T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN YİRMİ YAŞ DİŞİNİN GÖMÜLÜ KALMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

Handegül KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Hasan KÜÇÜKKOLBAŞI

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARIN YİRMİ YAŞ DİŞİNİN GÖMÜLÜ KALMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

Handegül KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Hasan KÜÇÜKKOLBAŞI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202004 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ii. ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince verdiği maddi destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na;

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, manevi olarak da her zaman desteğini hissettiğim değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hasan Küçükkolbaşı'na;

Tezimin oluşturulması, analizleri ve değerlendirilmesi süresince bilgileri ve manevi desteğiyle yanımda olan Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Özgür Hilal Erinanç'a;

Tezimin istatistiksel analizini gerçekleştiren Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Uygulamalı İstatistik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat Erişoğlu'na;

Doktara eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine;

Hayatım boyunca sevgi, hoşgörü ve fedakârlıklarıyla her zaman beni destekleyen sevgili annem, ablam ve babama;

Bölümdeki arkadaşlarıma, hemşirelerimiz ve personelimize;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

iii. İÇİNDEKİLER **Sayfa**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iv**

1.GİRİŞ

1.1.Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişleri 1

1.1.1.Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Gelişimi 1

1.1.2.Dişlerinin Gömülü Kalma Nedenleri 2

Gömülülüğün lokal nedenleri 2

Gömülülüğün sistemik nedenleri 2

1.1.3.Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Sınıflandırılması 3

1.1.4.Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Çekim Endikasyonları 5

1.2.Dental Follikül 7

1.2.1.Dental Follikülün Gelişimi ve Diş Sürmesi 7

1.2.2.Dental Follikülün Diş Sürmesindeki Rolü 10

1.3.Matriks Metalloproteinazlar 14

1.3.1.Matriks Metalloproteinazların Önemi 14

1.3.2.Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması 15

Kollajenazlar 15

Jelatinazlar 16

Stromelisinler 16

Matrilisinler 17

Membran tip matriks metalloproteinazlar 17

Diğer matriks metalloproteinazlar 17

1.3.3.Matriks Metalloproteinazların Yapısı 18

1.3.4.Matriks Metalloproteinazların Diş Gelişimi ve Sürmesindeki Rolü 19

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Çalışma ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması 26

2.2.Cerrahi Yöntem 26

2.3.İmmunohistokimyasal Analizin Gerçekleştirilmesi 27

2.4.İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi 28

2.5.Verilerin İstatistiksel Analizi 29

3.BULGULAR

3.1.Klinik Bulgular 30
3.2.İmmunohistokimyasal Bulgular 30
3.2.1.Çalışma ve Kontrol Gruplarında Fibroblastlarda MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları 32
3.2.2.Çalışma ve Kontrol Gruplarında Damar Duvarında MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları 34
3.2.3.Çalışma ve Kontrol Gruplarında Epitel Dokuda MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları 36
3.2.4.Çalışma ve Kontrol Gruplarında Makrofajlarda MMP-12 Ekspresyonu 37
3.2.5.Çalışma ve Kontrol Gruplarında MT1-MMP ve MMP-2 Ekspresyonlarının İlişkisi 38
3.2.6.Çalışma ve Kontrol Gruplarında İnflamasyon Yoğunluğu 39
3.2.7.İnflamasyon Yoğunluğunun Fibroblastlarda Boyanmaya Etkisi 40
3.2.8.İnflamasyon Yoğunluğunun Damar Duvarında Boyanmaya Etkisi 42
3.2.9.İnflamasyon Yoğunluğunun Epitel Dokuda Boyanmaya Etkisi 44
3.2.10.İnflamasyon Yoğunluğunun Makrofajlarda Boyanmaya Etkisi 46
3.2.11.İltihap Hücrelerinde MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları 47
3.2.12.İnflamasyon Yoğunluğunun İltihap Hücrelerinde Boyanmaya Etkisi 48
3.2.13.MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP ile Boyanan Doku ve İltihap Hücreleri Arasındaki İlişkiler 50

4.TARTIŞMA 51
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 61
6.ÖZET 63
7.SUMMARY 64
8.KAYNAKLAR 65
9.EKLER 73
EK-A. Etik Kurul Kararı 73
10.ÖZGEÇMİŞ 74

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC: Aminoetil karbazol

AYYD: Alt yirmi yaş dişi

cDNA: Tamamlayıcı DNA 'Complementary DNA'

°C: Derece celsius

DF: Dental follikül

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ESM: Ekstrasellüler matriks

H&E: Hematoksilen-eozin

Kantitatif RT-PCR: Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu 'Quantitative real-time polymerase chain reaction'

µm: mikrometre

mm: milimetre

MMP: Matriks metalloproteinaz

MT1-MMP: Membran tip I matriks metalloproteinaz

NICE: National Institute for Clinical Excellence

NIH: National Institute of Health

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu 'Polymerase chain reaction'

PDL: Periodontal ligament

pH: Hidrojenin gücü "Power of hydrogen"

RNA: Ribonükleik asit

RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu 'Reverse transcription polymerase chain reaction'

S. Sapma: Standart sapma

SEM: Taramalı elektron mikroskobu 'Scanning electron microscope'

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TIMP: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü 'Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase'

1. GİRİŞ

1.1. Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişleri

Sürme zamanı gelmesine rağmen; çeşitli sistemik ve lokal nedenlerle dental arkta yerini alamayarak kemik içinde veya mukoza altında kalmış dişler 'Gömülü diş' adını almaktadır (Ness ve Peterson 2004, Sailer ve Pajarola 2004).

Gömülülükleri en sık görülen dişler, alt yirmi yaş dişleridir (AYYD) ve bu dişlerin çekimi ağız cerrahisinde en çok uygulanan işlemdir (Ness ve Peterson 2004, Meral ve ark 2005, Cabbar ve ark 2008, Kim ve ark 2011, Leung ve Cheung 2011, Baqain ve ark 2012).

Richardson (1992) ve Hattab (1997)'a göre AYYD'lerin, farklı popülasyonlardaki gömülü kalma insidansı %9,5-39 arasında değişmektedir.

Gömülü kalma sıklığında AYYD'yi, sırasıyla üst yirmi yaş dişi, üst kanin, alt kanin, alt premolar, üst premolar, üst santral ve üst lateral dişler takip etmektedir (Waite ve Reynolds 1998, Ness ve Peterson 2004).

1.1.1. Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Gelişimi

AYYD'lerin gelişimi, yaklaşık 5 yaşında ektoderm kökenli ağız epiteli ile embriyonik nöral kabartıdan köken alan çene mezenkimi arasındaki etkileşimler ile başlamaktadır. AYYD'lerin gelişimi, çene kemiğinin büyümesiyle paralel olarak gerçekleşmektedir (Ten Cate ve ark 2003, Ness ve Peterson 2004).

AYYD'lerin mineralizasyonu 8 yaşında başlamaktadır ve jermler 9 yaşında radyografik olarak görünür hale gelmektedir. Tüberkül mineralizasyonu ise yaklaşık 2 yıl sonra tamamlanmaktadır. Kuron oluşumu genellikle 14 yaşında; köklerin yaklaşık olarak yarısı 16 yaşında; köklerin tamamı ise 18 yaşında apeksleri açık şekilde tamamlanmakta ve apeksler de 18-25 yaşları arasında kapanmaktadır. Diş sürmesi 17-21 yaşları arasında gerçekleşmektedir. Genellikle sürebilecek durumdaki AYYD'lerin %95'i, 24 yaşında sürmesini tamamlamış olmaktadır (McKern ve

Stewart 1957, Richardson 1992, Hattab 1997, Kruger ve ark 2001, Ventä ve ark 2001, Ness ve Peterson 2004, Shetty ve ark 2010).

1.1.2. Dişlerin Gömülü Kalma Nedenleri

Günümüze dek; daimi dişlerin gömülü kalmasına neden olan çeşitli lokal ve sistemik faktörler bildirilmiştir (Türker ve Yücetaş 2004, Zeitler 2004).

Gömülülüğün lokal nedenleri

1. Süt dişlerinin ağızda uzun süre kalması ya da erken kaybı sonucu oluşan yer darlığı,
2. Çocuklukta geçirilen ateşli hastalıklar sonucu kemikte meydana gelen değişiklikler,
3. Süpernümerer diş varlığı,
4. Malpoze diş jermleri,
5. Komşu dişin yapı ve dizi bozukluğu nedeniyle yaptığı baskı,
6. Ark uzunluğunun yetersiz oluşu,
7. Sürmeyi engelleyen odontojenik tümörler, kistler, iltihabi süreçler gibi patolojik etkenler,
8. Dişin çevresindeki kemik dokunun yoğun oluşu,
9. Uzun süreli kronik iltihaplanma nedeniyle dişin üzerini örten mukozanın kalınlaşması,
10. Travmatik etkenler nedeniyle diş jermlerinin zarar görmesi,
11. Kuron veya kök malformasyonu.

Gömülülüğün sistemik nedenleri

1. Prenatal (doğum öncesi) faktörler

1. Kalıtım,
2. Farklı ırktan birleşen kişilerin çocukları (melezlik),
3. Hamilelik döneminde annenin hatalı beslenmesi,

4. Hamilelik döneminde annenin geçirdiği spesifik enfeksiyonlar (sifiliz, tüberküloz gibi).

2. Postnatal (doğum sonrası) faktörler

1. Raşitizm,
2. Endokrin bozukluklar (Hipotiroidzm, Hipopituitarizm),
3. Anemi,
4. Konjenital sifiliz, tüberküloz,
5. Beslenme bozuklukluğu,
6. Travma,
7. Ateşli hastalıklar,
8. Çene ve çevre doku hastalıkları,
9. Işın tedavisi.

3. Gelişimsel bozukluklar

1. Damak yarığı,
2. Akondroplazi (uzun kemiklerde kıkırdağın kemikleşememesi ile oluşan cücelik),
3. Progeria (çocukluk çağında yaşlılık belirtileri),
4. Oksisefali (koni veya kule biçimli kafa kubbesi),
5. Kleidokraniyal disostoz (kafa kemiklerinde kireçlenme bozukluğu).

1.1.3. Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Sınıflandırılması

Gömülü AYYD'lerin çekim zorluğunun değerlendirilmesi amacıyla yapılan sınıflandırmalarda; dişin üzerindeki dokunun tipi, dişin açılanması, dişin mandibula ramus ön sınırı ve oklüzal düzlem ile olan ilişkileri göz önünde bulundurulmuştur.

Retansiyon şekillerine ya da üzerindeki örtücü dokunun tipine göre gömülü AYYD'ler; tamamen kemik retansiyonlu, kısmen kemik kısmen yumuşak doku retansiyonlu ve yumuşak doku retansiyonlu olmak üzere üç sınıf halinde gruplandırılmaktadır (Von Wowern ve Nielsen 1989).

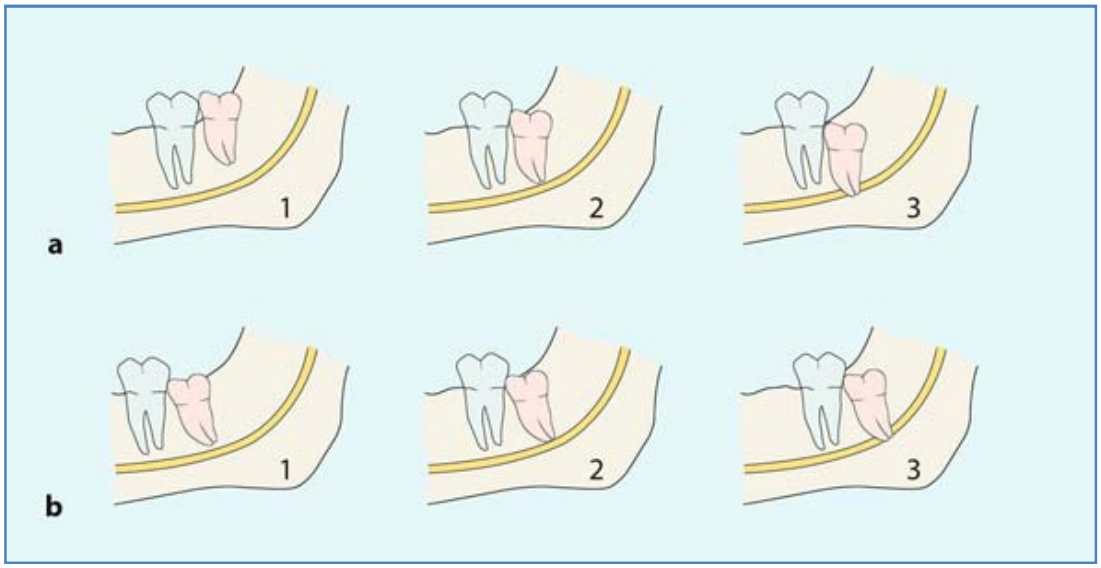
Pell ve Gregory (1933), AYYD'leri ramus ön kenarı ve oklüzal düzlem ile olan ilişkilerine göre sınıflandırmıştır.

Ramus ön kenarı ile olan ilişkiye göre gömülü AYYD'ler 3'e ayrılmaktadır (Şekil 1.1.b):

Sınıf I: AYYD'nin sürebilmesi için ikinci molar dişin distal kenarı ve alt çene ramusunun ön sınırı arasındaki mesafe dişin meziodistal genişliğinden fazladır.

Sınıf II: İkinci molar dişin distal kenarı ile alt çene ramusunun ön sınırı arasındaki mesafe AYYD'nin meziodistal boyutundan küçüktür.

Sınıf III: İkinci molar dişin distal kenarı ile alt çene ramusunun ön sınırı arasında, AYYD'nin sürebilmesi için hiç yer yoktur. Dişin bütünü ya da büyük bir kısmı ramus içindedir.



Şekil 1.1. Pell ve Gregory sınıflandırması. Oklüzal düzlemle olan ilişkiye göre **(a)** sırasıyla (pozisyon A, pozisyon B, pozisyon C); ikinci molar dişin distal kenarı ve alt çene ramusunun ön kenarı arasındaki mesafeye göre **(b)** sırasıyla (sınıf I, sınıf II, sınıf III) (Fragiskos 2007).

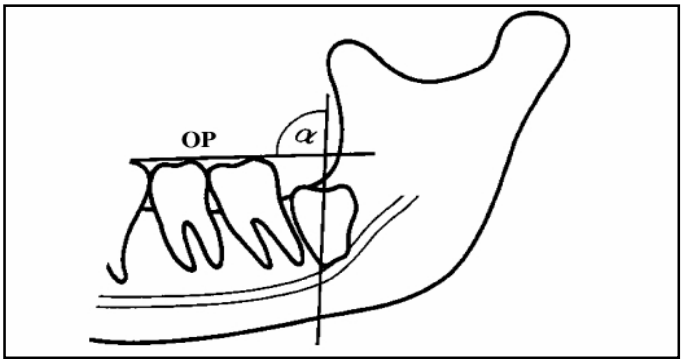
Oklüzal düzlemle olan ilişkiye göre gömülü AYYD'ler 3'e ayrılmaktadır (Şekil 1.1.a):

Pozisyon A: AYYD'nin oklüzal yüzeyi, alt ikinci molar dişin oklüzal yüzeyi ile aynı seviyededir ya da ondan daha yukarıdadır.

Pozisyon B: AYYD'nin oklüzal yüzeyi, alt ikinci molar dişin oklüzal yüzeyi ile servikal seviyesi arasındadır.

Pozisyon C: AYYD'nin oklüzal yüzeyi, alt ikinci molar dişin servikal seviyesinin altındadır.

Günümüzde kullanılan Winter sınıflandırmasında ise; gömülü AYYD'nin açılanması, dişin uzun ekseni ile oklüzal düzlem arasındaki açının panoromik radyografi üzerinde ölçülmesi ile belirlenmektedir (Şekil 1.2). Buna göre dişler; vertikal (α=61°-90°), mezioanguler (α=31°-60°), horizontal (α=0°-30°), distoanguler (α>90°) ve ters (α□0°) olarak gruplandırılmıştır (Almendros-Marqués ve ark 2006).



Şekil 1.2. Winter sınıflandırmasında kullanılan gömülü dişin uzun ekseni ile oklüzal düzlem arasındaki açı (Werkmeister ve ark 2005).

1.1.4. Gömülü Alt Yirmi Yaş Dişlerinin Çekim Endikasyonları

1979 yılında National Institute of Health (NIH) tarafından yirmi yaş dişlerinin çekimi ile ilgili aşağıdaki değerlendirmeler yapılmıştır (NIH 1980):

1. Yirmi yaş dişi çekimi kriterleri arasında; enfeksiyon, restore edilemeyecek çürük lezyonlar, kist, tümör, komşu diş ve kemiğin yıkımı bulunmaktadır.
2. Genç hastalarda, çekimden kaynaklanan morbidite oranı yaşlılardan daha düşüktür.
3. Hangi durumlarda çekime karar verileceğinin belirlenmesi konusunda günümüzdeki çalışmalar yetersizdir.

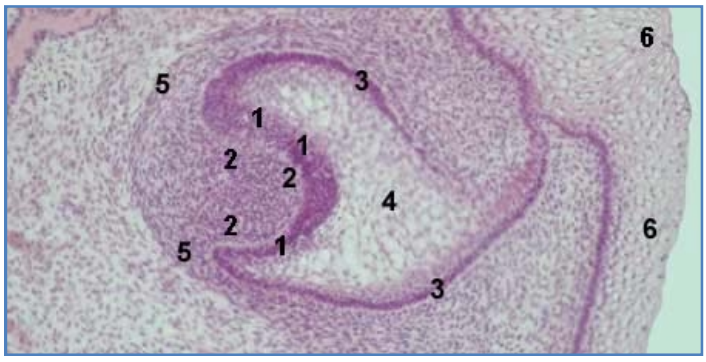
National Institute for Clinical Excellence (NICE) tarafından, gömülü yirmi yaş dişinin çekim endikasyonları arasında; rekürrent perikoronitis, sellülit, apse,

osteomiyelit, kist ve tümör gibi dental follikül (DF) hastalıkları, restore edilemeyen çürükler, tedavi edilemeyen pulpal ve/veya periapikal patolojiler, komşu dişin iç ve/veya dış rezorpsiyonu, diş kırığı, dişin cerrahi veya rekonstrüktif çene cerrahisini engellemesi, tümör rezeksiyon sahası içinde bulunması gibi durumlar bildirilmiştir. Ayrıca ilk kez oluşan perikoronit olgusunun, şiddetli olmadıkça çekim için bir endikasyon olmadığı da belirtilmiştir (NICE 2000). Bununla birlikte gömülü yirmi yaş dişleri ile ikinci molar dişler arasında periodontal hastalık ve cep gelişimi mevcutsa; bu dişlerin erken çekiminin periodontal hasarı azalttığı bilinmektedir. Bu nedenle periodontal hastalık da cerrahi çekim endikasyonu olarak göz önünde bulundurulmalıdır (Kugelberg ve ark 1991, Stathopoulos ve ark 2011). Sonuç olarak; çekim kararı verilirken her hastanın sağlık durumu, yaşı ve çekilecek dişin komşu yapılarla ilişkisi bireysel olarak dikkatle değerlendirilmelidir (Mercier ve Precious 1992, Adeyemo 2006).

1.2. Dental Follikül

1.2.1. Dental Follikülün Gelişimi ve Diş Sürmesi

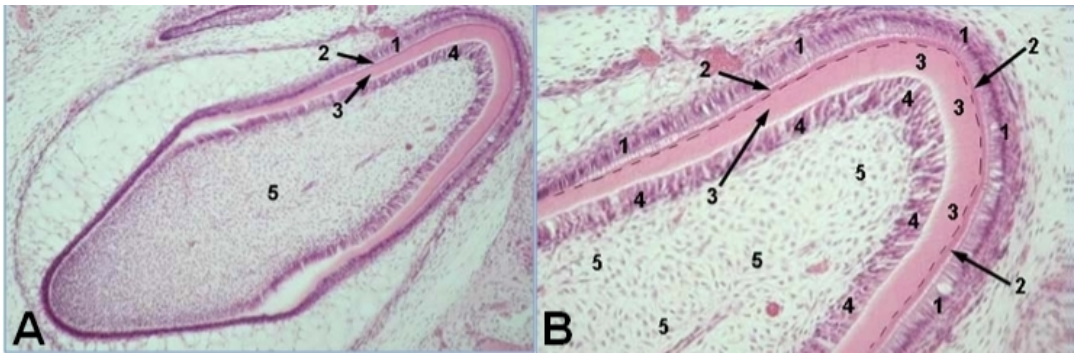
Odontogenez (diş oluşumu), embriyonal hayatın (0-10.hafta) 6.haftasında başlamaktadır. Diş gelişimi, oral epitel hücreleri (mine organını oluşturur) ve mezenkim hücreleri (dental papillayı oluşturur) arasındaki etkileşimler ile meydana gelmektedir. Bu süreçte mine organı, dental papilla ve onları çevreleyen DF oluşmaktadır (Resim 1.1). Gelişimin ilerleyen dönemlerinde mine organından mine, dental papilladan dentin ve pulpa; DF'den ise sement, periodontal ligament (PDL) ve alveoler kemik meydana gelmektedir. Diş gelişimi sırasında oluşan ameloblast ve odontoblast hücreleri, mine ve dentinin organik matriksini salgıladıktan sonra bu organik matrikslerin mineralizasyonu gerçekleşerek dişin kuron kısmının oluşumu devam etmektedir (Resim 1.2). Kuron mineralizasyonu tamamlanıp, kök oluşmaya başladıktan sonra diş sürmesi (erüpsiyon) başlamaktadır. Diş sürüp oklüzyonda yerini aldığında kök gelişimi ve kök çevresindeki dokuların oluşumu da tamamlanmış olmaktadır (Marks ve Schroeder 1996, Ten Cate ve ark 2003, Carlson 2004, Retrouvey ve ark 2012).



Resim 1.1. Hematoksilen-eozin (H&E) boyama. 1, 3 ve 4 Mine organı 1. İç mine epitel hücreleri (ameloblastları oluşturur), 2. Dental papilla, 3. Dış mine epitel hücreleri, 4. Mine organını oluşturan hücreler, 5. DF, 6. Ağız epiteli (Gunin 2000).

DF, gelişmekte olan bir dişin mine organını ve dental papillasını saran ince, yoğun, fibröz bağ dokusu olarak tanımlanmaktadır (Zhao ve ark 2009). DF, iç tarafta mine organıyla temas halindedir, dış tarafta ise alveoler kemikle damardan zengin bir bağ dokusu ile ayrılmıştır. DF; sement, PDL ve alveoler kemik oluşumuna

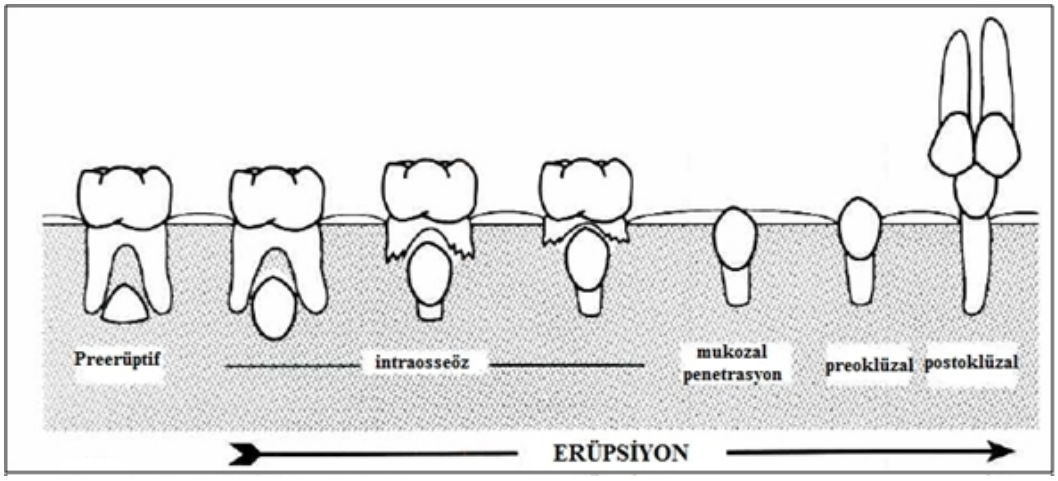
katılmakta ve dişin ağız ortamına sürmesi ile kaybolmaktadır (Gorski ve Marks 1992, Marks ve Schroeder 1996).



Resim 1.2. H&E boyama. Dental dokuların gelişimi. Mine ve dentin arasındaki sınır kesikli çizgi ile belirtilmiştir. 1. Ameloblastlar, 2. Mine, 3. Dentin (predentin), 4. Odontoblastlar (dental papillanın tepesini örten hücreler), 5. Pulpa (eski dental papilla) **(A,B)** (Gunin 2000).

Dişin alveoler kemik içinde geliştiği alandan ağız içinde fonksiyon göreceği pozisyonuna doğru olan hareketi "Diş sürmesi" olarak tanımlanmaktadır (Marks ve Schroeder 1996). Dişin erüpsiyon süreci 4 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1.3):

1. Preerüptif (sürme öncesi) dönem,
2. Prefonksiyonel erüptif (kemik içi fonksiyon öncesi; intraosseöz) dönem,
3. Fonksiyonel erüptif (mukozal penetrasyon; preoklüzal erüpsiyon) dönem,
4. Postoklüzal erüpsiyon dönemi.

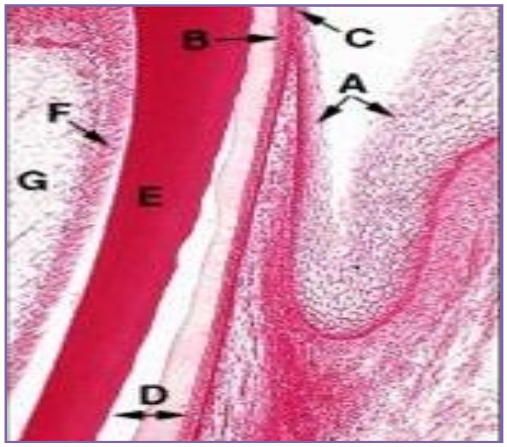


Şekil 1.3. Mandibular 1.premolar dişin erüpsiyon aşamalarının şematik gösterimi (Marks ve ark 1995).

Süt ve sürekli diş kuronlarının şekillenmeye başlamasından tamamlanmasına kadar olan preerüptif dönem, çenelerde büyüme ve gelişimle birlikte gerçekleşen ufak hareketleri içermektedir (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996).

DF'nin kontrolünde gerçekleşen prefonksiyonel erüptif dönemde, gelişen alveol kemiği içerisinde kemik rezorpsiyon ve oluşumu ile birlikte diş oklüzal veya insizal yönde yer değiştirmektedir. Yine bu aşamada, kök oluşumu da (kök dentini ve pulpa dokuları) gerçekleşmektedir (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996, Wise ve King 2008, Retrouvey ve ark 2012).

Kuronun tüberkül tepesi alveoler krete ulaştıktan hemen sonra sürme yolu oluşumu tamamlanmakta ve sürme hızı artmaktadır (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996). Mine organı epitelinin atrofiye olmasından sonra oluşan ve diş kuronunun üzerini kaplayan azalmış mine epiteli ile ağız epiteli temas ederek kaynaşmaktadır (Resim 1.3). Aynı şekilde DF epiteli de, PDL'yi oluşturmak üzere ağız epiteliyle kaynaşma göstermektedir. Fonksiyonel erüptif dönemde, alveol mukozasını delen diş kuronu, alveoler kret üzerinde mine-sement birleşimine kadar yükselmektedir (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996, Carlson 2004, Wise ve King 2008, Retrouvey ve ark 2012).



Resim 1.3. Sürme sırasında epitel kaynaşması. A. Ağız epiteli, B. Azalmış mine epiteli, C. Epitel kaynaşması, D. Mine, E. Dentin, F. Odontoblastlar, G. Pulpa (MacPherson 2002).

Diş oklüzal düzleme ulaştığında sürme oldukça yavaşlamakla birlikte; 50 yaşına kadar alveol yüksekliğindeki artışla oluşan büyüme ile paralel şekilde devam etmektedir (Marks ve Schroeder 1996). Postoklüzal erüpsiyon döneminde

gerçekleşen bu büyüme ile, yüzün vertikal boyutları artmakta ve aynı zamanda oklüzal aşınma dengelenmektedir. Karşı arktaki dişin kaybedilmesi ile ortaya çıkan kontak kaybı gibi durumlarda alveoler büyüme ve erüpsiyon hızı tekrar artış göstermektedir. Aynı zamanda bu dönemde destek alveoler kemik ve PDL'nin lifleri son şeklini almaktadır (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996, Retrouvey ve ark 2012).

1.2.2. Dental Follikülün Diş Sürmesindeki Rolü

DF ve ondan gelişen PDL, sürme sırasında diş ve alveol kemiği arasında aracılık eden ve komşu dokuların remodelinginde (yeniden yapılanması) önemli rol oynayan yumuşak dokulardır (Marks ve Schroeder 1996, Wise ve King 2008). DF'nin diş sürmesindeki rolünü araştıran Cahill ve Marks (1980), sürme başlangıcından önce DF'lerini çıkardıkları köpek premolar dişlerinin süremediğini göstermişlerdir. Marks ve Cahill (1984)'in DF'yi bozulmamış olarak yerinde bırakıp, dişi çıkardıkları ve yerine dental amalgam gibi yapay bir kopyasını ekledikleri çalışmaları ise yapay dişin sürmesi ile sonuçlanmıştır. Bu iki çalışma da DF'nin diş sürmesindeki önemini kanıtlamıştır.

Diş sürmesinin, DF içindeki bazı genlerin belirli zamanlarda belirli bölgelerde gerçekleşen ekspresyonu[1] sonucu çeşitli moleküllerin up ya da down regülasyonunun[2] oluşması ile kontrol edildiği düşünülmektedir (Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996, Wise ve King 2008). DF, diş sürmesinin intraosseöz safhasında alveoler kemik rezorpsiyonu ve oluşumunu düzenleyerek, sürmeyi başlatmakta ve devam ettirmektedir. DF'nin koronal taraftaki yarısının kemik rezorpsiyonunu; bazal taraftaki yarısının ise kemik oluşumunu kontrol ettiği belirlenmiştir (Gorski ve Marks 1992, Marks ve Schroeder 1996, Wise ve King 2008, Retrouvey ve ark 2012). DF'nin iki ayrı tarafında gerçekleşen ve sürme için gerekli olan bu olaylar birbirinden bağımsız olup biri; örneğin kemik oluşumu deneysel

[1]DNA'daki genetik bilgilerin bir RNA molekülü sentezi ile kopyalanması veya yazılmasına transkripsiyon; transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine ise translasyon adı verilmektedir. Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ekspresyonu olarak tanımlanmaktadır (Altınışık 2009).

[2]Gen ekspresyonunun regülasyonu, transkripsiyon ya da translasyon aşamasında indüklenme (up) ya da baskılanma (down) şeklinde ilgili genin kontrolünün sağlanması ile gerçekleşmektedir (MeSH 2013).

olarak diş hareketsiz hale getirilerek engellense bile kemik rezorpsiyonu ile sürme yolu oluşumu devam etmekte ve kuvvet ortadan kaldırıldığında da bu dişlerin sürdüğü gözlenmektedir (Cahill 1969, Wise ve ark 2002). Erüpsiyon süreci başlamadan önce DF'de mononükleer hücreler (osteoklast öncül hücreleri) toplanarak alveoler kemiği rezorbe ederek sürme yolunu oluşturacak olan osteoklastlara dönüşmek için birleşmektedir (osteoklastogenez) (Marks ve ark 1983, Wise ve ark 1985, Tirali ve ark 2011).

Diş sürmesi sırasında, kuronun bir parçası alveoler kretin üzerine çıktığı zaman supraosseöz safha başlamaktadır (Marks ve Schroeder 1996). DF, sürmenin bu safhasında alveol kemiğine ve semente tutunarak PDL'ye dönüşmektedir (Cahill ve Marks 1982, Wise ve ark 2007). Bu nedenle DF'deki osteoklastogenezi düzenleyen erüpsiyon genlerinden bazılarının, PDL'de de ekspresyonunun gerçekleştiği düşünülmektedir (Wise ve King 2008). PDL, sürme sırasında hızlı şekilde; diş oklüzal kontağa geldikten sonra da daha yavaş olacak şekilde alveoler kemiğin devamlı remodelingini gerçekleştirerek dişin hareketine yardım etmektedir (Marks ve Schroeder 1996, Wise ve King 2008). Bu nedenle PDL'nin esas hücrelerini oluşturan fibroblastlar, dişin gelişiminde ve fonksiyon görmesinde önemli role sahiptirler (Retrouvey ve ark 2012).

Ekstrasellüler matriks (ESM), bağ dokusunun hücre ve lifleri arasındaki boşlukları dolduran; hücreleri çevreleyen ve destekleyen bir yapıdır. Hücreler, ESM'yi oluşturan bileşenleri parçalayarak tutundukları yerden ayrılmakta ve matriks boyunca yeni pozisyonlarına doğru hareket etmektedirler. Normal büyüme ve gelişim için gerekli olan bu hücre göçü ve dokuların remodelingi, ESM'nin kontrollü şekilde yıkımına bağlıdır (Birkedal-Hansen ve ark 1993, Nagase ve Woessner 1999, Ravanti ve ark 1999, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003). ESM yıkımı ise proteolitik (protein parçalayıcı) enzimlerle gerçekleşmektedir. Proteinleri parçalayıcı bu enzimler (proteinaz), 4 gruba ayrılmaktadır: Serin proteinaz, sistein proteinaz, aspartik proteinaz ve matriks metalloproteinaz (MMP). Bu enzimler arasında MMP'lerin, ESM yıkımında merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir (Birkedal-Hansen ve ark 1993, Shin ve ark 2002, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003).

Kollajen, ESM'deki yapısal bir proteindir ve kollajen lifleri matriksi güçlendirmektedir. En önemlileri tip I, II, III, IV ve V kollajenlerdir. Tip I kollajen, kemik ve dentinde en bol bulunan kollajendir ve dokularda klasik olarak kollajen lif adı verilen yapılar halinde bulunmaktadır. Tip I ve III kollajen de, PDL'nin başlıca bileşenlerindendir. Kollajen liflerin, gelişen ihtiyaca ve komşu sert doku yüzeylerinin değişimine uyum sağlayabilmesi için hücreler düzenli olarak bu liflerin yıkımını gerçekleştirip yeni bir düzen içinde onları yenileriyle değiştirerek remodelingi gerçekleştirmektedir. Kollajen yıkımının MMP enzim alt gruplarından olan kollajenaz enzimleri tarafından başlatıldığı ve yine diğer MMP enzim alt grupları tarafından daha fazla parçalara ayrıldığı bildirilmiştir (Beertsen ve ark 2002, Polat 2011). Bununla birlikte Liu ve ark (1995) tarafından, kollajenaz aktivitesine dirençli tip I kollajene sahip mutant farelerin postnatal normal bir gelişim gösterdiğinin bulunması; kollajenaz enzimi olmadan da tip I kollajen yıkımının diğer MMP'ler tarafından gerçekleştirilebileceği düşüncesine yol açmıştır. Kerkvliet ve ark (1999) tarafından yine MMP enzim alt gruplarından olan jelatinaz (MMP-2) ile yapılan benzer bir çalışma bu bulguyu desteklemiştir.

Diş sürmesi sırasında gerçekleşen kemik rezorpsiyonu ve oluşumu için gerekli olan uyarıların, mine organı ve DF içindeki MMP enzimleri, büyüme faktörleri ve sitokinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gorski ve Marks 1992, Marks ve Schroeder 1996). Bu süreçlerde ESM'nin kollajen ve kollajen olmayan moleküllerinin yoğun şekilde yıkım ve yeniden yapılanması meydana gelmektedir (Birkedal-Hansen ve ark 1993, Nagase ve Woessner 1999, Maruya ve ark 2003). Bu durum; köpek premolar DF'si kullanılarak yapılan çalışmalarda, sürme sırasında MMP enzimlerinde, kollajen ve kollajen olmayan proteinlerde değişimin meydana geldiği gösterilerek doğrulanmıştır (Gorski ve ark 1988a, 1988b, Gorski ve Marks 1992). MMP enzimlerinin alt gruplarından olan kollajenaz ve stromelisinin DF'de yükselmiş seviyelerinin tespiti; bu enzimlerin doku yapım ve yıkım döngüsündeki rolünü göstermiştir (Gorski ve Marks 1992, Marks ve ark 1995, Marks ve Schroeder 1996). Ayrıca yapılan çalışmalarda erüpsiyon sürecinde periodontal dokulardaki (alveoler kemik, sement, PDL'lerde) gerçekleşen ESM'nin remodelinginin de; ESM moleküllerinin üretimi, MMP enzimleri tarafından ESM'nin yıkımı ve MMP enzimlerinin aktivitelerinin doku inhibitörleri (TIMP) tarafından durdurulması

(inhibisyon) arasındaki denge yoluyla düzenlendiği bildirilmiştir (Marks ve Schroeder 1996, Bode ve ark 1999, Beertsen ve ark 2002, Maruya ve ark 2003).

Dişin sürme bozuklukları arasında yer alan ve normal sürme zamanında oluşan sapma olarak tanımlanan "Gecikmiş diş sürmesi"nin patogenezinde; süren dişin DF'sinin, mukoza ile kaynaşmasında meydana gelen bozukluğun mukozanın yıkımında gecikmeye yol açarak dişin çıkmasını engellemesi yer almaktadır (Peedikayil 2011). Sürmeyi engelleyen bir başka bozukluk da, hiperplastik DF'dir. Bu kalın fibröz yapıdaki DF, röntgendeki görünümü ile dentigeröz kistle karıştırılabilmektedir (Fukuta ve ark 1991, Sun ve ark 2010). Kim ve ark (2008), MMP enzimlerinin ve TIMP'lerin anormal ekspresyonunun hiperplastik DF oluşumuna yol açabileceğini bildirmiştir. Bunlara ek olarak perikoronal bölgedeki hiperplazi gösteren ve fibromatöz yapıdaki operkuluma ait lezyonların da, fiziksel bir engel oluşturarak alttaki dişin normal sürmesini önlediği bilinmektedir. Bu tip lezyonlarda aktif doku remodelinginin indüklenmesiyle fibrozis geliştiği ve bu yolla diş sürmesinin geciktiği veya engellendiği düşünülmektedir (Yonemochi ve ark 1998, Verma ve ark 2005).

Dişin sürme yolunun oluşabilmesi için dişi çevreleyen dokuların ESM'sinde meydana gelen değişiklikler arasında; bağ dokusunun yıkımı, DF'nin koronal bölümündeki hücrelerin tip I kollajen üretimini durdurması ve bu bölgelerde osteoklastik hücre artışının meydana gelmesi bulunmaktadır. Dolayısıyla bağ dokusunda meydana gelebilecek anormal değişiklikler sürmeyi geciktirmekte ya da engellemektedir. Bu nedenle "Gecikmiş diş sürmesi"nin de, DF'nin koronal bölümündeki kollajenöz bağ dokusu varlığı nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir (Gorski ve Marks 1992, Shroff ve ark 1994, Yonemochi ve ark 1998). Dolayısıyla MMP enzimlerinin kollajen yıkımındaki etkisi düşünüldüğünde; dişin süremememesinde önemli rol oynadıkları anlaşılmaktadır.

1.3. Matriks Metalloproteinazlar

1.3.1. Matriks Metalloproteinazların Önemi

MMP enzimleri, ESM bileşenlerinin yıkımından sorumlu olan ve aktif bölgesinde çinko içeren proteolitik enzimlerin oluşturduğu büyük bir ailedir. MMP enzimleri; makrofaj, nötrofil, plazma hücreleri, keratinosit, fibroblast, kondrosit, osteoblast, osteoklast, epitel hücreleri ve endotel hücreleri gibi birçok hücre tarafından proenzim (inaktif) formunda sentezlenip salgılanmaktadır. Daha sonra MMP enzimlerinin, ekstrasellüler olarak (hücre zarı dışında) ya da hücre yüzeyinde; fiziksel, kimyasal ya da enzimatik etkenlerle aktivasyonu gerçekleşmektedir. MMP enzimlerinin ve onların özel doku inhibitörleri olan TIMP'lerin sentezlenip salgılanması, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir (Nagase 1997, Nagase ve Woessner 1999, Reel 2006, Rodríguez ve ark 2010, Biljana ve ark 2011).

TIMP'ler, MMP'lerin dokulardaki bölgesel aktivitelerinin kontrolüne katılarak; bağ doku metabolizmasının düzenlenmesinde temel rol alan protein yapılardır ve bugüne kadar omurgalılarda 4 adet TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4) bulunmuştur. Bunların dışında yapay olarak üretilmiş MMP inhibitörleri de mevcuttur (Gomez ve ark 1997, Brew ve ark 2000, Visse ve Nagase 2003).

MMP enzim ailesi, birçok fizyolojik (doku yeniden yapılanması, farklılaşma, yara iyileşmesi, mine ve dentin oluşumu, diş sürmesi gibi) ve patolojik süreçte (tümör yayılımı, fibrotik hastalıklar, eklem hastalıkları, inflamatuar hastalıklar, periodontal hastalıklar gibi); ESM'nin yıkımını sağlayarak rol almaktadır (Sorsa ve ark 2004, Reel 2006, Page-McCaw ve ark 2007, Nonaka ve ark 2009, Rodríguez ve ark 2010, Varun ve ark 2012).

MMP enzimleri bir kere aktive olduğunda, ESM'deki tüm proteinleri yıkabileceği için; aktivitesinin kontrol altında tutulması önemlidir. Normal dokularda MMP enzimlerinin ekspresyonu düşüktür; ancak aktif doku remodelingi gerekli olduğunda, üretimleri ve aktivasyonları hızla indüklenmektedir. Normal fizyolojik şartlarda MMP enzimlerinin aktivitesi; transkripsiyon, öncül proenzimlerin

aktivasyonları ve TIMP'ler tarafından inhibisyonları olmak üzere üç aşamada kontrol edilmektedir. Bunlardan birisi olan inhibitörler lehine gerçekleşen dengedeki bozulmanın fibrotik aktivite gelişimine yol açabildiği; enzimatik aktivitedeki artışın ise doku yıkımı ya da kanserde olduğu gibi hücre invazyonuna neden olacağı bildirilmiştir (Bode ve ark 1999, Creemers ve ark 2001, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003).

1.3.2. Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması

Gross ve Lapiere (1962) omurgalılardan elde edilen doğal tip I kollajenin yapısını bozan bir enzimin varlığını keşfetmişlerdir. Araştırmacılar, metamorfoz (başkalaşım) dönemindeki kurbağa yavrusunun kuyruk yüzgeci derisinden aldıkları ve kültüre ettikleri doku parçalarının, nötr pH'da ve 27˚C'de kollajeni parçalayabilen kollajenaz enzimini salgıladığını göstermişlerdir. Böylece ilk MMP enzim aktivitesinin keşfi gerçekleşmiştir.

Bugüne kadar omurgalılarda 25 adet MMP enzimi keşfedilmiştir ve bunlardan 23'ünün insanlarda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca suyılanı ve denizkestanesi gibi omurgasızlarda da çeşitli MMP enzimleri tanımlanmıştır (Sternlicht ve Werb 2001, Visse ve Nagase 2003). MMP enzimleri, etkiledikleri maddeye yani "substrat özgüllüğüne" göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membran tip MMP'ler ve diğerleri olarak 6 gruba ayrılmaktadır (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003, Varun ve ark 2012).

Kollajenazlar

MMP-1 (kollajenaz 1, interstisyel kollajenaz, fibroblast kollajenaz),
MMP-8 (kollajenaz 2, nötrofil kollajenaz),
MMP-13 (kollajenaz 3) ve
MMP-18 (kollajenaz 4, xenopus) enzimleri bu grupta yer almaktadır.

İnsan fizyolojik sıcaklığında kollajenaz enzimlerinin tümü, interstisyel (doku arasındaki) kollajenler tip I, II ve III'ü, denatüre ederek yani yapılarını değiştirerek parçalamaktadır. Bu parçalanan kısımların yıkımı, daha sonra jelatinazlar gibi diğer

MMP enzim grupları tarafından gerçekleştirilmektedir (Ravanti ve ark 1999, Creemers ve ark 2001, Visse ve Nagase 2003).

Jelatinazlar

MMP-2 (jelatinaz A) ve
MMP-9 (jelatinaz B) enzimleri bu grupta yer almaktadır.

Bu enzimler, kollajenin denatüre edilmiş hali olan jelatinleri, kolaylıkla yıkmaktadır (Allan ve ark 1995, Visse ve Nagase 2003).

Çalışmamızda incelediğimiz MMP-2 enziminin ekspresyonu; fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler, T lenfositler ve keratinositler gibi hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Birçok MMP enziminin aksine proMMP-2 enziminin aktivasyonu hücre dışında değil; membran tip I MMP (MT1-MMP) enzimi yoluyla hücre yüzeyinde gerçekleşmektedir. MMP-2 enzimi, tip I, II, III, IV, V, VII, X kollajeni yıkıma uğratmaktadır. Yapılan çalışmalarda insanda MMP-2 enzim mutasyonunun, kemiklerin harabiyet ve rezorbsiyonuna yol açan genetik bir bozukluk oluşturduğunun görülmesi; bu enzimin osteogenez için önemli olduğunu düşündürmüştür (Martignetti ve ark 2001, Wahlgren 2003, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003, Varun ve ark 2012).

Stromelisinler

MMP-3 (stromelisin 1),
MMP-10 (stromelisin 2) ve
MMP-11 (stromelisin 3) enzimleri bu grupta yer almaktadır.

Çalışmamızda incelediğimiz MMP-3 enziminin ekspresyonu; fibroblastlar, monosit, makrofaj, nötrofil, epitel hücreleri, endotel hücreleri, keratinositler, kondrositler gibi hücrelerde gerçekleşmektedir ve bu enzim tip II, III, IV, V, IX, X, XI kollajen ve jelatini yıkıma uğratmaktadır (Kerrigan ve ark 2000, Creemers ve ark 2001, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Jenkins ve ark 2004, Varun ve ark 2012).

Matrilisinler

MMP-7 (matrilisin 1, PUMP-1, en küçük uterin metalloproteinaz) ve
MMP-26 (matrilisin 2, endometaz) enzimleri bu grupta yer almaktadır.

Bu enzimler, menteşe bölgesi ve hemopeksin bölgesi bulunmayan en küçük MMP'lerdir (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003, Varun ve ark 2012).

Membran tip matriks metalloproteinazlar

MMP-14 (MT1-MMP),
MMP-15 (MT2-MMP),
MMP-16 (MT3-MMP),
MMP-17 (MT4-MMP),
MMP-24 (MT5-MMP) ve
MMP-25 (MT6-MMP) enzimleri bu grupta yer almaktadır.

Çalışmamızda incelediğimiz MT1-MMP enzimi, TIMP-2 ile oluşturduğu yapı vasıtasıyla hücre yüzeyinde proMMP-2'yi aktive edebilmektedir. Bu enzim tip I, II, III kollajen ve jelatini yıkıma uğratmaktadır (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003). MT1-MMP enziminin ekspresyonu, kemik ve diş gibi mineralize dokularda yüksek seviyede gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda MT1-MMP enzimi eksikliğinin, yetersiz kollajen remodelingine neden olarak; dwarfizm (cücelik), osteopeni, kraniyofasiyal anomaliler, yumuşak doku fibrozisi, artrit, iskeletsel displazi ve hatalı anjiyogenez gibi bozuklukların oluşmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Holmbeck ve ark 1999, Bartlett ve ark 2003)

Diğer matriks metalloproteinazlar

MMP-12 (metalloelastaz, makrofaj elastaz),
MMP-19 (RASI, iltihaplı romatizmal eklem zarında bir otoantijen),
MMP-20 (enamelisin),
MMP-21 (xenopus, XMMP),

MMP-23 (CA-MMP, sistein array),

MMP-27(CMMP, gallus) ve

MMP-28 (epilisin) enzimleri, yukarıda bahsedilen gruplardan herhangi birinde sınıflandırılamamıştır (Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003, Varun ve ark 2012).

Çalışmamızda incelediğimiz MMP-12 enziminin ekspresyonu, esas olarak makrofajlarda gerçekleşmektedir ve bu enzimin makrofaj göçü için gerekli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte fetüs gelişimi boyunca hipertrofik kondrositlerde de bu enzimin ekspresyonu gösterilmiştir. MMP-12 enzimi, tip IV kollajen ve jelatini yıkıma uğratmaktadır. Bu enzimin, anjiyogenezi inhibe ederek tümör gelişimini önlediği belirlenmiştir (Kerkelä ve ark 2001, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Hou ve ark 2004).

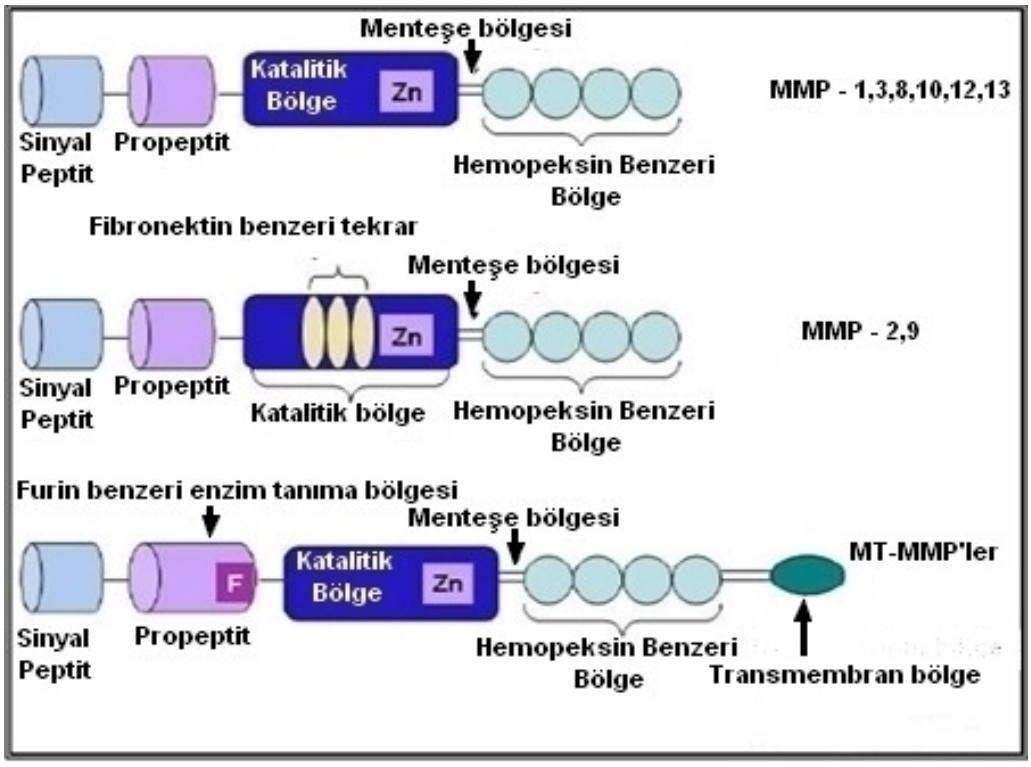
1.3.3. Matriks Metalloproteinazların Yapısı

MMP enzimlerinin yapısında şu bölümler bulunmaktadır (Şekil 1.4):

1. Sinyal peptit,
2. Propeptit,
3. Furin benzeri enzim tanıma bölgesi,
4. Katalitik bölge,
5. Fibronektin benzeri tekrarlar,
6. Menteşe bölgesi,
7. Hemopeksin benzeri bölge ve
8. Membran geçiş bölgesi (transmembran bölge).

MMP enzimleri, hücre içerisinde sentezlenmekte ve ekstrasellüler alana salgılanmaktadırlar. **Sinyal peptit**, enzimi salgılanması için işaretleyen ve salgılanma sonrası kaybolan bölümdür. **Propeptit bölgesi** bulunan inaktif formdaki MMP enzimlerine "proMMP" adı verilmektedir. Enzimin bu bölgesinin uzaklaştırılmasıyla, aktivasyonu gerçekleşmektedir. **Furin benzeri enzim tanıma bölgesi**, MMP'lerin furin benzeri enzimler tarafından hücre içi aktivasyonuna olanak tanımaktadır. Bu bölge MMP-11, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-23, MMP-24, MMP-25 ve MMP-28'de bulunmaktadır. **Katalitik bölge**, proteolitik aktivite için

gerekli olan çinko iyonlarını içermektedir. **Fibronektin benzeri tekrarlar**, MMP-2 ve MMP-9'da katalitik bölge içerisinde yer almaktadır ve bu enzimlerin jelatin ve kollajen substratlara bağlanmasına yardım ederek proteolitik aktivitelerini arttırmaktadır. **Menteşe bölgesi**, katalitik bölge ve hemopeksin benzeri bölgeyi bağlamaktadır. Bu bölge MMP-7 ve MMP-26 enzimlerinde bulunmamaktadır. **Hemopeksin benzeri bölge**, substrat bağlanmasında ve TIMP'lerle etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır. Bu bölge de, MMP-7, MMP-23 ve MMP-26 enzimlerinde mevcut değildir. **Membran geçiş (transmembran) bölgesi**, MT-MMP enzimlerinin hücre membranına tutunmasını kontrol eden bölümdür (Birkedal-Hansen ve ark 1993, Bode ve ark 1999, Kerrigan ve ark 2000, Kerkelä ve Saarialho-Kere 2003, Visse ve Nagase 2003, Reel 2006, Biljana ve ark 2011, Varun ve ark 2012).



Şekil 1.4. MMP'lerin yapısının şematik gösterimi. Zn: aktif çinko alanı (Reel 2006).

1.3.4. Matriks Metalloproteinazların Diş Gelişimi ve Sürmesindeki Rolü

Bugüne kadar çeşitli yöntemler kullanılarak MMP'lerin, diş dokularındaki ekspresyonu araştırılarak diş gelişimi ve sürmesindeki önemi belirlenmeye çalışılmıştır.

MT1-MMP enzimi ekspresyonunun, kemik ve kıkırdak oluşumuna katılan hücreler (osteoklastlar, osteoblastlar ve kondrositler) tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Bu enzimin dişin sert dokuları olan mine ve dentinin oluşumuna katılan hücrelerdeki (ameloblast ve odontoblast) ekspresyon seviyelerini de inceleyen Caron ve ark (1998), domuzların sürmemiş 2. ve 3.molar dişlerinin mine organı ve pulpa organından aldıkları kesitlerde, RT-PCR[3], Northern blot analizi[4] ve immunohistokimyasal inceleme[5] gerçekleştirerek; MT1-MMP enzimi ile bu enzim tarafından aktive edildiği bilinen MMP-2'nin ekspresyon seviyelerini değerlendirmişlerdir. Ayrıca çoklu karşılaştırma yapmak amacıyla; domuzun böbrek, kalp, karaciğer, beyin, dalak, iskelet kası, akciğer dokularında da MT1-MMP ekspresyon seviyelerini Northern blot analizi ile incelemişlerdir. Dentin mineralizasyonu ilerledikçe, mine organı ve pulpa organında MT1-MMP'nin ekspresyonunun arttığı ve bu enzimin incelenen dokular arasında en yüksek seviyesinin yine bu dokularda tespit edildiği görülmüştür. Bununla birlikte, mineralize olmayan diğer dokularda da MT1-MMP ekspresyonunun belirlenmesi, bu enzimin geniş bir doku dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. İncelenen kesitlerdeki MMP-2 enziminin varlığı da iki enzim arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır. Sonuç olarak; MT1-MMP'nin direkt ya da MMP-2 aracılığıyla dolaylı olarak; mine ve dentin mineralizasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

Diş oluşumu boyunca, organik matriks salgılanmakta, remodele olmakta ve dentin (dentinogenez) ve mineyi (amelogenez) oluşturmak için mineralize edilmektedir. MT1-MMP enzimi ekspresyonunun, mine organının ameloblastları ve dental papillanın odontoblastları tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Bartlett ve ark (2003), MT1-MMP enziminin gelişmekte olan dişin dentin ve mine

[3]Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu: DNA'yı çoğaltmak için kullanılan bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile RNA molekülü çoğaltılamadığı için; öncelikle RNA'nın ters transkriptaz enzimi vasıtasıyla tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya dönüştürülmesi işlemidir (MeSH 2013).

[4]Genin transkripsiyon ürünü olan RNA molekülünün saptanması için kullanılan bir yöntemdir (MeSH 2013).

[5]Dokulardaki hücre yapıları antijen kabul edilerek; özel olarak üretilen antikorlarla bu hücrelerin oluşturdukları kompleksin özel boyalar ile boyanarak görülür hale getirilmesi ile gerçekleştirilen analizdir (Yılmaz 2007).

oluşumundaki rolünü araştırmak amacıyla; bu enziminin olmadığı "knockout[6]" farelerin 1.ve 2.molar dişlerinin histolojik, radyolojik ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizini gerçekleştirmişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla; mandibulanın küçük, şekilsiz, kök uçlarının da kesilmiş gibi kısa olduğu ve diş sürmesinin geciktiği belirlenmiştir. Bununla birlikte dişlerin kuron (mine ve dentin) gelişiminin etkilenmemiş olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, dişi çevreleyen alveoler kemiğin yetersiz gelişiminin diş sürmesinde gecikmeye yol açtığını belirtmişlerdir.

MT1-MMP enzimi ile ilgili yapılan bir başka araştırmada Holmbeck ve ark (1999), bağ doku kollajen yıkımında önemli rol oynayan bu enzimin eksikliğinde büyüme ve gelişimde bozukluklar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Diş sürmesi sırasında, bir bağ doku olan PDL'nin de kollajen remodelingi gerçekleşmektedir. Beertsen ve ark (2002), MT1-MMP enzim geni susturulmuş farelerde, periodontal kollajen liflerinin yıkım ve yeniden yapımını gerektiren kök uzaması ve diş sürmesi olaylarının nasıl etkilendiğini araştırmak için; farelerin mandibular 1.molarlarından alınan kesitlerde, PDL fibroblastlarını incelemişler ve dişlerin kök uzunlukları ve alveoler kemik oluşumlarını kontrol grubuyla karşılaştırmışlardır. Deney grubunda, köklerin gelişiminde şiddetli gerilik, PDL'de gelişim bozukluğu, kemik oluşumunda eksiklik, dişle ve çene kemiğiyle ilişkili bütün bağ doku fibroblastlarında (PDL, ağız mukozası, dişeti ve periost) anormal değişiklikler tespit edilmiştir. Ayrıca bu dişlerin süremediği ve oklüzal yüzeylerinin yoğun kollajenden zengin mukozal bir doku ile örtülü olduğu görülmüştür. Bununla birlikte dişlerin kuron gelişimlerinin normal ve kemik rezorpsiyonunun da etkilenmemiş olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar MT1-MMP enziminin etkisini; kollajen remodelingi ve/veya kemik oluşumu aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşünerek; kollajen metabolizmasında oluşan bozukluk sonucu, PDL ve kemik arayüzünde de uygun remodelingin olamayacağını ve böylece de kemik oluşumu ya da sürmenin gerçekleşmeyeceğini bildirmişlerdir. Beertsen ve ark (2003) tarafından yapılan bir başka çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Diş sürmesi sırasında; periodontal dokularda (alveoler kemik, sement, PDL'lerde) gerçekleşen ESM remodelingi; ESM moleküllerinin üretimi, MMP'ler

[6]Geni susturulmuş (knockout) fare modelleri, bir genin devre dışı bırakılarak işlevinin anlaşılmasında kullanılmaktadır (Kansu 2008).

tarafından ESM'nin yıkımı ve TIMP'ler tarafından MMP'lerin inhibisyonu arasındaki denge yoluyla düzenlenmektedir. Kemikte osteoklastların yanısıra, osteoblastlar ve osteositlerin de MMP'ler gibi ESM'yi yıkan enzimleri ürettiği ve bu enzimleri kullanarak mineralize olmamış osteoid tabakanın kaldırılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir (Sahlberg ve ark 1999, D'Alonzo ve ark 2002). Maruya ve ark (2003) tarafından, in situ hibridizasyon tekniği[7] kullanılarak; sıçanların maksiller 1.molar dişinin sürmesi sırasında, osteoblastlar, osteositler, sementoblastlar, sementositler ve PDL fibroblastlarında; TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, MMP-2, MMP-8, tip I kollajen ekspresyonları araştırılmış ve alveoler kemik, sement ve PDL'de saptanan MMP-2 ve MMP-8 ile ilişkili olarak bulunan tip I kollajen ve TIMP'lerin yüksek ekspresyon seviyelerinin; sürme sürecindeki aktif ESM remodelingini gösterdiği bildirilmiştir.

Diş jerminde; dental papillayı mine organından ayıran ve diş gelişiminin ilerleyen safhalarında mine-sement birleşim yerini oluşturan bazal membranın, oluşumu ve yıkımı diş gelişimi için önemlidir (Bourd-Boittin ve ark 2005). Sahlberg ve ark (1992), fare molar jermlerinin dentin ve mine matrikslerinin salgılandığı dönemde, in situ hibridizasyon ve antikorlarla immün boyama teknikleri kullanarak dental mezenkim ve bazal membranda tespit ettikleri MMP-2 enziminin yüksek seviyedeki ekspresyonunun; bu enzimin bazal membran yıkımındaki rolünün göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Heikinhimo ve Salo (1995), aynı tekniği kullanarak insan fetüs (gebeliğin 13-20. haftalar arası) dişlerinin jerm epiteli, dental papilla, bazal membran ve DF dokularında; dentin ve mine organik matrikslerinin sentezlendiği aşamada bazal membranın temel yapısal bileşenlerinden olan tip IV kollajenin ve onun yıkımını gerçekleştiren MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar özellikle MMP-2 enziminin büyük ölçüde dental papilla ve DF hücrelerinde bulunduğunu ve bazal membran remodelingi ve parçalanmasında bu enzimin rol aldığını bildirmişlerdir.

[7]In situ hibridizasyon (melezleme); kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) saptanarak gösterilmesini sağlayan bir tekniktir (MeSH 2013).

Bugüne kadar, gelişmekte olan dişin mine ve dentininde zimografi[8] tekniği kullanılarak MMP-20, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 ve MT1-MMP enzimleri tespit edilmiştir. Bununla birlikte MMP-2 enziminin, dentin oluşumunda daha önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Caron ve ark 2001, Bartlett ve ark 2003, Bourd-Boittin ve ark 2005). Bourd-Boittin ve ark (2005), dentin ve mine organik matrikslerinin oluşumu ve mineralizasyonu sırasında; MMP-2, MMP-9 ve MMP-20 enzimlerinin ekspresyon seviyeleri ve etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında fare embriyo diş jermi kültürünü kullanmışlardır. Deney kültürlerlerine değişen dozlarda yapay üretilmiş MMP inhibitörü eklenmesi yoluyla, MMP enzimlerinin inhibisyonu gerçekleştirilmiş ve değerlendirme için Western blot[9] (MMP-20 için), zimografi (MMP-2 ve -9 için) ve immunohistokimyasal analiz kullanılmıştır. Yüksek dozda yapay MMP inhibitörü eklenen deney kültürlerinde, mine yapımı ve dentin matriks mineralizasyonu gerçekleşmemesine rağmen; predentin salgılanmasının devam ettiği belirlenmiştir. Ayrıca MMP-2 ve MMP-20 enzimlerinin inhibisyonu sonucu; bazı matriks proteinlerinin yıkımının azalması ve bu proteinlerin ESM'deki birikimi ile gelişen dentin ve mine matrikslerinin hatalı mineralizasyonu, MMP'lerin mine ve dentin oluşumundaki önemini göstermiştir.

DF'nin, kemik rezorpsiyonu ile sürme yolunun oluşumundaki önemli rolü bilinmektedir. Shroff ve ark (1995), yenidoğan fare 1.molar dişlerinin gelişimi ve sürmesi sırasında, DF'lerinde zimografi yöntemi ile jelatinaz enzim aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, DF'nin özellikle koronal bölümünde jelatinaz aktivitesinin başlamasıyla aynı zamanda tip I kollajende azalma tespit edilmesi nedeniyle; jelatinaz genin up regülasyonu ve tip I kollajen genin down regülasyonunun dişin sürme yolunun oluşumunu sağladığını belirtmişlerdir.

Gorski ve Marks (1992), zimografi ve Western blot tekniği ile sürme sırasında köpek premolar dişinin DF'sindeki, MMP ekspresyon seviyelerini incelemişler ve kuron, kök gelişimi ve sürme sırasında MMP-1 ve MMP-3

[8]Zimografi, MMP'lerin hem inaktif hem de aktif formlarının saptanmasında kullanılan ve enzimin, özel jel içine eklenmiş substratını tüketmesi esasına dayanan bir tekniktir (Kleiner ve Stetler-Stevenson 1994).

[9]Western blot, dokuda aranan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonunun belirlenmesini sağlayan bir moleküler biyoloji tekniğidir (Karaaslan 2008).

enzimlerinin yüksek seviyede ekspresyonları gözlemişlerdir. Ayrıca DF içine hücre geçişinin sağlanabilmesi için gerçekleşen bazal membran yıkımında da yine MMP enzimlerinin görev aldığı bildirilmiştir (Cahill ve ark 1988).

Kim (2007), birden çok sürmemiş diş bulunan 2 hastanın follikül fibroblastlarını, mikroarray[10] ve kantitatif RT-PCR[11] ile incelemiş ve kontrol grubu olarak da normal deri ve dişeti fibroblastlarını kullanmıştır. Çalışmasında MMP-3 ve MMP-12 enzim aktivitesinin down regülasyonunun dişin süremesinde önemli olabileceğini belirtmiştir.

Kalın fibröz yapıdaki hiperplastik DF'nin, sürmeyi engellediği bilinmektedir. Kim ve ark (2008), gömülü bir dişten aldıkları hiperplastik DF'nin fibroblastlarını ve kontrol grubu olarak da yine bir hastanın 2.molarından aldıkları dişeti dokusunun fibroblastlarını mikroarray ve kantitatif RT-PCR ile incelemişlerdir. Ayrıca histolojik ve immünhistokimyasal analiz için; 24 adet hiperplastik DF ve normal süren kanin dişlerinden elde edilen 18 adet normal DF örneği kullanılmıştır. Araştırmacılar, hiperplastik DF'de önemli derecede artmış kollajen tip I, IV, VIII, XI, TIMP-1, TIMP-3 ve TIMP-4 ile azalmış MMP-1, MMP-3, MMP-10 ve MMP-16 enzim ekspresyonlarını tespit etmişlerdir. Bunlar arasında özellikle MMP-3 enzimi, hiperplastik DF'de daha düşük bulunmuştur. Bulguları doğrultusunda hiperplastik DF'lerde, MMP'ler ve TIMP'lerin anormal ekspresyonunun bağ doku remodelingini bozarak; fibröz dokuda artış oluşması ile birlikte diş sürmesinde bozukluklara yol açtığını bildirmişlerdir.

Osteoklastlar kemiği rezorbe ederken MMP enzim aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Ancak rezorpsiyon sürecindeki en önemli MMP enzimi henüz belirlenememiştir. Literatürde MMP-12 enziminin, makrofajlar ve hipertrofik kondrositler de dahil olmak üzere; sadece birkaç hücrede sentez edildiği bildirilmiştir. Hou ve ark (2004), Northern blot analizi ile inceledikleri tavşan osteoklastlarının; makrofajlarla aynı seviyede MMP-12 enzim ekspresyonu

[10]Aynı anda çok sayıda genin ekspresyon düzeylerinin gözlenebildiği tekniktir (MeSH 2013).

[11]Kantitatif Real-Time PCR: Reaksiyonun aynı anda izlenerek PCR döngü sayısının ayarlanabildiği tekniktir (Günel 2007).

gerçekleştirdiğini belirlemişler; ayrıca in situ hibridizasyon tekniğiyle de bu enzimin ekspresyonunu, fare kafatası ve uzun kemiklerinde de tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada MMP-12 enziminin, kemik rezorpsiyonu ve osteoklast göçündeki rolünü de araştırmak için zimografi ve Western blot teknikleri kullanılarak; enzim geni susturulmuş fareler incelenmiştir. Araştırmacılar kemik organik matriksinin %90'ını oluşturan tip I kollajeni sadece denatüre halinde yıkabilen MMP-12 enziminin, kollajen çözünmesinde sınırlayıcı olmadığını ve kemik matriksinin çözünmesindeki etkisini diğer MMP enzimleriyle birlikte gösterdiğini belirtmişlerdir.

DF'nin, diş sürmesi sırasında farklı bölgelerinde ve farklı zamanlarda çeşitli moleküllerde artış ya da azalma meydana gelerek; kemik rezorpsiyonu ve oluşumu ile bu süreci kontrol ettiği bilinmektedir. MMP'ler, ESM'nin yıkımını gerçekleştirerek, kemik ve yumuşak doku remodeling sürecinde yani bu dokuların yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır. Bugüne kadar çeşitli MMP'lerin, gelişmekte olan diş dokularındaki ekspresyon seviyeleri araştırılarak; diş sürmesine olan etkileri de belirlenmeye çalışılmıştır. Bilindiği kadarıyla bunların çoğu hayvan çalışmasıdır ve yalnızca Kim (2007)'in ve Kim ve ark (2008)'nın yaptıkları çalışmalarda daimi gömülü insan dişindeki MMP'lerin normal dışı ekspresyonunun sürmeyi engelleyebileceği bildirilmiştir. Kollajen ve bağ doku remodelinginde önemli rol oynayan MMP'lerin sürme sırasındaki azalmış ekspresyon seviyeleri sonucu dişlerin süremeyeceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, literatür bilgiler göz önünde bulundurularak seçilen MMP enzimlerinin (MT1-MMP, MMP-2, MMP-3, MMP-12); en sık gömülü kalan dişler olmaları nedeniyle AYYD'lerden alınan DF'lerde ve kontrol grubu olarak elde edilen sağlıklı dişeti örneklerinde, immunohistokimyasal yöntem kullanılarak dişlerin gömülü kalması üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

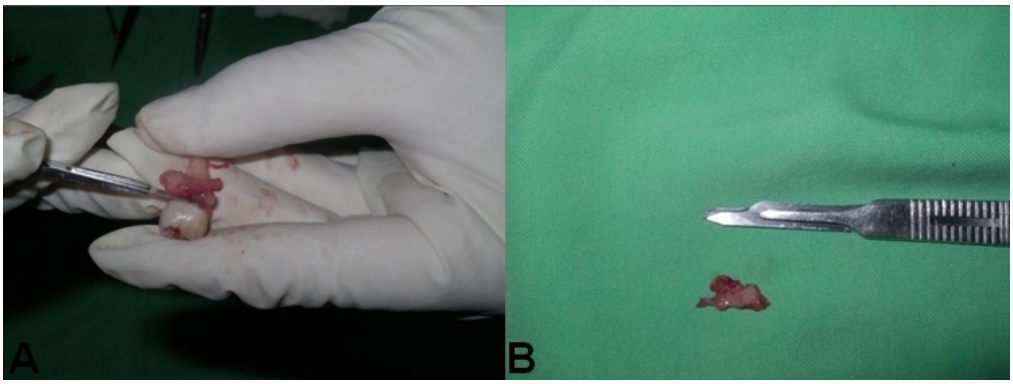
2.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Araştırmaya Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan; çalışmanın amacı ve içeriği anlatılıp bilgilendirilmiş onay formu alınanlar dahil edildi. Araştırmanın çalışma grubunda; 18-25 yaş aralığındaki hastalardan, perikoronal aralığının radyografideki görüntüsü 3 mm'yi geçmeyen, semptomsuz ve profilaktik amaçla çekilmiş 29 adet tam gömülü (mukoza ve/veya kemik retansiyonlu) AYYD'nin etrafından alınan DF dokuları kullanıldı. Kontrol grubuna ise; 20-35 yaş aralığındaki hastalardan, dentisyonda yerini almış ve çeşitli nedenlerle çekimi gerçekleştirilmiş olan 24 adet AYYD'nin etrafındaki sağlıklı dişeti dokusundan alınan örnekler dahil edildi. Araştırmamız, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2011-30 karar sayısı ile onayı alınarak yürütüldü. Çalışma ve kontrol gruplarına dahil olan bireylerin seçiminde dikkat edilen diğer bazı kriterler arasında; sistemik bir hastalığının bulunmaması, son 6 ay içerisinde herhangi bir ilaç tedavisi almamış olması, sigara kullanmaması, konjenital diş eksikliğinin bulunmaması, antibiyotik, analjezik veya lokal anesteziğe karşı alerjisinin olmaması ve hamile veya emziren olmaması yer aldı.

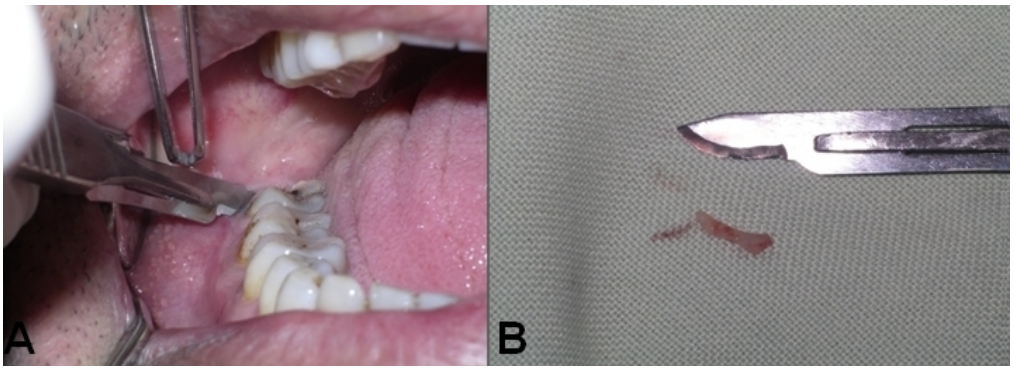
2.2. Cerrahi Yöntem

Operasyon öncesi hastalara %7,5 povidon iyot içeren solüsyonlarla ağız gargarası yaptırılmasının ardından; artikain ve epinefrin içeren lokal anestezik solüsyon ile inferior alveoler, lingual ve bukkal sinir bloğu sağlandı. Alveoler kret üzerinde yapılan horizontal ve vertikal insizyonların ardından, mukoperiosteal flep kaldırıldı. Kemik retansiyonlu dişlerde, rond ve fissür frezlerle serum fizyolojik irrigasyonu altında dişin üzerindeki kemik doku uzaklaştırıldı. Diş alındıktan hemen sonra etrafındaki follikül dokusu dikkatlice eksize edildi (Resim 2.1). Kanama kontrolü yapıldıktan sonra, yara bölgesi 3/0 atravmatik ipek sütürlerle dikildi. Kontrol grubunda ise; çekim öncesi dişin vestibül kole bölgesinden yaklaşık 2,5-3 mm genişliğinde sağlıklı dişeti dokusu eksize edildi (Resim 2.2).

Doku örnekleri elde edildikten sonra, immunohistokimyasal analiz yapılması için Başkent Üniversitesi Konya Uygulama ve Araştırma Merkezi Patoloji Bölümü'ne gönderildi ve analiz işlemine kadar %10'luk formalin içeren steril kaplarda muhafaza edildi.



Resim 2.1 DF dokusunun elde edilişi **(A,B)**.



Resim 2.2 Dişeti dokusunun elde edilişi **(A,B)**.

2.3. İmmunohistokimyasal Analizin Gerçekleştirilmesi

Hasta gruplarından alınan toplam 53 adet doku örneğine ait, parafin takibi ile elde edilen parafin bloklardan alınan 3 µm kalınlığındaki kesitler; sırasıyla aşağıdaki immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulanarak incelendi:

- ✓ 56 ˚C'lik etüvde 1 gün bekletildi.
- ✓ 15 dakika ksilende ve 15 dakika dereceli alkolde bekletilerek deparafinize edildi ve immunohistokimyasal boyama basamaklarına geçildi.
- ✓ Antijen retrieval (geri kazanım) işlemi için pH 8,0 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) tampon çözeltisi ile 30 dakika kaynatıldı.

✓ 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7,6) ile yıkandı.

✓ %3 hidrojen peroksitte 10 dakika bekletildi.

✓ Tekrar PBS solüsyonuna alınarak 10 dakika bekletildikten sonra 38 ˚C'de tripsin enzimi ile 10 dakika bekletildi.

✓ MMP-2[12], MMP-3[13], MMP-12[14] ve MT1-MMP[15] enzimleri için primer antikorlar uygulanarak oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.

✓ MMP-12 için tripsin basamağı uygulanmadı.

✓ Daha sonra PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.

✓ Biotinylated anti goat polivalan antikorda 15 dakika bekletilerek işlem sonunda tekrar PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.

✓ Streptavidin Peroksidazda 15 dakika bekletildi.

✓ 5 dakika süre ile kromojene [aminoetil karbazol (AEC)] alındı.

✓ Distile su ile yıkandı.

✓ H&E'de 1-2 dakika tutuldu.

✓ Tekrar distile su ile yıkandı.

✓ Son olarak 'Aqueous mounting medium' ile kapatılarak işlem tamamlandı.

2.4. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi

MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 enzimlerinin ekspresyonları dokuda fibroblastlar, damar duvarı, epitel ve iltihap hücrelerinde değerlendirildi. Dokular, boyanma şiddetine göre;

O: negatif ya da boyanma olmaması,

1(+): zayıf pozitif boyanma,

2(+): orta şiddette pozitif boyanma,

3(+): kuvvetli pozitif boyanma olarak skorlandı.

Ayrıca dokuların inflamasyon yoğunluğu şiddeti hafif 1(+), orta 2(+) ve şiddetli 3(+) olarak; dokulardaki MMP'lerle boyanan iltihap hücresi yoğunluğu da

[12]Santa Cruz Biotechnology, A-Gel VC2, sc-58385, 1:150 konsantrasyonda.
[13]Santa Cruz Biotechnology, AAO7, sc-80202, 1:100 konsantrasyonda.
[14]Santa Cruz Biotechnology, MM0027-7G20, sc-101449, 1:100 konsantrasyonda.
[15]Santa Cruz Biotechnology, sc-101451, 1:100 konsantrasyonda.

yüzde olarak (%) değerlendirildi. MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 enzim antikorları için plasenta dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Dokuda MMP-12 enzimi ile pozitif boyanan makrofaj yüzdesi belirlendi ve pozitif kontrol olarak pilonidal sinüs materyaline ait yoğun makrofaj içeren doku kullanıldı.

Tüm kesitler, x40 büyütmede Olympus BX51 mikroskop ile incelendi.

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmanın verilerinin istatistiksel analizi, SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, USA) paket programı ile yapıldı ve bütün testler $\alpha = 0.05$ anlam düzeyinde gerçekleştirildi. Çalışma ve kontrol gruplarında; fibroblastlar, damar duvarı ve epitel dokudaki MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3'ün ekspresyonlarının değerlendirilmesinde "ki-kare analizi"; makrofajlardaki MMP-12 ekspresyonunun değerlendirilmesinde ise "Mann Whitney U testi" kullanıldı. Çalışma ve kontrol gruplarında, MT1-MMP ile MMP-2 ekspresyonları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla "sıra korelasyon değerleri" hesaplandı. Çalışma ve kontrol grupları arasında, inflamasyon yoğunluğu açısından farklılık olup olmadığının değerlendirilmesinde "ki-kare analizi" gerçekleştirildi. İnflamasyon yoğunluğunun; fibroblast, damar duvarı ve epitel dokularındaki MMP ekspresyonlarına olan etkisi "ki-kare analizi" ile değerlendirildi. İnflamasyon yoğunluğunun, makrofajlardaki MMP-12 ekspresyonuna olan etkisinin değerlendirilmesinde ise; "Kruskal-Wallis testi" kullanıldı. İltihap hücrelerindeki MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla "bağımsız iki örneklem t testi" kullanıldı. İnflamasyon yoğunluğunun, iltihap hücrelerindeki MMP ekspresyonlarına olan etkisinin değerlendirilmesinde "tek yönlü varyans analizi"; hangi inflamasyon yoğunluğu dereceleri arasındaki farkın ya da farkların anlamlı olduğunun değerlendirilmesinde ise; "Tukey'in en güvenilir anlamlı fark testi" gerçekleştirildi. MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3'ün fibroblast, damar duvarı, epitel ve iltihap hücrelerindeki ekspresyonları arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi için "sıra korelasyon değerleri" hesaplandı.

3. BULGULAR

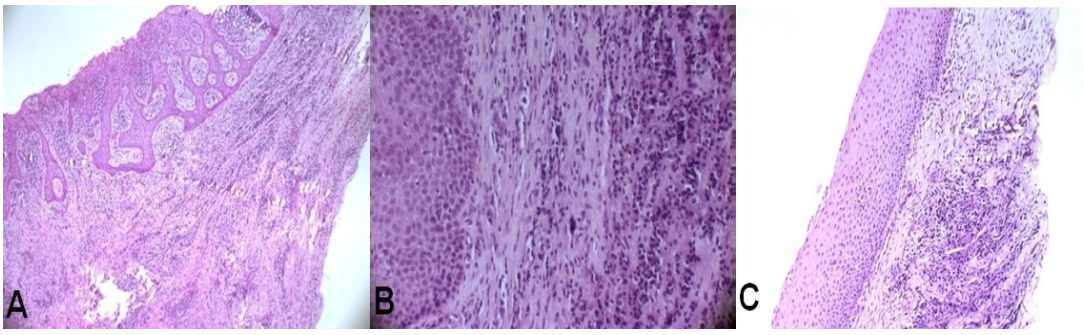
3.1. Klinik Bulgular

Çalışma (follikül) grubunda toplam 29; kontrol (dişeti) grubunda 24 hasta bulunmaktadır. Çalışma grubuna, AYYD'nin sürmesi beklenen dönem olan 18-25 yaş aralığındaki hastalardan çekilen gömülü dişler dahil edildi. Kontrol grubunda ise 20-35 yaş aralığındaki hastalar seçildi. Yaş ortalaması çalışma grubunda 20,21; kontrol grubunda ise 29,50 olarak bulundu. Çalışma grubundaki hastaların %48,3'ü (n=15) kadın ve %51,7'si (n=14) erkektir. Kontrol grubundaki hastaların ise; kadın (n=12) ve erkek (n=12) oranı eşittir (%50).

Follikülü alınan gömülü AYYD'ler retansiyon şekillerine göre gruplandığında %41,4'ü kemik, %34,5'i kemik ve mukoza, %24,1'i ise mukoza retansiyonlu olarak bulundu. Çalışmamızda sürmeyi engelleyecek fiziksel durumları ortadan kaldırmak için örneklerin hepsi; Pell ve Gregory sınıflandırmasında ramus ön kenarı ile ilişkiye göre sınıf I ve Winter sınıflandırmasına göre vertikal olarak seçildi. Pell ve Gregory sınıflandırmasında oklüzal düzlemle olan ilişkiye göre gruplandığında ise; dişlerin %27,6'sı pozisyon A, %51,7'si pozisyon B ve %20,7'si pozisyon C olarak bulundu.

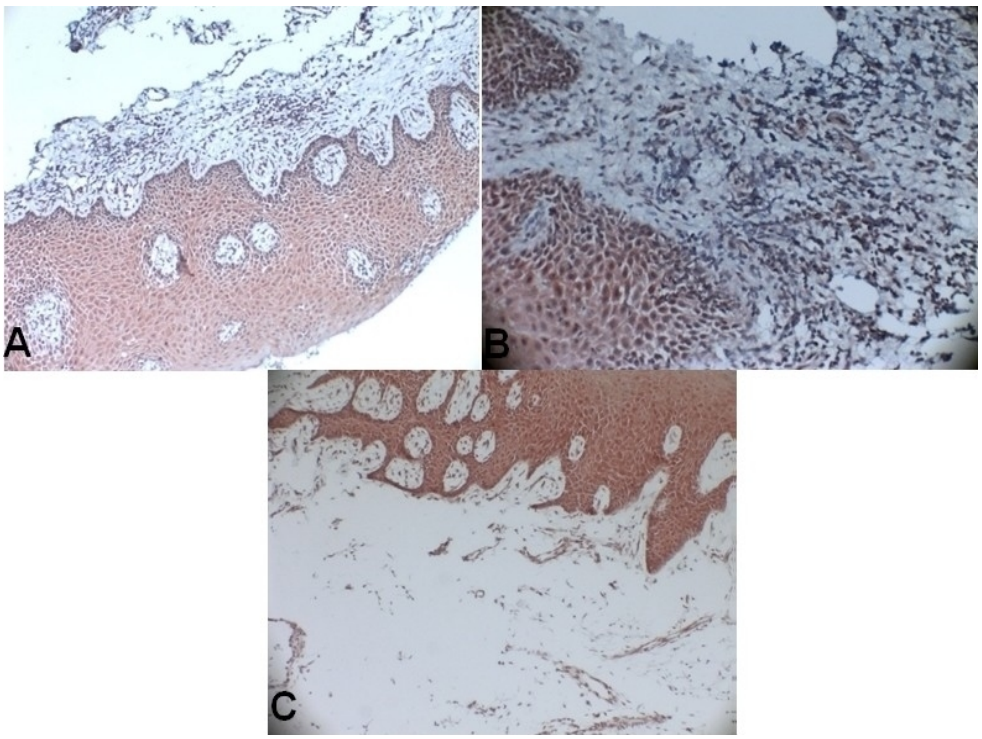
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Çalışma grubundan alınan DF'ler (Resim 3.1 A, B) ile kontrol grubundan alınan dişeti örnekleri (Resim 3.1 C) incelendi.

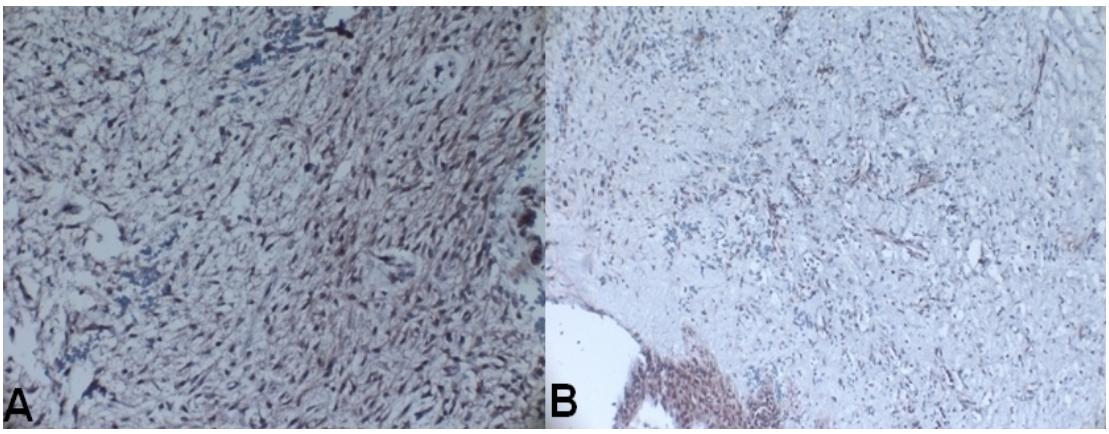


Resim 3.1 (A, B) DF, H&E x20, x40 büyütmede, **(C)** Dişeti, H&E x 20 büyütmede.

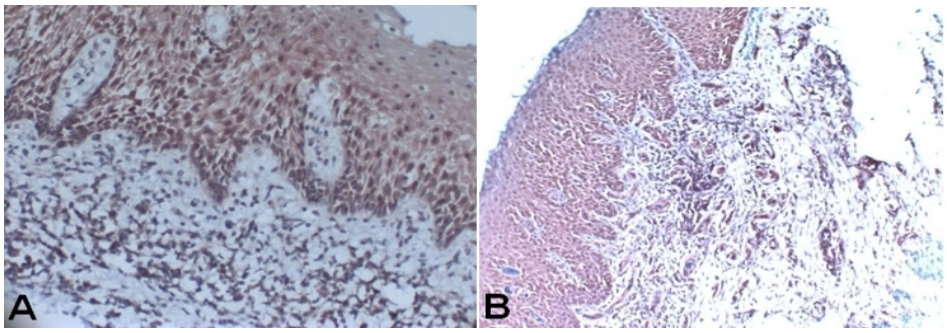
Çalışma ve kontrol gruplarında MT1-MMP (Resim 3.2) MMP-2 (Resim 3.3 ve 3.4) ve MMP-3 (Resim 3.5) enzimlerinin boyanma yoğunlukları dokuda fibroblastlar, damar duvarı, epitel dokuda ve iltihap hücrelerinde değerlendirildi.



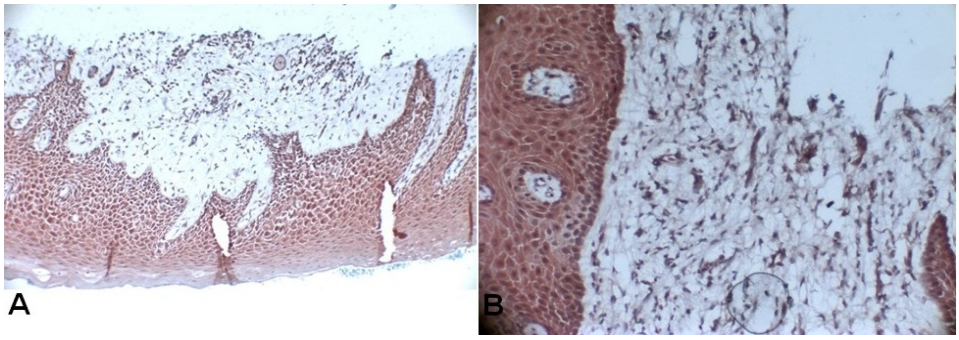
Resim 3.2. DF'de MT1-MMP ekspresyonu. **(A, B)** Fibroblast, damar, epitel ve iltihap hücrelerinde ekspresyon x 20, x 40 büyütmede, **(C)** Epitelde ve stroma içerisindeki vasküler yapılarda kuvvetli ekspresyon x 40 büyütmede.



Resim 3.3. DF'de MMP-2 ekspresyonu. **(A)** Stroma içerisinde fibroblastlarda belirgin ekspresyon x 40 büyütmede, **(B)** Stroma içerisinde vasküler yapılarda belirgin ekspresyon x 40 büyütmede.



Resim 3.4. MMP-2 ekspresyonu. **(A)** Dişetinde orta şiddette ekspresyon x 40 büyütmede, **(B)** DF'de fibroblast, damar, epitel ve iltihap hücrelerinde ekspresyon x 20 büyütmede.



Resim 3.5. DF'de fibroblast, damar duvarı, epitel ve iltihap hücrelerinde kuvvetli MMP-3 ekspresyonu. **(A)** x 20 büyütmede, **(B)** x 40 büyütmede.

3.2.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarında Fibroblastlarda MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları

Kontrol ve çalışma gruplarında, fibroblastlardaki her bir MMP ile boyanma yoğunluklarının dağılımı Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. Kontrol ve çalışma gruplarına göre fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.

	Kontrol grubu				**Çalışma grubu**			
	FİBROBLAST				**FİBROBLAST**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
MT1-MMP	-	8/24 (%33,3)	5/24 (%20,8)	11/24 (%45,8)	-	3/29 (%10,3)	6/29 (%20,7)	20/29 (%69)
MMP-2	0/24 (%0)	15/24 (%62,5)	5/24 (%20,8)	4/24 (%16,7)	1/29 (%3,4)	14/29 (%48,3)	7/29 (%24,1)	7/29 (%24,1)
MMP-3	1/24 (%4,2)	12/24 (%50)	3/24 (%12,5)	8/24 (%33,3)	1/29 (%3,4)	8/29 (%27,6)	5/29 (%17,2)	15/29 (%51,7)

Fibroblastlardaki boyanma incelendiğinde; **MT1-MMP** ile çalışma grubunda zayıf (%10,3) ve orta şiddette pozitif boyananlar (%20,7) kontrol grubundan daha düşük; kuvvetli pozitif boyananlar (%69) ise daha yüksek bulundu. **MMP-2** ile çalışma grubunda zayıf pozitif boyananların (%48,3) kontrol grubundan daha düşük; orta şiddette (%24,1) ve kuvvetli pozitif boyananların (%24,1) ise daha yüksek olduğu görüldü. **MMP-3** ile çalışma grubunda zayıf pozitif boyananların (%27,6) kontrol grubundan daha düşük; orta şiddette (%17,2) ve kuvvetli pozitif boyananların (%51,7) ise daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışma grubunda, MMP-2 ve MMP-3 ile birer adet boyanmayan örnek; kontrol grubunda ise, MMP-3 ile 1 adet boyanmayan örnek olduğu belirlendi.

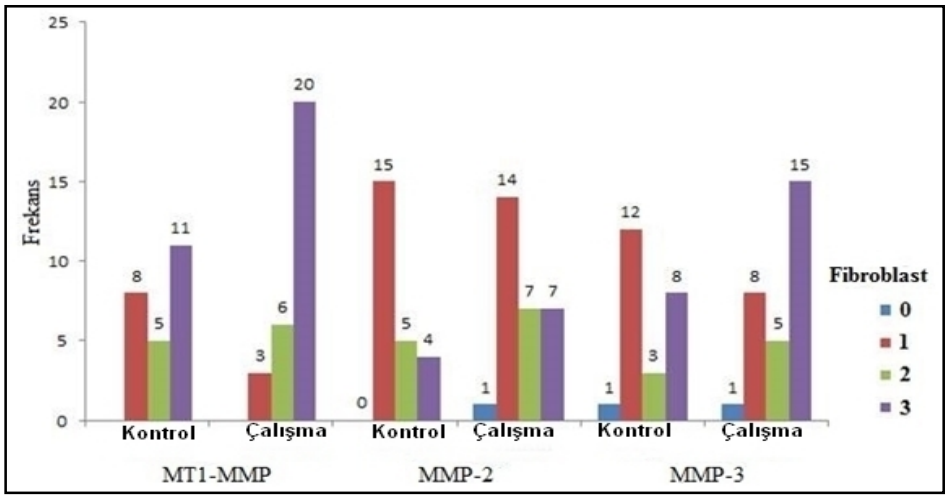
Çizelge 3.1'deki sonuçlar doğrultusunda; her bir MMP'ye göre fibroblastlardaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının test edilmesinde ki-kare analizi gerçekleştirildi. Test sonucu elde edilen ki-kare test değerleri, serbestlik dereceleri ve anlamlılık değerleri Çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. Fibroblastlardaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasındaki farkın testi.

	Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık (p)**
MT1-MMP	4,55	2	0,103
MMP-2	1,73	3	0,630
MMP-3	2,99	3	0,394

Çizelge 3.2'deki anlamlılık değerleri incelendiğinde üç MMP'ye göre de fibroblastlardaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Çalışma ve kontrol gruplarında, fibroblastlardaki MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.1'de gösterildi.

Şekil 3.1. MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3'ün fibroblastlardaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma gruplarında dağılımları.



3.2.2. Çalışma ve Kontrol Gruplarında Damar Duvarında MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları

Kontrol ve çalışma gruplarında, damar duvarında her bir MMP ile boyanma yoğunluklarının dağılımı Çizelge 3.3'te verildi.

Çizelge 3.3. Kontrol ve çalışma gruplarında, damar duvarındaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.

	Kontrol grubu				**Çalışma grubu**			
	DAMAR				**DAMAR**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
MT1-MMP	-	7/24 (%29,2)	5/24 (%20,8)	12/24 (%50)	-	2/29 (%6,9)	7/29 (%24,1)	20/29 (%69)
MMP-2	0/24 (%0)	15/24 (%62,5)	4/24 (%16,7)	5/24 (%20,8)	2/29 (%6,9)	11/29 (%37,9)	6/29 (%20,7)	12/29 (%34,5)
MMP-3	-	10/24 (%41,7)	6/24 (%25)	8/24 (%33,3)	-	7/29 (%24,1)	7/29 (%24,1)	15/29 (%51,7)

Damar duvarındaki boyanma incelendiğinde **MT1-MMP** ile çalışma grubunda zayıf pozitif boyananlar (%6,9) kontrol grubundan daha düşük; orta şiddette (%24,1) ve kuvvetli pozitif boyananlar (%69) ise daha yüksek bulundu. **MMP-2** ile çalışma grubunda zayıf pozitif boyananların (%37,9) kontrol grubundan daha düşük; orta şiddette (%20,7) ve kuvvetli pozitif boyananların (%34,5) ise daha

yüksek olduğu görüldü. **MMP-3** ile çalışma grubunda zayıf (%24,1) ve orta şiddette pozitif boyananların (%24,1) kontrol grubundan daha düşük; kuvvetli pozitif boyananların ise daha yüksek (%51,7) olduğu tespit edildi. Çalışma grubunda, MMP-2 ile 2 adet boyanmayan örnek olduğu belirlendi.

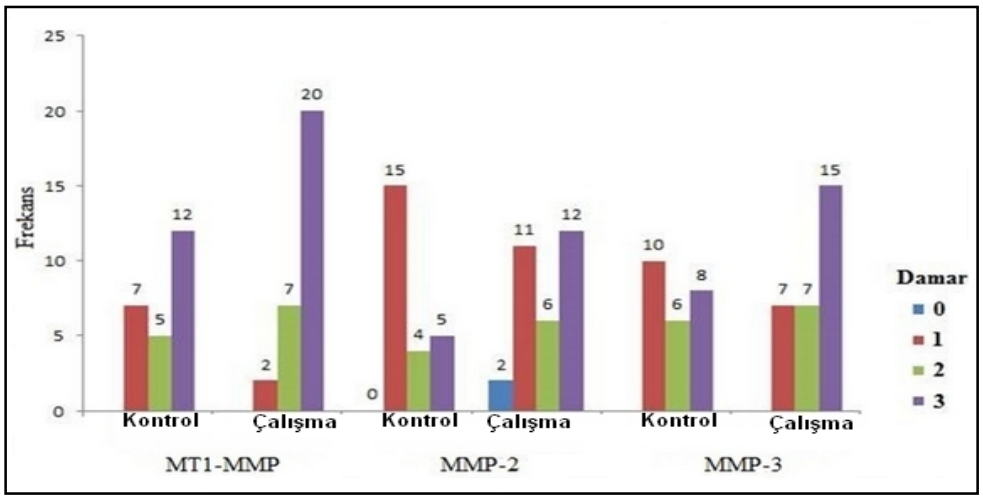
Çizelge 3.3'teki sonuçlar doğrultusunda; her bir MMP'ye göre damar duvarındaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının test edilmesinde ki-kare analizi gerçekleştirildi. Test sonucunda elde edilen ki-kare test değerleri, serbestlik dereceleri ve anlamlılık değerleri Çizelge 3.4'te verildi.

Çizelge 3.4. Damar duvarındaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasındaki farkın testi.

	Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık (p)**
MT1-MMP	4,68	2	0,096
MMP-2	4,25	3	0,236
MMP-3	2,29	2	0,319

Çizelge 3.4'teki anlamlılık değerleri incelendiğinde üç MMP'ye göre de damar duvarındaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Çalışma ve kontrol gruplarında, damar duvarındaki MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.2'de gösterildi.

Şekil 3.2. MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3'ün damar duvarındaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma gruplarında dağılımları.



3.2.3. Çalışma ve Kontrol Gruplarında Epitel Dokuda MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları

Kontrol ve çalışma gruplarında, epitel dokudaki her bir MMP ile boyanma yoğunluklarının dağılımı Çizelge 3.5' te verildi.

Çizelge 3.5. Kontrol ve çalışma gruplarında epitel dokudaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.

	Kontrol grubu				**Çalışma grubu**			
	EPİTEL				**EPİTEL**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
MT1-MMP	0/24 (%0)	4/24 (%16,7)	8/24 (%33,3)	12/24 (%50)	2/29 (%6,9)	2/29 (%6,9)	5/29 (%17,2)	20/29 (%69)
MMP-2	-	11/24 (%45,8)	8/24 (%33,3)	5/24 (%20,8)	-	6/29 (%20,7)	11/29 (37,9)	12/29 (%41,4)
MMP-3	0/24 (%0)	7/24 (%29,2)	7/24 (%29,2)	10/24 (%41,7)	2/29 (%6,9)	7/29 (%24,1)	6/29 (%20,7)	14/29 (%48,3)

Epitel dokudaki boyanma incelendiğinde; **MT1-MMP** ile çalışma grubunda zayıf (%6,9) ve orta şiddette pozitif boyananlar (%17,2) kontrol grubundan daha düşük; kuvvetli pozitif boyananlar ise daha yüksek (%69) bulundu. **MMP-2** ile çalışma grubunda zayıf pozitif boyananların (%20,7) kontrol grubundan daha düşük (%20,7); orta şiddette (%37,9) ve kuvvetli pozitif boyananların (%41,4) ise daha yüksek olduğu görüldü. **MMP-3** ile çalışma grubunda zayıf (%24,1) ve orta şiddette pozitif boyananların (%20,7) kontrol grubundan daha düşük; kuvvetli pozitif boyananların (%48,3) ise daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışma grubunda, MT1-MMP ile 2 adet ve MMP-3 ile ikişer adet boyanmayan örnek olduğu belirlendi.

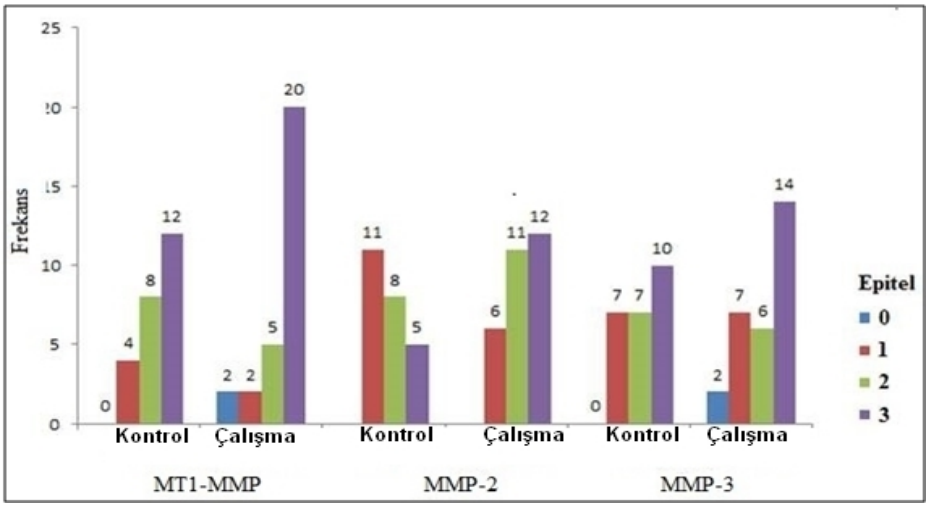
Çizelge 3.5'teki sonuçlar doğrultusunda; her bir MMP'ye göre, epitel dokudaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının test edilmesinde ki-kare analizi gerçekleştirildi. Test sonucunda elde edilen ki-kare test değerleri, serbestlik dereceleri ve anlamlılık değerleri Çizelge 3.6'da verildi.

Çizelge 3.6. Epitel dokudaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasındaki farkın testi.

	Test Değeri	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık (p)
MT1-MMP	4,93	3	0,177
MMP-2	4,39	2	0,111
MMP-3	2,29	3	0,514

Çizelge 3.6'daki anlamlılık değerleri incelendiğinde üç MMP'ye göre de epitel dokudaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Çalışma ve kontrol gruplarında, epiteldeki MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.3'te gösterildi.

Şekil 3.3. MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3'ün epitel dokudaki boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma gruplarında dağılımları.



3.2.4. Çalışma ve Kontrol Gruplarında Makrofajlarda MMP-12 Ekspresyonu

Kontrol ve çalışma gruplarında MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.7. Kontrol ve çalışma gruplarında MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler.

	N	Ortalama	S. Sapma
Kontrol grubu	24	0,042	0,20
Çalışma grubu	29	0,793	2,06
Genel	53	0,453	1,56

MMP-12 enzimi ile makrofajlarda boyanma incelendiğinde; çalışma grubunda 8 adet ve kontrol grubunda 1 adet örnekte pozitif boyanma tespit edildi. Çalışma grubunda boyanan makrofaj yüzdesinin ortalaması (0,79), kontrol grubundan (0,04) daha yüksek bulundu.

Çizelge 3.7'deki sonuçlar doğrultusunda; kontrol ve çalışma gruplarında MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için Mann Whitney U testi gerçekleştirildi. Test sonucuna göre makrofaj yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($z = -2{,}28$ ve $p = 0{,}022 < \alpha = 0{,}05$).

3.2.5. Çalışma ve Kontrol Gruplarında MT1-MMP ve MMP-2 Ekspresyonlarının İlişkisi

Fibroblast, damar duvarı, epitel ve iltihap hücresinde boyanma yoğunlukları bakımından; MT1-MMP ile MMP-2 arasındaki ilişkileri görmek için hesaplanan sıra korelasyon değerleri ve bu değerlerin anlamlılığı için hesaplanan anlamlılık değerleri (p) Çizelge 3.8'de verildi.

Çizelge 3.8. MT1-MMP ve MMP-2 ekspresyonları arasındaki ilişki (*işareti istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade eder).

	MT1-MMP & MMP2			
	Epitel	**Damar**	**Fibroblast**	**İlt. Hücreleri**
Sıra Korelasyon Değeri	0,39	0,41	0,43	0,30
Anlamlılık Değeri (p)	0,004*	0,002*	0,001*	0,029*

Çizelge 3.8'deki sıra korelasyon ve anlamlılık değerleri incelendiğinde; MT1-MMP ve MMP-2 arasında orta derecede pozitif yönlü bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin her bir dokudaki boyanma yoğunluğu için anlamlı olduğu görüldü. Buna göre MT1-MMP'nin her bir dokudaki (fibroblast, damar duvarı, epitel) ve iltihap hücrelerindeki boyanma yoğunluğu arttıkça MMP-2'nin de boyanma yoğunluğunun artması beklenir.

3.2.6. Çalışma ve Kontrol Gruplarında İnflamasyon Yoğunluğu

Kontrol ve çalışma gruplarında inflamasyon yoğunluklarının dağılımı Çizelge 3.9'da verildi.

Çizelge 3.9. Kontrol ve çalışma gruplarına göre inflamasyon yoğunluklarının dağılımı.

	İnflamasyon yoğunluğu		
	1	**2**	**3**
Kontrol grubu	7/24 (%29,2)	8/24 (%33,3)	9/24 (%37,5)
Çalışma grubu	13/29 (%44,8)	9/29 (%31)	7/29 (%24,1)

İnflamasyon yoğunlukları açısından karşılaştırıldığında; çalışma grubunda inflamasyon yoğunluğu hafif olan örnek sayısı (%44,8) kontrol grubundan daha yüksek; inflamasyon yoğunluğu orta (%31) ve şiddetli (%24,1) olan örnek sayıları ise kontrol grubundan daha düşük bulundu.

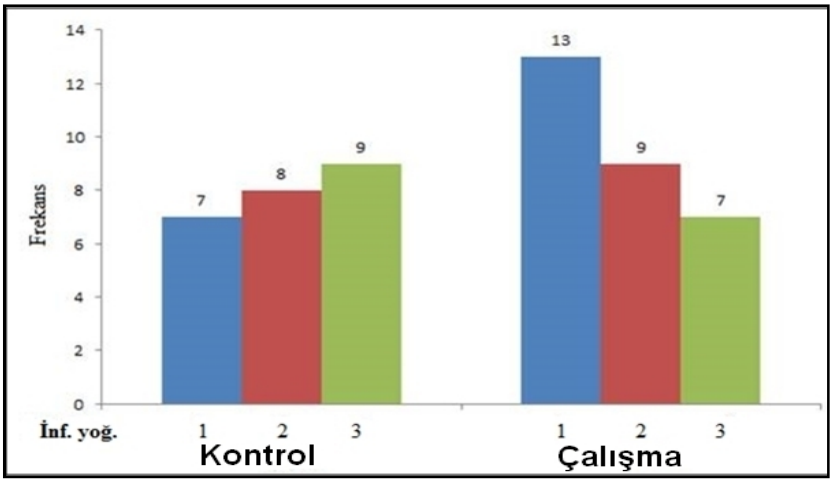
Çizelge 3.9.'daki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının test edilmesinde ki-kare analizi gerçekleştirildi. Test sonucu elde edilen ki-kare test değerleri, serbestlik dereceleri ve anlamlılık değerleri Çizelge 3.10'da verildi.

Çizelge 3.10. İnflamasyon yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasındaki farkın testi.

Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık (p)**
1,65	2	0,438

Çizelge 3.10'daki anlamlılık değerleri incelendiğinde; inflamasyon yoğunlukları bakımından kontrol ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($\chi_h^2 = 1{,}652$ ve $p = 0{,}438 > \alpha = 0{,}05$). Çalışma ve kontrol gruplarında, inflamasyon yoğunluğunun dağılımı Şekil 3.4'te gösterildi.

Şekil 3.4. Kontrol ve çalışma gruplarına göre inflamasyon yoğunluklarının dağılımı.



3.2.7. İnflamasyon Yoğunluğunun Fibroblastlarda Boyanmaya Etkisi

Her bir MMP için, fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarının inflamasyon yoğunluğuna göre dağılımı Çizelge 3.11'de verildi.

Çizelge 3.11. İnflamasyon yoğunluğuna göre fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarının dağılımı (M1: MT1-MMP, M2:MMP-2, M3:MMP-3).

	İnflamasyon yoğunluğu											
	1				**2**				**3**			
	FİBROBLAST				**FİBROBLAST**				**FİBROBLAST**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
M1	-	8/20 (%40)	5/20 (%25)	7/20 (%35)	-	3/17 (%17,6)	5/17 (%29,4)	9/17 (%52,9)	-	0/16 (%0)	1/16 (%6,3)	15/16 (%93,8)
M2	0/20 (%0)	14/20 (%70)	5/20 (%25)	1/20 (%5)	1/17 (%5,9)	11/17 (%64,7)	1/17 (%5,9)	4/17 (%23,5)	0/16 (%0)	4/16 (%25)	6/16 (%37,5)	6/16 (%37,5)
M3	2/20 (%10)	11/20 (%55)	2/20 (%10)	5/20 (%25)	0/17 (%0)	9//17 (%52,9)	1/17 (%5,9)	7/17 (%41,2)	0/16 (%0)	0/16 (%0)	5/16 (%31,3)	11/16 (%68,8)

İnflamasyon artışıyla beraber fibroblastlarda MMP enzimleri ile boyanma yoğunluğunun genel olarak arttığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda

MT1-MMP ile kuvvetli pozitif boyanan fibroblast örnekleri %35 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda enzim ile boyanan fibroblast örneklerinin de artarak %93,8'e çıktığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MMP-2** ile kuvvetli pozitif boyanan fibroblast örnekleri %5 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda bu oran %37,5'e yükseldi. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda, **MMP-3** ile kuvvetli pozitif boyanan damar duvarı örnekleri %25 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda bu oran %68,8'e çıktı.

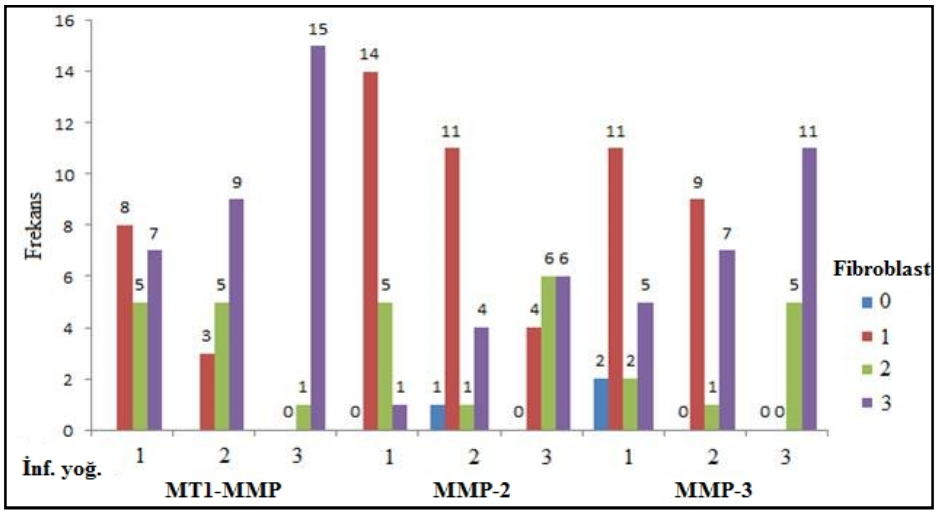
Çizelge 3.11'deki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunluğuna göre, her bir MMP ile fibroblastlardaki boyanma yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için ki-kare analizi kullanıldı. Test sonuçları ve her bir MMP için, inflamasyon yoğunluğu ile fibroblastlardaki boyanma yoğunluğu arasındaki sıra korelasyon değerleri Çizelge 3.12'de verildi.

Çizelge 3.12. İnflamasyon yoğunluklarına göre fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarındaki farklılığın testi.

	Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık (p)**	**Korelasyon (p) Damar-İnf. Yoğ**
MT1-MMP	14,76	4	0,005*	0,500* (0,000)
MMP-2	14,20	6	0,027*	0,367* (0,007)
MMP-3	19,97	6	0,003*	0,481* (0,000)

Çizelge 3.12 incelendiğinde; üç MMP için de, inflamasyon yoğunluğuna göre fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği görüldü (p<0,05). Buna göre inflamasyon yoğunluğu artıkça fibroblastlardaki üç MMP ile boyanma yoğunluğunun da artması beklenir (p<0,05). İnflamasyon yoğunluğuna göre, fibroblastlarda MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.5'te gösterildi.

Şekil 3.5. İnflamasyon yoğunluğuna göre, her bir MMP için, fibroblastlardaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.



3.2.8. İnflamasyon Yoğunluğunun Damar Duvarında Boyanmaya Etkisi

Her bir MMP için, damar duvarındaki boyanma yoğunluklarının inflamasyon yoğunluğuna göre dağılımı Çizelge 3.13'te verildi.

Çizelge 3.13. İnflamasyon yoğunluğuna göre damar duvarındaki boyanma yoğunluklarının dağılımı (M1: MT1-MMP, M2:MMP-2, M3:MMP-3).

	İnflamasyon yoğunluğu											
	1				**2**				**3**			
	DAMAR				**DAMAR**				**DAMAR**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
M1	-	6/20 (%30)	7/20 (%35)	7/20 (%35)	-	3/17 (%17,6)	5/17 (%29,4)	9/17 (%52,9)	-	0/16 (%0)	0/16 (%0)	16/16 (%100)
M2	0/20 (%0)	14/20 (%70)	3/20 (%15)	3/20 (%15)	1/17 (%5,9)	9//17 (%52,9)	2/17 (%11,8)	5/17 (%29,4)	1/16 (%6,3)	3/16 (%18,8)	5/16 (%31,3)	7/16 (%43,8)
M3	-	10/20 (%50)	4/20 (%40)	6/20 (%30)	-	7/17 (%41,2)	4/17 (%23,5)	6/17 (%35,3)	-	0/16 (%0)	5/16 (%31,3)	11/16 (%68,8)

İnflamasyon artışıyla beraber damar duvarında MMP enzimleri ile boyanma yoğunluğunun genel olarak arttığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MT1-MMP** ile kuvvetli pozitif boyanan damar duvarı örnekleri %35 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda enzim ile boyanan damar duvarı örneklerinin de artarak %100'e çıktığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MMP-2** ile kuvvetli pozitif boyanan damar duvarı örnekleri %15 iken;

inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda %43,8'e yükseldi. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MMP-3** ile kuvvetli pozitif boyanan damar duvarı örnekleri %30 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda bu oran %68,8'e çıktı.

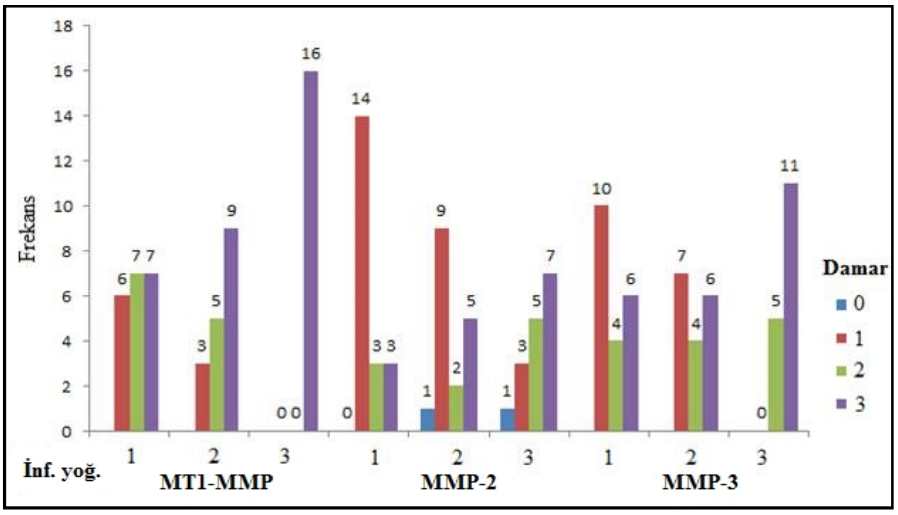
Çizelge 3.13'teki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunluğuna göre her bir MMP ile damar duvarındaki boyanma yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için ki-kare analizi kullanıldı. Test sonuçları ve her bir MMP için, inflamasyon yoğunluğu ile damar duvarındaki boyanma yoğunluğu arasındaki sıra korelasyon değerleri Çizelge 3.14'te verildi.

Çizelge 3.14. İnflamasyon yoğunluklarına göre damar duvarındaki boyanma yoğunluklarındaki farklılığın testi.

	Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık (p)**	**Korelasyon (p) Damar-İnf. Yoğ**
MT1-MMP	16,48	4	0,002*	0,524* (0,000)
MMP-2	10,57	6	0,103	0,306* (0,026)
MMP-3	11,50	4	0,022*	0,400* (0,003)

Çizelge 3.14 incelendiğinde; MT1-MMP ve MMP-3 için, inflamasyon yoğunluğuna göre damar duvarındaki boyanma yoğunluklarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği görüldü (p<0,05). Buna göre inflamasyon yoğunluğu artıkça, damar duvarındaki MT1-MMP ve MMP-3 enzimleri ile boyanma yoğunluğunun da artması beklenir (p<0,05). MMP-2 için ise; inflamasyon yoğunluğu ile damar duvarındaki boyanma yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p = 0,103 > α = 0,05). İnflamasyon yoğunluğuna göre, damar duvarındaki MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.6'da gösterildi.

Şekil 3.6. İnflamasyon yoğunluğuna göre, her bir MMP için damar duvarındaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.



3.2.9. İnflamasyon Yoğunluğunun Epitel Dokuda Boyanmaya Etkisi

Her bir MMP için, inflamasyon yoğunluğuna göre epitel dokudaki boyanmanın dağılımı Çizelge 3.15'te verildi.

Çizelge 3.15. İnflamasyon yoğunluğuna göre epitel dokudaki boyanma yoğunluklarının dağılımı (M1: MT1-MMP, M2:MMP-2, M3:MMP-3).

	İnflamasyon yoğunluğu											
	1				**2**				**3**			
	EPİTEL				**EPİTEL**				**EPİTEL**			
	0	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**	**0**	**1**	**2**	**3**
M1	1/20 (%5)	3/20 (%15)	5/20 (%25)	11/20 (%55)	0/17 (%0)	3/17 (%17,6)	5/17 (%29,4)	9/17 (%52,9)	1/16 (%6,3)	0/16 (%0)	3/16 (%18,8)	12/16 (%75)
M2	-	7/20 (%35)	8/20 (%40)	5/20 (%25)	-	9//17 (%52,9)	3/17 (%17,6)	5/17 (%29,4)	-	1/16 (%6,3)	8/16 (%50)	7/16 (%43,8)
M3	2/20 (%10)	8/20 (%40)	3/20 (%15)	7/20 (%35)	0/17 (%0)	6/17 (%35,3)	5/17 (%29,4)	6/17 (%35,3)	0/16 (%0)	0/16 (%0)	5/16 (%31,3)	11/16 (%68,8)

İnflamasyon artışıyla beraber epitel dokuda MMP enzimleri ile boyanma yoğunluğunun genel olarak arttığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MT1-MMP** ile kuvvetli pozitif boyanan epitel dokusu örnekleri %55 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda enzim ile boyanan epitel doku örneklerinin de artarak %75'e çıktığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda; **MMP-2** ile kuvvetli pozitif boyanan epitel dokusu örnekleri %25 iken;

inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda bu oran %43,8'e yükseldi. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda **MMP-3** ile kuvvetli pozitif boyanan epitel dokusu örnekleri %35 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda bu oran %68,8'e çıktı.

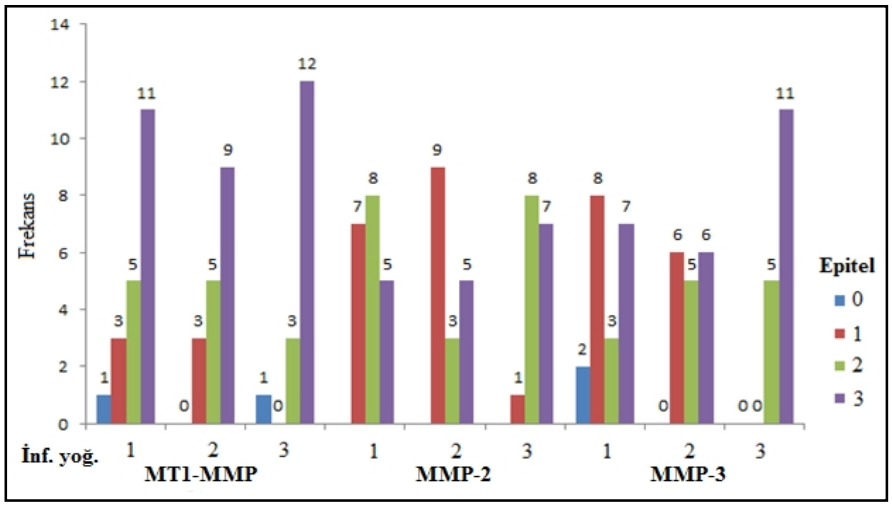
Çizelge 3.15'teki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunluğuna göre her bir MMP ile epitel dokudaki boyanma yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için ki-kare analizi kullanıldı. Test sonuçları ve her bir MMP için, inflamasyon yoğunluğu ile epitel dokudaki boyanma yoğunluğu arasındaki sıra korelasyon değerleri Çizelge 3.16'da verildi.

Çizelge 3.16. İnflamasyon yoğunluklarına göre epitel dokudaki boyanma yoğunluklarındaki farklılığın testi.

	Test Değeri	**Serbestlik Derecesi**	**Anlamlılık(p)**	**Korelasyon (p) Epitel-İnf. Yoğ**
MT1-MMP	4,84	6	0,565	0,167 (0,232)
MMP-2	9,28	4	0,055	0,222 (0,109)
MMP-3	13,42	6	0,037*	0,383* (0,005)

Çizelge 3.16 incelendiğinde; MMP-3 için, inflamasyon yoğunluğuna göre epitel dokudaki boyanma yoğunluklarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği görüldü (p = 0,037 < α = 0,05) . Buna göre inflamasyon yoğunluğu artıkça epitel dokudaki MMP-3 enzimiyle boyanma yoğunluğunun da artması beklenir (p= 0,005 < α = 0,05). İncelenen diğer iki MMP'ye göre ise inflamasyon yoğunluğu ile epitel dokudaki boyanma yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0,05). İnflamasyon yoğunluğuna göre, epitelde MMP boyanma yoğunluklarının dağılımı Şekil 3.7'de gösterildi.

Şekil 3.7. Her bir MMP için, inflamasyon yoğunluğuna göre epitel dokudaki boyanma yoğunluklarının dağılımı.



3.2.10. İnflamasyon Yoğunluğunun Makrofajlarda Boyanmaya Etkisi

MMP-12 için, inflamasyon yoğunluğuna göre boyanan makrofaj yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 3.17'de verildi.

Çizelge 3.17. İnflamasyon yoğunluğuna göre boyanan makrofaj yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler.

İnflamasyon yoğunluğu	N	Ortalama	S. Sapma
1	20	0,25	0,55
2	17	0,18	0,53
3	16	1,00	2,71
Genel	53	0,45	1,56

İnflamasyon artışıyla beraber makrofajlarda MMP-12 enzimi ile boyanma yoğunluğunun arttığı görüldü. İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdesinin ortalaması 0,25 iken; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğunda ortalama 1,00'e yükseldi.

Çizelge 3.17'deki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunluğuna göre MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis testi gerçekleştirildi. Test sonucunda inflamasyon yoğunluğuna göre makrofaj yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($\chi_h^2 = 0{,}493$ ve $p = 0{,}781 > \alpha = 0{,}05$).

3.2.11. İltihap Hücrelerinde MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP Ekspresyonları

Kontrol ve çalışma gruplarında MMP'lerle boyanan iltihap hücre yüzdelerine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 3.18'de verildi.

Çizelge 3.18. Kontrol ve çalışma gruplarında boyanan iltihap hücre yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler.

	N	MT1-MMP		MMP-2		MMP-3	
		Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	24	52,08*	21,87	33,33	28,39	45,00	28,13
Çalışma	29	65,69*	21,99	41,72	28,92	51,90	30,95
Genel	53	59,53	22,77	37,92	28,71	48,77	29,63

Çalışma grubunda MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 ile boyanan iltihap hücre yüzdesi ortalaması; kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu.

Çizelge 3.18'deki sonuçlar doğrultusunda; kontrol ve çalışma gruplarında her bir MMP'ye göre boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için bağımsız iki örneklem t testi kullanıldı. Test sonuçları Çizelge 3.19'da verildi.

Çizelge 3.19. Kontrol ve çalışma grupları arasında boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından farklılığa ilişkin bağımsız iki örneklem t testi sonuçları.

	t Test Değeri	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık (p)
MT1-MMP	-2,25	51	0,029*
MMP-2	-1,06	51	0,294
MMP-3	-0,84	51	0,404

Çizelge 3.19 incelendiğinde; MT1-MMP ile boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından, kontrol ve çalışma grupları arasında elde edilen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p =0,029 < α=0,05). Buna göre çalışma grubunda boyanan iltihap hücre yüzdesinin, kontrol grubundakine göre daha fazla olduğu söylenir. İncelenen diğer iki MMP ile boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından ise kontrol ve çalışma grupları arasında elde edilen farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p>0,05).

3.2.12. İnflamasyon Yoğunluğunun İltihap Hücrelerinde Boyanmaya Etkisi

İnflamasyon yoğunluğuna göre, her bir MMP için boyanan iltihap hücre yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler Çizelge 3.20'de verildi.

Çizelge 3.20. İnflamasyon yoğunluğuna göre boyanan iltihap hücre yüzdesine ait tanımlayıcı istatistikler.

İnflamasyon Yoğunluğu	N	MT1-MMP		MMP-2		MMP-3	
		Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma
1	20	49,50	22,59	20,50	20,12	33,50	31,00
2	17	59,12	22,24	36,47	29,36	52,94	25,44
3	16	72,50	17,61	61,25	20,94	63,44	23,99
Genel	53	59,53	22,77	37,92	28,71	48,77	29,63

İnflamasyon yoğunluğu zayıf olduğunda, MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 ile boyanan iltihap hücre yüzdesi ortalamalarının; inflamasyon yoğunluğu şiddetli olduğundaki ortalamalardan daha düşük olduğu görüldü.

Çizelge 3.20'deki sonuçlar doğrultusunda; inflamasyon yoğunluğuna göre her bir MMP ile boyanan iltihap hücre yüzdeleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Test sonuçları Çizelge 3.21'de verildi.

Çizelge 3.21. Tek yönlü varyans analizi test sonuçları.

	Gruplar arası KT	SD	Gruplar içi KT	SD	F_{hesap}	Anlamlılık (p)
MT1-MMP	4706,44	2	22256,77	50	5,29	0,008*
MMP-2	14813,46	2	28058,24	50	13,20	0,000*
MMP3	8401,40	2	37243,88	50	5,64	0,006*

Çizelge 3.21 incelendiğinde; inflamasyon yoğunlukları arasında, üç MMP ile boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından elde edilen farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05). Ortalamalar incelendiğinde inflamasyon yoğunluğu arttıkça boyanan iltihap hücre yüzdesinin de arttığı anlaşıldı. Hangi inflamasyon yoğunluğu dereceleri arasındaki farkın ya da farkların anlamlı olduğunu

görmek için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey'in en güvenilir anlamlı fark testi (Tukey HSD) gerçekleştirildi. Test sonuçları Çizelge 3.22'de verildi.

Çizelge 3.22. Tukey'in en güvenilir anlamlı fark testi sonuçları.

	MT1-MMP		MMP-2		MMP-3	
İnflamasyon Yoğunlukları	**Ortalamalar arası fark**	**Anlamlılık (p)**	**Ortalamalar arası fark**	**Anlamlılık (p)**	**Ortalamalar arası fark**	**Anlamlılık (p)**
1-2	-9,62	0,358	-15,97	0,112	-19,44	0,088
1-3	-23,00	0,006*	-40,75	0,000*	-29,94	0,005*
2-3	-13,38	0,173	-24,78	0,011*	-10,50	0,516

Çizelge 3.22 incelendiğinde; inflamasyon yoğunluğunun zayıf ile şiddetli olduğu durumlar arasında MT1-MMP ile boyanan iltihap hücresi yüzdesi bakımından anlamlı bir fark bulundu (p= 0,006 < α=0,05). MMP-2 için; inflamasyon yoğunluğunun zayıf ile şiddetli olduğu (p= 0,000 < α=0,05) ve orta ile şiddetli olduğu durumlar (p= 0,011 < α=0,05) arasındaki boyanan iltihap hücresi yüzdesi bakımından elde edilen farklar anlamlı bulundu. MMP-3 için; inflamasyon yoğunluğu zayıf ile şiddetli olduğu durumlar arasında boyanan iltihap hücresi yüzdesi bakımından anlamlı bir fark bulundu (p= 0,005 < α=0,05).

Her bir MMP'ye göre, inflamasyon yoğunluğu ile boyanan iltihap hücre yüzdesi arasındaki sıra korelasyon değerleri Çizelge 3.23'te verildi.

Çizelge 3.23. MMP'lere göre inflamasyon yoğunluğu ile boyanan iltihap hücresi yüzdesi arasındaki sıra korelasyon değerleri.

MTMMP		MM2		MM3	
Korelasyon	**Anlamlılık (p)**	**Korelasyon**	**Anlamlılık (p)**	**Korelasyon**	**Anlamlılık (p)**
0,42	0,002*	0,58	0,000*	0,42	0,002*

Çizelge 3.23'teki sıra korelasyon değerleri incelendiğinde; üç MMP için, inflamasyon yoğunluğu ile boyanan iltihap hücre yüzdesi arasında pozitif yönlü orta dereceli anlamlı bir ilişki bulunduğu görüldü (p<0,05). Buna göre inflamasyon yoğunluğu arttıkça boyanan iltihap hücre yüzdesinin de artması beklenir.

3.2.13. MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP ile Boyanan Doku ve İltihap Hücreleri Arasındaki İlişkiler

Her üç MMP'ye göre, farklı dokulardaki (epitel, damar duvarı ve fibroblast) boyanma yoğunlukları ve boyanan iltihap hücre yüzdesi arasındaki ilişkileri görmek için hesaplanan sıra korelasyon değerleri ve sıra korelasyon değerlerinin anlamlılığı için hesaplanan anlamlılık değerleri (p) Çizelge 3.24'te verildi.

Çizelge 3.24. Sıra korelasyon değerleri.

	MT1-MMP			**MMP-2**			**MMP-3**		
	Damar	**Fibr.**	**İ.Hücre (%)**	**Damar**	**Fibr.**	**İ.Hücre (%)**	**Damar**	**Fibr.**	**İ.Hücre (%)**
Epitel	0,535 (0,000*)	0,474 (0,000*)	0,437 (0,001*)	0,849 (0,000*)	0,781 (0,000*)	0,597 (0,000*)	0,689 (0,000*)	0,686 (0,000*)	0,567 (0,001*)
Damar	-	0,967 (0,000*)	0,728 (0,000*)	-	0,877 (0,000*)	0,675 (0,000*)	-	0,886 (0,000*)	0,760 (0,000*)
Fibr.	-	-	0,757 (0,000*)	-	-	0,693 (0,000*)	-	-	0,771 (0,000*)

Çizelge 3.24 incelendiğinde; üç MMP için de farklı dokulardaki (epitel, damar duvarı ve fibroblast) boyanma yoğunlukları arasındaki ilişkilerle; farklı dokulardaki boyanma yoğunlukları ile boyanan iltihap hücre yüzdesi arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Buna göre, bir MMP ile bir dokudaki boyanma yoğunluğu artıkça diğer dokulardaki boyanma yoğunluğunun da artması beklenir. Aynı şekilde bir MMP ile boyanan iltihap hücre yüzdesi artıkça dokulardaki boyanma yoğunluklarının da artması beklenir. Örneğin; çalışma grubunda MT1-MMP ile boyanan iltihap hücresi yüzdesi artarsa; aynı enzimle epitel dokudaki boyanma yoğunluğunun da artması beklenir.

4. TARTIŞMA

Diş gelişimi ve sürmesinde MMP enziminin etkinliği ile ilgili günümüze kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte; yaptığımız literatür incelemesi sonucunda araştırmamızın, AYYD'lerin DF'leri kullanılarak ilgili dişlerin gömülü kalmalarında MMP enzim etkinliğini değerlendiren ilk çalışma olduğu görülmüştür. Bu amaçla, diş sürmesini en fazla etkileyebileceği düşünülen 4 adet MMP enzimi (MMP-2, MMP-3, MMP-12, MT1-MMP) seçilerek kullanılmıştır. Bulgularımız doğrultusunda hipotezimiz kabul edilmiştir.

Gelişmekte olan bir dişi saran ince, yoğun, fibröz bağ dokusu olan DF (Zhao ve ark 2009); alveoler kemik rezorpsiyonu ve oluşumunu düzenleyerek sürmeyi başlatmakta ve devam ettirmektedir. Diş sürmesini yönlendiren uyaranların, DF içindeki MMP enzimleri, büyüme faktörleri ve sitokinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gorski ve Marks 1992, Marks ve Schroeder 1996, Wise ve ark 2002, Wise ve King 2008, Retrouvey ve ark 2012).

Diş sürmesi sırasında, kök uzaması, PDL remodelingi, alveoler kemik oluşumu ve rezorpsiyonu gerçekleşmekte (Marks ve Schroeder 1996) ve bu süreçlerde, ESM'nin kollajen ve kollajen olmayan moleküllerinin yoğun şekilde yıkım ve yeniden yapılanması meydana gelmektedir (Birkedal-Hansen ve ark 1993, Nagase ve Woessner 1999, Maruya ve ark 2003). MMP'ler, bu remodeling sürecinde ESM'nin yıkımını gerçekleştiren esas enzim grubudur. Bu nedenle MMP'ler ile onların aktivitelerinin kontrolünü sağlayan TIMP'ler arasındaki denge önemlidir. TIMP'ler lehine dengedeki bozulma fibrotik aktivite gelişimine yol açarken; MMP aktivitesindeki artış ise doku yıkımına neden olmaktadır (Marks ve Schroeder 1996, Bode ve ark 1999, Beertsen ve ark 2002, Maruya ve ark 2003).

Bugüne dek MMP enzimlerinin ESM'nin yıkımı yoluyla; yara iyileşmesi, kemik yapımı ve yıkımı, damar oluşumu, diş yapılarının oluşumu, diş sürmesi, tümör yayılımı, fibrotik hastalıklar, inflamatuar hastalıklar, periodontal hastalıklar gibi çeşitli durumlarda rol aldıkları belirlenmiştir (Sorsa ve ark 2004, Reel 2006, Page-McCaw ve ark 2007, Nonaka ve ark 2009, Rodríguez ve ark 2010, Varun ve ark 2012).

Kollajen remodelingi, diş sürmesi ve iskeletsel gelişim için çok önemlidir (Holmbeck ve ark 1999, Beertsen ve ark 2002). Kollajen liflerin yıkımının, kollajenaz enzimleri tarafından başlatıldığı ve jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) gibi diğer MMP enzimleri tarafından daha fazla parçaya ayrıldığı bildirilmiştir (Ravanti ve ark 1999). Bununla birlikte Liu ve ark (1995) ve Kerkvliet ve ark (1999), kollajenaz enzimi olmadan da tip I kollajen yıkımının diğer MMP'lerle gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Dişin sürme yolunun oluşabilmesi için, DF'nin de dahil olduğu dişi çevreleyen dokuların ESM'sinde bazı değişiklikler meydana gelmektedir (Gorski ve Marks 1992, Shroff ve ark 1994) ve bu nedenle kollajen ve bağ doku remodelinginde meydana gelebilecek anormal değişiklikler sürmeyi geciktirmekte ya da engellemektedir. "Gecikmiş diş sürmesi"nin, DF'nin koronal bölümündeki kollajenöz fibröz bağ dokusu varlığı nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir (Shroff ve ark 1994, Yonemochi ve ark 1998). Ayrıca perikoronal bölgede fiziksel bir engel oluşturarak alttaki dişin normal çıkmasını önleyen operkuluma ait lezyonların da, fibromatöz yapıda olduğu bildirilmiştir (Yonemochi ve ark 1998, Verma ve ark 2005).

Bu durumda, kollajen ve bağ doku remodelinginde önemli rol oynayan MMP enzimlerinin eksikliği ve/veya TIMP'lerin artışı sonucu meydana gelecek kollajen yıkımında azalma ve fibröz doku artışının; dişin sürmesini geciktirmesi veya engellemesi muhtemel görünmektedir. Bu görüş, Kim ve ark (2008)'nın diş sürmesini engelleyen kalın fibröz yapıdaki hiperplastik DF'de tespit ettikleri, azalmış MMP ekspresyonu ile birlikte artmış kollajen ve TIMP ekspresyonu bulgusuyla desteklenmektedir.

MT1-MMP enzimi ile ilgili literatür incelendiğinde; bu enzimin genellikle kemik ve diş gibi mineralize dokularda yüksek seviyede ekspresyonunun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte Caron ve ark (1998), bu enzimin yumuşak dokularda da ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, domuzların sürmemiş dişlerinin ameloblast ve odontoblastlarında; MT1-MMP ile bu enzim tarafından aktive edildiği bilinen MMP-2'nin artmış ekspresyon seviyelerini tespit etmişler ve MT1-MMP'nin direkt ya da MMP-2 aracılığıyla dolaylı olarak;

mine ve dentin gelişiminde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada Bartlett ve ark (2003), MT1-MMP enziminin olmadığı farelerde dişlerin kök gelişiminde gerilik olduğunu ve dişleri çevreleyen alveoler kemiğin yetersiz gelişiminin de diş sürmesinde gecikmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Beertsen ve ark'nın (2002) MT1-MMP enziminin olmadığı farelerde yaptıkları çalışmada ise; PDL'de kollajen yıkımının bozulması sonucu; kök gelişiminde gerilik, alveoler kemik oluşumunda bozukluk, diş ve çene kemiğiyle ilişkili bütün bağ doku fibroblastlarında da (PDL, ağız mukozası, dişeti ve periost) anormal değişiklikler tespit edilmiş ve kemik oluşumu ile diş sürmesinin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Ayrıca süremeyen bu dişlerin yüzeylerinin de yoğun kollajenöz bir doku ile örtülü olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda immunohistokimyasal yöntem kullanılarak, çalışma grubunun DF'leri ve kontrol grubunun dişeti örneklerinin fibroblast, damar duvarı ve epitel dokularında MT1-MMP enziminin ekspresyon seviyeleri ayrı ayrı değerlendirildi. 2 adet DF örneğindeki epitel doku haricinde; incelenen bütün örneklerde MT1-MMP enzimi ile pozitif boyanma görüldü. Her iki grupta da doku bileşenlerini oluşturan fibroblastlar, damar duvarı ve epitel arasında MT1-MMP ekspresyonu açısından; bileşenlerden birinde artarken diğerinde de artacak şekilde pozitif korelasyon (doğru orantılı ilişki) olduğu anlaşıldı ($p < 0{,}05$). MMP'lerin esas olarak ekspresyonunun fibroblastlardan gerçekleştiği düşünüldüğünde; fibroblasttaki ekspresyonun, enzimin damar duvarı ve epitelde de ekspresyonunu etkilediği doğrulandı. Çalışmamızda fibroblastlardaki boyanma incelendiğinde; kontrol grubunda zayıf ve orta şiddette pozitif boyanma daha büyük oranda görülürken; çalışma grubunda kuvvetli pozitif boyanmanın daha yüksek oranda olduğu ve buna karşılık zayıf ve orta şiddette pozitif boyanmanın daha az olguda görüldüğü tespit edildi. Epiteldeki ekspresyonda da aynı durum görülmekle beraber; damar duvarında kontrol grubunun yalnızca zayıf pozitif boyanma için çalışma grubundan daha yüksek orana sahip olduğu belirlendi. Ancak aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0{,}05$). Buna rağmen literatürle de uyumlu olarak MT1-MMP enziminin, diş gelişimindeki önemi ve sürme sırasında yükselen ekspresyon seviyesi göz önüne alındığında; araştırmamızda da kontrol grubuna göre çalışma grubunda MT1-MMP ekspresyonunun daha yüksek oranda olduğu tespit edildi. Bununla birlikte çalışma grubunda enzimin ekspresyon

seviyesinin, kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark yaratacak kadar yükselememesi nedeniyle; incelenen dişlerin süremmemesinde bu enzimin etkisi olabileceği düşünüldü. Literatürde MT1-MMP enziminin, MMP-2 enzimini aktive ettiği bildirildiği için; çalışmamızda ayrıca bu iki enzim arasındaki ilişki de incelendi ve doku bileşenlerindeki MT1-MMP ile MMP-2 enzimlerinin ekspresyonları arasında pozitif korelasyon olduğu doğrulandı.

İncelediğimiz MMP-2 enzimi ile ilgili literatürde; Sahlberg ve ark (1992), fare molar jermlerinin gelişimi sırasında dental papillayı mine organından ayıran bazal membranda bu enzimin yüksek seviyede ekspresyonunun olduğunu bildirmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada Heikinhimo ve Salo (1995), insan fetüs diş dokularındaki yoğun MMP-2 enzim ekspresyonunun; diş gelişiminde önemli rol oynayan bazal membran remodelingi ve yıkımında etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Shroff ve ark (1995), fare mandibular 1.molar dişlerin DF'lerinde, özellikle koronal bölümde, jelatinaz aktivitesi artışının ve tip I kollajen azalmasının dişlerin sürmesini sağladığını göstermişlerdir. Maruya ve ark (2003), sıçanlarda maksiller 1.molar dişin sürmesi sırasında; alveoler kemik, sement ve PDL'de MMP-2 ve MMP-8 seviyesi ile ilişkili olarak saptanan yüksek tip I kollajen, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ekspresyon seviyelerinin, bu dokuların sürme sürecindeki aktif ESM remodelingini gösterdiğini bildirmişlerdir. Bourd-Boittin ve ark (2005), fare mandibular 1.molar diş jerminde MMP-2 ve MMP-20 enzimlerindeki inhibisyonun, dentin ve mine oluşumunda bozukluklarla sonuçlandığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda MMP-2 enziminin fibroblast, damar duvarı ve epiteldeki ekspresyon seviyeleri ayrı ayrı değerlendirildi. Çalışma grubunda, 2 dokuda damar duvarı ve 1 dokudaki fibroblastlar haricinde; incelenen bütün örneklerde MMP-2 enzimi ile pozitif boyanma görüldü. Her iki grupta da doku bileşenlerini oluşturan fibroblastlar, damar duvarı ve epitel arasında MMP-2 ekspresyonu açısından; bileşenlerden birinde artarken diğerinde de artacak şekilde pozitif korelasyon olduğu anlaşıldı ($p < 0{,}05$). Bulgular değerlendirildiğinde MT1-MMP ile benzer olarak; kontrol grubunda her üç bileşende (fibroblast, damar duvarı ve epitel) MMP-2'nin zayıf ekspresyonunun daha büyük oranda görüldüğü saptandı; buna karşın kuvvetli ekspresyon gösteren doku sayısının daha az olduğu dikkat çekti. Çalışma grubunda ise orta şiddette ve kuvvetli MMP-2 ekspresyonu gösteren doku sayısının daha fazla

olduğu belirlendi ancak istatistiksel değerlendirmede anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$). Diş gelişimindeki önemi ve sürme sırasındaki yükselen ekspresyon seviyesi göz önüne alındığında; çalışma grubunda saptanan MMP-2 ekspresyon seviyesinin, kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark yaratacak kadar yükselememesi nedeniyle; incelenen dişlerin süremmemesinde bu enzimin etkisi olabileceği düşünüldü.

İncelediğimiz MMP-3 enzimi ile ilgili literatürde; Gorski ve Marks (1992), köpekte premolar dişin DF'sinde, kuron ve kök gelişimi ile beraber sürme sırasında MMP-1 ve MMP-3 enzimlerinin yüksek seviyede ekspresyonunu gözlemişlerdir. Kim (2007), birden çok sürmemiş diş bulunan 2 vakadan elde ettiği follikül fibroblastlarını inceleyerek; MMP-3 ve MMP-12 enzim aktivitesinin down regülasyonunun dişin süremmemesinde önemli olabileceğini belirtmiştir. Yine Kim ve ark (2008) başka bir çalışmada, normal DF'lerle karşılaştırdıkları hiperplastik DF'lerde; azalmış MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-16 enzim ekspresyonları ile birlikte artmış kollajen tip I, IV, VIII, XI ve TIMP-1, TIMP-3, TIMP-4 ekspresyonlarını tespit etmişler ve MMP ekspresyonunda oluşan bu azalmanın, kollajen yıkımında da azalmaya neden olarak; bağ doku kalınlığı artışı ile karakterize hiperplastik DF gelişimindeki rolünü vurgulamışlardır. Dişin süremme patogenezi incelendiğinde hiperplastik DF'nin de etyolojide rol aldığı görülmektedir.

Çalışmamızda MMP-3 enziminin fibroblast, damar duvarında ve epiteldeki ekspresyon seviyeleri ayrı ayrı değerlendirildi. Çalışma grubunda 2 dokuda epitel, 1 dokuda fibroblastlar ve kontrol grubunda 1 dokuda fibroblastlar haricinde; incelenen bütün örneklerde MMP-3 enzimi ile pozitif boyanma görüldü. MT1-MMP ve MMP-2 ile benzer olarak; MMP-3 enzimi ile de fibroblastlarda kontrol grubunda zayıf pozitif boyanan olgu sayısının çalışma grubundan yüksek olduğu; orta şiddette ve kuvvetli pozitif boyanan olgu sayısının ise daha düşük olduğu belirlendi. Damar duvarı ve epitel incelendiğinde; kontrol grubunda zayıf ve orta şiddette pozitif boyanan olgu sayısının çalışma grubundan daha yüksek; kuvvetli pozitif boyanan olgu sayısının ise daha düşük olduğu anlaşılmasına rağmen aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Yine MT1-MMP ve MMP-2 ile benzer olarak; çalışma ve kontrol gruplarında her üç bileşendeki (fibroblast, damar duvarı ve epitel) MMP-3 ile boyanma arasında da pozitif korelasyon olduğu tespit

edildi ($p < 0,05$). MMP-3 enziminin diş gelişimindeki önemi, sürme sırasında yükselen ve kalın fibröz yapılı hiperplastik DF'lerdeki düşen ekspresyon seviyesi göz önüne alındığında; çalışmamızda incelenen bazı DF'lerde ekspresyon seviyesi daha yüksek bulunmakla birlikte; MT1-MMP ve MMP-2 ile benzer olarak kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark yaratacak kadar yükselemediği için dişlerin süremememesinde etkisi olabileceği düşünüldü.

İncelediğimiz MMP-12 enzimi, makrofajlar ve hipertrofik kondrositler de dahil olmak üzere; sadece birkaç hücrede sentezlenmektedir. Literatür incelendiğinde; Hou ve ark (2004), kemik rezorpsiyonunda MMP-12'nin tek başına sınırlayıcı olmadığını; etkisini diğer MMP'lerle birlikte gösterdiğini belirtmişlerdir. Kim (2007)'in yaptığı çalışmada ise, MMP-12 enzim aktivitesinin down regülasyonunun dişin süremememesinde önemli olabileceği bildirilmiştir.

Literatür bulguları eşliğinde, çalışmamızda MMP-12 enziminin makrofajlardaki ekspresyonu dikkate alınarak; kontrol ve çalışma grubundaki seviyeleri araştırıldı. Çalışma grubunda 8 adet, kontrol grubunda ise yalnızca 1 adet dokuda MMP-12 ile pozitif boyanmış makrofajlar tespit edildi. Çalışma grubunda MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdesi ortalamasının (0,79), kontrol grubundan (0,04) daha yüksek olduğu görüldü ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Ancak makrofajların pozitif olduğu dokuların, yaş aralığının üst sınırına yakın hastaların dokuları olması dikkat çekici bir özellik olarak karşımıza çıktı ve MMP-12 ekspresyonunun kronik inflamasyon süreci ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Jerez ve ark (2011), semptomsuz apikal periodontitisli hastalardan alınan periapikal lezyon örneklerinde; makrofajlar, plazma hücreleri ve endotel hücrelerde artmış MMP-12 enzim seviyelerini tespit etmişler ve bu enzimin periapikal lezyonların gelişiminde anahtar rol oynadığını belirtmişlerdir. García-Sesnich ve ark (2012), semptomsuz apikal periodontitisli hastalardan alınan periapikal eksuda örneklerinde saptanan artmış MMP-12 enzim seviyesinin; kanal tedavisi sonrası düştüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları da MMP-12 ekspresyonunun inflamatuar süreçle ilişkisini desteklemektedir.

Shin ve ark (2002) ise akut inflamasyonlu insan dişi pulpalarında; MMP-1, MMP-2 ve MMP-3 enzimlerinin artmış ekspresyon seviyelerini tespit etmişler ve bu enzimlerin pulpada inflamasyon gelişiminde ve doku yıkımında rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca MMP-1 ve MMP-3 enzimlerinin; polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, plazma hücreleri ve lenfositler tarafından salgılandığını göstermişlerdir. Çalışmamızda DF'de iltihap hücreleri izlenmekle birlikte olgularımızda aktif inflamatuar bir patoloji tespit edilmedi. Bununla birlikte; DF'de MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 enzimlerinin varlığının gösterilmesi literatür bilgileri eşliğinde; bu enzimlerin olası bir aktif inflamatuar süreçte ortaya çıkan moleküllerle etkileşerek, inflamasyonda da rol oynayabileceklerini düşündürdü.

Çalışmamızda; fibroblastlar, damar duvarı ve epitel dışında iltihap hücrelerinde de MMP ekspresyonu gözlendi. MMP'lerle boyanan iltihap hücre yüzdesi bakımından kontrol ve çalışma grubundaki örnekler karşılaştırıldığında; 3 MMP için de boyanan iltihap hücre yüzdesinin çalışma grubunda daha fazla olduğu görüldü ve MT1-MMP enzimi için bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0{,}05$). Ayrıca doku bileşenlerinin (fibroblast, damar duvarı, epitel) boyanması ve MMP'lerle boyanan iltihap hücresi yüzdesi arasında da pozitif korelasyon olduğu tespit edildi. Bu bulgu MMP ekspresyon artışının, dokularda inflamasyonu arttırıyor olabilmesinin muhtemel olduğunu düşündürdü; bununla birlikte dokularda inflamasyonun MMP ekspresyonunu arttırıyor olabilmesi de aynı şekilde muhtemel görüldü.

Rutin incelemede ağız ortamında görünmeyen gömülü yirmi yaş dişinin DF'sinde inflamatuar değişimler olması genellikle beklenmemektedir. DF'de inflamatuar değişimlerin oluşmasını, Damante ve Fleury (2001) iki şekilde açıklamıştır. Bunlardan birincisi; DF'deki inflamatuar içeriğin fizyolojik olabileceğidir. Örneğin sürme sırasında; azalmış mine epitelinin hücreler arası boşluklarının ağız epitelindekinden daha geniş olması nedeniyle buraya penetre olan ağız antijenlerinden inflamatuar reaksiyon gelişebilmektedir. İkincisi ise gömülü yirmi yaş dişlerinin komşu dişin distalinde oluşan bir periodontal cep vasıtasıyla ağız ortamı ile ilişkiye geçebileceği yönündedir.

Çalışmamızda DF'leri incelenen dişlerin tamamı, tam gömülü (mukoza ve/veya kemik retansiyonlu) olarak seçildi ve incelediğimiz doku örneklerinin çoğunda iltihap hücreleri değişen oranlarda saptandı. İnflamasyon yoğunluğu hafif, orta ve şiddetli olarak gruplandı. Dokudaki inflamasyonun da MMP ile boyanmayı arttırabileceği düşünüldüğü için; inflamasyon yoğunluğunun fibroblast, damar duvarı, epitel ve makrofajlarda MMP'lerle boyanmaya olan etkisi de incelendi. Genel olarak inflamasyon yoğunluğu artışıyla MMP enzimleri ile boyanmanın da arttığı gözlendi. İnflamasyon yoğunluğunun artışına göre, MT1-MMP ile boyanmadaki artış fibroblastlar ve damar duvarında; MMP-2 ile artış fibroblastlarda; MMP-3 ile boyanma ise tüm doku bileşenlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0{,}05$). İnflamasyon yoğunluğu arttıkça MMP-12 ile boyanan makrofaj yüzdesinin de arttığı görülmesine rağmen; fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0{,}05$). Ancak bu durumun, örnek hacminin arttırılması ile anlamlı hale gelebileceği anlaşıldı.

Araştırmamızda, kontrol ve çalışma gruplarındaki örneklerde değişen derecelerde inflamasyon tespit edilmesi nedeniyle; iki grup inflamasyon yoğunlukları açısından karşılaştırıldı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü ($p > 0{,}05$). Bu bulgu da, inflamasyon ve MMP ekspresyonu arasında ilişki görülmesine rağmen; özellikle daha önce bahsedilen Shin ve ark (2002)'nın çalışmasında belirtildiği gibi aktif inflamatuar süreçte, farklı sitokinlerin ve moleküllerin de önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle dokuda saptadığımız MMP ekspresyon artışının doğrudan inflamatuar hücrelerle ilişkili olmayıp; bu MMP'lerin diş sürmesinde etkili moleküller olduğunu ve yeterli ekspresyonlarının olmaması nedeniyle dişin süremediğini düşünmekteyiz.

Sürmemiş veya gömülü kalmış dişlerde, dişlerin kuronuna bitişik bulunan ve odontogenezin epitel kalıntılarını içeren DF'den, kronik periyotta diş sürmesini engelleyen odontojenik kist ve tümörler gelişebilmesi de önemli bir patoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Günhan 2001, Carlson 2004, Da Silva ve ark 2007). Literatür incelendiğinde gömülü üçüncü molarlarda; Glosser ve Campbell (1999) %37, Adelsperger ve ark (2000) %34, Rakprasitkul (2001) %35, Baykul ve ark (2005) %50 ve Stathopoulos ve ark (2011) %2.15 oranında kistik değişim bildirmişlerdir. Histolojik olarak incelendiğinde; folliküler kistte ince, birkaç sıralı nonkeratinize çok

katlı yassı epitel bulunduğu; DF'de ise tek veya birkaç katlı epitel ve bağ dokusu gözlendiği belirtilmiştir. Kist duvarı genellikle gevşek fibröz bağ dokudan oluşmaktadır. İnflamasyonun bulunduğu olgularda, kist duvarında kollajenize bağ dokusu artışı ve epitelde kalınlaşma görülmekle birlikte; kistin genişlemesini sağlayan kemiği rezorbe edici faktörlerin salınımı için kisti tetikleyen mekanizmada, inflamasyon bulunması şart değildir (Günhan 2001, Neville ve ark 2002, Carlson 2004). Ancak inflamasyonun DF epitelinde proliferatif aktiviteyi uyardığı da bilinmektedir (Villalba ve ark 2012).

DF'de, yalnızca çok katlı yassı epitel varlığının kistik değişimi belirttiğini savunan araştırmacıların (Glosser ve Campbell 1999, Curran ve ark 2002, Baykul ve ark 2005) yanı sıra; bu durumun normal olup yaşla birlikte azalmış mine epitelinin değişimi ile geliştiğini savunanlar da (Consolaro 1987) mevcuttur. Ayrıca kist tanısında kemik kavitesi ve lümende kist içeriğinin de bulunmasının önemli olduğu bildirilmiştir (Damante ve Fleury 2001, Kotrashetti ve ark 2010). De Oliveira ve ark (2008) ve Daley ve Wysocki (1995), çok katlı yassı epitel varlığının, folliküler kist olarak değil; DF dokusunun squamöz farklılaşması olarak tanımlanmasını önermişlerdir.

Klinik uygulamalarda gömülü AYYD'lerin röntgen üzerinde ölçülen follikül aralık değerleri incelendiğinde; bazı yazarlar 3mm'nin altındaki (Kim ve Ellis 1993); bazıları ise 2,5 mm'nin altındaki değerlerin DF'de patolojik değişimi göstermediğini bildirmiştir (Glosser ve Campbell 1999). Bununla birlikte Baykul ve ark (2005), panoramik radyografide 2,5 mm'den daha az genişliğe sahip 94 DF'nin %50'sinde, kistik değişim saptamışlardır. Bizim çalışmamıza ise; klinik ve radyolojik olarak normal görünümlü, follikül aralığı 3 mm'den küçük olan gömülü dişler dahil edildi. Çalışmamızda incelenen DF örneklerinde kistik değişim düşünülmedi; ancak örneklerin çoğunda histopatolojik incelemede DF'nin çok katlı yassı epitelle döşeli olduğu görüldü ve iltihap hücreleri saptandı.

Literatürde kist genişlemesi gibi doku yıkımının olduğu süreçlerde çeşitli sitokinlerin, MMP enzimlerinin ekspresyonunu gerçekleştirmeleri için hücreleri uyardığı da bildirilmiştir (Barkhordar 1987, Takahashi 1998, Wahlgren 2003). Odontojenik keratokistte MT1-MMP, kollajenazlar ve jelatinazların ekspresyonuna

rastlanmıştır (Teronen ve ark 1995, Meghji ve ark 1996, Li ve ark 1997, Kubota ve ark 2000, Kubota ve ark 2002). Ayrıca folliküler kist duvarında da, kollajenazlar ve jelatinazların bulunması; bu enzimlerin kist genişlemesinde rol oynadıklarını göstermiştir (Teronen ve ark 1995, Kubota ve ark 2000). Çalışmamızda da DF'de MMP ekspresyonu gözlenmesi, literatürle de uyumlu olarak, MMP'lerin ilerleyen kronik süreçte kist gelişimine de katkısı olabileceğini düşündürdü.

Diş gelişimi ve sürmesinde en çok etkiye sahip olabileceğini düşündüğümüz MMP'leri (MMP-2, MMP-3, MMP-12, MT1-MMP) seçerek, dişleri sürmemiş ancak halen sürme olasılığı olan (18-25 yaş aralığında) hasta grubunun tam gömülü AYYD'lerinin DF'lerinde bu enzimlerin ekspresyon seviyelerini inceledik. Ayrıca bu enzimlerin akut ve kronik inflamasyonla ve kistle olası ilişkilerini de değerlendirdik. Araştırmamızda; kontrol grubuna göre çalışma grubu örneklerinde, MMP ekspresyonunun nispeten daha kuvvetli olduğu tespit edilmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturacak seviyede yükselmediğini gördük. Literatür bilgiler gözönünde bulundurularak ve bulgularımız dahilinde, bu moleküllerin seviyesinde normale göre bir artış bulunmamasının dişlerin sürmemesi ile ilişkili olabileceği sonucuna vardık.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Araştırmamız, AYYD'lerin DF'lerinde MMP enzimlerinin gömülülük yönünden etkisinin incelendiği ilk çalışma olduğu için önemlidir.

2. Diş sürmesi sırasında özellikle remodeling sürecinde, ESM'nin kollajen ve kollajen olmayan moleküllerinin yıkımı sırasında görev aldığı literatürde özellikle vurgulanan MMP'lerden olan; MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 enzimlerinin insan DF dokusundaki ekspresyonları çalışmamızda gösterilerek bu enzimlerin diş sürme sürecine katkısı olabileceği vurgulandı.

3. Literatürde özellikle kemik ve diş gibi mineralize dokularda yüksek seviyede eksprese edildiği bildirilen MT1-MMP'nin, yumuşak dokuda da ekspresyonu gösterildi.

4. Literatürle uyumlu olarak MT1-MMP ile MMP-2 enzimlerinin ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu saptandı.

5. MMP-12 enzim ekspresyonunun, çok az sayıda örneğin makrofajlarında saptanması ve bunların da yaş aralığının üst sınırına yakın hastalara ait olması nedeniyle bu enzimin kronik inflamasyon süreci ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

6. Doku bileşenlerindeki (fibroblast, damar duvarı, epitel) MMP ekspresyonu ile MMP'lerle boyanan iltihap hücresi yüzdesi arasında da pozitif korelasyonun olduğu görüldü.

7. Doku bileşenlerindeki MT1-MMP, MMP-2 ve MMP-3 ekspresyonlarının, iltihap hücrelerindeki ekspresyon ve inflamasyon yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesine karşın; çalışma ve kontrol gruplarının inflamasyon yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaması; artan MMP ekspresyonlarının diş sürme süreci ile ilişkili olabileceğini gösterdi.

8. Literatür bilgiler ve bulgularımız dahilinde; DF'deki MMP ekspresyonlarında anlamlı bir artış olmamasının dişlerin süreememesinde etkisi olabileceği düşünüldü.

Yapmış olduğumuz araştırmanın, dişin sürme sürecinde MMP ekspresyonunu etkileyebilecek doku inhibitörleri veya olası diğer farklı moleküllerdeki değişimlerin de etkisinin inceleneceği, daha fazla sayıda örnek içeren, daha kapsamlı ve farklı yöntemler de kullanılarak yapılacak yeni çalışmalara katkıda bulunacağına inanmaktayız.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Matriks Metalloproteinazların Yirmi Yaş Dişinin Gömülü Kalması Üzerine Etkisinin İmmunohistokimyasal Analizi

Handegül Korkmaz

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2013

Diş sürmesi; kök uzaması, alveoler kemik remodelingi ve periodontal ligament düzenlenmesini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Matriks metalloproteinazlar, özellikle kollajen remodelingi olmak üzere; diş sürmesini de içeren doku remodelinginde önemli rol oynayan enzim grubudur. Bugüne kadar dişlerin yumuşak ve sert dokularının incelenmesi; MMP-2, MMP-3, MMP-12 ve MT1-MMP'nin diş sürmesiyle en ilişkili olabilecek MMP'ler olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada, MMP'ler ile dişin gömülü kalması arasındaki ilişkiyi belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla, dental foliküllerde ve normal dişeti dokularında MMP-2, MMP-3, MMP-12 ve MT1-MMP'nin immunohistokimyasal ekspresyonlarını karşılaştırdık.

Gömülü alt üçüncü molarlara ait 29 adet DF çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak 24 adet normal dişeti doku örneği kullanıldı. MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP ekspresyonları fibroblastlar, damar duvarı, epitel ve iltihap hücrelerinde değerlendirildi. Bununla birlikte MMP-12 ekspresyonu yalnızca makrofajlarda saptandı. Her örnekte ayrıca inflamasyon yoğunluğu da incelendi. İstatistiksel testler için anlamlılık düzeyi "$p < 0{,}05$" olarak belirlendi. Çalışma ve kontrol grupları arasında, dokuların herhangi bir bileşeni için MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0{,}05$). İstatistiksel olarak anlamlı fark yalnızca makrofajlarda MMP-12 ekspresyonu için bulundu ($p < 0{,}05$). Ayrıca inflamasyon yoğunluğunun fibroblastlar, damar duvarı, epitel ve iltihap hücrelerinde MMP'lerin ekspresyonunu arttırdığı bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı fark MT1-MMP için damar duvarı ve fibroblastlarda; MMP-2 için fibroblastlarda ve MMP-3 için tüm doku bileşenlerinde bulundu ($p < 0{,}05$). Ancak çalışma ve kontrol grupları arasında inflamasyon yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0{,}05$). MMP-12 ekspresyonu inflamasyon yoğunluğuyla artmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0{,}05$). MT1-MMP ve MMP-2 arasındaki ilişki de incelendi ve pozitif bir korelasyon bulundu ($p < 0{,}05$).

Literatürdeki sonuçlar göz önüne alındığında ve bu çalışmanın sınırları dahilinde; MMP ekspresyonundaki değişimlerin gömülü diş patogenezinde olası bir rol oynuyor olabileceği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Dental follikül; diş; gömülü; MMPs.

7. SUMMARY

Immunohistochemical Evaluation of the Effect of Matrix Metalloproteinases on Third Molar Impaction

Tooth eruption is a complex mechanism which requires root elongation, alveolar bone remodelling and periodontal ligament organization. Matrix metalloproteinases (MMPs) are group of enzymes that play an important role in tissue remodeling especially proper collagen remodeling including tooth eruption. To date examination of soft and mineralized tissues of teeth reveals that MMP-2, MMP-3, MMP-12 and MT1-MMP are the most related possible MMPs of tooth eruption. In this study we aimed to determine the relation between MMPs and tooth impaction. For this purpose, we compared the immunohistochemical expressions of MMP-2, MMP-3, MMP-12 and MT1-MMP in dental follicles with in normal gingival tissues.

29 dental follicles of impacted lower third molars were included in this study. 24 normal gingival tissue samples were used as the control group. The expressions of MMP-2, MMP-3 and MT1-MMP were evaluated in fibroblasts, vessel wall, epithelium and inflammatory cells. However, the expression of MMP-12 was determined only in macrophages. The severity of inflammation was also examined in each sample. For the statistical tests, the significance level was set at "$p < 0,05$". There wasn't found statistically significant differences for the expressions of MMP-2, MMP-3 and MT1-MMP in any components of tissues between the study and control groups ($p > 0,05$). The statistically significant difference was found only for the expression of MMP-12 in macrophages ($p < 0,05$). It was also found that the severity of inflammation increases the expression of MMPs in all fibroblasts, vessel wall, epithelium and inflammatory cells. The statistically significant difference was found in vessel wall and fibroblasts for MT1-MMP; in only fibroblasts for MMP-2 and in all components of tissues for MMP-3 ($p < 0,05$). However there wasn't found statistically significant differences for the severity of inflammation between the study and control groups ($p > 0,05$). Although the expression of MMP-12 increased with the severity of inflammation, the difference wasn't found statistically significant ($p > 0,05$). The relationship between MT1-MMP and MMP-2 was also studied and a positive correlation was found ($p < 0,05$).

Given the results in literature and within the limitations of the present study it can be concluded that the changes in MMP expression might be playing a possible role in the pathogenesis of impacted tooth.

Key Words: Dental follicle; impacted; MMPs; tooth.

8. KAYNAKLAR

1. Adelsperger J, Campbell JH, Coates DB, Summerlin DJ, Tomich CE. Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;89(4):402-6.

2. Adeyemo WL. Do pathologies associated with impacted lower third molars justify prophylactic removal? A critical review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(4):448-52.

3. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. Biochem J. 1995;309 (Pt1):299-306.

4. Almendros-Marqués N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Influence of lower third molar position on the incidence of preoperative complications. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(6):725-32.

5. Altınışık M. Gen ifadesi: replikasyon, transkripsiyon, translasyon, posttranslasyonel modifikasyonlar. 2009; [cited 2011 Jun 5]. Available from: http://www.mustafaaltinisik.org.uk/kaynaklarim.htm

6. Baqain ZH, Al-Shafii A, Hamdan AA, Sawair FA. Flap design and mandibular third molar surgery: a split mouth randomized clinical study. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012;41(8):1020-4.

7. Barkhordar RA. Determining the presence and origin of collagenase in human periapical lesions. J Endod. 1987;13(5):228-32.

8. Bartlett JD, Zhou Z, Skobe Z, Dobeck JM, Tryggvason K. Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice. Connect Tissue Res. 2003;44(1):300-4.

9. Baykul T, Saglam AA, Aydin U, Başak K. Incidence of cystic changes in radiographically normal impacted lower third molar follicles. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(5):542-5.

10. Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. Eur J Oral Sci. 2002;110(6):445-51.

11. Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. Inhibition of molar eruption and root elongation in MT1-MMP-deficient mice. Connect Tissue Res. 2003;44(1):298-9.

12. Biljana E, Boris V, Cena D, Veleska-Stefkovska D. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). J Cell Anim Biol. 2011;5(7):113-20

13. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(2):197-250.

14. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell Mol Life Sci. 1999;55(4):639-52.

15. Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. Exp Cell Res. 2005;304(2):493-505.

16. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta. 2000;1477(1-2):267-83.

17. Cabbar F, Güler N, Comunoğlu N, Şençift K, Çöloğlu S. Determination of potential cellular proliferation in the odontogenic epithelia of dental follicle of the asymptomatic impacted third molars. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(10):2004-11.

18. Cahill DR. Eruption pathway formation in the presence of experimental tooth impaction in puppies. Anat Rec. 1969;164(1):67-77.

19. Cahill DR, Marks SCJ. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol. 1980;9(4):189-200.

20. Cahill DR, Marks SCJ. Chronology and histology of exfoliation and eruption of mandibular premolars in dogs. J Morphol. 1982;171(2):213-18.

21. Cahill DR, Marks SCJ, Wise GE, Gorski JP. A review and comparison of tooth eruption systems used in experimentation-a new proposal on tooth eruption. In: Davidovitch Z, editor. The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption. Birmingham: EBSCO Press; 1988. p.1-7.

22. Carlson ER. Odontogenic cysts and tumors. In: Milaro M, editor. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2004. p:575-96.

23. Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. Matrix Biol. 1998;17(7):501-11.

24. Caron C, Xue J, Sun X, Simmer JP, Bartlett JD. Gelatinase A (MMP-2) in developing tooth tissues and amelogenin hydrolysis. J Dent Res. 2001;80(7):1660-4.

25. Consolaro A. Caracterização microscópica de folículos pericoronários de dentes não-irrompidos e parcialmente irrompidos; Sua relação com a idade. Doctoral Thesis. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru Universidade de São Paulo; 1987.

26. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? Circ Res. 2001;89(3):201-10.

27. Curran AE, Damm DD, Drummond JF. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: histopathologic evaluation. J Oral Maxillofac Surg. 2002;60(6):613-7.

28. D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Krane SM, and Partridge NC. Bone proteinases. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 251–64.

29. Da Silva BC, da Silva LI, Filho MS, de Quadros OF. Epidermal growth factor receptor distribution in pericoronal follicles: relationship with the origin of odontogenic cysts and tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103(2):240-5.

30. Daley TD, Wysocki GP. The small dentigerous cyst. a diagnostic dilemma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;79(1):77-81.

31. Damante JH, Fleury RN. A contribution to the diagnosis of the small dentigerous cyst or the paradental cyst. Pesqui Odontol Bras. 2001;15(3):238-46.

32. De Oliveira DM, de Souza AES, da Silveira MM, Camargo IB. Correlation of the radiographic and morphological features of the dental follicle of third molars with incomplete root formation. Int J Med Sci. 2008;5(1):36-40.

33. Fragiskos FD. Surgical extraction of impacted teeth. In: Fragiskos FD, Shröder GM, Himberger M, editors. Oral Surgery, 1st ed. Berlin: Springer; 2007. p.121-79.

34. Fukuta Y, Totsuka M, Takeda Y, Yamamoto H. Pathological study of the hyperplastic dental follicle. J Nihon Univ Sch Dent. 1991;33(3):166-73.

35. García-sesnich J, Hernandez M, Dezerega A, Henriquez L, Cavalla F, Soto F, Garrido M. MMP-12: Presence and semiquantification in Periapical Exudates during Endodontic Therapy. Scientific Poster. 21 June 2012, Iguaçu Falls, Brazil.

36. Glosser JW, Campbell JH. Pathologic change in soft tissues associated with radiographically 'normal' third molar impactions. Br J Oral Maxillofac Surg. 1999;37(4):259-60.

37. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol. 1997;74(2):111-22.

38. Gorski JP, Marks SCJ, Cahill DR, Wise GE. Biochemical analysis of the extracellular matrix of the dental follicle at different stages of tooth eruption. In: Davidovitch Z, editor. The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption. Birmingham: EBSCO Press; 1988a. p. 251-60.

39. Gorski JP, Marks SCJ, Cahill DR, Wise GE. Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. Connect Tissue Res. 1988b;18(3):175-90.

40. Gorski JP, Marks SCJ. Current concepts of the biology of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med. 1992;3(3):185-206.

41. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci USA. 1962;15(48):1014-22.

42. Gunin AG. Web textbook and atlas of hıstology images. Digestive system. tongue, tooth, tooth development. 2000; [cited 2011 Aug 5]. Available from: http://www.histol.chuvashia.com/atlas-en/digestive-05-en.htm

43. Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi "real-time pcr". Turkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;27(5):763-67.

44. Günhan Ö. Oral ve maksillofasiyal patoloji. 1'nci baskı, Ankara, Atlas kitapçılık, 2001; 37-8.

45. Hattab FN. Positional changes and eruption of impacted mandibular third molars in young adults. A radiographic 4-year follow-up study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84(6):604–8.

46. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. J Dent Res. 1995;74(5):1226-34.

47. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. Cell. 1999;99(1):81-92.

48. Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, Ferreras M, Sato T, Shapiro SD, Foged NT, Delaissé JM. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. Bone. 2004;34(1):37-47.

49. Jenkins K, Javadi M, Borghaei RC. Interleukin-4 suppresses IL-1-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts. J Periodontol. 2004;75(2):283-91.

50. Jerez P, Hernandez M, Dezerega A, Retana A, Barrientos C, Dutzan N, Henriquez L, Garcia-sesnich J, Reyes M, Garrido M. MMP-12: Levels and immunolocalization in periapical lesions of endodontic origin. 4th Meeting of the Latin America Region and 24th Annual Meeting of the Chilean Division of IADR. Scientific Poster. 3 October 2011, Santiago, Chile.

51. Kansu E. 2007 nobel ödülü öyküsü: embriyonik kök hücreleri ve knock-out fare modellerinin önemi. ANKEM Derg. 2008;22(2):5-8.

52. Karaaslan Ç. Laboratuvar teknikleri, "western blott" tekniği. Asthma Allergy Immunol. 2008;6(1):38-40.

53. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. Exp Dermatol. 2003;12(2):109-25.

54. Kerkelä E, Böhling T, Herva R, Uria JA, Saarialho-Kere U. Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. Bone. 2001;29(5):487-93.

55. Kerkvliet EH, Docherty AJ, Beertsen W, Everts V. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. Matrix Biol. 1999;18(4):373-80.

56. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. J Orthod. 2000;27(3):227-33.

57. Kim J, Ellis GL. Dental follicular tissue: misinterpretation as odontogenic tumors. J Oral Maxillofac Surg. 1993;51(7):762-7.

58. Kim SG. Multiple unerupted teeth related to the under-expression of MMP-3, MMP-12, and the over-expression of FGF-5. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65(9):43.e56.

59. Kim SG, Kim MH, Chae CH, Jung YK, Choi JY. Downregulation of matrix metalloproteinases in hyperplastic dental follicles results in abnormal tooth eruption. BMB Rep. 2008;41(4):322-7.

60. Kim HR, Choi BH, Engelke W, Serrano D, Xuan F, Mo DY. A comparative study on the extractions of partially impacted mandibular third molars with or without a buccal flap: a prospective study. J Oral Maxillofac Surg. 2011;69(4):966-70.

61. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem. 1994; 218(2): 325-29.

62. Kotrashetti VS, Kale AD, Bhalaerao SS, Hallikeremath SR. Histopathologic changes in soft tissue associated with radiographically normal impacted third molars. Indian J Dent Res. 2010;21(3):385-90.

63. Kruger E, Thomson WM, Konthasinghe P. Third molar outcomes from age 18 to 26: findings from a population-based New Zealand longitudinal study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;92(2):150–5.

64. Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. Interleukin-1alpha-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. J Dent Res. 2000;79(6):1423-30.

65. Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. Interleukin-1alpha enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. J Dent Res. 2002;81(1):23-7.

66. Kugelberg CF, Ahlström U, Ericson S, Hugoson A, Kvint S. Periodontal healing after impacted lower third molar surgery in adolescents and adults. A prospective study. Int J Oral Maxillofac Surg. 1991;20(1):18-24.

67. Leung YY, Cheung LK. Correlation of radiographic signs, inferior dental nerve exposure, and deficit in third molar surgery. J Oral Maxillofac Surg. 2011;69(7):1873-9.

68. Li T, Browne RM, Matthews JB. Immunocytochemical expression of growth factors by odontogenic jaw cysts. Mol Pathol. 1997;50(1):21-7.

69. Liu X, Wu H, Byrne M, Jeffrey J, Krane S, Jaenisch R. A targeted mutation at the known collagenase cleavage site in mouse type I collagen impairs tissue remodeling. J Cell Biol. 1995;130(1):227-37.

70. MacPherson BR. Oral histology, a digital laboratory and atlas. 2002; [cited 2012 Sept 11]. Available from: http://www.uky.edu/~brmacp/oralhist/module3/lab/imgshtml/image32.htm

71. Marks SCJ, Cahill DR, Wise GE. The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption in the dog. Am J Anat. 1983;168(3):277-89.

72. Marks SCJ, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. Arch Oral Biol. 1984;29(4):311-22.

73. Marks SCJ, Gorski JP, Wise GE. The mechanisms and mediators of tooth eruption-models for developmental biologists. Int J Dev Biol. 1995;39(1):223-30.

74 Marks SCJ, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. Anat Rec. 1996;245(2):374-93.

75. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, Desnick RJ. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. Nat Genet. 2001;28(3):261-5.

76. Maruya Y, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Mayanagi H. Expression of extracellular matrix molecules, MMPs and TIMPs in alveolar bone, cementum and periodontal ligaments during rat tooth eruption. J Electron Microsc (Tokyo). 2003;52(6):593-604.

77. McKern TW, Stewart TD. Chapter II-eruption of the third molars. 1957; [cited 2011 May 11]. Available from: http://ebookbrowse.com/mckern-stewart-1957-part-2-pdf-d19870039

78. Medical subject headings (MeSH). National library of medicine. 2013; [cited 2013 Feb 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2013/MB_cgi

79. Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. Arch Oral Biol. 1996;41(6):523-31.

80. Meral G, Saysel M, Ökten S. Gömülü yirmi yaş dişlerinin cerrahi çekimi: Hasta profili ve preoperatif parametreler. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2005;29(4):56-61.

81. Mercier P, Precious D. Risks and benefits of removal of impacted third molars. A critical review of the literature. Int J Oral Maxillofac Surg. 1992;21(1):17-27.

82. Moyers RE. Handbook of orthodontics. 4th ed. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1988. p. 387.

83. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997;378(3-4):151-60.

84. Nagase H, Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274(31):21491-4.

85. National Institute for Clinical Excellence. Guidance on removal of wisdom teeth. London: National Institute for Clinical Excellence; 2000; [cited 2011 May 20]. Available from: http://www.nice.org.uk/page.aspx?o=ta001

86. Ness GM, Peterson LJ. Impacted Teeth. In: Milaro M, editor. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2004.p.139-55.

87. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. Second Edition. Philadelphia, USA, WB Saunders Co, 2002; p. 107-36, 589-601.

88. NIH consensus development conference for removal of third molars. J Oral Surg. 1980;38(3):235-6.

89. Nonaka CF, Augusto VGFJ, Cristina da CMM, Batista da SL, Pereira PL. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in odontogenic myxoma and dental germ papilla. Pathol Res Pract. 2009;205(7):458-65.

90. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):221-33.

91. Peedikayil FC. Delayed tooth eruption. e-Journal of Dentistry. 2011;1(4). p.81-6 [cited 2011 Oct 14]. Available from URL: http://www.ejournalofdentistry.com/home.asp

92. Pell GJ, Gregory BT. Impacted mandibular third molars: classification and modified techniques for removal. Dent Digest 1933; 39:330-38.

93. Polat G. Ekstrasellüler matriks. Ders notları. 2011; [cited 2012 Jan 7]. Available from: http://www.mersin.edu.tr/hastane/prof-dr-gurbuz-polat/ders-notlari5781

94. Rakprasitkul S. Pathologic changes in the pericoronal tissues of unerupted third molars. Quintessence Int. 2001;32(8):633-8.

95. Ravanti L, Häkkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J, Kähäri VM. Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1999;274(52):37292-300.

96. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz: derleme. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2006;26(5):527-37.

97. Retrouvey JM, Goldberg M, Schwartz S. Chapter 5–Dental Development and Maturation, from the Dental Crypt to the Final Occlusion. Pediatric Bone 2nd ed. USA: Academic Press; 2012. p. 83–108.

98. Richardson ME. Changes in lower third molar position in the young adult. Am J Orthod Dentofac Orthop. 1992;102(4):320-7.

99. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? new substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. Biochim Biophys Acta. 2010;1803(1):39-54.

100. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Association between the expression of murine 72 kDa type IV collagenase by odontoblasts and basement membrane degradation during mouse tooth development. Arch Oral Biol. 1992;37(12):1021-30.

101. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. Eur J Oral Sci. 1999;107(2):121-30.

102. Sailer HF, Pajarola GF. Sürmemiş Dişler. In: Kişnişçi RŞ, Tüz HH. Diş Hekimliği Renkli Atlası Ağız Cerrahisi. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004, p.71-99.

103. Shetty DC, Ahuja P, Urs AB, Bablani D, Bablani D, Paul M. Epidemiological status of 3rd molars-their clinical implications. J Oral Health Comm Dent. 2010;4(1):12-25.

104. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod. 2002;28(4):313-5.

105. Shroff B, Pileggi R, Norris K, Orbegoso R, Wilson T, Sauk JJ. Dynamic variations in the expression of type I collagen and its molecular chaperone Hsp47 in cells of the mouse dental follicle during tooth eruption. Arch Oral Biol. 1994;39(3):231-43.

106. Shroff B, Norris K, Pileggi R. Protease activity in the mouse dental follicle during tooth eruption. Arch Oral Biol. 1995;40(4):331-5.

107. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis. 2004;10(6):311-8.

108. Stathopoulos P, Mezitis M, Kappatos C, Titsinides S, Stylogianni E. Cysts and tumors associated with impacted third molars: is prophylactic removal justified? J Oral Maxillofac Surg. 2011;69(2):405-8.

109. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

110. Sun CX, Ririe C, Henkin JM. Hyperplastic dental follicle - review of literature and report of two cases in one family. Chin J Dent Res. 2010;13(1):71-5.

111. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J. 1998;31(5):311-25.

112. Ten Cate AR, Sharpe PT, Roy S, Nanci A. Development of the tooth and its supporting tissues. In: Nanci A, editor. Ten Cate's oral histology. Development, structure, and function. 6th ed. Louis: Mosby; 2003. p. 79–110.

113. Teronen O, Salo T, Laitinen J, Törnwall J, Ylipaavalniemi P, Konttinen YT, Hietanen J, Sorsa T. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. Eur J Oral Sci. 1995;103(3):141-7.

114. Tirali EB, Yalçınkaya EZ, Çehreli SB. Sürme anomalileri. GÜ Diş Hek Fak Derg. 2011;28(3): 217-23.

115. Türker M, Yücetaş Ş. Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi. 3. Baskı, Ankara, Özyurt Matbaacılık, 2004; 223-25.

116. Varun BR, Bindu JN, Sivakumar TT, Anna PJ. Matrix metalloproteinases and their role in oral diseases: a revıew Oral & Maxillofacial Pathology Journal [OMPJ]. 2012;3(1):186-91.

117. Ventä I, Turtola L, Ylipaavalniemi P. Radiographic follow-up of impacted third molars from age 20 to 32 years. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30(1):54-7.

118. Verma DK, Nair PN, Luder HU. Quantitative histological features and ultrastructure of opercula of human teeth showing normal and delayed eruption. J Oral Pathol Med. 2005;34(2):109-15.

119. Villalba L, Stolbizer F, Blasco F, Mauriño NR, Piloni MJ, Keszler A. Pericoronal follicles of asymptomatic impacted teeth: a radiographic, histomorphologic, and immunohistochemical study. Int J Dent. 2012;2012:935310.

120. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827-39.

121. Von Wowern N, Nielsen HO. The fate of impacted lower third molars after the age of 20. A four-year clinical follow-up. Int J Oral Maxillofac Surg. 1989;18(5):277-80.

122. Wahlgren J. Matrix metalloproteinases in pulpitis, chronic apical periodontitis and odontogenic jaw cysts. Doctoral Thesis. University of Helsinki, Faculty of Medicine; 2003. Available from URL: http://urn.fi/URN:ISBN:952-10-1355-9

123. Waite PD, Reynolds RR. Surgical management of impacted third molars. Semin Orthod. 1998;4(2): 113-23.

124. Werkmeister R, Fillies T, Joos U, Smolka K. Relationship between lower wisdom tooth position and cyst development, deep abscess formation and mandibular angle fracture. J Craniomaxillofac Surg. 2005;33(3):164-8.

125. Wise GE, Marks SCJ, Cahill DR. Ultrastructural features of the dental follicle associated with formation of the tooth eruption pathway in the dog. J Oral Pathol. 1985;14(1):15-26.

126. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(4):323-34.

127. Wise GE, Yao S, Henk WG. Bone formation as a potential motive force of tooth eruption in the rat molar. Clin Anat. 2007;20(6):632-9.

128. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. J Dent Res. 2008; 87(5): 414–34.

129. Yılmaz N. İmmünohistokimyasal analiz. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri: Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar II:123-4, Kasım 2007, İstanbul, Türkiye.

130. Yonemochi H, Noda T, Saku T. Pericoronal hamartomatous lesions in the opercula of teeth delayed in eruption: an immunohistochemical study of the extracellular matrix. J Oral Pathol Med. 1998;27(9):441-52.

131. Zeitler DL. Management of impacted teeth other than third molars. In: Milaro M,editor. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2004.p.131-7.

132. Zhao Z, Liu H, Jin Y, Lingling E. Influence of ADAM28 on biological characteristics of human dental follicle cells. Arch Oral Biol. 2009;54(9):835-45.

9. EKLER

EK-A. Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SELÇUKLU TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARLARI

Toplantı Sayısı: 03	Toplantı Tarihi : 26.04.2011

Karar Sayısı 2011-30 Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Hasan KÜÇÜKKOLBAŞI'nın, proje yürütücülüğünü yaptığı "Matriks Metalloproteinazların Yirmi yaş dişinin gömülü kalması üzerine etkisinin immunohistokimyasal analizi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 22.04.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Selçuk Üniversitesi Selçuklu Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Hasan KÜÇÜKKOLBAŞI'nın, proje yürütücülüğünü yaptığı "Matriks Metalloproteinazların Yirmi yaş dişinin gömülü kalması üzerine etkisinin immunohistokimyasal analizi" başlıklı araştırmasının oy birliği ile kabulüne karar verildi.

ASLI GİBİDİR
26.04.2011
Zeynep AKIN ÖNDER
Raportör

10. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Antalya'da doğdu. İlköğrenimini Antalya Koleji'nde, ortaokul ve lise öğrenimini Antalya Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra; 2003 yılında başladığı İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak görev yapmaktadır. Bekârdır.