürün (TP1020, Historesin Embedding Kit) kullanma talimatlarına sıkıca uyuldu.

2.1.1.1. Dehidrasyon

Dişler doku takip kasetlerine yerleştirildi ve sırasıyla %70, %80, % 96'lık alkolde 1'er saat tutularak doku takibi (TP1020, Leica microsystems, Heidelberg, Almanya) gerçekleştirildi.

2.1.1.2. İnfiltrasyon

İnfiltrasyon solüsyonu, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı ve uygulandı (Tablo 2.1 ve 2.2).

Tablo 2.1. Sentetik rezin bloklama kitinin özellikleri

Baz rezin/likit	Aktivatör	Sertleştirici
2-Hidroksietil-metakrilat	Dibenzolperoksit	Dimetil sulfoksit

Tablo 2.2. İnfiltrasyon solüsyonu ve bloklama vasatının hazırlanması

İnfiltrasyon solüsyonunun hazırlanması	50 ml baz rezin + 1 paket (0.5 gr) aktivatör, magnetik karıştırıcıda tam çözünme görünene kadar karıştırılır
Bloklama vasatının hazırlanması	15 ml infiltrasyon solüsyonu + 1 ml sertleştirici, karıştırılır ve derhal kullanılır

2.1.1.3. Bloklama

Bloklama solüsyonunun hazırlanması Tablo 2.2'de verilmektedir. Dokular özel akrilik tutucular içerisinde ve hazırlanan solüsyonla gömüldükten sonra oda sıcaklığında 40-120 dakikada tamamlandı. Takiben bloklar, kesit alınana kadar buzdolabında saklandı.

2.1.1.4. Kesit Alma

Blokların kenarları traşlandıktan sonra, tungsten karbid kesici ağızlı, özel bıçak ve bıçak tutucusu (MZ6 Stereomikroskop Swing Arm Disseksiyon Statifi, Leica microsystems, Heidelberg, Almanya) takılan mikrotomla (SM 2000R, Leica microsystems, Heidelberg, Almanya) 5-7 μm'lik kesitler alındı. Kesit alınması esnasında gerek bloklar gerekse mikrotomun bıçağı, %30-40'lık etanol ile sürekli nemli tutuldu. Daha sonra kesitler, her lama 3 adet olmak üzere, poly-L-lizin kaplı lamlara alındı ve üzerleri polietilen örtüyle örtülerek kauçuk rollerle düzleştirildi ve 42°C'de 2 gün süreyle kurumaya bırakıldı.

2.1.1.5. Deplastisizasyon

Kesitler üç kez 20'şer dakika 2-metoksietilasetat'da, iki kez 5'er dakika aseton'da ve iki kez de 5'er dakika deiyonize suda bekletildi.

2.1.2. Parafin bloklama

Dekalsifikasyonu tamamlanan ve bir gece akar su altında yıkanan örnekler daha sonra doku takip cihazına aktarılarak sırasıyla birer kez 80 ve 90, üç kez 96 derecelik alkollerden; üç kez izopropil alkolden; iki kez ksilolden ve iki kez de sıcak parafinden geçirildi ve takiben bloklandı. Parafine gömülen dişlerden mikrotomla (SM 2000R, Leica microsystems, Heidelberg, Almanya) 5-7 μm kalınlığında labial-lingual doğrultuda seri kesitler alındı. Kesitler, poly-L-lizin kaplı lamlara alınarak 37º'Cde gece boyunca kurutuldu. Doku kesitleri, ksilen serisinde deparafinizasyonu takiben, konsantrasyonu azalan etil alkol serisinde geçirilerek rehidre edildi ve deiyonize distile suya alındı.

Her iki gruptan seçilen kesitler aşağıdaki boyama metotlarından biriyle boyandı.

2.2. Boyama

2.2.1. Hematoksilen-eozin

Genel histolojik yapını belirlenmesi amacıyla hazır hematoksilen ve eosin boyama solüsyon serisi (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

2.2.2. TRAP enzimi demonstrasyonu

Seçilen doku kesitlerinde odontoklast/osteoklastların belirlenmesi amacıyla, bu hücrelere spesifik olan tartrat dirençli asit fosfataz (TRAP) enzim histokimyasal yöntemle demonstre edildi. Bu amaçla, asetat tamponunda (0.2M, pH 5) substrat olarak naftol AS-BI fosfat ve non spesifik enzimatik aktiviteyi bloke edici olan ajan olarak 50 mM L(+)tartarik asit içeren çözeltiye kromojen grup olarak Fast-Red Violet LB diazonyum tuzu (Sigma; St. Louis, MO, ABD) ilave edilerek inkübasyon solüsyonu hazırlandı. Solüsyonun son pH'sı 5'e ayarlandı. Kesitler, bu inkübasyon solüsyonda 37 ºC'de 45 dakika bekletildi (Cole ve Walters, 1987). Takiben kesitlere asetat tamponunda hazırlanan (0.2 M, pH 5,2) %1'lik metil grenle çekirdek boyası uygulandı ve gliserin-jelatinle kapatıldı.

2.2.3 İmmüno histokimya

Bu amaçla R&D firmasının kitleri (R&D Systems, MN, USA), kullanıldı. Firmaca önerilen prensiplere sıkı bir biçimde uyulmakla birlikte, örneklerin mineralize doku olması ve uzun bir dekalsifikasyon süreci uygulanması nedeniyle spesifik antijenik boyanma elde edilinceye kadar, değişik primer antikor konsantrasyonları, farklı inkübasyon süreleri, farklı sürelerde mikrodalga uygulamalı veya uygulamasız, hem mikrodalga ve hem de Tween-20 (Sigma, USA) muamelesi tarzında pek çok uygulama ve bunların kombinasyonları denendi. Sonuç olarak, aşağıdaki işlemlerden oluşan metodun en uygun sonucu verdiği kabul edildi:

Kesitler pH'sı 7,3 olan 0,1 M fosfat tampon solüsyonunda (PBS) ıslatıldı ve doku kesitlerinin etrafı PAP-pen'le (Beckman Coulter, İmmünotech, Marseille, France) çizilip, nemli kutuya alındı. Takiben kesitler, metanolde hazırlanan %0,3'lük H_20_2'de 1,5 saat oda sıcaklığında (20°C) tutularak endojen peroksidaz inhibe edildi. PBS'te 3 kez 5'er dakika yıkamanın ardından kesitler, antijen retrieval için mikrodalga fırında 2-3 dakika bekletildi ve PBS'te hazırlanan %0,3'lük Tween-20 (Sigma, St. Louis, USA) ile 20 dakika muamelenin ardından PBS'le yıkandı. Non spesifik zemin boyanmasını engellemek için kesitler, serum bloke edici ajanla 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra kesitlerin bir kısmı anti-insan osteoprotegerin poliklonal primer antikoruyla (BAF805, R&D Systems, MN, USA), bir kısmı da anti-insan RANKL (AF805, R&D Systems, MN, USA) primer antikoruyla (50µg/ml) nemlendirme kutusu içinde +4ºC'de bir gece inkübe edildi. Takiben, üç kez PBS'le yıkanan kesitler, primer antikora spesifik ve streptavidinle konjuge sekonder antikorla 60 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar PBS'le yapılan 3 yıkamanın ardından kesitler, 0,1 M yüksek hassasiyetteki streptavidin-HRP konjugatıyla 45 dakika muamele edildi. Bir kez daha PBS'le yapılan yıkamanın ardından kesitlerde 15 dakika süreyle, substrat olarak hidrojen peroksit, kromojen grup olarak da 3,3'diaminobenzinde (DAB) kullanılmak suretiyle peroksidaz enzimi demonstre edildi ve kesitler distile suyla 5 dakika süreyle yıkandı. Yapılan mikroskobik incelemede reaksiyon ürünü rengi soluk olan kesitlere 100 mg DAB, 33 ml distile su, 66 ml 300 mM PBS (pH 7,3), 0.66 ml %3'lük H_2O_2 ve 5 ml %1 kobalt klorürle 4 ml %1 nikel sülfat karıştırılarak hazırlanan "nikel-kobalt DAB reaksiyonu güçlendiriciyle (Ni,Co-enhancer)" 15 dakika DAB renk yoğunlaştırma işlemi uygulandı. Distile suda yıkanan kesitlerde Mayers hematoksilen (Merck) ile 3 dakikalık çekirdek boyaması uygulandı. Mor renk oluşuncaya kadar akan çeşme suyunda tutulan preparatlar, alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon ve takiben de ksilen serisinden geçirildikten sonra sentetik resin (Entellan, Merck) yardımıyla lamelle kapatıldı.

2.3. Kontrol Boyamaları

2.3.1. Negatif Kontroller

TRAP için negatif kontroller, kesitlerin 80°C'deki sıcak suda 15 dakika tutulduktan sonra yapılan enzim demonstrasyonuyla hazırlandı.

İmmün reaksiyonların özgünlüğünü kanıtlamak amacıyla, 1- Primer antikorların uygulanmaması, 2- Hem primer ve hem de sekonder antikorlar yerine sığır serum albümini kullanılarak yapılan boyamalarla negatif kontrol preparatları hazırlandı.

2.3.2. Pozitif Kontroller

Bu amaçla, belirgin miktarda RANKL ve OPG antijeni eksprese eden hücrelere sahip olan insan tonsilla palatina kesitleri, diş kesitleri ile aynı şekilde immüno histokimyasal işleme tabi tutuldu.

2.4. Histomorfometrik Analizler

Boyanan kesitler ışık mikroskobunda (E400, Nicon Eclipse E400, Kawasaki, Kanagawa Japonya) incelendi. Gerekli görülen bölgelerden, farklı büyütmelerde büyütme çizgisini içeren dijital görüntüler kaydedildi. Kaydedilen dijital görüntüler dijital görüntü analiz programıyla (Clemex Vision PE 3.5, Clemex Technologies, Inc., Quebec, Kanada) analiz edilerek, Tablo 2.3'te hesaplanan parametrelere ait veriler belirlendi.

2.5. İstatistik Analizleri

İncelenen parametreler ait sayısal veriler arasındaki olası ilişki ki-kare testi ile ve bu sonuçların birbirleriyle korelasyonu ise Spearman korelasyon testi ile bir istatistik programı yardımıyla (SPSS 15.0 Full) değerlendirildi.

Tablo 2.3. Araştırmada kullanılan histomorfometrik değerlendirme kriterleri

Skor	İltihabi reaksiyon şiddeti (birim alan-1000μ^2-/iltihabi hücre)	Rezorpsiyon evresi	Koronal odontoblastik tabaka	$TRAP^+$ hücre	$RANKL^+/OPG^+$ hücre
0	Çok az veya hiç: İltihabi hücre yok	Tamamlanmış	Korunmuş	Yok	Yok
1	Hafif: Ortalama 10 iltihabi hücreden az	Kök boyunun 1/3'ü rezorbe olmuş	Yer yer kaybolmuş	İnterradiküler alan/kesici rezorpsiyon yüzünde 1-3 odakta	Pulpada fibroblast/monosit-makrofaj/endotel hücreleri
2	Orta seviyede: ortalama 10 ila 25 iltihabi hücre	Kök boyunun 2/3-1/3'ü arasında bir rezorpsiyon	Predentinde rezorpsiyon başlamış	İnterradiküler alan/kesici rezorbsiyon yüzü tamamıyla kaplı	İnterradiküler alan/kesici rezorpsiyon yüzünde odontoklastlarda
3	Şiddetli: Ortalama 25 iltihabi hücreden fazla	Rezorpsiyon başlamamış		Kök ucunda birkaç odakta	Pulpada ve rezorpsiyon yüzünde
4	Nekrotik/Periapikal apse	Patolojik rezorpsiyon		Tek bir kök boyunca	PDL/dağınık patern
5				Her iki kök boyunca	
6				Predentinal rezorpsiyon	
7				Dağınık/pulpa odakları	
8				Periapikal abse/Mikroabse	

3. BULGULAR

Çalışmada, toplam 100 dişin ortadan ikiye ayrılmasıyla elde edilen ve biri parafine ve diğeri de sentetik rezine gömülerek hazırlanan bloklardan alınan kesitler ve bunların boyanmasıyla hazırlanan preparatlar değerlendirildi. Parafin kesitlerde, plastik kesitlere göre daha fazla detay kaybı meydana gelmesi nedeniyle, sentetik resinde bloklanan toplam 66 örnekten elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi ve araştırmada bunların sonuçlarından yaralanıldı. Bu örnekler 27'si kız, 25'i erkek olmak üzere yaşları 4-13 arasında değişen (Ortalama=8.62+2.3) toplam 52 hastadan alınan 66 dişe aitti (Tablo 3.1). Tablo 3.1'de, değerlendirilen dişlere ait veriler ve hastaların demografik bilgileri verilmiştir.

Araştırma değerlendirme kriterlerine göre elde edilen veriler sıralayıcı kategorik bir nitelik taşıdığından, incelenen parametreler arasındaki ilişkiyi görmek amacıyla yapılan korelasyon analizinde Spearman-Rho sonuçları dikkate alınmıştır (Tablo 3.2).

3.1. Histolojik Değerlendirme

Tablo 3.1'e göre çekim endikasyonlarına ve sonrasında dıştan görünüşe göre toplam 13 kesici, 53 molar dişin 36'sının fizyolojik, 30'unun ise patolojik rezorpsiyona uğradığı öngörüldü. Bununla birlikte histolojik değerlendirmeler 4 kesici, 3 azı olmak üzere sadece 7 dişte iltihabi hücre infiltrasyonunun söz konusu olmadığı bir rezorpsiyon gözlendi (Tablo 3.3). Araştırmanın histolojik değerlendirmelerine ilişkin sonuçları toplu halde Tablo 3.3 ve 3.4'te görülmektedir.

Hematoksilen eozinle boyanan preperatlar iltihabi reaksiyon şiddeti kriterlerine göre değerlendirildiklerinde, örneklerin çoğunda (%90) en az 1 seviyesinde iltihabi reaksiyon bulunduğu tespti edildi. Buna göre, tüm örnekler tek bir grupta ve tablo 3.3'te yer alan kriterlere, iltihabi reaksiyon durumu kriteri de eklenerek toplam 6 kriter ile değerlendirildi. İltihabi reaksiyon düzeyleri arasındaki farkı gözlemek için yapılan çoklu karşılaştırma testinde 1, 2 (Ortalama farkı=1,00; SH=0,32; p=0,024) ve 3, 2 (Ortalama farkı=0,86; SH=0,27; p=0,018) olarak skorlanan iltihabi reaksiyon seviyeleri arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlendi.

Mine-sement hattından itibaren kök boyu en fazla 1-3 mm kalmış dişler rezorpsiyonu tamamlanmış dişler olarak değerlendirildi (%30,66).

Kök rezorpsiyonları tamamlanmış olmasına rağmen çoğu örnekte odontoblastik tabaka genelde sağlamdı (9/20) (Resim 3.1); 2 örnekte koronal odontoblastik tabaka, odontoklastları içeren rezorpsiyon lakünaları ile yer yer kesintiye uğramıştı ve 9 örnekte predentin rezorpsiyonu başlamıştı. Kök rezorpsiyonu tamamlanmış ve predentin rezorpsiyonu başlamış dişlerde dahi pulpa dokusunun normal özelliklerini koruduğu gözlendi (Resim 3.2). Rezorpsiyonunu tamamlamış örneklerin sadece %15'inde pulpa dokusunda iltihap gözlenmezken geri kalan örneklerde hafiften şiddetliye iltihabi reaksiyon varlığı gözlendi. Bazi örneklerde dökülmeden önce rezorpsiyonun lakünasında sementum-benzeri depolanmanın olduğu gözlendi.

Tablo 3.1. Araştırma kapsamında yer alan dişlere ve ait oldukları hastalara ait veriler

No	Yaş	Cinsiyet	Diş boyu	Diş (azı/kesici)	Rezorpsiyon türü	No	Yaş	Cinsiyet	Diş boyu	Diş (azı/kesici)	Rezorpsiyon türü
1	8	K	10.0	A	F	34	9	K	11.19	A	P
2	8	K	12.76	A	F	35	7	K	14.62	A	P
3	7	K	9.76	Ke	F	36	10	K	10.32	A	P
4	10	K	11.39	A	P	37	9	E	16.67	A	P
5	10	K	13.67	A	P	38	9	E	9.45	A	F
6	8	K	15	A	P	39	13	K	14.28	A	F
7	8	K	14.9	A	P	40	7	K	13.5	A	P
8	7	E	9.95	A	F	41	11	E	6.4	A	F
9	4	E	10.23	Ke	F	42	5	K	15.36	A	P
10	5	E	11.55	A	P	43	13	K	5.99	A	F
11	13	E	10.3	Ke	F	44	7	E	15.06	A	P
12	13	E	9.63	Ke	F	45	7	E	14.13	A	F
13	12	K	9.5	A	F	46	12	E	8.48	A	F
14	6	K	15.43	Ke	F	47	6	K	8.19	Ke	F
15	8	E	10.84	A	P	48	6	K	8.09	Ke	F
16	8	E	12.62	A	F	49	6	K	15.54	Ke	P
17	10	E	14.74	A	P	50	6	K	12.12	A	P
18	12	E	12.82	A	P	51	10	E	8.08	A	F
19	7	E	15.83	A	P	52	11	E	12.44	A	F
20	11	K	7.86	A	F	53	11	E	14.74	A	P
21	7	K	7.03	Ke	F	54	7	K	10.82	A	P
22	10	K	8.19	Ke	F	55	13	E	12.75	A	P
23	10	K	6.47	A	F	56	8	K	14.31	A	F
24	7	E	15.66	A	P	57	7	K	18.52	A	P
25	10	E	12.58	A	P	58	5	E	14.45	A	P
26	8	E	13.98	A	F	59	5	E	7.27	A	F
27	10	E	12.88	A	P	60	7	K	8.95	Ke	F
28	10	E	6.48	A	F	61	6	K	8.74	Ke	F
29	10	E	6.35	A	F	62	7	K	10.62	A	P
30	10	E	7.94	A	F	63	7	K	12.46	A	P
31	10	K	5.1	A	F	64	9	E	9.91	A	P
32	10	K	8.24	A	F	65	9	K	5.73	A	F
33	10	K	16.1	A	P	66	7	E	6.18	Ke	F

E: Erkek K: Kız

A: Azı dişi Ke: Kesici

F: Fizyolojik rezorpsiyon

P: Patolojik rezorpsiyon

Tablo 3.2. Araştırma değerlendirme kriterleri arasındaki korelasyon

Correlations

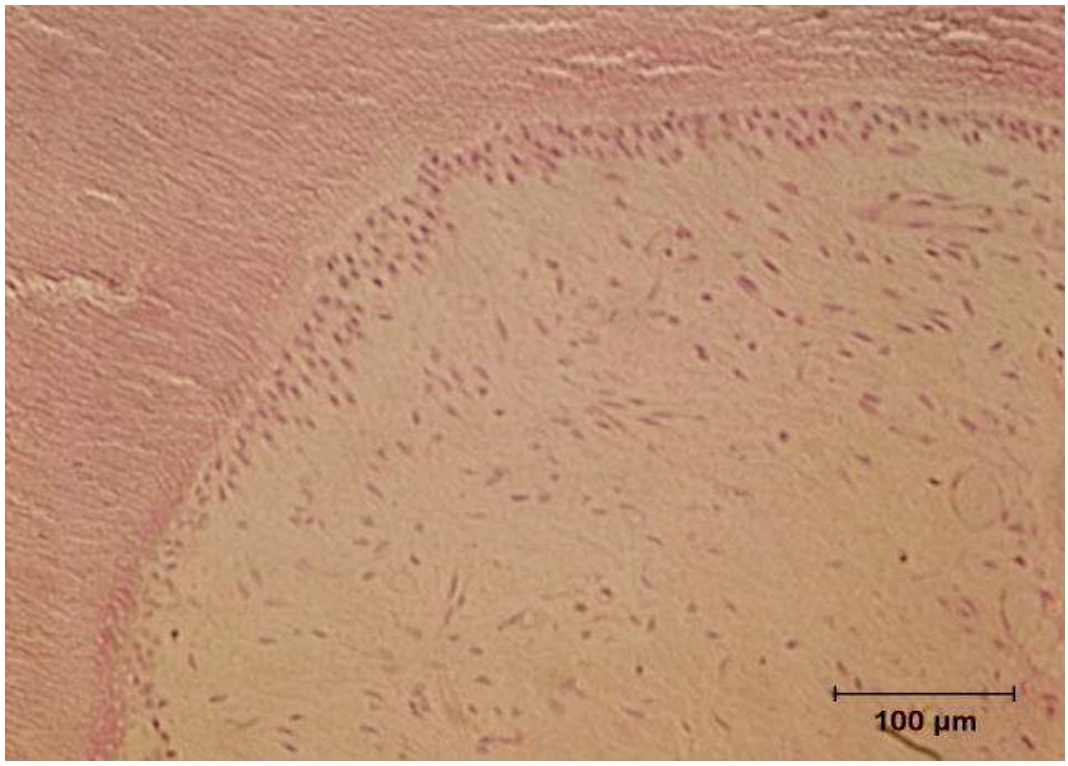
			RANKL	OPG	enf	koronal	rezevre	TRAP
Spearman's rho	RANKL	Correlation Coefficien	1,000	,104	,025	,081	,040	,139
		Sig. (2-tailed)	.	,406	,843	,519	,748	,266
		N	66	66	66	66	66	66
	OPG	Correlation Coefficien		1,000	,137	,256*	-,059	-,002
		Sig. (2-tailed)		.	,273	,038	,640	,989
		N		66	66	66	66	66
	enf	Correlation Coefficien			1,000	,303*	-,047	,039
		Sig. (2-tailed)			.	,013	,708	,757
		N			66	66	66	66
	koronal	Correlation Coefficien				1,000	-,265*	,375**
		Sig. (2-tailed)				.	,031	,002
		N				66	66	66
	rezevre	Correlation Coefficien					1,000	-,097
		Sig. (2-tailed)					.	,437
		N					66	66
	TRAP	Correlation Coefficien						1,000
		Sig. (2-tailed)						.
		N						66

* Korelasyon 0.005 seviyesinde anlamlıdır (2-tailed)

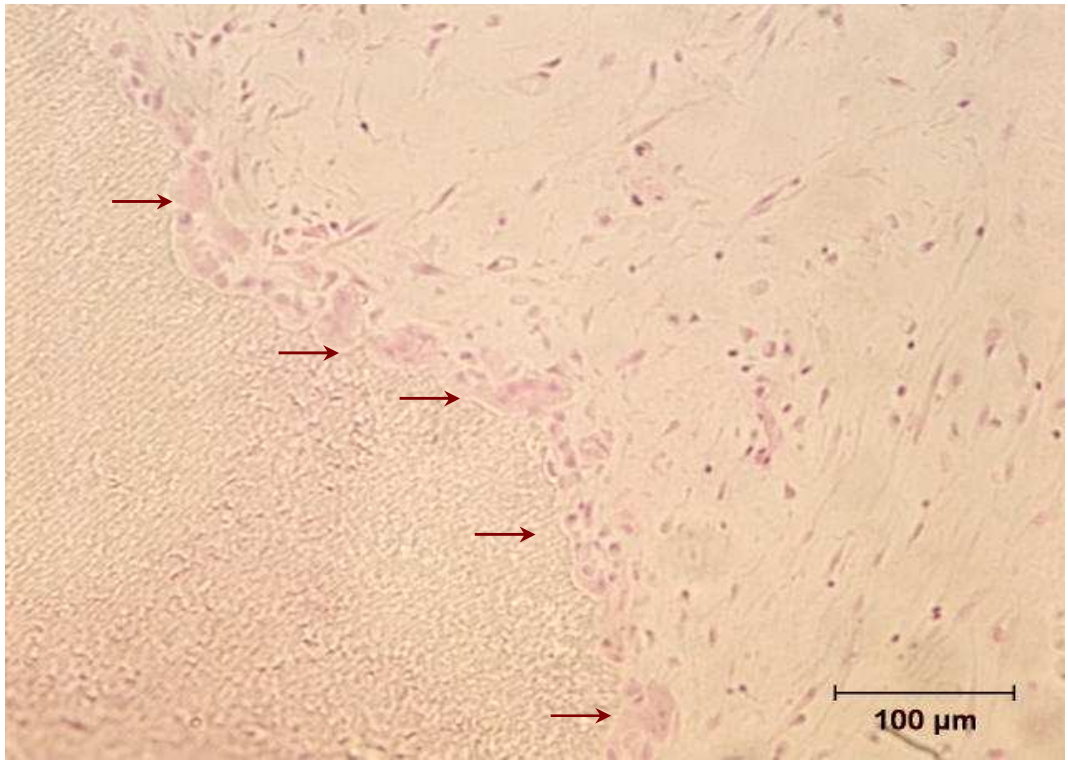
** Korelasyon 0.001 seviyesinde anlamlıdır (2-tailed)

Tablo 3.3. Her bir örnek için elde edilen histomorfometrik değerlendirme sonuçları

Örnek no	İltihabi reaksiyon şiddeti	Rezorpsiyon evresi	Koronal odontoblastik tabaka	$TRAP^+$ hücre	$RANKL^+$ hücre	OPG^+ hücre	Örnek no	İltihabi reaksiyon şiddeti	Rezorpsiyon evresi	Koronal odontoblastik tabaka	$TRAP^+$ hücre	$RANKL^+$ hücre	OPG^+ hücre
1	4	0	2	2	0	0	**34**	3	0	2	5	1	1
2	3	0	1	2	2	0	**35**	4	2	2	2	1	1
3	0	0	0	2	0	0	**36**	3	0	2	4	0	1
4	0	0	0	2	0	0	**37**	3	2	2	2	3	1
5	0	0	3	4	0	0	**38**	3	1	0	2	3	1
6	3	0	3	1	1	2	**39**	3	0	4	2	1	1
7	1	0	3	0	1	1	**40**	3	1	4	0	3	1
8	4	1	2	2	0	0	**41**	3	2	0	8	3	1
9	3	2	3	7	1	1	**42**	4	0	3	0	2	2
10	3	0	1	2	1	1	**43**	3	2	0	8	3	1
11	1	0	3	2	1	0	**44**	3	2	2	7	3	4
12	3	0	3	7	3	0	**45**	3	1	2	7	1	1
13	4	0	2	5	3	0	**46**	3	0	0	8	3	1
14	0	0	1	0	3	0	**47**	3	0	2	2	1	0
15	4	0	1	0	3	0	**48**	0	0	2	0	3	1
16	3	0	2	5	0	0	**49**	4	0	3	2	1	0
17	3	0	3	5	3	1	**50**	3	1	2	4	4	1
18	1	0	4	5	3	0	**51**	3	0	0	3	0	0
19	1	0	3	8	3	0	**52**	2	0	2	2	0	1
20	3	2	0	2	1	1	**53**	4	1	4	3	1	1
21	0	0	0	2	1	1	**54**	3	0	2	0	3	1
22	4	2	0	6	0	0	**55**	3	0	2	0	3	0
23	3	2	0	6	1	1	**56**	3	0	2	5	0	1
24	3	2	3	4	1	1	**57**	3	0		3	1	3
25	3	0	1	3	1	1	**58**	4	1	1	7	1	1
26	3	1	2	7	3	0	**59**	3	1	0	7	3	0
27	2	0	4	3	0	0	**60**	0	0	3	7	3	1
28	3	2	0	6	2	1	**61**	3	0	3	3	3	1
29	3	0	0	6	1	1	**62**	3	0	2	0	0	0
30	3	0	0	2	2	1	**63**	3	0	1	0	0	1
31	3	2	0	6	2	1	**64**	3	0	0	2	3	1
32	3	2	0	6	1	1	**65**	3	0	0	2	3	1
33	3	0	3	5	3	0	**66**	3	2	0	2	1	1



Resim 3.1. Kök rezorpsiyonu tamamlanmış bir örnekte sağlıklı pulpa dokusu ve düzgün odontoblastik tabaka görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

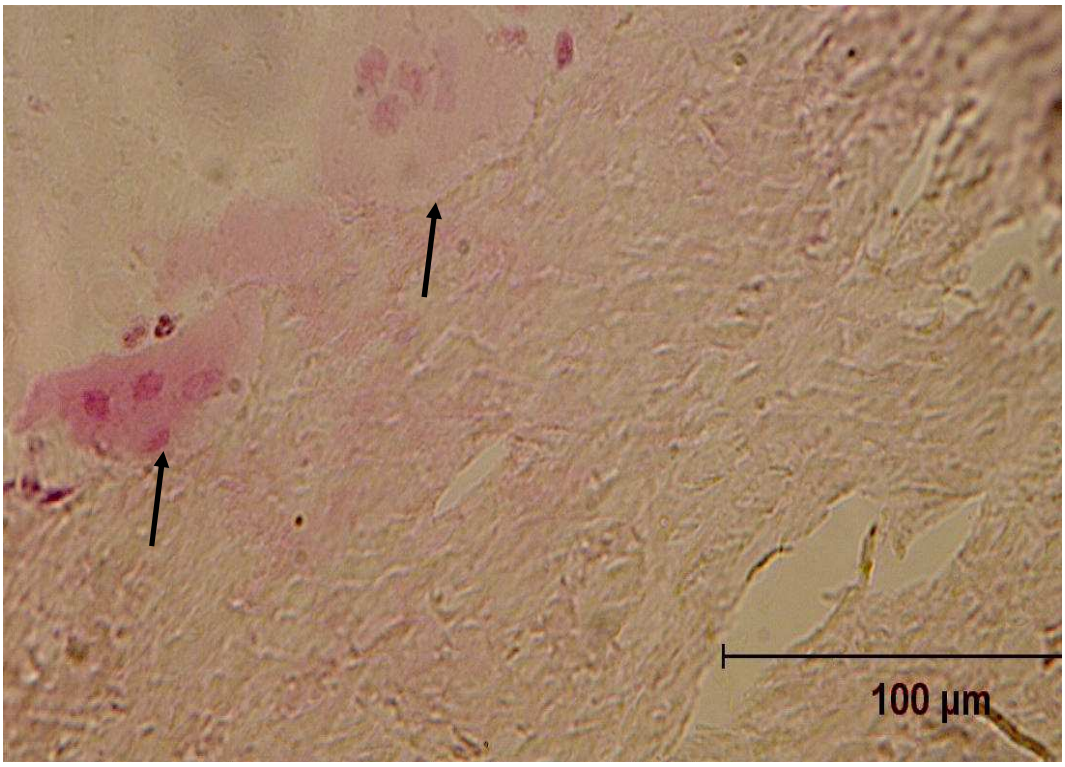


Resim 3.2. Predentinde rezorpsiyonun başlamış olduğu bir örnekte rezorpsiyon lakünalarında tek ve çok çekirdekli odontoklaslar (oklar) ve sağlıklı pulpa görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

Tablo 3.4. Değerlendirme kriterlerine göre elde edilen sonuçların toplam değerleri (n=66).

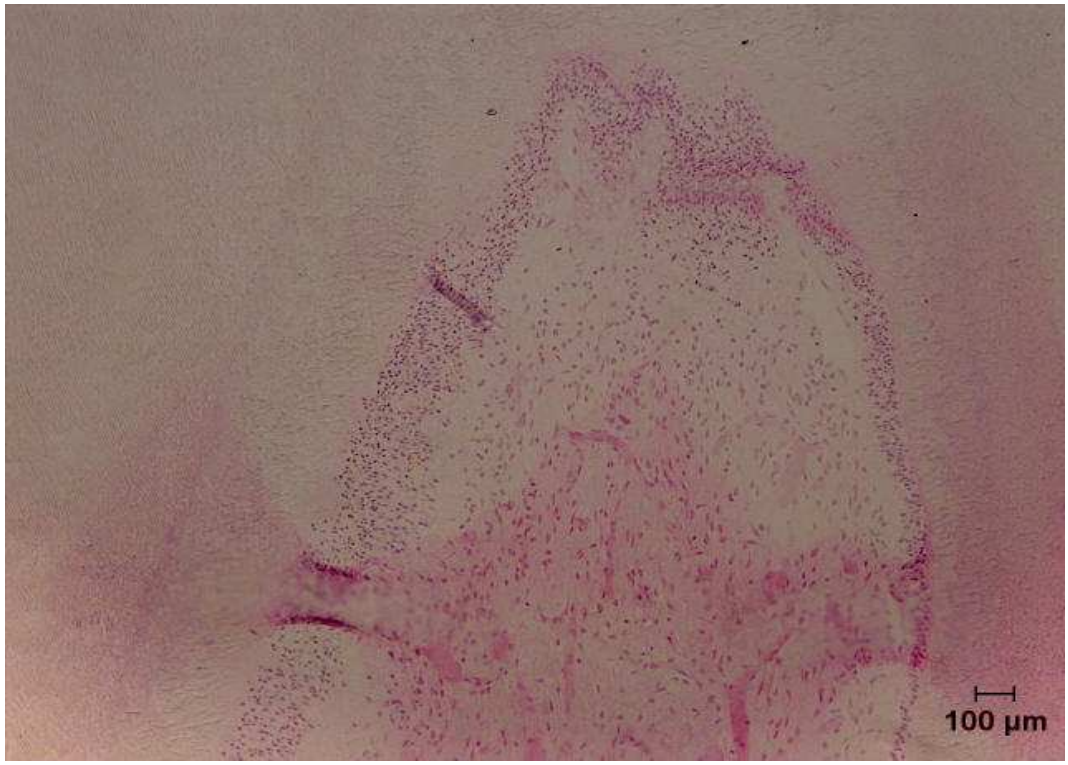
İltihabi reaksiyon şiddeti					Rezorpsiyon evresi					Koronal odontoblastik tabaka			TRAP$^+$ hücre								RANKL$^+$ hücre					OPG$^+$ hücre				
0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
7	4	2	43	10	20	7	20	14	5	43	9	14	10	1	20	6	4	7	6	8	4	14	22	5	24	1	24	38	2	1	1

Geri kalan örneklerde dişler rezorpsiyonun farklı evrelerine aitti. Rezorpsiyonun her evresinde, rezorpsiyon yüzünde rezorpsiyon lakünaları içinde tek ve/veya çok çekirdekli odontoklastlar izlenmekteydi (Resim 3.3). Fizyolojik rezorpsiyonun gözlendiği olgularda rezorpsiyon kök uçlarından başlamakla birlikte, daimi dişe bakan yüzde belirgin olarak daha aktif ve simetrik olduğu dikkati çekti. Patolojik rezorpsiyon gözlenen olguların çoğunda fizyolojik rezorpsiyonu pulpal patolojinin takip etmiş olabileceğini düşündüren tarzda bir rezorpsiyon modeli izlendi; özellikle rezorpsiyon kök ucundan başlamış olmakla birlikte, kökler arası bölgede yoğun iltihabi hücre infiltrasyonunun görülmekteydi. İltihabi reaksiyonun daha şiddetli ve yaygın olduğu olgularda daha yaygın bir internal rezorpsiyon gözlendi.



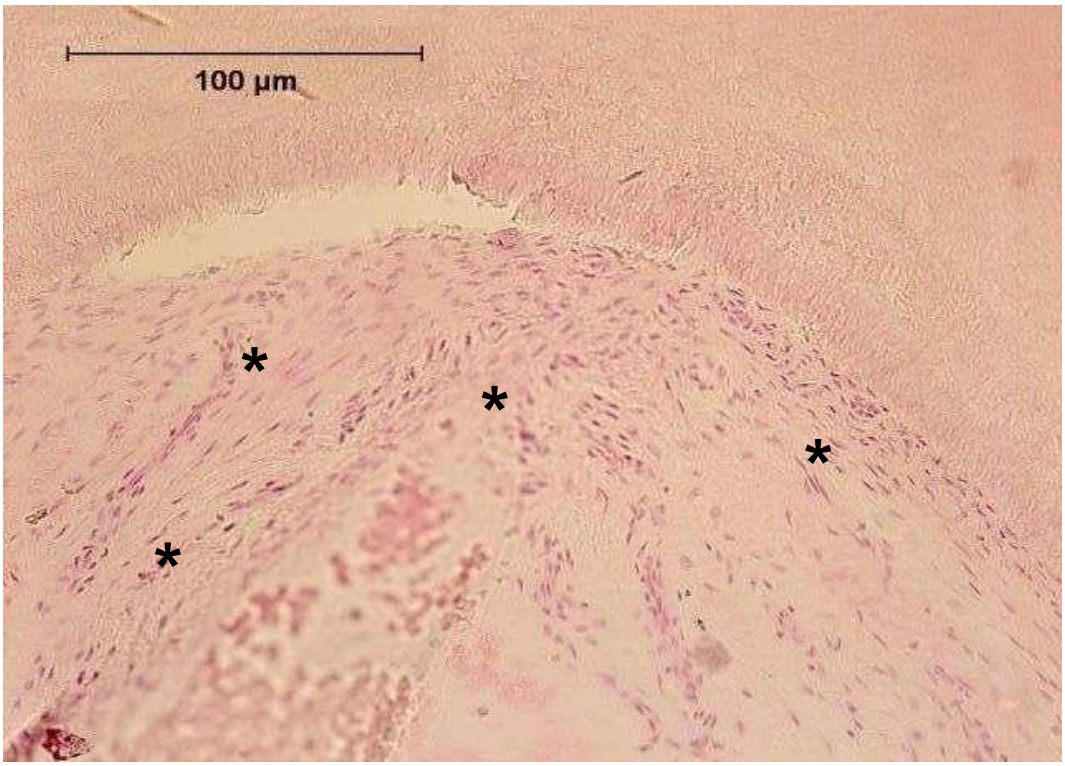
Resim 3.3. Rezorpsiyon lakünası içinde çok çekirdekli odontoklastlar (oklar) görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

Dişlerin tümü değerlendirildiğinde toplam 59 örnekte hafiften şiddetliye doğru değişen şiddette iltihabi reaksiyon tespit edilmesine rağmen, 43 örnekte koronal odontoblastik tabakanın bütünlüğünün bozulmadığı gözlendi (Resim 3.4). Spearman's *rho* korelasyon testi, iltihabi reaksiyon derecesi ile koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü arasında pozitif zayıf; koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü ve rezorpsiyon evresi arasında negatif zayıf bir ilişki olduğunu gösterdi (Tablo 3.2).

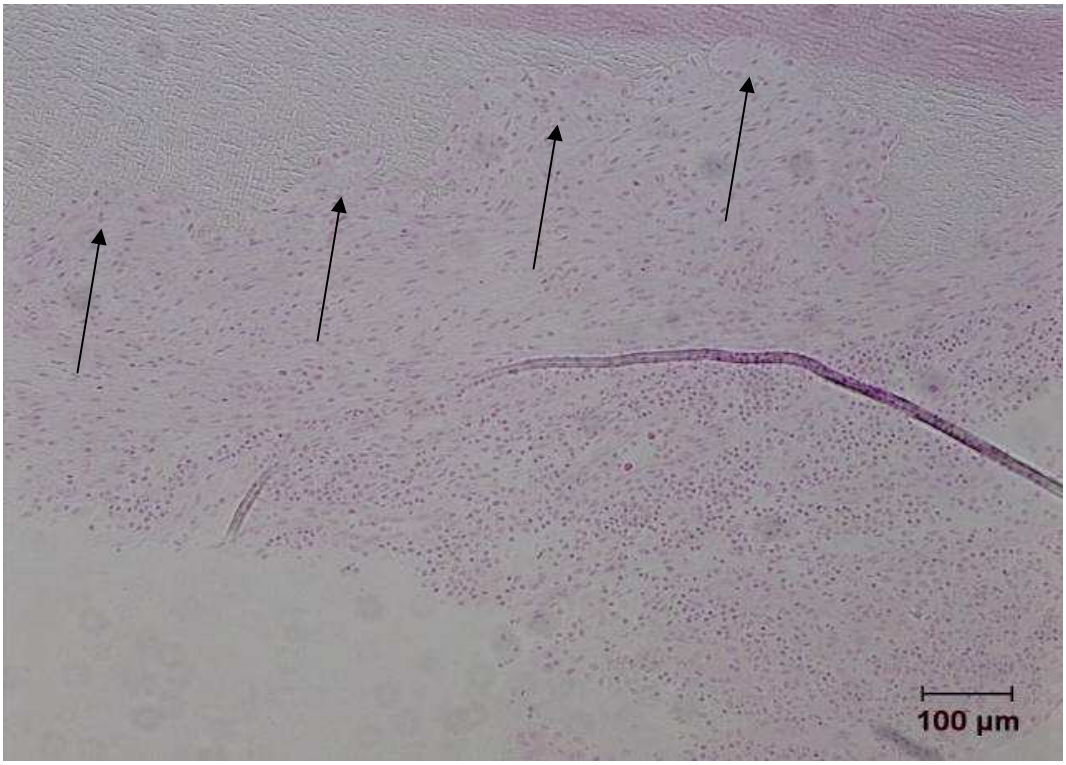


Resim 3.4. Enfekte bir örnekte koronal pulpada odontoblast tabakasının bütünlüğünün korunduğu gözlenmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

Kronik yangı gösteren çok köklü dişlerin çoğunda kökler arası servikal 1/3 kısımda yoğun iltihabi hücre infiltrasyonu gözlendi (Resim 3.5). Böyle dişlerin çoğunda kök ucunda rezorpsiyon başlamıştı. Koronal pulpada mikroapse benzeri yoğun iltihabi hücre odaklarının tespit edildiği durumlarda krondan başlayarak kökün çeşitli kısımlarında internal rezorpsiyonun başladığı gözlendi (Resim 3.6).

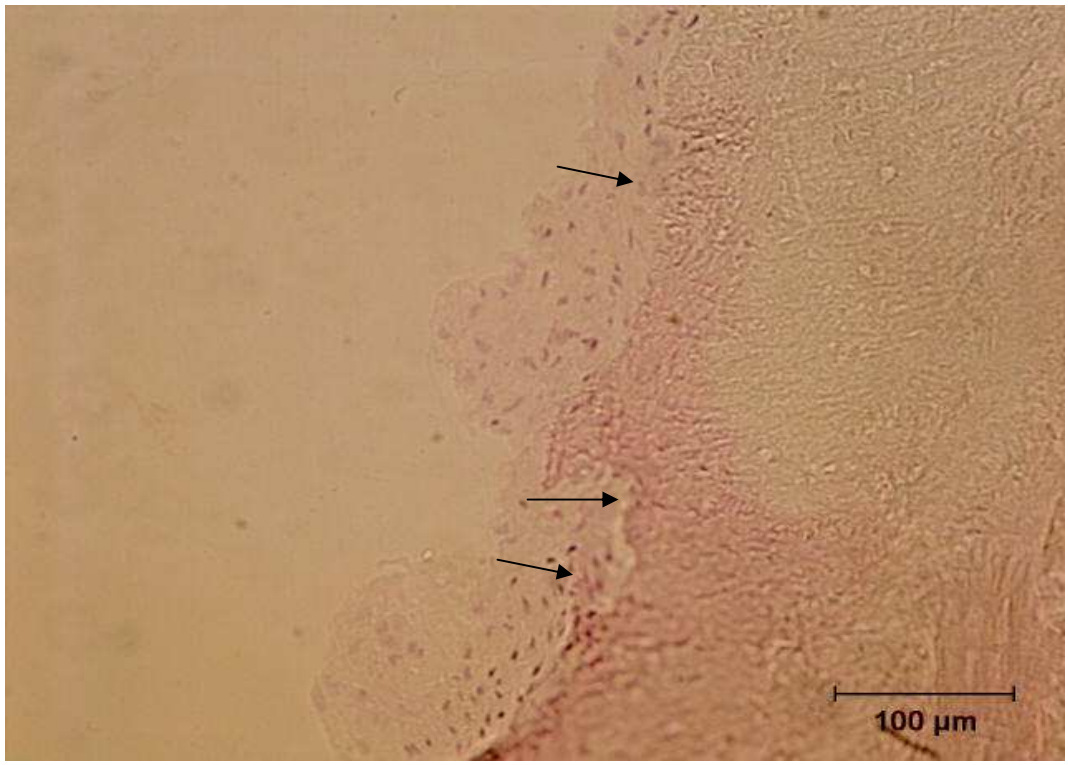


Resim 3.5. Kökler arası bölgede yoğun hücre infiltrasyonu (asteriks) Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.



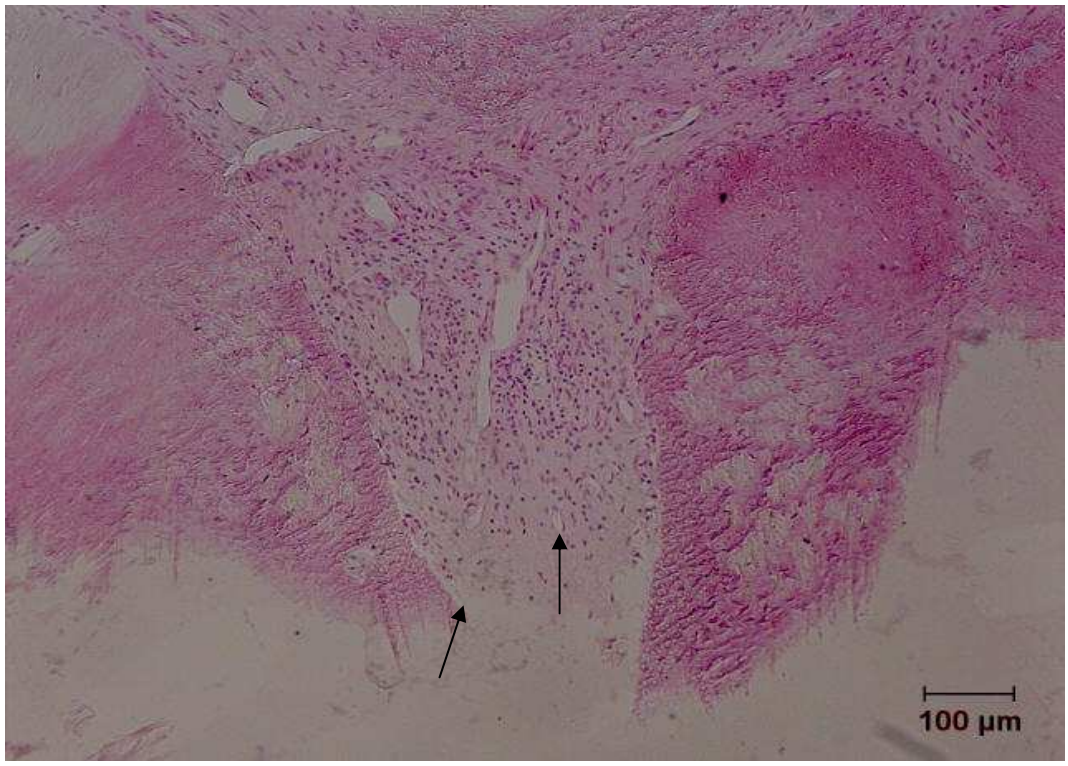
Resim 3.6. Enfekte pulpada internal rezorpsiyon (ok) görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

Patolojik kök rezorpsiyonu, çürük olan taraftaki kökün tamamen veya kısmen rezorbe olmasına rağmen diğer kökün sağlam kalması şeklinde gözlendi. İltihabın şiddetli olduğu dişlerde periapikal bölgede abse ve granüloma gibi patolojik oluşumlar mevcuttu. Bu grup dişlerde distrofik kalsifikasyonlar da gözlenmekteydi. Desmodonsiyumun yapışık olduğu örneklerin çoğunda periodontal ligamentin sağlıklı olduğu gözlendi. Bununla beraber ilerlemiş iltihabi durumlarda periodontal alanda rezorpsiyon belirgindi (Resim 3.7).

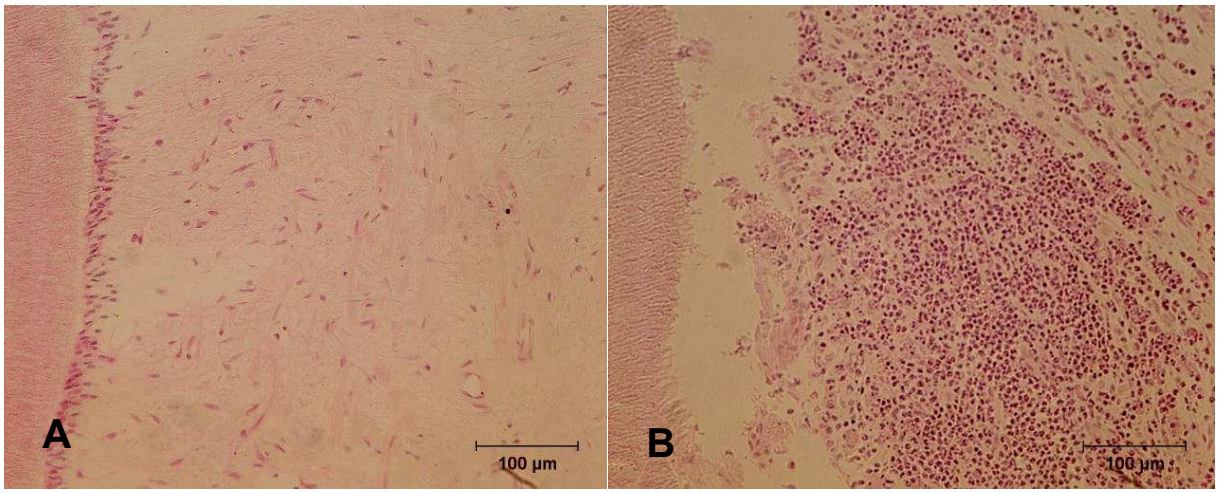


Resim 3.7. İleri derecede enfekte bir dişte interdental yüzeyde kök yüzeyinde rezorpsiyon lakünaları (ok) görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

Rezorpsiyonun tamamlanmasına yakın evrede dişetinin ve oral epitelden ve periodonsiyumdan kaynaklandığı düşünülen iltihabi hücrelerin krona girişi ile rezorpsiyonun hızlandığı görüldü (Resim 3.8). Bu sırada kökün apikale yakın kısmında gözlenen iltihabi reakisyonların koronal pulpaya ulaşmadığı dikkati çekti (Resim 3.9A ve B).



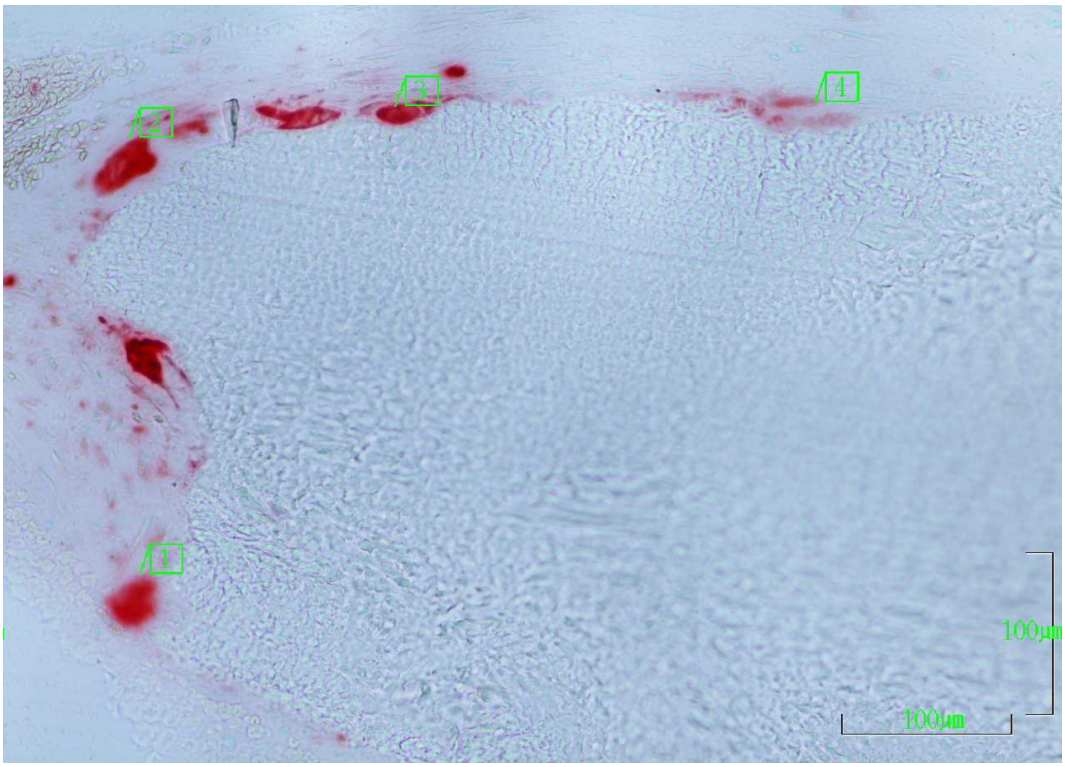
Resim 3.8. Rezorbe kök ucunda hücre infiltrasyonu (oklar) belirgin biçimde görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.



Resim 3.9. Koronal pulpası sağlıklı (A) dişte rezorbe kök ucuna yakın bölgedeki (B) yoğun hücre infiltrasyonu görülmektedir. Hematoksilen-eozin, büyütme çizgisi:100 µm.

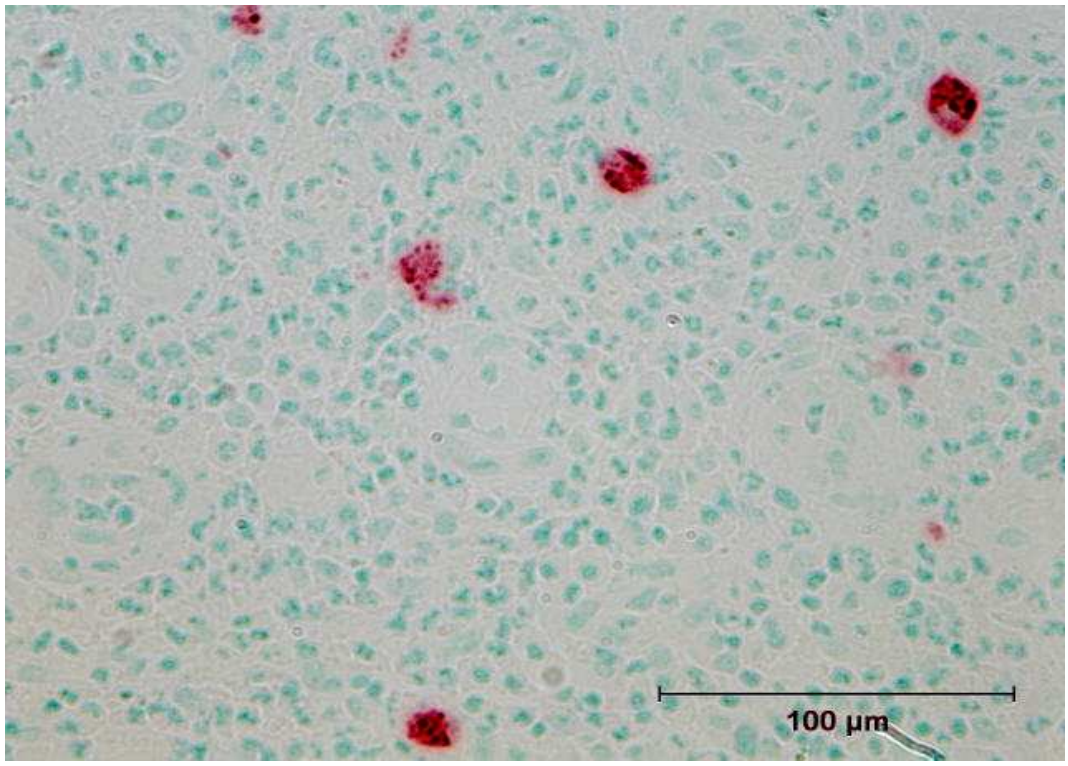
3.2. TRAP Histokimyası

Rezorpsiyon yüzündeki pek çok çok çekirdekli odontoklast hücresi ve/veya bunlara komşu tek çekirdekli hücreler $TRAP^+$ boyandı (20/66). Reaksiyon ürünü granüler kırmızımsı-kestane rengi sitoplazmik boyanma şeklinde tespit edildi. Rezorpsiyon yüzeyi boyunca lakünalar içinde yerleşmiş $TRAP^+$ hücrelerde değişik yoğunluklarda ve sitoplazmik modelde boyanma gözlendi (Resim 3.10).

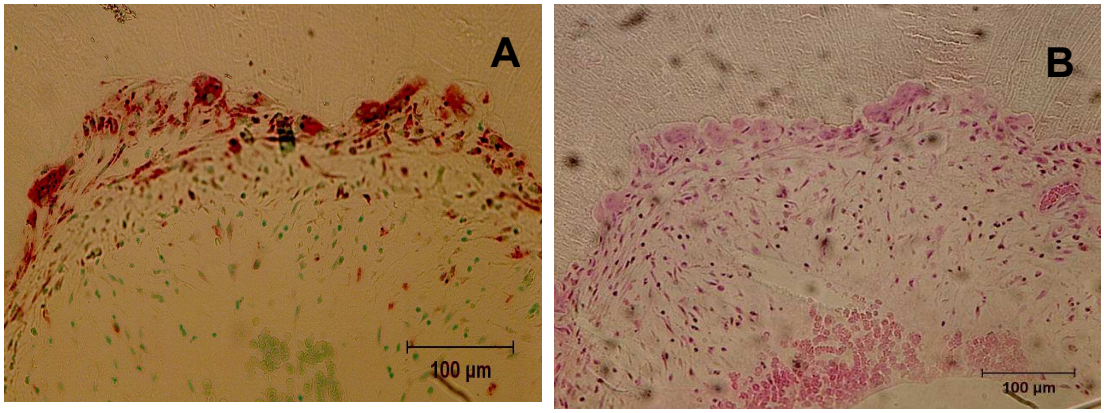


Resim 3.10. Rezorpsiyon yüzeyi boyunca tipik $TRAP^+$ hücreler ve zayıftan (1) şiddetliye (2, 3, 4) değişik sitoplazmik modellerde spesifik boyanma gözlenmekte TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm.

$TRAP^+$ hücreler, özellikle iltihabın şiddetli olduğu dişlerde pulpa odasında da gözlendi (8/66) (Resim 3.11). Predentinal rezorpsiyon gözlenen 6 dişte rezorpsiyon lakünası içerisinde $TRAP^+$ hücre tespit edildi ve bu dişlerin tamamında şiddetli derecede iltihabi reaksiyon mevcuttu (Resim 3.12). Bu dişlerde tespit edilen $TRAP^+$ hücrelerin damar çevresinde oldukları gözlendi. Bununla birlikte $TRAP^-$ olan 7 örneğin 5'inde $RANKL^+$ olan hücre yoğunlukları tespit edildi. Tüm örnekler göz önüne alındığında koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü ile $TRAP^+$ hücre varlığı arasında pozitif orta derecede bir korelasyon tespit edildi (Resim 3.13) (Tablo 3.2).

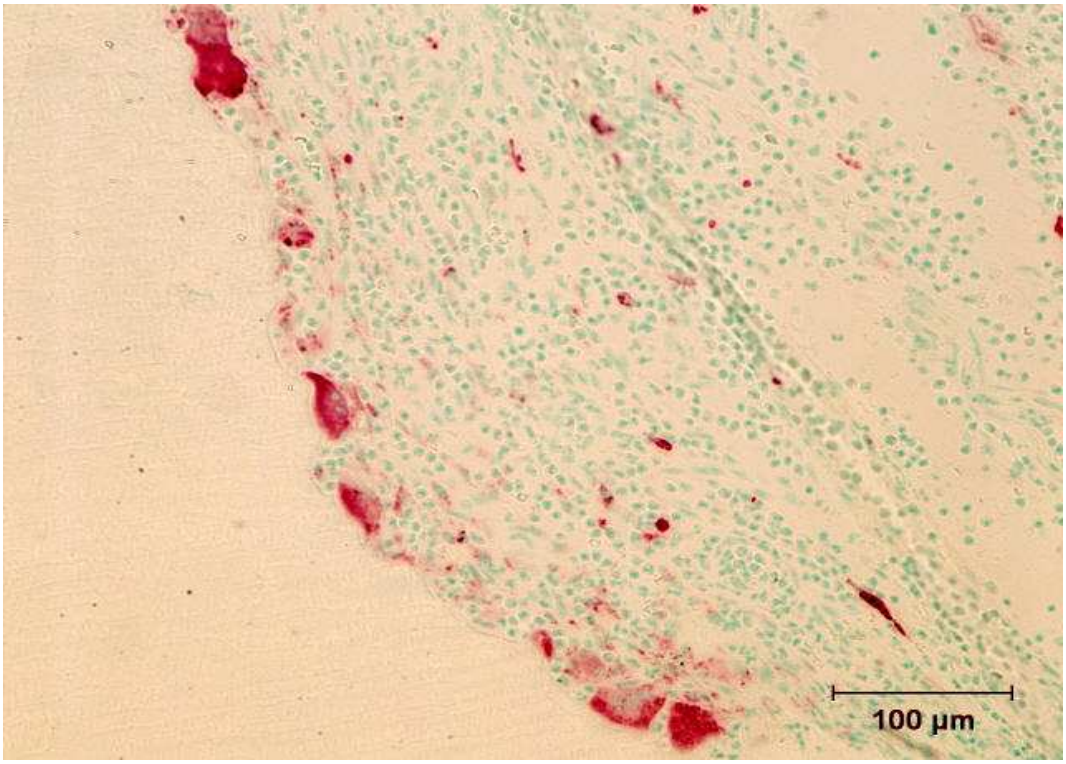


Resim 3.11. Yoğun iltihabi hücrelerle birlikte pulpa odasında $TRAP^+$ hücreler görülmektedir. TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm.

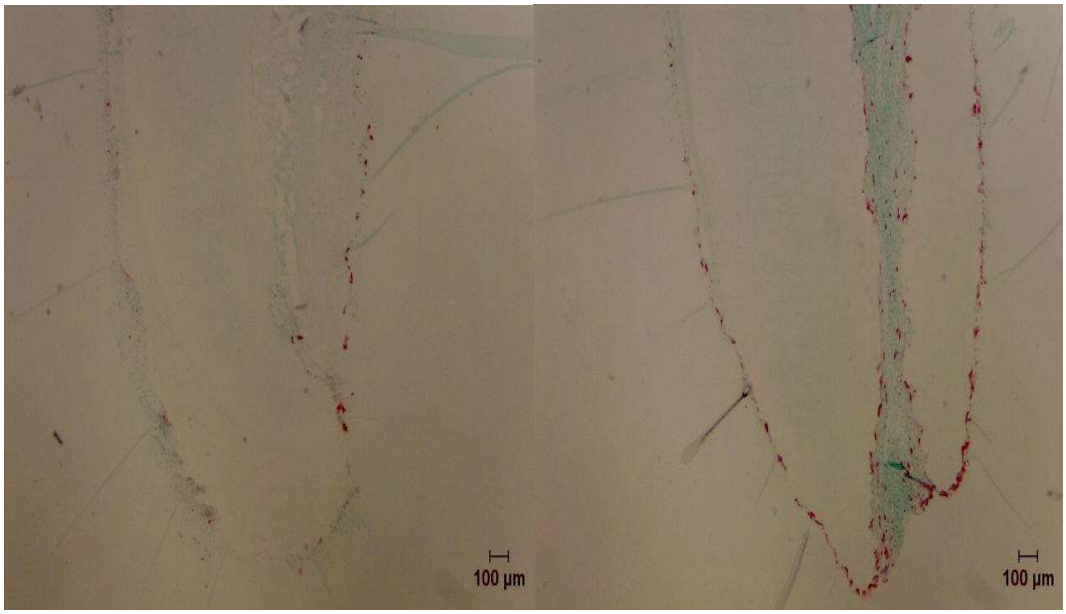


Resim 3.12. Predentindeki rezorpsiyon lakünaları içinde $TRAP^+$ hücreler (A) ve aynı bölgenin hematoksilen-eozin ile boyanmış görüntüsü (B) izlenmektedir. TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm

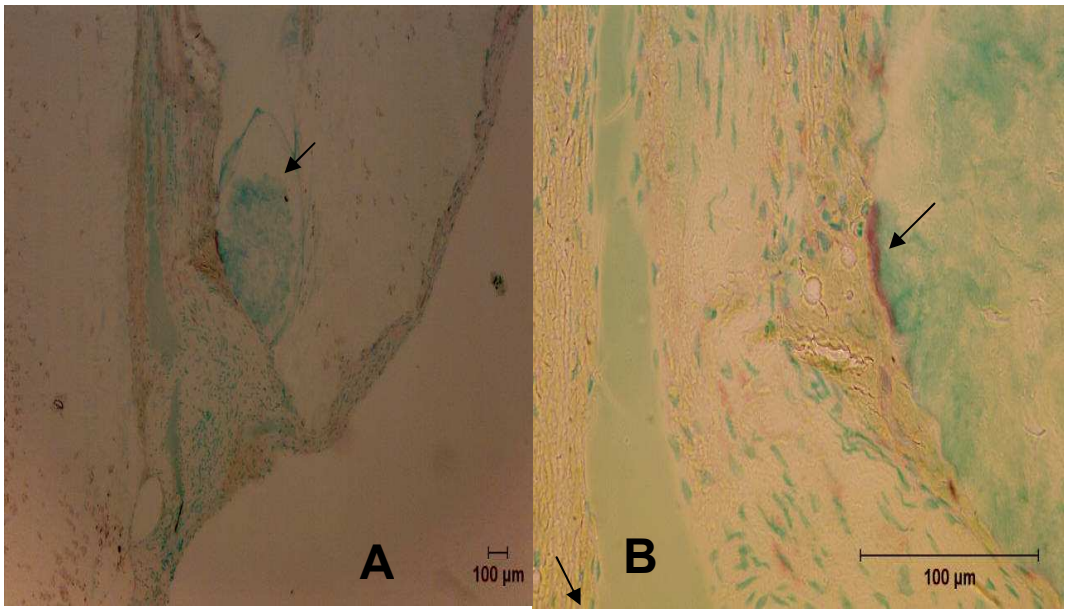
İleri derecede iltihabi reaksiyon gözlenen dişlerde tüm kök yüzeylerinin $TRAP^+$ hücrelerle kaplı olduğu görüldü (Resim 3.14). Kökler arası bölgede gözlenen yoğun iltihabi infiltrasyonun gözlendiği yerlerde pozitif reaksiyonlar belirgindi. İnternal rezorpsiyonun gözlendiği bölgelerde, periapikal lezyon varlığında, distrofik kalsifikasyonun çevresinde $TRAP^+$ hücre yoğunluğu dikkat çekmekteydi (Resim 3.15).



Resim 3.13. Koronal odontoblastik tabaka bütünlüğünün bozulduğu ve dentin/predentinin aktif bir şekilde $TRAP^+$ hücrelerle rezorbe edildiği bir dişte aynı zamanda enfekte pulpada yer alan tek veya çok çekirdekli $TRAP^+$ hücreler görülmekte. TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm.



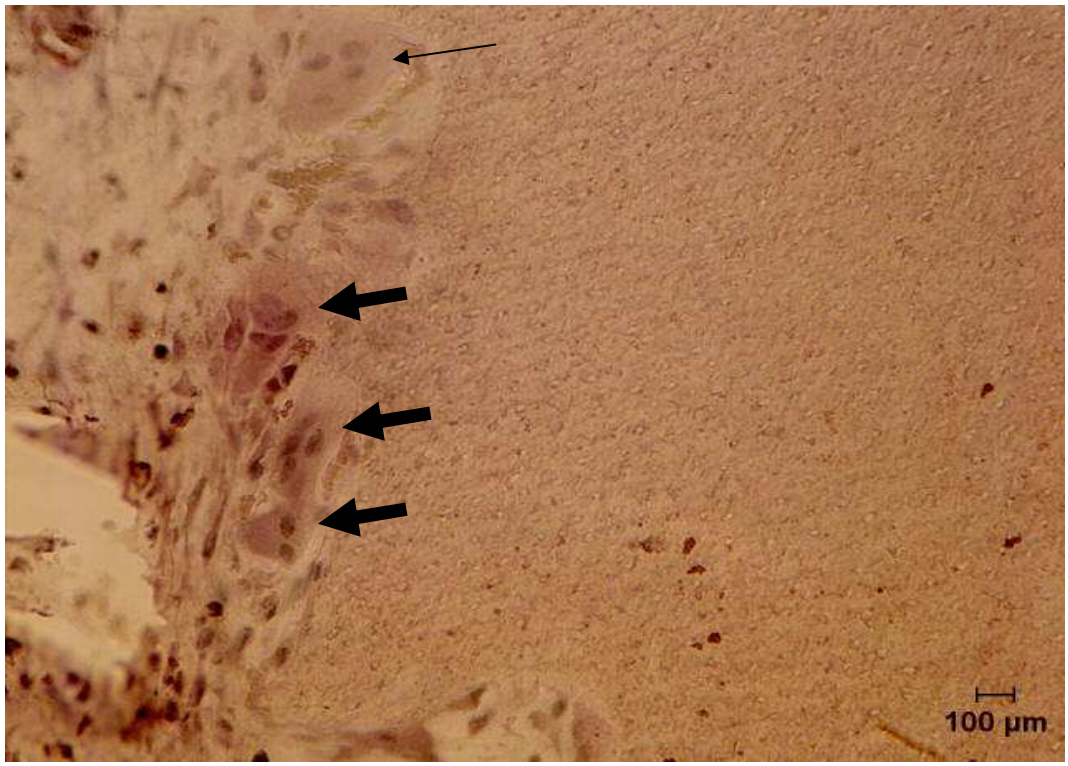
Resim 3.14. Şiddetli iltihabi reaksiyon gözlenen bir azı dişinde kök yüzeylerinde ve kök pulpasında $TRAP^+$ hücreler izlenmektedir. TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm



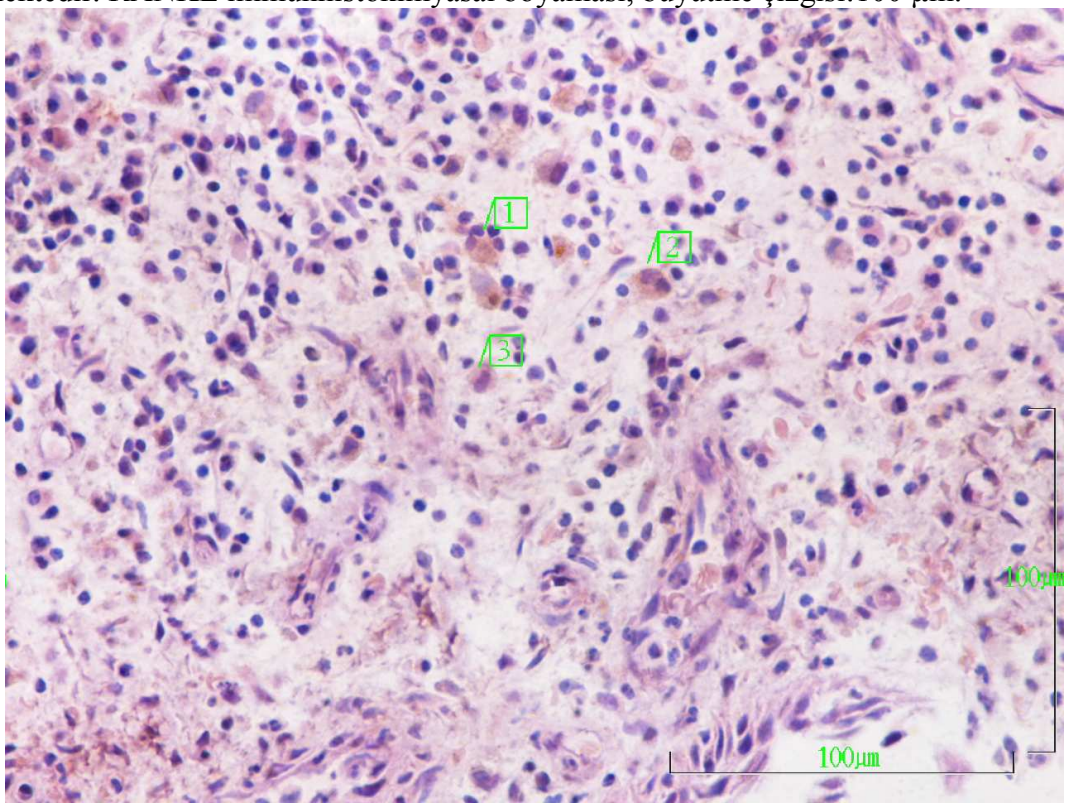
Resim 3.15. Kök pulpası içerisinde distrofik kalsifikasyonun (ok) gözlendiği bir dişte (A) kalsifikasyon ve çevresinde gözlenen $TRAP^{+}$ hücreler (ok) (B) gözlenmektedir. TRAP boyama, büyütme çizgisi 100 µm.

3.3. RANKL İmmüno histokimyası

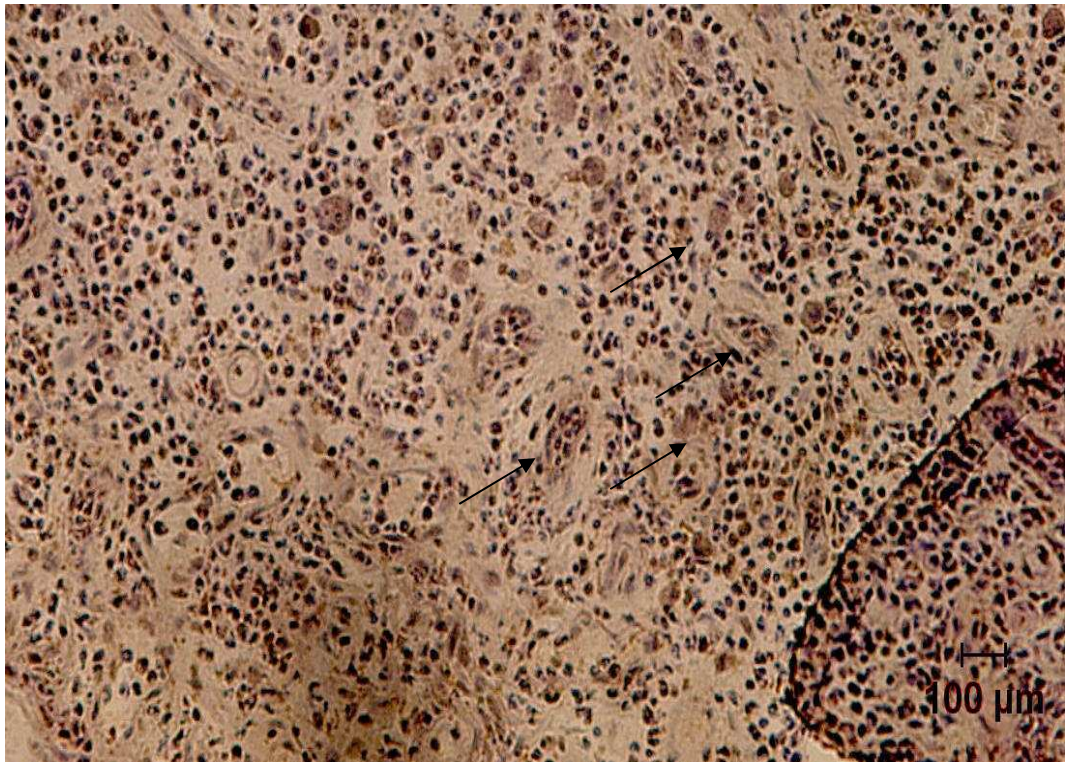
İncelenen toplam 66 örneğin 52'sinde (%78) $RANKL^{+}$ hücreler gözlendi. Lokalizasyon, 22/52 (%42) örnekte pulpayla sınırlıyken, 5/52 (%9) örnekte rezorpsiyon lakünasındaki odontoklastlar ve/veya tek çekirdekli hücrelerde, 24/52 (%46) örnekte ise hem pulpada hem de rezorpsiyon yüzünde lokalize hücrelerde idi. Tüm immünoreaktif hücreler zayıftan güçlüye doğru çeşitli yoğunluklarda granüler tipte spesifik koyu kahverengi renginde sitoplazmik boyanma gösterdi (Resim 3. 16). Pulpa dokusunda gözlenen $RANKL^{+}$ hücreler genel olarak pulpa fibroblastları, lenfosit hücreleri, endoteliyal hücreler, monosit ve makrofajlar veya tek çekirdekli pulpal/lenfoid hücreler idi (Resim 3.17). İltihabi hücre infiltrasyonunun yoğun olduğu örneklerde özellikle damar çevresindeki $RANKL^{+}$ hücreler belirgindi (Resim 3.18).



Resim 3.16. Rezorpsiyon lakünası içerisinde kuvvetli (kalın oklar) ve zayıf (ince ok) immüno pozitif RANKL reaksiyonu veren odontoklast hücreleri görülmektedir. RANKL immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.

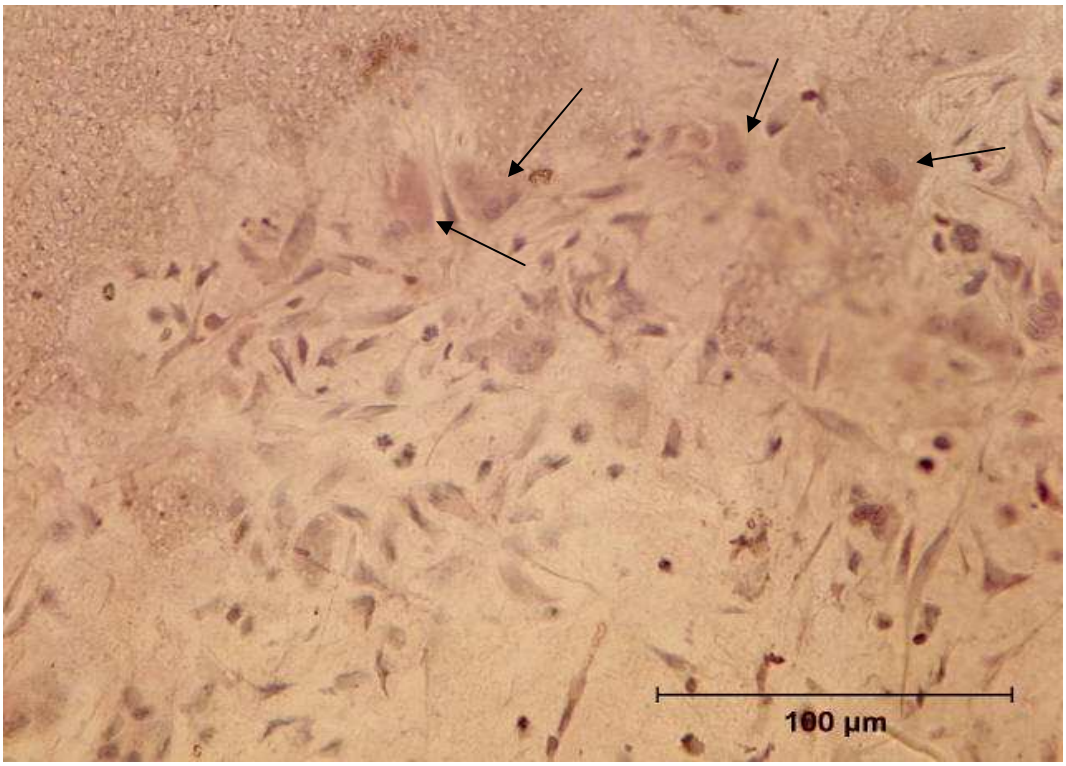


Resim 3.17. Enfekte pulpa dokusunda pek çok pozitif pulpal fibroblastlar, lenfosit hücreleri, endoteliyal hücreler, monosit ve makrofajlar veya tek çekirdekli pulpal/lenfoid hücreler görülmektedir (1-3). RANKL immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.



Resim 3.18. Perivasküler lokalizasyonda RANKL immün-pozitif hücreler (oklar). RANKL immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.

Ayrıca PDL fibroblastları ve bitişik periodonsiyumdaki mono ve/veya multinükleer hücreler de immünoreaktif idiler. Kimi olguda odontoblastik tabaka bütünlüğü bozulmuş olmakla birlikte subodontoblastik alanda zayıf pozitif reaksiyon gözlendi (Resim 3.19). Kimi olguda sağlıklı odontoblatik tabaka arasında az sayıda olmakla birlikte tek çekirdekli $RANKL^{+}$ hücre varlığı dikkati çekmiştir. İltihabi reaksiyonun yoğun olduğu bölgede pek çok pozitif hücre gözlenmekteydi. Aynı örnekte immünoreaktif olan ve olmayan hücreler aynı bölgede tespit edilebildi. Farklı hücre tiplerinde boyanmanın varlığı veya yokluğu için iltihabi reaksiyon seviyeleri ile ilişkili olarak pulpal ve/veya rezorpsiyon yüzünde olmak üzere bir model tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde iltihabi reaksiyon seviyeleri ve RANKL ekspresyonunun görülüp görülmemesi arasında anlamlı ilişki saptandı (χ^2=12,21; SD=4; p=0,016).



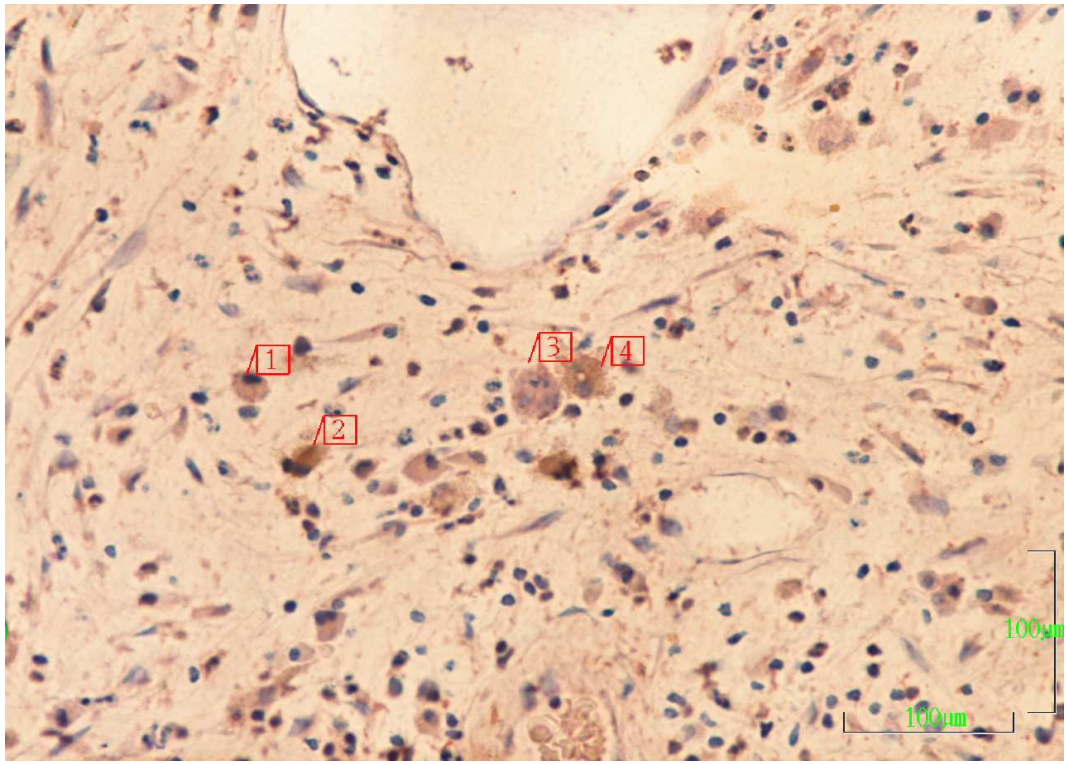
Resim 3.19. Predentinde rezorpsiyonun başladığı bir olguda zayıf pozitif reaksiyon gösteren ihtimali odontoblastlar görülmektedir (oklar). RANKL immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.

3.4. OPG İmmüno histokimyası

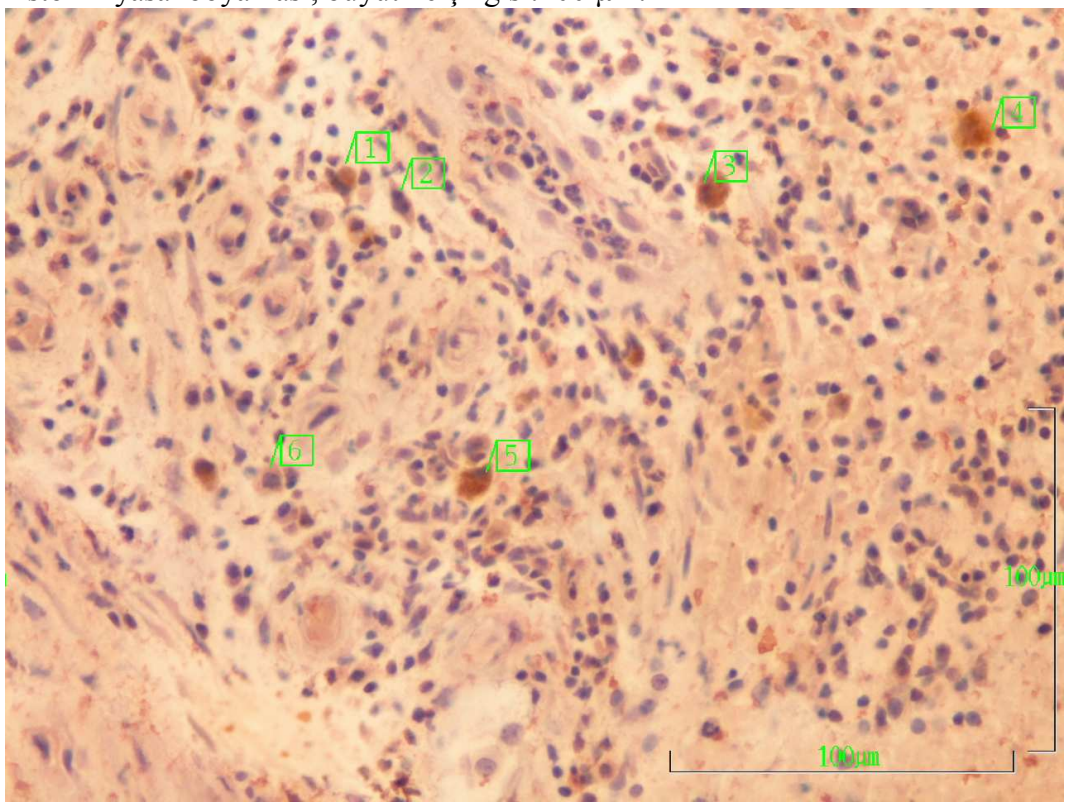
Toplam 42 örnekte (%63) olmakla birlikte RANKL'a göre daha zayıf oranda OPG immünoreaktif hücre varlığı tespit edildi. Gözlenen pozitif reaksiyonların neredeyse tamamı (%95) pulpal lokalizasyona sahipti. İmmunreaktif hücreler çoğunlukla odontoblastlar, pulpal fibroblastlar ve tek çekirdekli pulpal hücreler idi (Resim 3.20, 21). OPG^{+} hücrelerde de damar endotelinde spesifik lokalizasyon gözlemlemek olası idi. Spearman's rho korelasyon testi ile OPG ile koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü arasında pozitif zayıf bir ilişki olduğu tespit edildi (Tablo 3.2). OPG ve RANKL ekspresyonları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (χ^2=0,353, SD=1, p=0.552).

3.5. Kontroller

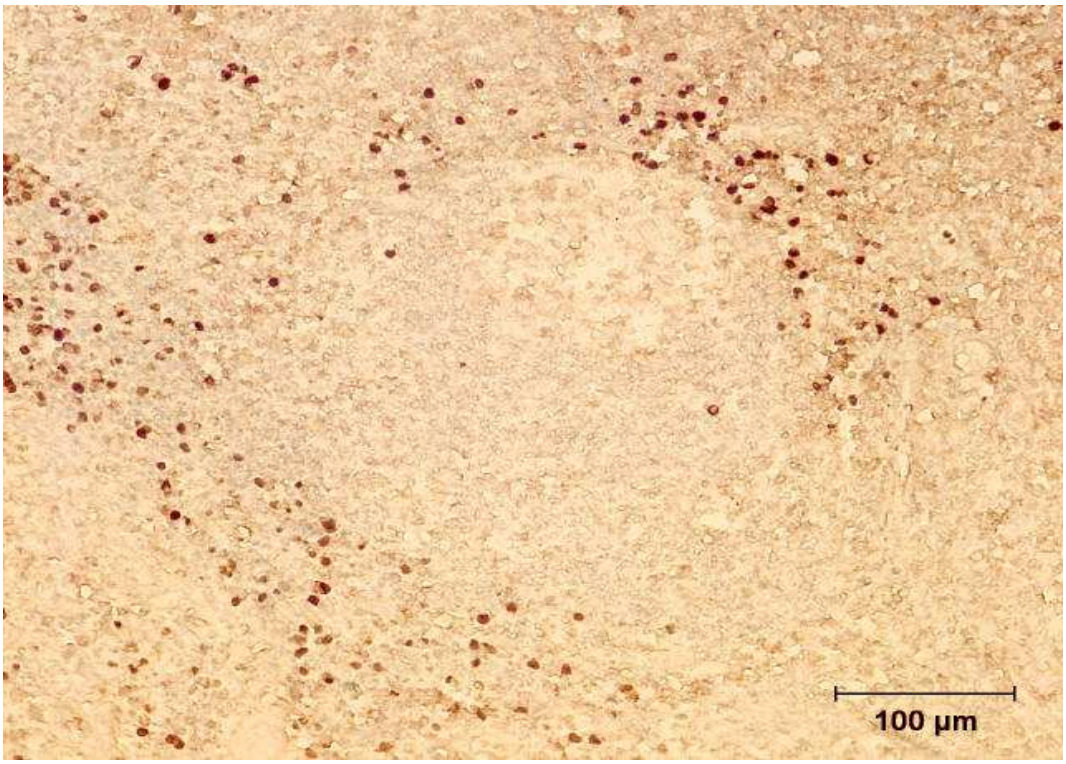
Pozitif kontrol grubu olan insan tonsillerinde kuvvetli pozitif RANKL (Resim 3.22) ve OPG ekspresyonu gözlenirken (Resim 3.23), primer veya sekonder antikorların kullanılmadığı negatif kontrollerde herhangi bir ekspresyon saptanmadı.



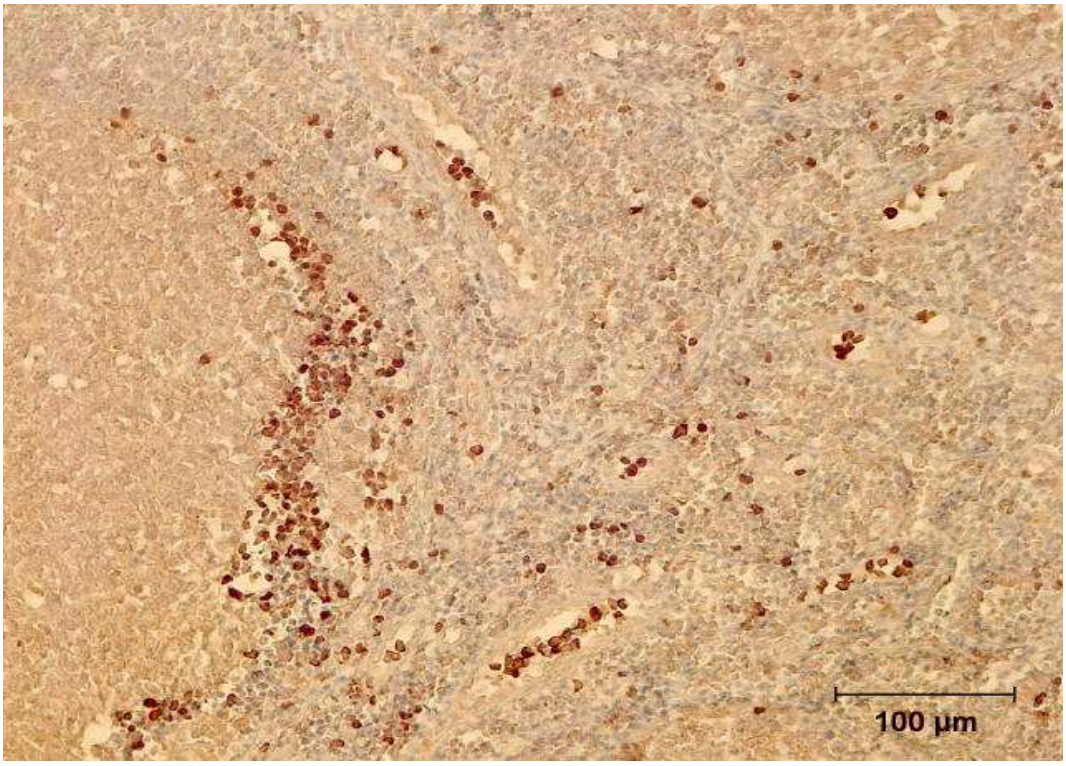
Resim 3.20. Pulpal lokalizasyonda OPG^{+} hücreler (1-4) görülmektedir. OPG immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.



Resim 3.21. Pulpada tek ve çok çekirdekli OPG^{+} hücreler (1-6) görülmektedir. OPG immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.



Resim 3.22. İnsan tonsilinde çok sayıda pozitif OPG hücresi gözlenmektedir. OPG immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.



Resim 3.23. İnsan tonsilinde $RANKL^{+}$ hücreler gözlenmektedir. RANKL immunhistokimyasal boyaması, büyütme çizgisi:100 µm.

4. TARTIŞMA

Bu tezde gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında insan süt dişlerinde fizyolojik ve patolojik rezorpsiyon olaylarında spesifik RANKL ve OPG protein ekspresyonları *in situ* immüno histokimyasal teknik ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar insan süt dişi rezorpsiyonunda özellikle iltihabi reaksiyonun olaya katılmasıyla birlikte, RANKL/RANK/OPG yolunun aktive olabileceğini önermektedir.

Dişlerin mineralize matriksinin rezorpsiyonundan sorumlu hücreler olan odontoklastların, osteoklastlarla benzer histolojik ve fizyolojik özellikleri olmasına rağmen, rezorpsiyon substratlarının farklılığı, süt dişi rezorpsiyonunun kemik remodelinginden farklı olup olmadığı sorusunun güncelliğini korumasına neden olmaktadır. Kök rezorpsiyonunun, rezorptif süreçleri stimüle veya inhibe eden faktörler arasındaki moleküler etkileşimlerin biyolojik bir sonucu olduğu düşünülebilir. İlaveten osteoklast ve odontoblastların fonksiyonlarının ve aktivitelerinin düzenlenmesi kısmen farklılık teşkil etmektedir. Örneğin, bir prostanoid sentezi inhibitörü olan indometasin osteoklastik kemik rezorpsiyonunu baskılarken, diş kökü rezorpsiyonunu arttırmaktadır. Bir diğer örnek olarak kök rezorpsiyonu parathormon tarafından etkilenmiyor görülmektedir; hiperparatiroidizmi olan hastalarda kemik rezorpsiyonu görülmemektedir (Helfrich 2005). Bununla birlikte Kuşgöz ve ark. (2005) süt dişi kök rezorpsiyonunda gecikme gözlenen çocuklarda yaptıkları araştırmada bu çocuklardaki parathormon, alkalen fosfataz ve serbest T_4 hormon seviyelerinin, süt dişi kök rezorpsiyonu normal sınırlar içinde gerçekleşen bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı ve daha yüksek olduğunu bildirmişler ve bu durumu söz konusu hastalarda aktif büyüme gelişimin devam ettiği şeklinde yorumlamışlardır. Tüm bu sebeplerle insan süt dişlerinin rezorpsiyon mekanizmalarında yer alan etmenlerden pek çoğu henüz bilinmemektedir.

Konu rezorpsiyonun hücresel mekanizmalarına indirgendiğinde, Sasaki ve ark. (1988) odontoklastların sadece, rezorpsiyon sürecinde sağlam dentin yerine serbestleşmiş apatit kristalleriyle etkileşebildiklerini göstermişlerdir. İnsan süt dişlerinin fizyolojik kök rezorpsiyonu boyunca, odontoklastların dentin yüzeylerinin

kısmi ekstrasellüler degradasyonunu yarattıkları ve daha sonra apatit kristallerinin çözünme ve rezorpsiyonunu ayarladıkları düşünülmektedir (Sasaki ve ark. 1988). Kemik remodelinginde ise osteoblastların osteoklastlarla etkileşerek kemik rezorpsiyonunda aktif bir rol oynadıkları gösterilmiştir (Rodan ve Martin 1981). Fakat, odontoklastlar tarafından indüklenen kök rezorpsiyonunun kemik remodelinginde olduğu gibi osteoblast/stromal hücre oluşumunu içermemesi, kök rezorpsiyonunun osteoklastik kemik rezorpsiyonundan daha farklı bir mekanizmayla düzenlendiğini düşündürmektedir (Freilich 1971). Bununla birlikte diş rezorpsiyonu için sementoblastlar/periodontal ligament fibroblastları veya odontoblastlar gibi formatif hücrelerin osteoblastlarla benzer bir yeteneğe sahip olup olmadıkları hala tartışmalı bir konudur. Osteoklast şekillenmesi ve farklılaşmasının düzenleyicisi olan RANKL'ın osteoblastlar tarafından sentezlendiği ve salgılandığının bulunmasıyla, osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki ilişkinin moleküler yönü aydınlığa çıkarılmıştır (Yasuda ve ark. 1998). Bununla birlikte insan süt dişi rezorpsiyonunda RANKL ve tuzak reseptörü OPG'nin rollerine ilişkin sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır.

Kemiği rezorbe eden osteoklastların farklılaşması ve aktivitesinin RANKL/RANK/OPG gibi pek çok sitokinleri ve çeşitli büyüme faktörlerini içeren çok sayıda faktörle düzenlendiği gösterilmiştir (Hofbauer ve Heufelder, 2001). Odontoklastlarınsa bu anlamda kök rezorpsiyonunu düzenleyen kendi faktörlerini üretip üretmedikleri veya fonksiyonlarının büyüme faktörleri ile düzenlenip düzenlenmediği ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Yıldırım ve ark. (2008) düşmekte olan süt dişlerinin pulpa dokusunda RANKL, OPG, MCP-1, CSF-1, TGFβ ve Cbfa-1 mRNA ekspresyonlarını araştırmışlar ve pulpa dokusu hücrelerinin osteoklastogeneziste aktif rol oynayan tüm bu molekülleri eksprese ettiğini ve sağlıklı daimi diş pulpa dokusuyla kıyaslandığında, süt dişi pulpasında RANKL ekspresyonunun anlamlı derecede fazla olduğunu göstermişlerdir. Götz ve ark.(2001) insan süt dişlerinde yaptıkları *in situ* immunhistokimyasal çalışmada odontoklastların osteoklastların aksine insülin benzeri büyüme faktörünü üretmediği sonucuna varmışlardır. Linsuwanont ve ark. (2002a, b, 2006) sığır süt dişi rezorpsiyonu sırasında odontoklastlarında MMP-9, katepsin K ve MT1-MMP ekspresyonunun söz konusu olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte süt dişi rezorpsiyonunda tek bir molekül veya molekül grubunun spesifik rolüne dair bir veri elde edilememiştir.

Odontoklastogenezisin moleküler düzenleyicileri olan RANKL/RANK/OPG konusunda ise ulaşabildiğimiz yayınlar dahilinde, sadece Oshiro ve ark. (2001) ve Lossdörfer ve ark. (2002) insan süt dişlerinde fizyolojik rezorpsiyon sırasında RANKL ve RANK ekspresyonunu gösteren araştırmacılar olmuşlardır. Fukushima ve ark. (2003) ise süt dişlerinden elde ettikleri PDL hücre kültürleri ile RANKL mRNA ekspresyonunu göstermişlerdir.

Bu tez kapsamında incelenen örneklerde %78 oranında tespit edilen RANKL ekspresyonu %88 oranında pulpal lokalizasyon göstermiştir. Pulpada tespit edilen immün-pozitif reaksiyon nerdeyse her zaman pulpal fibroblastlar, damar endoteli, monosit-makrofajlar ve tek çekirdekli pulpal/fagositer/lenfositer hücreler gibi iltihabi hücrelerde olmuştur. Odontoblastik tabakada kuvvetli bir reaksiyon gözlemleyememmemiz, nispeten direkt olarak karşılaştırma yapabileceğimiz örneklem ve metodolojiye sahip sınırlı sayıda araştırmadan biri olan Lossdörfer ve ark. (2002) tarafından bildirilen bulgularla çelişmektedir. Bununla birlikte predentin rezorpsiyonun başladığı bazı örneklerde subodontoblastik tabakada ihtimali odontoblastik hücrelerde bir kısım zayıf immün-pozitif reaksiyon elde edilmiştir. Odontoblastik tabakada kuvvetli $RANKL^{+}$ reaksiyonlar gözleyemeyişimizin kesin bir açıklamasını yapmanın çok kolay olmadığı düşünülmektedir. Muhtemel bir sebep olarak fiksasyon, dekalsifikasyon ve doku takibi işlemleri sırasında protein degradasyonuyla karşılaşmış olabilme olasılığımız gösterilebilir. Böylece elde ettiğimiz sonuçların ancak çok kuvvetli ekspresyonlara ait olabileceği düşünülmektedir. Bir diğer olasılık ise, araştırmamızda yer alan dişlerin %80'inin (53/66) ileri derecede iltihabi reaksiyona sahip olması nedeniyle sağlıklı ekspresyonlar sergileyebilecek hücre sayısının azlığıdır. Bununla birlikte araştırmamızda patolojik rezorpsiyon gösteren örneklerin de yer almasıyla, Lossdörfer ve ark. (2002)'nın aksine, RANKL ve OPG ekspresyonu açısından bir model önerilebilmiştir. Lossdörfer ve ark. (2002) ise araştırmalarında belirli bir hücresel ve mekansal model öneremediklerini bildirmişlerdir. Diğer taraftan, fizyolojik rezorpsiyon sürecinde olan sağlıklı süt dişlerinde benzer metodoloji ile gerçekleştirilen ilk çalışma olan Oshiro ve ark. (2001)'nın çalışmasında RANKL immün boyanmasının rezorbe olan kök dentini yüzeylerinde yer alan bazı odontoklastlarda ve komşu bazı stromal hücrelerde olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada Lossdörfer ve ark. (2002)'nın çalışmasının ayrıntıları yer almamaktadır.

Bu durumda alanının ilk çalışmaları arasında yer alan, süt dişi rezorpsiyonunun moleküler mekanizmalarına ait bu tarz çalışmaların benzer protokollerle tekrarlanarak kesin sonuçlara ulaşılmasının mümkün olacağı düşünülmektedir.

Araştırmamızın bulguları arasında bulunan rezorpsiyon lakünaları içindeki odontoklastlara komşu tek çekirdekli $RANKL^{+}$ hücrelerin varlığı, Oshiro ve ark. (2001) tarafından dental dokularda odontoklast/stromal hücre arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinin olası açıklamaları olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte araştırmamızda pulpada, rezorpsiyon yüzünde lakünalar içerisinde veya sağlıklı PDL'te gözlenen tek çekirdekli hücrelerin fagositer, lenfositik veya pulpal stromal hücreler olup olmadıklarının daha ileri çalışmalarla açıklığa kavuşturulması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, bahsedilen bu iki çalışmadan farklı olarak araştırmamızda, ulaşabildiğimiz kadarıyla ilk defa, enfekte süt dişleri üzerinde RANKL/OPG ekspresyonu araştırılmış ve özgün bulgular elde edilmiştir. Diğer taraftan monosit ve makrofajların RANKL üretimi hakkında pek az bildiri bulunmaktadır (Crotti ve ark. 2003). Periprostetik osteolizis vakalarında monositlerin ve CD68 (makrofaj işaretleyicisi) eksprese eden hücrelerin aynı zamanda RANKL ekprese ettikleri gösterilmiştir (Haynes ve ark. 2001). Bu durumda rezorbe olmakta olan çoğu ileri derecede iltihaplı süt dişlerinin pulpalarında gözlemlediğimiz pozitif hücre reaksiyonlarının hem hücresel kaynağının hem de, bu hücrelerin yüzeyinde RANK'a bağlı RANKL nedeniyle oluşup oluşmadıklarının belirlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

İltihabi süreçlerde aktif T-lenfositlerin RANKL eksprese ettikleri ve bu sebeple T-lenfositler ile monosit/osteoklast öncüsü hücreler arasındaki hücre-hücre temasının osteoklast şekillenmesinde yer almasının olası olduğu düşünülmektedir. Akabinde, B lenfositlerin de RANKL eksprese ederek veya bizzat kendisi osteoklast ata hücresi olarak osteoklast formasyonuna katılabildiği gösterilmiştir (Lerner 2004, 2006). Bu sebeple bu tezde elde edilen pulpal monosit-makrofaj $RANKL^{+}$ reaksiyonları ile, T hücreleri ile monositler/osteoklast ata hücreleri arasındaki hücre-hücre temaslarının periodontitiste iddia edildiği gibi pulpitiste de veya rezorpsiyonun ilerleyen safhalarında iltihaplı pulpa dokusunda gözlenen predentinal rezorpsiyonda odontoklast formasyonunda da önemli olmasının kuvvetli bir olasılık olduğu düşünülmektedir.

Nitekim iltihabi hücreler tarafından eksprese edilen RANKL'ın, osteoklast formasyonunu, stromal hücreler/osteoblastlar olmaksızın bakteriler tarafından infiltre olan lökositler arasındaki hücre-hücre etkileşimleriyle direkt olarak stimüle etme mekanizmasında yer aldığı önerilmiştir (Teng ve ark. 2000, Lerner 2004). Romatoid artritte fibroblastların, benzer şekilde periodontitiste gingival fibroblastlar ve periodontal ligament hücrelerinin RANKL eksprese ettikleri ve bu ekspresyonların IL-1 and TNF-α tarafından arttırıldığı gösterilmiştir (Sakata ve ark. 1999). Bu sebeple sadece RANKL-eksprese eden T hücrelerinin ve yerel fibroblastların da iltihabi hastalıklarla ilişkili osteoklastogenezis ile bağlantılı oldukları düşünülmektedir (Lerner 2004). Bu tez araştırmalarından elde edilen sonuçlarla RANKL-eksprese eden T-hücreleri, gingival fibroblastlar, periodontal ligament hücreleri ve osteoblastlara, iltihap ile indüklenmiş süt dişi rezorpsiyonunda iltihabi hücreler, pulpa fibroblastları ve endotel hücreleri eklenmiştir. Pulpa dokusunun, çoğunluğu T-hücre hattından olan immün hücreleri içerdiği ve bu hücrelerin odontoklastik aktivasyondaki rolleri gösterilmiştir (Kannari ve ark. 1998, Angelova ve ark. 2004). Simsek ve Durutürk (2005) çürüklü süt dişi pulpasında $CD3^+$ lenfositlerin sayısında artış olduğunu saptamışlardır. $CD3^+$ lenfositlerin fizyolojik kök rezorpsiyonunda sayısal olarak artış gösterdiği ve bu hücrelerin RANKL ekspresyonundan sorumlu oldukları bildirilmiştir (Suda ve ark. 1999, Angelova ve ark. 2004). Bununla birlikte süt dişi rezorpsiyonunda bu hücrelerce sentezlenen RANKL miktarının, fizyolojik rezorpsiyonda özellikle odontoblastlar tarafından sentezlenmesi muhtemel RANKL miktarı arasındaki oranın önem derecelerini tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte, daha ileri araştırmalar için önemli bir konuyu teşkil ettiği açıktır. Lerner (2004) tarafından önerildiği gibi hücre tipinden bağımsız olarak, süt dişi rezorpsiyonunda, osteoklastogeneziste olduğu gibi RANK aktivasyonunun vazgeçilmez bir rol oynaması muhtemeldir ve OPG'nin ise süt dişi rezorpsiyonunun patolojik süreçlerinde patolojik rezorpsiyonun inhibe edilmesinde ilginç bir farmakolojik yaklaşım olması söz konusudur.

Süt dişi rezorpsiyonu sırasında kronik iltihabi hücrelerin gingival dokulardan süt dişi pulpası/PDL dokusuna infiltrasyonu, muhtemelen periodontitiste alveoler kemik lizisine yol açan iltihabi süreçte söz konusu olduğu gibi dentinal ve predentinal rezorpsiyonu hızlandıran bir süreç olabileceği düşünülmektedir.

Dökülmek üzere olan süt dişleri pulpasında RANKL mRNA ekspresyonunun, sağlıklı pulpa dokusundaki ekspresyonlara göre anlamlı derecede fazla olması pulpa dokusunda olgun osteoklastları şekillendirebilecek hücreler olduğunun güçlü bir kanıtıdır (Yıldırım ve ark. 2008). Bu tez çalışmasında olgun odontoklast işaretleyicisi olan $TRAP^+$ hücrelerin varlığının gösterilmesi de fizyolojik veya patolojik sebeplerle rezorbe olmakta olan süt dişinin pulpa ve periodontal dokularında bazı hücrelerin henüz farklılaşmaya uğradığını ve olgun odontoklast haline geldiğini ifade edebilir. Nitekim pulpada $TRAP^-$ olduğu halde $RANKL^+$ olarak tespit ettiğimiz hücrelerin, pulpada bu preodontoklastik popülasyonu işaret ettiği düşünülmektedir. Benzer şekilde odontoklastlara komşu tek çekirdekli $RANKL^+$ hücrelerin varlığı dental dokularda odontoklast/stromal hücre arasındaki hücre-hücre etkileşimlerinin olası açıklamaları olabilir (Oshiro ve ark. 2001).

Bununla birlikte fizyolojik süt dişi kök rezorpsiyonu sırasında tek çekirdekli hücrelerin odontoklastlara farklılaşması süreci hakkındaki bilgiler hala oldukça kısıtlıdır. Sasaki ve ark. (1989) kedi yavrusunun süt dişlerinde yaptıkları araştırmalarında odontoklastların sitodiferansiyasyonunun, multinukleasyonu, sitoplazmik polarizasyonu, hücre-matriks tanınması/eşleşmesi, kıvrımlı kenar gelişimi ve mineralize matriksin rezorpsiyonunu içerdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar preodontoklastların multinukleasyonunun dentin yüzeyinden uzakta rezorbe olan dokuda oluştuğunu açığa çıkarmışlardır. Ayrıca, kıvrımlı kenarlar mineralize dokuların odontoklastik rezorpsiyonunun aktif alanları olduklarından, kıvrımlı kenar oluşma süreci odontoklast sitodiferansiyasyonunun en önemli morfolojik ve fonksiyonel süreci olarak ifade edilmiştir (Sasaki ve ark. 1989). Ultrastrüktürel çalışmalarda kıvrımlı kenarın pürüzsüz bölge formasyonu aracılığıyla üretiliyor olduğu görüldüğünden Sasaki ve ark. (1988) bir başka araştırmalarında pürüzsüz bölgenin dentin yüzeyinden uzakta olan odontoklastlarda değil, mineralize olmayan predentinle karşılaşan preodontoklastlarda şekillendiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, dentin ve/veya predentin matriksinin tanımlanmamış bazı organik bileşenlerinin bu durumu indüklemiş olabileceğini düşündüklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Baron ve ark. (1986) osteoklast multinukleasyonunun sadece rezorbe olmakta olan kemik yüzeyinde görüldüğünü bildirmelerinin ardından Sahara ve ark. (1994) kemik iliği hücrelerinden köken alan osteoklast benzeri hücrelerin multinukleasyonunun mineralize matriks yokluğunda vit D3 ile indüklendiğini

göstermişlerdir. Bu durumda multinukleasyonun mineralize matriks varlığından çok bazı sitokinlerle indüklendiği düşünülmektedir. Araştırmamızda pulpa dokusunda mineralize yüzeylerden uzakta gözlemlediğimiz RANKL immün-pozitif reaksiyonların bu bulguları desteklediği düşünülmektedir.

Bununla birlikte osteoblastlar/odontoblastlar ve PDL hücreleri RANKL için ana kaynak olduklarından, osteoklastik/odontoklastik fonksiyonun teorik olarak bu hücrelerin sayısının azalmasıyla birlikte azalacağını beklemek gerekir. Araştırmamızda odontoblastlarda nadiren gözlemlediğimiz RANKL ekspresyonunu, iltihabi reaksiyon nedeniyle aktif protein sentezi ve ekspresyonu yapan hücre sayısındaki azalmayla açıklamak mümkün olabilir. Diğer taraftan paradoksikal olarak, osteoklastlardaki RANKL/RANK otokrin mekanizması sayesinde osteoklastların fizyolojik şartlarda fonksiyonlarını korumalarının mümkün olduğu bilinmektedir. Odontoklastlarda tespit edilen RANKL pozitivitesinin, RANKL'ın otokrin veya parakrin rolünü ifade edebileceği bildirilmiştir (Boyce ve Xing 2007). Osteoklast farklılaşmasında osteoblastik/stromal hücrelerin destekleyici fonksiyonunda rol almak kadar RANKL'ın aynı zamanda osteoklastların rezorptif yetenekleri ve sağkalımlarını desteklediği bildirilmiştir (Kartsogiannis ve ark. 1999). Araştırmamızda bu bulguları destekler nitelikte, tek veya çok çekirdekli odontoklastlarda çeşitli derecelerde boyanma gözlenmiştir. Bu farklı yoğunluktaki boyanmalar, hücrelerin farklı aktivite fazlarına veya farklı hücre tiplerinde farklı protein seviyelerinin ekspresyonuna veya kişiler arası farklılıklara atfedilebilir (Lossdörfer ve ark. 2002). Bu durumda araştırmamızda elde ettiğimiz kuvvetli pozitif odontoklastik ekspresyonlar, şiddetli iltihabi reaksiyon koşullarında bile odontoklastların aktivitelerini bu otokrin fonksiyonlarıyla koruyabildiklerini işaret ediyor olabilir. Bu sebeple süt dişlerinin kök rezorpsiyonlarının araştırılması sırasında fizyolojik veya patolojik rezorpsiyon sınıflandırmasından çok iltihabi reaksiyonun olduğu ve olmadığı süt dişi dokularında nispi RANKL, RANK ve OPG oranlarının belirlenmesinin önem kazanacağı düşünülmektedir.

Araştırmamız sonuçları bu bulgular çerçevesinde değerlendirildiğinde, verilerimiz, odontoklast sitodiferansiyasyonunun moleküler mekanizmalarından, eğer sadece tek mekanizma değilse, biri olması muhtemel olan RANKL/RANK/OPG sinyallemesine ait sonuçları içermektedir. Sasaki ve ark. (1988)'nın bildirdiklerine

benzer şekilde tek çekirdekli hücre/olası pre-odontoklastların pozitif reaksiyonları rezorbe olan dentinden uzakta, pulpa santralinde gözlenmiştir. Benzer şekilde $TRAP^-$ hücrelerin $RANKL^+$ reaksiyonları da yine pulpa santralinde ve pulpa santrali ve rezorpsiyon lakünalarındaki odontoklastlar ve/veya tek çekirdekli hücrelerde gözlenmiştir. İltihabın olmadığı, fizyolojik rezorpsiyonun sağlıklı bir şekilde devam ettiği dişlerde ise RANKL immünoreaksiyonunun görülmemesi yine Sahara ve ark. (1994)'nın bulgularını destekler şekilde predentinal veya dentinal rezorpsiyonda bir farklılığı önermektedir. Bununla birlikte çok az sayıda örnekte gözlediğimiz ve sağlıklı odontoblast tabakası arasına yerleşmiş az sayıda tek çekirdekli $RANKL^+$ hücrelerin varlığı, bahsedilen olasılığın daha ileri araştırmalarla desteklenmesini gerektirmektedir. Nitekim Lossdörfer ve ark. (2002) fizyolojik rezorpsiyon sırasında odontoblastik tabakada güçlü RANKL ekspresyonunu göstermişlerdir. Diğer taraftan odontoblastlar birbirleriyle sıkı kontaktlarla ilişkide olduklarından, odontoklastların veya öncülerinin predentine ulaşabilmeleri için bu sıkı bağları kırmaları gerekmektedir. Bununla birlikte yapılan araştırmalarda, monosit, makrofaj ve lenfositlerden oluşan iltihap hücrelerinin pulpaya infiltrasyonunun çok çekirdekli hücrelerin predentin yüzeylerinde görülmesinden önce oluştuğu ve bu iltihap hücrelerinden bazılarının odontoblastlarla yakın temasta oldukları görülmüştür (Sasaki ve ark. 1992, 1994). Bu iltihabi hücrelerden salınan sitokinler, kompleman veya diğer faktörlerin odontoblastik dejenerasyona ve ardından odontoklast farklılaşmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu bulguları destekleyerek Sasaki ve ark. (1994) pek çok sayıda çok çekirdekli odontoklastın mineralize olmayan predentin yüzeyinde lokalize olduklarını ve bu hücrelerin aktif olarak dentini rezorbe eden odontoklastlarla aynı ultrastrüktürel karakteristiklere sahip olduklarını göstermiştir. Bu durumda ancak 1998'in sonlarında keşfedilen RANKL ile açıklanabilen osteoklastogenezisin osteoblast bağımlılığının, odontoklastogeneziste de odontoblastlar veya pulpal fibroblastlar, damar endoteli hücreleri tarafından sergilenip sergilenemeyeceği ve bu hücrelerdeki RANKL ekspresyonu karşılığında tek çekirdekli olası preodontoklastların hücre yüzeylerinde RANK ekspresyonu ile pulpda matür odontoklastlara farklılaşmaların indüklenmelerinin söz konusu olup olmayacağı daha ileri hücresel işaretlemelerle araştırılmalıdır düşüncesindeyiz.

Odontoklastların öncüleri veya bunların odontoklastlara farklılaşmasına ilişkin mevcut kısıtlı sayıda veri, yine RANKL/RANK/OPG sinyallemesiyle genişletilebilir. Sahara ve ark. (1996) odontoklastların öncülerini histokimyasal ve sitokimyasal tekniklerle gözlemlemeye çalıştıkları araştırmalarında, süt dişinin kökünün tamamen rezorbe olması ardından, pulpa odasında gözlenen internal rezorpsiyon evresinde, pulpa odasında $TRAP^+$ hücreleri bulamadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, ilerleyen evrelerde $TRAP^+$ çok çekirdekli hücrelerin pulpa odasında görülmeye başlamasından önce $TRAP^+$ tek çekirdekli hücreleri bildirmişlerdir (Sahara ve ark. 1994, 1996). Benzer şekilde biz de araştırmamızda koronal odontoblastik tabaka bütünlüğünün bozulması ile $TRAP^+$ hücre miktarının artması arasında (pozitif) orta derecede bir ilişki olduğunu tespit etmiş bulunmaktayız.

Odontoklastların hücresel orijinine ilişkin kesin veriler bulunmamakla birlikte, osteoklastlar gibi hematopoietik kaynağa sahip oldukları düşünülmektedir (Sahara ve ark. 1996). Bu düşünceyi destekler şekilde araştırmamızda pulpa odasında ve iltihap odaklarında damar çevresinde güçlü RANKL immün-pozitif hücre reaksiyonu gözlenmiştir. Bu sebeple odontoklastların da osteoklastlar gibi hematopoietik hücrelerden köken aldıkları ve pulpa odasına dolaşımla ulaşıyor olabilecekleri ihtimali elde ettiğimiz verilerle de desteklenmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler, insan süt dişlerinin fizyolojik ve patolojik rezorpsiyonunun histolojik bulguları ile uyumludur (Ten Cate 1986, Prove ve ark. 1992, Sahara ve ark. 1993, Bolan ve de Carvalho Rocha 2007). Bolan ve de Carvalho Rocha (2007)'nın bildirdiğinin tersine elde ettiğimiz verilere göre koronal odontoblastik tabaka bütünlüğünün korunduğu dişlerin tamamında pulpa dokusunun sağlıklı olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte iltihabi reaksiyon derecesi ile koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü arasında pozitif zayıf bir ilişki saptanarak, koronal odontoblastik tabaka bütünlüğünün bozulmasının, iltihabi reaksiyonun pulpa odasında ilerlemesiyle paralellik gösterdiği saptanmıştır. Nitekim Soskolne ve Binstein (1977), Eronat ve ark. (2002) ve ve de Carvalho Rocha (2007) süt dişinin rezorpsiyonunun tamamlandığı evrede kronda odontoblastların yakınında iltihabi hücre varlığını gingival sulkus yoluyla görülen ikincil infiltrasyon ile korele etmişlerdir. Angelova ve ark. (2004) süt dişlerinin immünokompetan hücrelerinin

fizyolojik kök rezorpsiyonunun artışıyla paralel olarak arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca tez çalışmamızda, koronal odontoblastik tabaka bütünlüğünün bozulması ve rezorpsiyon evresi arasında saptanan negatif zayıf ilişki, fizyolojik rezorpsiyonda, rezorpsiyonun kronda predentine ilerleyene kadar, koronal pulpanın bütünlüğünün bozulmadığının farklı bir ifadesi olmuştur. Veya bir diğer deyişle, elde edilen bu veriler, süt diş kök rezorpsiyonunun ilerleyen safhalarında, koronal odontoblastik tabakanın dejenerasyonunu ile predentini rezorbe eden çok sayıda çok çekirdekli odontoklast varlığını göstermiştir.

İnsan süt dişlerinde dökülmeden önce rezorpsiyonun lakünasında sementum-benzeri depolanmanın olduğu gösterilmiştir (Rölling 1981, Sahara ve ark. 1993, Yawaka ve ark. 2003). Sasaki ve ark. (1992) insan süt dişlerinde dökülmeden önce pulpal yüzde odontoklastik rezorpsiyonun görüldüğünü ve bu internal rezorpsiyonun belirgin bir eksfoliasyon zamanı ile ilişkili histolojik değişikliklere yol açtığını göstermişlerdir. Bu internal rezorpsiyonun sonunda odontoblastlar tedricen gözden kaybolmakta ve rezorbe dentin yüzeyleri sement-benzeri doku depolanmasıyla tamir edilmektedir (Sahara ve ark. 1993). Biz de araştırmamızda özellikle kök rezorpsiyonunu tamamlamış ve pulpa odasının gingival ve periodontal ve iltihabi hücre infiltrasyonuna açıldığı aşamada internal rezorpsiyonu ve yer yer kısmi sement depolanmasını gözlemledik. Aslında sement depolanması iltihaplı diş dokularında görülen bir tamir mekanizması olarak bildirilmektedir. Nitekim daimi dişlerde apikal periodontitisin kronik evresinde ve iltihabın iyileşme sürecinde rezorbe kök yüzeyinde sement depolanması ile morfometrik bir restorasyonun söz konusu olduğu gösterilmiştir (Lomçalı ve ark. 1996). Ayrıca, periodontal ligament yaralanmaları tamirinde de yaralanma alanının makrofaj ve osteoklastlarla rezorbe edildiğini ve müteakip tamirin yeni sement ve Sharpey liflerini içerdiği gösterilmiştir (Andreasen ve ark. 1994). Apikal periodontitisli süt dişlerinde de sement depolanması olduğu bildirilmiştir. Araştırmamızda da benzer şekilde şiddetli enfekte dişlerde gözlenen periapikal enfeksiyonlarda yer yer tamiri andıran sert doku birikimleri gözlenmiştir. İlave olarak, Furseth (1968) insan süt dişlerinin kök yüzeylerinin rezorbe lakünalarındaki tamir dokusunun hücresel sement ve presement olduğunu göstermiştir. Yawaka ve ark. (2000) şiddetli apikal periodontitise sahip insan süt dişlerinde rezorbe dentin yüzeyinde depolanmış sementumun histolojik özelliklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre bu sementum asellüler, çizgili yapısıyla

depolanması için zamana ihtiyacı olduğunu ifade eden ve bu sebeple iltihabi reaksiyonun erken evrelerinde depolanmaya başladığı düşünülen bir sementtir (Yawaka ve ark. 2000).

Araştırmamızda pulpal yüzeyde odontoklastik rezorpsiyonu, Sahara ve ark. (1992)'nın da bildirdiği gibi kök yüzeyi uzunluğunun 1 mm'nin altına düştüğü durumlarda başladığı gözlenmiştir. Bu evrede pulpa odasını tedricen infiltre eden monosit, makrofaj ve lenfositler gibi iltihabi hücrelerin varlığı ile paralel olarak, RANKL ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde iltihabi hücre varlığı çürük nedeniyle indüklenen patolojik durumlarda da gözlendiğinde yine RANKL ekspresyonunun varlığı ve yokluğu arasında anlamlı bir ilişki gösterilmiştir. Bu durumda bu tez araştırmasının bulguları süt dişlerinde rezorpsiyonun fizyolojik ve patolojik süreçler dahilindeki iltihabi durumlarda RANKL-RANK-OPG yoluyla gerçekleştiğini önermektedir.

Koronal internal rezorpsiyonun süt dişinin düşmesinin ileri/geç evresinde görülmesi, marjinal periodontal dokudaki iltihabi hücre infiltrasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Sahara ve ark. 1992). Gerçekten de koronal odontoblastik tabakanın sağlam olduğu ve pulpa odasında enfeksiyöz hücre gözlenmediği durumlarda RANKL ekspresyonu da gözlenmemiştir. Diğer taraftan pulpa odası duvarlarında çok çekirdekli odontoklastlar görülmeden önce pulpa odasında iltihabi hücre infiltrasyonu ve RANKL ekspresyonu gözlenmiştir. Aynı örneklerin TRAP boyalarında negatif sonuç elde edilmesi, $RANKL^{+}$ hücrelerin preodontoklastlar olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, koronal odontoblastik tabakanın bütünlüğünün bozulduğu ve pulpa odasının rezorpsiyon yüzeyine açılarak iltihabi hücrelerin pulpayı istila etmeye başladığı evrede de RANKL ekspresyonunun, hem pulpa içindeki iltihabi hücrelerde, hem pulpal fibroblastlarda, hem de rezorpsiyon yüzündeki lakünaların içinde yer alan odontoklastlarda gözlenmesi, iltihabi hücre varlığıyla birlikte RANKL ekspresyonunun söz konusu olduğu bulgusunu desteklemektedir. Nitekim Sahara ve ark. (1992) süt dişi düşmesinden önce görülen koronal internal rezorpsiyonun, kök rezorpsiyonunda gözlenen "fizyolojik" rezorpsiyondan çok, aslında "patolojik" rezorpsiyon olduğunu iddia etmektedirler. Pulpal inflamasyon seviyesiyle RANKL ekspresyonunun görülüp görülmemesi arasında anlamlı bir ilişkiyi tespit etmemizin de bu iddiayı desteklediği

düşünülmektedir. Bu durum aslında fizyolojik olarak değerlendirilebilecek, bununla birlikte patolojik süreçlerle sonuçlanabilen çürük, aşırı okluzal travma veya periodontal iltihap gibi olayların da işin içine katıldığı bir rezorpsiyonu akla getirmektedir.

Diğer taraftan özellikle iltihabi süreçlerin söz konusu olduğu romatoid artrit ve periodontitis gibi hızlı kemik yıkımının söz konusu olduğu tablolarda birbirine zıt olarak çalışan RANKL ve OPG dengesinin hastalığın gidişatına karar verdiği artık kanıtlanmış durumdadır (Lerner 2000, 2006). Bu bağlamda bu tez kapsamında süt dişi rezorpsiyonunda pulpal ve periodontal hücreler tarafından salgılandığı daha önce gösterilmiş olan (Rani ve MacDougal 2000, Lossdörfer ve ark. 2002, Fukushima ve ark 2003) OPG ve RANKL moleküllerinin dengesine dair sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışılan dişlerin %78'inde RANKL sentezlendiğinin gösterilmesine karşın, aynı örneklerin %63'ünde OPG protein ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Aradaki fark protein varlığı veya yokluğu anlamında anlamlı bir farklılık sergilememekle birlikte, ekspresyon şiddeti ve dağılımında istatistiksel olarak belirgin olmamakla birlikte değişiklikler göze çarpmaktadır. Bu durumda dental hücreler hem RANKL'ı, hem de OPG'yi üretebilmelerine rağmen sonuç, muhtemelen nispi konsantrasyon ile belirlenmektedir. Böylece kök rezorpsiyonu, fizyolojik olsun olmasın, mevcut faktörler arasındaki denge değişimleri ile ayarlanmaktadır.

Fizyolojik rezorpsiyon evresinde olan insan süt dişlerinden elde ettikleri PDL hücrelerinde RANKL ekspresyonunu araştıran Fukushima ve ark. (2003), odontoklastik kök rezorpsiyonu ve osteoklastik kemik rezorpsiyonu sırasında RANKL ekspresyonu ve aktivasyonunun farklılığına dair bir kanıt tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Lossdörfer ve ark. (2002) odontoblastlarda, pulpa hücrelerinde ve PDL fibroblastlarında tespit ettikleri pozitif RANKL reaksiyonlarını, odontoklastların farklılaşması ve aktivasyonu için zorunlu olabileceğini iddia etmişlerdir. Bu durumda PDL kollajen fibrillerinin ortadan kalkmasının kök rezorpsiyonuna yol açan temel mekanizma olduğu iddiasında yeni bir boyut açılıyor olmaktadır. Nitekim, Süt dişi PDL hücrelerinin, daimi diş PDL hücrelerine göre daha fazla miktarda kollajenaz ürettikleri, bununla birlikte iltihabi sitokinlerin MMP'ların ekspresyonunu arttırdığı halde, MMP aktivitelerini

düzenleyen TIMP üzerinde bir etki yaratmadığı gösterilmiştir (Wu ve ark. 1999). Bu durumda süt dişi PDL hücreleri hem MMP'ları hem de TIMP'ları üretebilmesine rağmen sonuç eksprese olan moleküllerin nispi konsantrasyonları ile belirlenmektedir. Wu ve ark. (1999) kökte rezorpsiyonunun, rezorptif süreçleri stimüle veya inhibe eden faktörler arasındaki moleküler etkileşimlerin bir sonucu olduğunu; doku stabilitesi veya çözünmesinin bu faktörler arasındaki etkileşimlerin dengesiyle belirlendiğini ve rezorpsiyonun gerçekleşmesi için PDL hücrelerinin veya ekstrasellüler matriksin katabolizmasını düzenleyecek yeni ve eşsiz faktörleri üretmesine gerek olmadığını savunmaktadırlar. Süt dişi rezorpsiyonunda osteoklastogeneziste aktif rol oynayan moleküllerin mRNA seviyesinde ekspresyonlarının RT-PCR ile araştıran Yıldırım ve ark. (2008) ise, rezorpsiyonun son evresinde olan ve neredeyse kendiliğinden eksfoliye olmak üzere olan süt dişlerinin pulpa dokularında RANKL ekpresyonunun, OPG, Cbfa-1, MCP-1, CSF-1 ve TGFβ1 yanı sıra, sağlıklı daimi diş pulpasında tespit edilen ekspresyonlara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu göstermişlerdir. Bu durum süt dişi pulpasının, tıpkı süt dişi PDL hücreleri gibi, süt dişi rezorpsiyonunda odontoklastogenezis için aktif rol oynayan molekülleri eksprese ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte PCR çalışması hücresel orijine ait bir veri elde edilmesini engellemiştir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, rezorpsiyonun son evresinde olan süt dişlerinde RANKL ekspresyonu, pulpal hücrelerde ve odontoklastlarda gözlenmiştir. Bu iki araştırma süt dişi rezorpsiyonunda RANKL/RANK/OPG sinyallemesinin önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir. Ayrıca, bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalarda *ex vivo* şartlar ile, belirtilen verilere, patolojik durumda süt dişi kök rezorpsiyonunda RANKL ve OPG protein ekspresyonlara ilişkin veriler de eklenmiştir.

Bakteriyel kontaminasyonla indüklenen periapikal inflamasyon gibi olaylardaki kemik ve diş rezorpsiyonunda osteoklastik aktiviteleri düzenleyen mekanizmalar çok iyi anlaşılamamıştır. Yıldırım ve ark. (2006) kemik kaybında rol oynayan sitokinleri süt dişi periapikal lezyonunda araştırdıkları çalışmalarında, sağlıklı pulpa dokusuyla kıyaslandığında periapikal lezyonlarda anlamlı oranda RANKL ekspresyonunda artış saptamışlardır. Sabeti ve ark. (2004) ise daimi dişlerin periapikal lezyonlarında RANKL ekspresyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, ratlarda deneysel olarak indüklenmiş periapikal patolojilerde RANKL-immün-pozitif

hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Zhang ve Peng 2005). Bu çalışmaların tamamında RANKL/RANK/OPG sisteminin kemik metabolizması düzenleyicileri arasında önemli bir yer tuttuğu sonucuna varılmıştır. Araştırmamızda yer alan ileri derecede enfekte süt dişleri pulpalarında tespit ettiğimiz RANKL immünoreaksiyonlarına göre süt dişinin kronik enfeksiyonlarında kök rezorpsiyonunun, Lossdörfer ve ark. (2002)'nın da önerdiği gibi, pulpanın kronik granülamatöz iltihaplarındaki dentin rezorpsiyonlarından sorumlu olan, damarlar, lenfositler ve plazmik hücreler ve tek çekirdekli fagositlerden köken almış olabilecek klastik hücrelerce gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Moleküler etkileşim ise, proiltihabi sitokinlerin (Il-1, TNFα gibi) osteoblast/stromal hücrelerden RANKL ekspresyonunu arttırması benzeri pulpal stromal hücrelerden olası salınım ve böylece dentin çevresinde pulpada, PDL ve gingival dokularda ve periapikal kemikte RANKL ve OPG dengesini düzenleyerek RANK/RANKL sistemiyle uyumlu bir şekilde çalışması olarak düşünülmektedir (Hofbauer ve Heufelder 2001).

Araştırmamızda süt dişleri, çeşitli sebeplerle çekilmeleri ardından endikasyona, radyografik verilere ve ekzodontik gözlemlere dayanarak, fizyolojik ve patolojik rezorpsiyon gruplarına ayrılmaya çalışılmıştır. Bununla beraber hematoksilen-eozinle elde edilen iltihabi hücre gözlemlerine ait verilerle her iki gruptaki süt dişlerinde sadece, 7 dişte iltihabi reaksiyonun olmadığını, diğer dişlerde ise hafiften şiddetliye doğru iltihabi reaksiyonun mevcut olduğun anlaşılmıştır. Bunun üzerine dişler RANKL ekspresyonu parametresinin bağımlı değişken olarak alınması ile diğer parametreler ile olan kıyaslamalar göz önüne alınarak tek bir grupta değerlendirilmeye alınmıştır. Özellikle iltihabi reaksiyon düzeyleri ve bu iltihabi reaksiyon seviyeleri ve RANKL ekspresyonunun görülüp görülmemesi arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak olduğu saptanmıştır. Ayrıca araştırmamızın değerlendirme kriterlerine göre elde ettiğimiz veriler, sıralayıcı kategorik bir nitelik taşıdığından, değişkenler arasındaki ilişki Spearman-Rho korelasyon analizi sonuçları dikkate alınarak tespit edilmiştir.

Pozitif ve negatif kontrol gruplarından elde edilen veriler araştırmanın özgünlüğünü ve duyarlılığını onaylamıştır. Bununla birlikte araştırmamızın immünhistokimyasal boyama metodunun ön denemelerinde, kontrol grubunda gözlenen olumlu sonuçların diş dokusunda birebir yansıtılmadığı görülmüştür.

Örneğin antijen geri çekilmesi için uygulanan mikrodalga uygulamasının, hassas diş dokuları için uygun olmadığı görülmüş ve bu sebeple bir kısım kesitte yeterli gözlem yapılamamıştır. Bu sebeple dental araştırmalar için daha spesifik bir pozitif kontrol grubunun kullanılmasına gerek olduğu düşünülmektedir. Gerek bu tez kapsamında gerekse diğer araştırmalarda (Sabeti ve ark. 2004, Yıldırım ve ark. 2006) kuvvetli ekspresyonların tespit edildiği periapikal lezyonlar bu anlamda kullanılabilecek olmakla beraber, iltihabın derecesini ve sağlıklı ekspresyonlarını devam ettirebilecek durumda olan hücre varlığını önceden kestirmek mümkün olmayacaktır. Bu durumda araştırmalarımızın devamında elimizdeki mevcut kesitlerin yeni protokollerde de kullanılmasıyla bu problemin üstesinden gelinebilir. Konu, ülkemizde pek çok nedenle, belli araştırma gruplarının, tek bir konu üzerinde yoğunlaşamamasının, araştırmalarının tekrarını ve devamlılığını çoğu zaman yetersiz maddi destek ile sağlayamamasının kapsamına da girmektedir. Uygulanan protokolün eksiklerini veya avantajlarını ortaya koyan bu tez ile, takip eden araştırmalarla ülkemiz dişhekimlerinin yapacakları daha ileri çalışmalarda kullanılması umulmaktadır.

Bu tez araştırmasında, bildiğimiz kadarıyla, ülkemizde ilk kez diş dokusunda sentetik rezinde bloklama süreci uygulanmıştır. Dişin hem sert hem de yumuşak dokuları bir arada bulundurması, parafin kesitlerde bu iki dokunun sıklıkla birbirinden ayrılmasıyla, odontoblastik tabakaya ait gözlemlerde pek çok soruna yol açtığı iyi bilinmektedir (Yıldırım 2000). Araştırmamızda kullandığımız protokol ile bu problemlerin üstesinden gelinebilmiş ve tüm boyama işlemlerinde parafin kesitlere göre daha yüksek kalitede sonuçlar elde edilmiştir. Fizyolojik ve patolojik rezorpsiyon gruplarının iltihabi reaksiyon şiddeti kriterine göre tek bir grup altında toplanması ardından, toplam 100 diş arasından, değerlendirmeye uygun olarak ideal özellikler sergileyen sentetik rezinde bloklama ile elde edilmiş toplam 66 örnekten hazırlanan preparatlar seçilmiş ve değerlendirilmiştir.

Araştırmada öncelikle rutin hematoksilen-eozin boya ile boyanmış kesitler arasında iltihabi reaksiyon derecesi, koronal odontoblastik tabakanın bütünlüğü ve rezorpsiyon evresi değerlendirilmiştir. Daha sonra farklılaşmasını tamamlamış odontoklastları görebilmek amacıyla TRAP boyası gerçekleştirilmiş ve daha sonra

RANKL ve OPG protein ekspresyonlarının varlığı ve lokalizasyonlarının gözlenebilmesi amacıyla özgün immunhistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir.

Süt dişleri günümüz araştırma tekniklerinin geldiği noktada mükemmel bir *in situ* araştırma materyalini teşkil etmektedir. Araştırmamızda olduğu gibi gerekli endikasyonlarla çekilen süt dişlerinin dental enfeksiyonların mekanizmalarının aydınlatılmasında çok değerli bir yer tuttuğuna inanılmaktadır. Teke (2007) doktora tez çalışmasında, pedodonti kliniklerinde rutin olarak kullanılan dental restoratif materyallerin antibakteriyel etkinliklerini kıyaslamak üzere süt dişlerini kullanmıştır. Alınan periapikal radyograflarda süt dişlerinin dökülme sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ve oldukça yüksek bir doğruluk derecesiyle tahmin edilebildiği gösterilmiştir (Teke 2007). Son günlerin önemli tartışmaları arasında yer alan etik problemler göz önüne alındığında diş hekimliğinde, elbette uygun endikasyonlar ve etik kurul izinleri dahilinde, tedavi kapsamında çekilen dişler veya alınan dokuların dental enfeksiyonlar ve anomalilere yönelik araştırmalar için sunduğu zenginliğin, ülkemizin dental literatüre katkısını arttıracağına inanılmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Süt dişi rezorpsiyonu ve ardından daimi dişlerin sürmesi ilişkisi, kraniyofasiyal kompleksin normal gelişimini kuvvetle etkileyen bir fizyolojik süreçtir. Daimi dişin geç sürmesi/süt dişinin normalden uzun süre ağızda kalması okluzyonda bozulmaya yol açmasının yanı sıra, temporomandibular eklem disfonksiyonu gibi fizyolojik sağlığı ve yetişkin dönemde hayat kalitesini etkileyebilecek pek çok probleme direkt olarak sebep olabilir (Hua ve ark. 2007). Klinik olarak, altında daimi diş olmayan süt dişinin ağızda ne kadar süre kalacağına dair bir belirtecimiz bulunmamaktadır (Ith-Hansen ve Kjaer 2000, Nordquist ve ark. 2005). Bazı vakalarda yetişkin döneme kadar ağızda kalırlarken kimi zaman da çok daha hızlı eksfoliye olabilmektedirler. Bununla birlikte süt azı dişinin 20 yaşına kadar herhangi bir kök rezorpsiyonu göstermeksizin ağız içinde kaldığı durumlarda daha uzun bir zaman bu halde kalabildikleri gözlenmiştir (Bjerklin ve Bennett 2000). Bu sebeple, süt dişi rezorpsiyonu durumunun önceden tahmin edilebildiği güvenilir bir belirleyici varlığı, süt dişilerinin çekiminin ve bu yerin kapatılmasının önerilmediği yer darlığının olmadığı vakaların ortodontik tedavilerinin planlaması için faydalı olabilecektir. Gecikmiş süt dişi rezorpsiyonunun tedavisi alttaki daimi diş germinin sürme durumuna bağlı olarak değişmektedir. Diğer taraftan gecikmiş süt dişi erüpsiyonu için de çeşitli tedaviler önerilmektedir. Bunlar, sürme önündeki engellerin kaldırılması, dişin ortodontik tedaviyle veya kendiliğinden sürmesinin sağlanması şeklindedir. Bununla birlikte cerrahi veya ortodontik bir yaklaşım olmaksızın gecikmiş süt dişi rezorpsiyonu ve/veya daimi diş erüpsiyonunun hızlandırılmasına yol açan bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Bu durumda osteoklast formasyonu ve aktivasyonunun tetiklenmesi etkili bir moleküler strateji olarak bildirilmektedir (Hua ve ark. 2007). Kök rezorpsiyonu sürecinin kontrolü ve düzenleyicilerin neler olduğunun anlaşılması biyolojiyi manüple edip gerekli olduğu durumlarda süt dentisyonunun devamının sağlanmasına yardımcı olabilecektir.

Yakın zamanda kemik rezorpsiyonu dengeleyicileri tarafından aktive edilen spesifik sinyalleme yolunun bloke edilmesiyle ilgili olarak osteolizisin tedavi edilmesinde bir strateji olarak RANK sinyalleme yolu en iyi uygulamalardan biri olarak değerlendirilmektedir. NF-κB sinyallemesi blokajının *in vitro* implant partikülleri ile indüklenmiş osteoklastogenezisi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir.

RANKL/RANK/OPG etkileşimlerinin ve sinyallemesinin terapötik anlamda hedeflenmesi iltihapla ilişkili kemik hastalıklarının tedavisi için gelecek vaat ettiği bildirilmektedir (Baud'huin ve ark. 2007). Odağa süt dişinin patolojik rezorpsiyonu alındığında ise, endodontik tedavi endikasyonlarının sınırlarını genişletecek şekilde veya idiopatik birtakım rezorpsiyonlarda, elde ettiğimiz verilerle oldukça yüksek bir ihtimalle desteklendiği üzere, iltihabi hücrelerde rezorptif moleküllerin ekspresyonlarının blokajı amacıyla lokal uygulamaların söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan romatoid artrit ve periodontitiste kemik yıkımının immün sistemin iltihabi aktivasyonu nedeniyle olabileceği iddia edilmektedir (Teng ve ark. 2000, Theill ve ark. 2002, Taubman ve ark. 2007). Süt dişi rezorpsiyonu fizyolojik bir süreç olmakla birlikte, süt dişi enfeksiyonu sonucunda gözlenen hızlanmış ve atipik rezorpsiyon immün sistemin olaya katılmasını akla getirmektedir. Bu tez kapsamında elde edilen veriler bu bulguları destekler niteliktedir. Diğer taraftan periodontal dokuya aşırı ortodontik kuvvet uygulandığında RANKL ve diğer sitokinleri eksprese eden osteoklastların sayısında artma ve fizyolojik şartlarla kıyaslandığında lokalizasyonlarında da değişme olduğu gösterilmiştir (Ogasawara ve ark. 2004). RANKL'ın periodonsiyumda osteoklast gelişimiyle ve fizyolojik diş migrasyonuna karşılık gelen kemik rezorpsiyonunun aktivasyonunda önemli roller oynadığı önerilmiştir (Kawamoto ve ark. 2002). Bu durumda, fizyolojik süt dişi rezorpsiyonu sırasında, süt dişine gelen çiğneme kuvvetlerinin, çocuğun güçlenen çene eklemiyle ve daha komplike hale gelen diyetiyle birlikte, bu anlamda süt dişi periodontal ligamentinde RANKL ekspresyonu açısından bir yeniden düzenlenmeye gidip gitmediğinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Böylece özellikle ortodontik tedavilerde süt dişi rezorpsiyonları hızlandırılabilir. Aksi ise anti-RANKL veya OPG-Fc füzyon proteinleri gibi terapilerle söz konusu olabilir. Bir diğer terapötik yaklaşımın, süt dişi enfeksiyonunun bir parametresi olarak cep sıvısında RANKL/OPG oranının ölçümü enfeksiyonun immün efektör hücrelerinden kaynaklanan RANKL aktivitesi ve/veya üretiminin inhibisyonuyla tedavi edilebileceği şeklinde olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla beraber RANKL/RANK/OPG yolundan bağımsız TNFα gibi diğer sitokinler tarafından indüklenen odontoklastogenezis bu tür terapötik yaklaşımlar için daha kontrollü uygulamaları gerektirdiği unutulmamalıdır. Yine de günümüzdeki dental ve

periodontal tedavilerin çoğu sıklıkla mekanik işlemlere dayandırılmakta ve immün hücreler gözardı edilmektedir. Bu sebeple dişhekimliğinde yeni tedavilerin dentin ve/veya kemik rezorpsiyonunda majör roller oynayan immün hücrelerin katılımını hedeflemelidir (Taubman ve ark. 2007).

Sonuç olarak bu tez kapsamında elde edilen bilgiler dahilinde sadece süt dişi rezorpsiyonunun mekanizmaları değil, aynı zamanda süt dişi enfeksiyonlarına ait veriler de değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalardan elde edilen sonuçlar geleneksel inanışın aksine, süt dişi rezorpsiyonunun tamamıyla fizyolojik bir süreç olmayıp çoğunlukla çürükle/aşırı okluzal kuvvetle veya gingival dokudan mikroorganizmaların invazyonuyla indüklenen konakçı cevabıyla tetiklenen iltihabi süreçlerin de işin içine katılabileceği daha karmaşık bir sistem olabileceğini önermektedir. Devam niteliğindeki araştırmaların gerçekleştirilmesi, henüz alanının ilkleri arasında yer alan bu tür araştırmalardan elde edilen bilgileri daha somut ve klinik olarak uygulanabilir hale getirecektir. Elde edilen veriler süt dişi rezorpsiyonunda ve enfeksiyonunda RANKL ekspresyonunun önemli roller oynayabileceği yolundadır. RANKL/OPG dengesi ve olası tedavi stratejileri daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Süt Dişi Periodontal Ligamenti Ve Pulpasında Osteoprotegerin Ve Rankl Proteinlerinin Ekspresyonunun Enzim İmmüno Histokimyasal Yöntemle Araştırılması

Doç. Dr. Sibel YILDIRIM

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA-2008

Süt dişleri, okluzal mekanik travma, enfeksiyöz ve iltihabi pulpal/periapikal ve/veya periradiküler süreçler sonucunda patolojik kök rezorpsiyonu ile erken kaybedilebilmektedirler. Yakın zamanda osteoklastogenezisin moleküler mekanizmalarının işletilmesinde yer alan OPG (osteoprotegerin) ve RANKL (*Receptor activator of nucleer factor kappa B ligand)* ikilisi osteoklast formasyonu ve fonksiyonunun anahtar düzenleyicileri olarak bildirilmiştir. RANKL-RANK sinyallemesi ve biyolojik olarak aktif OPG seviyesi arasındaki dengenin osteoklastların gelişimi ve aktivasyonunu ve kemik metabolizmasını düzenlediğini göstermektedir.

Bu tez kapsamında fizyolojik veya patolojik kök rezorpsiyonuna uğrayan insan süt dişleri kullanılarak OPG ve RANKL'ın rezorpsiyon süreçlerindeki olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla OPG ve RANKL'ın rezorbe olan süt dişi dokularındaki spesifik lokalizasyonları, çeşitli endikasyonlarla, yaşları 4-13 arasında değişen, 27 kız, 25 erkek hastadan çekilmiş, toplam 66 süt dişinin pulpal ve periodontal/periapikal dokuları üzerinde enzim ve immuno histokimyasal yöntemlerle gösterilmesi öngörülmüştür.

Dişler etik kurul izni ve ebeveynin bilgilendirimesi ile çekildi. Çekimden hemen sonra dişler fikse edildi ve rutin immuno histokimyasal takibe alındı. Dekalsifikasyonu tamamlanan dişler ortalarından ikiye ayrılarak parafinde ve sentetik rezinde bloklandı. Kesitlerin alınmasının ardından histolojik, histokimyasal ve immuno histokimyasal tetkikler yapabilmek amacıyla hematoksilen eozin, TRAP ve spesifik OPG, RANKL immuno histokimyasal boyalar uygulandı. Dişler iltihabi reaksiyon

düzeyleri, koronal odontoblastik tabakanın bütünlüğü, rezorpsiyon seviyesi, TRAP, OPG ve RANKL pozitif hücrelerin varlığı şeklindeki altı ayrı kriterle değerlendirildi. Elde edilen verilere uygulanan istatistiksel analizler süt dişi rezorpsiyonunda OPG ve RANKL protein ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki saptayamazken, iltihabi reaksiyon seviyeleri ve RANKL ekspresyonunun görülüp görülmemesi arasında anlamlı ($p=0,016$); iltihabi reaksiyon derecesi ile koronal odontonlastik tabaka bütünlüğü arasında pozitif zayıf; koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü ve rezorpsiyon evresi arasında negatif zayıf bir ilişki; OPG ile koronal odontoblastik tabaka bütünlüğü arasında pozitif zayıf bir ilişki saptandı.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalardan elde edilen sonuçlar geleneksel inanışın aksine, süt dişi rezorpsiyonunun tamamıyla fizyolojik bir süreç olmayıp çoğunlukla çürükle/aşırı okluzal kuvvetle veya gingival dokudan miroorganizmaların invazyonuyla indüklenen konakçı cevabıyla tetiklenen iltihabi süreçlerin de işin içine katılabileceği daha karmaşık bir sistem olabileceğini önermektedir. Araştırmanın sonuçları süt dişinin rezorpsiyonunda RANKL/RANK/OPG yolunun aktive olabileceğini önermektedir. Elde edilen veriler ve RANKL/OPG ekspresyonlarından sorumlu olan spesifik hücrelerin belirlenmesi amacıyla yapılacak daha ileri çalışmalar ile birlikte, dişte kök rezorpsiyonunun yönlendirilmiş terapötik yaklaşımlarla kontrol edilebilmesinin olası olduğunu önermektedir.

7. SUMMARY

Repuclic of Turkey
SELÇUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Enzyme-immunohistochemical investigation of osteoprotegerin and RANKL expression in peridontal ligament and pulpal tissues of human deciduous teeth

Assoc. Prof. Dr. Sibel YILDIRIM

Department of Histology and Embriology
DOKTORATE THESIS/ KONYA-2008

Deciduous teeth can be lost prematurely due to occlusal mechanical trauma, infectious and inflammatory pulpal/periapical and/or periradicular pathologies that cause pathological root resorption. Recently, OPG and RANKL molecular duality, which is responsible for molecular mechanisms of osteoclastogenesis, has been proved to be a key modulator of osteoclast formation and function. The results from genetical and functional studies showed that the balance between RANKL-RANK signaling and biologically active OPG level could regulate osteoclast development and activation and bone metabolism.

In this thesis, using physiologically or pathologically resorbing human deciduous teeth, it was aimed to search the possible roles of OPG and RANKL during resorption processes. With this aim, it was anticipated enzymatic and immünohistochemical localization of specific localization of OPG and RANKL in 66 resorbing deciduous teeth which were extracted from 27 female and 25 mail patients aged between 4 and 13. Extracted teeth were fixed immediately and processed for immunhistochemical technique. Having completed decalcification teeth were separeted into two axially and emmbedded in parafin or in acrylic embedding medium. The sections were taken and stained by hematoxylen-eosin, TRAP and specific OPG and RANKL antibody staining for histologic, enzyme histochemical and immünohistochemical evaluations respectively. The sections from each tooth were evaluated according to the enfection level, coronal odontoblastic integrity, the level of resorption and positive staining for TRAP; RANKL and OPG. Statistical analysis of obtained data showed significant relation between infection status and RANKL expression ($p=0,016$); positive and weak relation between infection level and coronal odontoblastic integrity; negative and weak relation between resorption level and coronal odontoblastic integrity; and positive-weak relation between OPG and coronal odontoblastic integrity, although there is no significant relation between OPG and RANK expression level.

The results obtained from this thesis' research suggest that, contrary to conventional belief, deciduous tooth resorption is not a physiological one but it is more complicated process which involves the provacation by caries/over loaded occlusal forces or inflammations triggerred by host immune reactions that caused from microorganism invasion through gingival tissues. This thesis suggests that RANKL/RANK/OPG pathway can be activated via infection during deciduous toth physiological resorption. Obtained data and further studies on specific cell sources for RANKL/OPG expression can be anticipated to root resorption management which will be directed via several therapeutic approaches.

8. KAYNAKLAR

1. AB Dişhekimliği pratiği. 2004; www.saglik.gov.tr/extras/birimler/abkd/DENTAL_ PRACTICE.doc.
2. Alev Alaçam, GÜ Dişhek Fak Pedodonti AD, Ders Notları, 2000.
3. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997; 390: 175-179.
4. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997; 390:175-179.
5. Andreasen FM, Andreasen JO. Luxation injuries, In. Andreasen JO, Andreasen FM eds. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 3rd ed. Munksgaard, Copenhagen. pp 366-382.
6. Angelova A, Tagaki Y, Okiji T, Kaneko T, Yamashita Y. İmmünocompetent cells in the pulp of human deciduous teeth. Arch Oral Biol 2004; 49:29-36.
7. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87: 4080–4084
8. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporos Int. 2000; 11: 905-913.
9. Avery JK. Eruption and Shedding of Teeth In: Steel PF ed. Essentials of Oral Histology and Embryology. 2nd ed. New York: Mosby Inc; 2000. p. 71-83.
10. Baron R, Neff L, Van PT, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. Am J Pathol. 1986; 122: 363-378.
11. Baud'huin M, Lamoureuxa F, Duplomba L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmünology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci. 2007; 64: 2334-50.
12. Bjerklin K, Bennett J. The long-term survival of lower second primary molars in subjects with agenesis of the premolars. Eur J Orthod. 2000; 22: 245-255.

13. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39: 1077-1081.
14. Bolan M, de Carvalho Rocha MS. Histopathologic study of physiological and pathological resorptions in human primary teeth, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 104:680-5.
15. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL& OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. J Clin Periodontol. 2007; 34:370–376.
16. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Therap. 2007; 9S1: 1-7.
17. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1998; 12: 1260–1268.
18. Chammbers TJ, Thomson BM, Fuller K. effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. J Cell Sci. 1984; 70: 61-71.
19. Cheng X, Kinosaki M, Takami M, Choi Y, Zhang H, Murali R. Disabling of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss in vivo. J Biol Chem. 2004; 279, 8269–8277.
20. Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. J Histochem Cytochem.1987; 35:203-209.
21. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Perio Res. 2003; 38: 380–387.
22. Damay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK): interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem. 1998; 273: 20551–20555.

23. Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In sitı hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. Arch Oral Biol. 1999; 44: 907-915.
24. Eronat C, Eronat N, Aktug M. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using Ag-NOR staining method. Int J Paediatr Dent 2002;12:207-14.
25. Freilich LS. Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of Odontoclasts: effects of parathyroid extract. J Dent Res. 1971; 1047-1055.
26. Fukushima H, Jimi E, Kajiya H, Motokawa W, Okabe K. Parathyroid-hormone-related protein induces expression of receptor activator of NF-{kappa}B ligand in human periodontal ligament cells via a cAMP/protein kinase A-independent pathway. J Dent Res. 2005; 84:329-34.
27. Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamato 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;111:346-52
28. Furseth R. The resorption process of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. Arch Oral Biol. 1968; 13: 417-431.
29. Gökalp A. SÜ Dişhek Fak Pedodonti AD, Ders Notları, 2000.
30. Gorski JP; Marks SC Jr. Current concepts of the biology of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med. 1992; 3: 185-206.
31. Gülhan A. Pedodonti. İstanbul: İÜ Basımevi. 1994; p.168-172.
32. Hall RK. Pediatric Orofacial Medicine and Pathology. 1st ed. London-Glasgow-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Chapman&Hall Medical. 1994.
33. Harokopakis-Hajishengalis E. Pysiologc root resorption in primary teeth: molecular and histological events. J Oral Sci. 2007; 49: 1-12.
34. Hasegawa T, Kikuiri T, Takeyama S, Yoshimura Y, Mitome M, Oguchi H. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. Tissue Cell. 2002; 34:44-51.
35. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid

arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. Rheumatology. 2003; 42:123-134.

36. Haynes DR; Crotti TN, Potter AE. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprostetic osteolysis. J Bone Joint Surg Br. 2001; 83B: 902-911.
37. Helfrich MH. Osteoclast diseases and dental abnormalities. Arch Oral Biol 2005; 50:115-122.
38. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med. 2001; 79:243-253.
39. Hopewell-Smith A. The process of osteolysis and odontolysis, or so-called "absorption of calcified tissues": A new and original investigation. Dent Cosmos 1930; 72: 323-345.
40. Hua F, Zhang L, Chen Z. Trigger osteoclast formation and activation: molecular treatment strategy of delayed tooth eruption. Med Hypotheses. 2007; doi:10.1016/j.mehy.2007.04.012
41. Ith-Hansen K, Kjaer I. Persistence of deciduous molars in subjects with agenesis of the second premolars. Eur J Orthod. 2000; 22: 239-243.
42. Jiang Y, Mehta CK, Hsu TY, Alsulaimani FFH. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. Infect Immun. 2002; 70:3143-3148.
43. Jones SJ, Boyde A, Ali NN. The resorption of biological and nonbiological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts. Anat Embryol. 1984; 170: 247-256.
44. Kannari N, Oshima H, Maeda T, Noda T, Takano Y. Class II MHC antigen-expressing cells in the pulp tissue of human decidous teeth prior to shedding. Arch Histol Cytol 1998; 61:1-15.
45. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. J Dent Res. 2001; 80:887-891.
46. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW. Localization of RANKL (Receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. Bone. 1999; 25:525–34.

47. Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K, Nagaoka E, Ozawa H. İmmünolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. Arch Oral Biol. 2002; 47: 55-58.
48. Khosla S. Minireview: The OPG7RANKL/RANK system. Endocrinol 2001; 142: 5050-5055.
49. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. J Exp Med 2005; 202: 589–595.
50. Kjellberg H, Beiring M, Albertsson Wikland K. Craniofacial morphology, dental occlusion, tooth eruption, and dental maturity in boys of short stature with or without growth hormone deficiency Eur J Oral Sci. 2000; 108: 359-67.
51. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, Mc- Cabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint de struction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature 1999; 402: 304–309.
52. Kronfeld R. The resorption of the roots of deciduous teeth. Dent Cosmos 1932; 74: 103-120.
53. Kuşgöz A, Yıldırım S, Kubar A, İlhan B. Gecikmiş Süt Dişi Rezorpsiyonunda Büyüme Gelişim Parametrelerinin Araştırılması. Türk Pedodonti Derneği 6. Ulusal Sempozyumu, 26-27 Mayıs 2006, Büyük Isparta Oteli, Isparta, Türkiye.
54. Kuşgöz, A. Gecikmiş Diş Erüpsiyonunda Lokal Doku Özelliklerinin Moleküler Biyolojik Analizleri. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2005.
55. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Couillaud-Battaglia S, Heymann D, Redini F. OPG/membranous-RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. Bone. 2006; 39: 706–715.
56. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi

G,Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998; 93, 165–176.

57. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. J Dent Res. 2006; 85:596-607.
58. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies wıth ımportance for physıologıcal and pathologıcal bone resorptıon Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15:64-81.
59. Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. Matrix Biol. 2000; 19: 107-120.
60. Linsuwanont B, Tahagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. Bone. 2002a; 31:472-478.
61. Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Localization of cathepsin K in bovine odontoclasts during deciduous tooth resorption. Calcif Tissue Int. 2002b; 70: 127-133.
62. Linsuwanont SB, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression MT1-MMP during deciduous tooth resorption in odontoclasts. J Bone Miner Metab. 2006; 24: 447-453.
63. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med. 2003; 11: 17-21.
64. Lomçalı G, Şen BH, Çankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. Endodont Dent Traumatol 1996; 12: 70-76.
65. Lossdörfer S, Götz W, Jager A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. J Dent Res. 2005; 84: 634-638.
66. Manisalı Y, Koray F. Ağız diş embriyolojisi ve histolojisi, İstanbul: Yenilik basımevi, 1982.
67. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends Mol Med. 2005; 11: 76-81.
68. McDonald RE, Avery DR. Dentıstry for the chıld and adolescent, 6th Ed. St. Louis: Mosby, 1994.

69. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. J. Exp. Med. 2000; 192: 463–464.
70. Miura H, Kariyasu M, Yamasaki K, Arai Y, Sumi Y. Relationship between general health status and the change in chewing ability: a longitudinal study of the frail elderly in Japan over a 3-year period. Gerodontology. 2005; 22: 200-5.
71. Mogi K, Otogoto J, Ota N, Togari, A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. J Dent Res. 2004; 83, 166–169.
72. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Aramaki M, Mahanonda R, Kojima T, Murakami Y, Saito M, Morotome Y, Ishikawa I. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. Clin Exp Immun. 2002; 130: 338–344.
73. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. Quintessence. 1999; 30: 9-25.
74. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. J Clin Invest 1986; 78: 355-360.
75. Nordquist I, Lennartsson B, Paulander J. Primary teeth in adults – a pilot study. Swed Dent J. 2005; 29: 27-34.
76. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56: 2135-2146;
77. Obersztyn A. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. J Dent Res. 1963; 42: 660-674.

78. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin, and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. J Periodont Res. 2004; 39: 42-49.
79. Ohazama A, Courtney J-M, Sharpe PT. Opg, Rankl, and Rankl in tooth development: Co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. J Dent Res. 2004; 83:241-244.
80. Prove SA, Symons AL, Meyers IA. Physiological root resorption of primary molars. J Clin Pediatr Dent. 1992; 16: 202-206.
81. Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. Mol Cell Biol Res Commun. 2000; 3:145-152.
82. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis. Calcif Tissue Int. 1981; 33: 349–351
83. Rölling I. Histomorphometric analysis of primary teeth during the process of resorption and shedding. Scand J Dent Res. 1981; 132-142.
84. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. Ann NY Acad Sci 2006; 1068: 100–109.
85. Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of receptor activator of NF-κB ligand in apical periodontitis. J Endod 2004; 31:17-18.
86. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Yagasaki H, Deguchi T, Suzuki K. A histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. J Dent Res. 1993; 72: 634-640.
87. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Ygasaki H, Deguchi T, Suzuki K. A Histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. J Dent Res. 1992b; 72:634-640.
88. Sahara N, Okafuji N, ToyokiA, Suzuki I, Deguchi T, Suzuki K. Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to shedding of human deciduous teeth. Arch Histol Cytol 1992a; 55:273-285.
89. Sahara N, Okafuji N, ToyokiA, Suzuki I, 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.
90. Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoklast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. Anat Rec. 1996; 244: 33-49.

91. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M. Expression of steoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. J Bone Miner Res. 1999; 9:1486-1492.
92. 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 Dent Res. 1990; 25: 143-151.
93. Sasaki T, Motegi N; Suzuki H, Watanabe C, Tadokoro K, Yanagisawa T, Higashi S. Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. Amer J Anat. 1988; 183: 303-335.
94. Sasaki T, Shimizu T, Suzuki H, Watanabe C. Cytodifferentiation and degeneration of Odontoclasts in physiologic root resorption of kitten deciduous teeth. Acta Anat. 1989; 135: 330-340.
95. Sasaki T, Ueno-Matsuda E. İmmünocytochemical localization of cathepsins B and G in odontoclasts of human deciduous teeth. J Dent Res. 1992; 71: 1881-1884.
96. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22: 549-53.
97. Shimuzu Y, Inoyama Y, Tagami A. Suppression of osteoclastlike cell formation by periodontal ligament cells. J Bone Miner Metab 1996; 14: 65–72.
98. Siccoli MM, Bassetti CL, Sandor PS: Facial pain: clinical differential diagnosis. Lancet Neurol. 2006; 5:257–267
99. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997; 89:309-319.
100. Soskolne WA, Bimstein E. A histomorphological study of the shedding process of human deciduous teeth at various chronological stages. Arch Oral Biol 1977; 22:331-5.
101. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of

the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endoc Rev. 1999; 20:345-57.

102. Şimşek Ş, Durutürk L. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption. Arch. Oral Biol. 2005; 50: 461-468.
103. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentaition in osteoimmünology. J Mol Med. 2005; 83: 170-179.
104. Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. J Clin Periodontol 2007; 34: 367–369.
105. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med. 2001; 12:125-135.
106. Teke, A. Farklı dentin bağlayıcıların süt dişlerindeki antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2007.
107. Ten Cate AR, Anderson RD. An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. J Dent Res. 1986; 65: 1087-1093.
108. Teng YTA, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest. 2000; 106:R59-R67.
109. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK. T cells, bone loss, and mammalian evolution. Ann Rev İmmünol. 2002; 20:795-823.
110. Titelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000; 289: 1504-1508.
111. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. Exp Gerontol. 2003; 38:605-614.
112. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys. Res. Commun. 1997; 234: 137–142.
113. Udagawa N, Kotake S, Kamatani N, Takahashi N, Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2002; 4:281-290.

114. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. J Cell Sci. 2000; 113: 371-381.
115. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. J Periodontol. 2004; 75, 1586–1591.
116. Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamuta H. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. J Periodontal Res. 2001; 36:56-63.
117. Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. J Dent Res. 2000; 79:1937-1942.
118. Wise GE, Ren Y, Yao S. Regulation of osteoprotegerin gene expression in dental follicle cells. J Dent Res. 2003; 82: 298-302.
119. Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. Arch Oral Biol. 2002; 47:247-254.
120. Wittrant Y, Theoleyre S, Coullaud S, Dunstan C, Heynmann D, Redini F. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-κB ligand and osteoprotegerin biological activities. Exp Cell Res. 2004; 293:292-301.
121. Wong B R, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE (tumor necrosis factor TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med. 1997; 186: 2075–2080.
122. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS III, Frankel WN. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997; 272:25190-25194.
123. Wu YM, Richards DW, Rowe DJ. Production of matrix-degrading enzymes and inhibition of osteoclast-like cell differentiation by fibroblast-like cells from the periodontal ligament of human primary teeth. J Dent Res. 1999; 78: 681-689.

124. Yamaga T, Yoshihara A, Ando Y, Yoshitake Y, Kimura Y, Shimada M, Nishimuta M, Miyazaki H. Relationship between dental occlusion and physical fitness in an elderly population. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002; 57: M616-20.
125. Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE () In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. Arch Oral Biol 2004; 49:451-456.
126. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 3597–3602.
127. Yawaka Y, Osanai M, Akiyama A, Ninomiya R, Oguchi H. Histological study of deposited cementum in human deciduous teeth with pathological root resorption. Ann Anat. 2003; 185: 335-341.
128. Yıldırım S. Transforming Growth Factor-Beta1'in Pulpa Tedavilerinde Kullanılabilirliğinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2000.
129. Yıldırım S, Yapar M, Kubar A, Slots J. Human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and bone resorption-inducing cytokines in periapical lesions of deciduous teeth. Oral Microbiol İmmünol. 2006; 21: 107-111.
130. Yıldırım S, Yapar M, Sermet U, Sener K. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod. 2008; 105:113-20.
131. Zhang X, Peng B. İmmünolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. J Endod 2005; 31:574–577.

9. ÖZGEÇMİŞ

Temmuz 1970'de Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğretimimi Ankara'da tamamladıktan sonra 1987 yılında Hacettepe Üniversitesi'ne girdim. 1993'te Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım ve 2000 yılında "Transforming Growth Factor-Beta1'in Pulpa Tedavilerinde Kullanılabilirliğinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi" isimli tez çalışmasıyla Pedodonti doktoramı tamamladım. 2002 yılının Mayıs ayında Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalına yardımcı doçent olarak atandım. Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nin Dental Histoloji birimini kurdum ve eş zamanlı olarak Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ikinci doktorama başladım. 29 Kasım 2006'da doçentlik ünvanını kazandım ve Ocak 2007'de halen görev yapmakta olduğum Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nın başkanlığını üstlendim. Araştırma ilgi alanlarım süt dişi rezorpsiyonunda sitokinlerin rolü, rejeneratif pulpa tedavileri ve oral mikrobiyal patolojilerdir.