



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL DÖNEMDEKİ FARKLI ETKENLERİN YAVRU
SIÇANLARDA MİNE DEFEKTİ OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. CANAN DUMAN
DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI ADI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali Menteş

2017-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Pedodonti
Tez Sahibi : Canan Duman
Tez Başlığı : Prenatal Dönemdeki Farklı Etkenlerin Yavru Sıçanlarda Mine Defekti
Oluşumuna Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Sınav Tarihi : 24/04/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof Dr Ali MENTEŞ

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof Dr İlknur TANBOĞA

Marmara Üniversitesi

Prof Dr Işın ULUKAPI

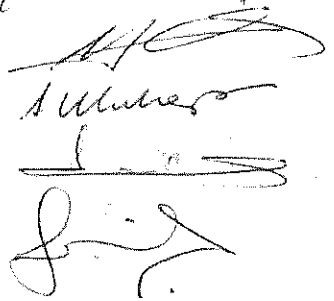
Okan Üniversitesi

Prof Dr Elif SEPET

İstanbul Üniversitesi

Prof Dr Feriha ERCAN

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 04/05/2017 tarih ve 12 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gökse ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Canan Duman



TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na girdiğim günden beri büyük desteği olan, pedodonti eğitimini en iyi şekilde almamız için gerekli ortam ve şartları sağlayan, anlayışı ve pozitif bakış açısı ile her zaman desteğini hissettiğim, klinik deneyimlerinin yanı sıra hayata dair tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bana büyük bir sabır ve titizlik ile yardımcı olan, samimiyetini, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyerek akademik deneyimi ve önerileri ile bana her konuda yol gösteren; akademik yönünün yanı sıra hayata karşı duruşunu ve bakış açısını her yönüyle kendime örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan mutluluk ve onur duyduğum çok değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Ali MENTEŞ**'e

Pedodonti doktora eğitiminin disiplinini en iyi şekilde almam için çaba gösteren ve bana sayısız katkıları olan değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ** ve Sayın **Prof. Dr. Betül KARGÜL**'e,

Tez izleme komitemde bulunan Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Işın ULUKAPI**, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Prof. Dr. Elif SEPET**, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Feriha ERCAN**'a,

İmmünohistokimyasal incelemelerde bilgisini, tecrübesini, emeğini özverili bir şekilde benimle paylaşan, hakkını ödeyemeyeceğim Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü öğretim görevlisi Sayın **Yrd. Doç. Dr. Naziye ÖZKAN**'a,

Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimime katkıları ile her zaman hatırlayacağım, mesleki tecrübelerini paylaşarak bana sayısız katkıları olan **Doç. Dr. Sertaç PEKER, Doç. Dr. Başak DURMUŞ, Yrd. Doç. Dr. Işıl Özgül KALYONCU, Yrd. Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Figen EREN GİRAY** ve **Dr. Ahu DURHAN**'a,

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve mesleki alandaki birlikteliğimizin ötesinde dostluklarını, sevgilerini paylaştığım ve birlikteliğimizden güç aldığım **Dt. Elif Gizem AKTEPE, Dr. Edibe EGİL, Dr. Pınar KULAN, Dt. Merve ULUAKAY, Dt. Ecem AKBEYAZ, Dt. Eda OKUTAN, Dt. Yasemin AYIK, Dt. Ece YILMAZKASAPOĞLU, Dt. Berkant SEZER, Dt. Buse Tansu GÜNDOĞAN, Dr. Barhan PEKEL** ve diğer **TÜM ASİSTAN** arkadaşlarıma,

Doktora eğitimi ve tez sürecimin zorlu dönemlerinde varlıklarıyla bana güç veren sevgili dostlarım **Özgün ÖZEL, Pelin KOCABAŞ, Özge ERDOĞAN, Duygu ASLAN, Melis ÖZTÜRK, Onur GÜNEŞ, Şükrü Can AKMANSOY, Hasan Can ŞAHİN, Ceren ÖÇ** ve **Belgi KUTLU**'ya,

Tez yazım sürecime benimle birlikte emek veren, benimle birlikte uykusuz kalan, umutsuzluğa düştüğüm anlarda büyük bir sabır ve özveriyle bana moral veren, sevgisini ve desteğini her daim hissettiğim, yanımda olmasından güç aldığım **Osman Şahin KÖŞKER**'e

Tez aşamalarımı ciddi bir emek ve mesai harcayarak fotoğraflayan, bugüne kadar attığım her adımda sevgi ve yardımını asla esirgemeyen, beni dünyanın en şanslı ablası yapan, kardeşim **Ömer Can DUMAN**'a

Hayatımın ilk gününden bugüne bana ikinci anne olan, her yıl daha da zorlaşan sınav dönemlerimde yanıma taşınıp hem beni hem arkadaşlarımı besleyen, bitmek tükenmek bilmeyen enerjisine hayret ettiğim ve imrendiğim, teşekkür etmeye kelimelerin yetmeyeceği canım anneannem **Keriman KURAL**'a

Bu günlere gelebilmemin en büyük sebebi olan, maddi ve manevi desteğini bir an olsun esirgemeyen, mutluluğum için her fedakarlığı yapan, güçlü karakteri ve insani değerlerini hayatımın her aşamasında örnek aldığım ve alacağım, kızı olmaktan gurur duyduğum, bu hayattaki en büyük şansım, canım annem, öğretmenim, en yakın arkadaşım **Neriman KURAL**'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-121214-0381 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xiv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1.Mine Kompozisyonu, Formasyonu ve Yapısı.....	5
4.1.1.Minenin fiziksel karakteristikleri	5
4.1.2.Minenin yapısı.....	6
4.2.Amelogenesis	7
4.2.1.Salgı öncesi faz	9
4.2.1.1.Morfogenetik faz	9
4.2.1.2.Diferansiyasyon fazı	9
4.2.2.Salgı fazı.....	10
4.2.3.Olgunlaşma fazı	12
4.2.3.1.Geçiş fazı.....	12
4.2.3.2.Tam olgunlaşma	13
4.3.Ekstraselüler Protein Matrisi.....	15
4.3.1.Mine proteinleri.....	16
4.3.1.1.Amelogenin	16
4.3.1.2.Ameloblastin	17

4.3.1.3.Enamelin	19
4.3.1.4.Amelotin.....	20
4.3.2. Mine proteinazları	20
4.3.2.1. Matriks metalloproteinaz 20 (MMP-20)	21
4.3.2.2.Kallikrein-4 (KLK4)	22
4.3.2.3.Kimotripsin C.....	22
4.4.Sıçanlarda Diş Gelişimi	22
4.4.1.Kesici dişler.....	23
4.4.2.Molar dişler	24
4.5.Gelişimsel Mine Defektleri	25
4.5.1.Süt dentisyonda mine defektleri.....	28
4.5.1.1.Prevalans	29
4.5.1.2.Dağılım.....	30
4.5.1.3.Etiyoloji.....	30
4.5.2.Daimi Dentisyonda Mine Defektleri	31
4.5.2.1.Prevalans	32
4.5.2.2.Etiyoloji.....	32
4.6.Kronik Stres	33
4.7.Bisfenol A	34
4.7.1.BFA'nın yapısı	35
4.7.2.BFA'nın genel sağlık üzerine etkileri	35
4.7.3.Diş hekimliğinde BFA	37
4.8.Amoksisilin	37
4.9.Enfeksiyon	39
5.GEREÇ ve YÖNTEM.....	41
5.1.Sıçan Deney Gruplarının Oluşturulması	42

5.1.1.Kronik stres grubu.....	43
5.1.2.BFA grubu.....	43
5.1.3.Amoksisilin grubu.....	45
5.1.4.Enfeksiyon grubu	46
5.2.Deney Hayvanlarını Bakımı ve Beslenmesi	47
5.3.Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu	48
5.4.Deney Hayvanlarından Doku Örneklerinin Alınması.....	48
5.4.1.Stereomikroskop incelemesi	50
5.4.2.Histolojik inceleme	50
5.4.3.İmmünohistokimyasal inceleme.....	50
5.5.İstatistiksel Değerlendirme.....	51
6. BULGULAR	54
6.1.Stereomikroskop İncelemesi Bulguları	54
6.2.Histomorfolojik İnceleme Bulguları	57
6.3.İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları	63
6.3.1.AMELX immünekspresyonu	64
6.3.2.AMBN immünekspresyonu	74
7.TARTIŞMA	83
8.SONUÇLAR	107
9.KAYNAKLAR	108
10.EKLER.....	136
11.ÖZGEÇMİŞ.....	137
11.1. Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler.....	138
11.2.Ulusal ve uluslararası yayınlar	138

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AI	Amelogenesis imperfekta
AMBN	Ameloblastin
AMEL	Amelogenin
AMELX	X kromozom amelogenin
ATP	Adenozin trifosfat
AVP	Arginin vazopresin
BADGE	Bisfenol-A diglisidileter
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BFA	Bisfenol-A
Bis-DMA	Bisfenol-A dimetakrilat
Bis-GMA	Bisfenol-A glisidilmetakrilat
C	Klor
Ca	Kalsiyum
CD 14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CRF	Kotrikotropin salgı faktörü
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSPP	Dentin sialofosfoprotein
ENAM	Enamelin
EPA	Çevre Koruma Ajansı
g	gram
GC	Glukokortikoid
Gly	Glisin
GT	Gomori'nin tek aşamalı trikrom boyası
H&E	Hematoksilen-eozin
HPA	Hipotalamus hipofiz adrenal
HRP	Horseradish peroksidaz
Ig A	İmmünoglobulin A
Ig G	İmmünoglobulin G
İHK	İmmünohistokimya

kDa	kilodalton
kg	kilogram
KLK4	Kallikrein 4
Leu	Lösin
LPS	Lipopolisakkarid
LRAP	Lösinden zengin amelogenin peptidi
mg	miligram
µg	mikrogram
µm	mikrometre
MIH	Molar keser hipomineralizasyonu
MMP-20	Matriks metalloproteinaz 20
NaClO	Sodyum hipoklorid
nm	nanometre
NOAEL	Yan etki oluşturmada alınabilecek maksimum doz
P	Forfor
Pro	Prolin
PVC	Polivinil klorid
RfD	Günlük maksimum kabul edilebilir referans doz
RNA	Ribonükleik asit
SCPP	Salgısal kalsiyum bağlayıcı fosfoprotein
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SPARC	Asidik ve sisteinden zengin salgı proteini
TEGDMA	Trietilen glikol dimetakrilat
Thr	Treonin
TLR	Toll benzeri reseptör
UDMA	Üretan dimetakrilat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: İnsan dışında ameloblastların hayat döngüleri boyunca oluşan çeşitli fonksiyonel safhalar.	8
Şekil 2: BFA'nın kimyasal yapısı.....	35
Şekil 3: Sıçan deney gruplarının oluşturulması	41
Şekil 4: Grupların gelişim fazlarına göre AMELX immünekspresyonu	63
Şekil 5: Grupların gelişim fazlarına göre AMBN immünekspresyonu	63



RESİM LİSTESİ

Resim 1: Yeni doğan sıçanların görüntüsü.....	42
Resim 2: Postnatal 10. gündeki sıçanların görüntüsü.....	42
Resim 3: Çiftleşme için gruplanan Sprague-Dawley sıçanlar	43
Resim 4: 24 saat aydınlık ortamda tutulan sıçanların odası	44
Resim 5: BFA grubunun cam kafesleri	44
Resim 6: BFA	44
Resim 7: Amoksisilin enjektabl flakon	45
Resim 8: Amoksisilinin intraperitoneal enjeksiyonu	45
Resim 9: Bakteriyal LPS	46
Resim 10: LPS doz ayarlaması ve intraperitoneal enjeksiyonu	46
Resim 11: Dijital termometre	47
Resim 12: LPS enjekte edilmiş sıçanda rektal ateş ölçümü	47
Resim 13: Ketamin ve ksilazin.....	48
Resim 14: 10 günlük sıçanın mandibulası.....	49
Resim 15: Grupların ve çenelerin numaralandırılması.....	49
Resim 16: İmmünohistokimyasal boyama aşamaları	52
Resim 17: İmmünohistokimyasal inceleme aşamaları	53
Resim 18: Kontrol grubu molar dişlerin parlak, şeffaf, beyaz ve pürüzsüz mine yüzeyi	54

Resim 19: Kronik stres grubu molar dişlerin tüberküllerinde geniş pit şeklinde mine kayıpları (ok) ve etrafında mat hipoplazik görünüm (*).....	55
Resim 20: BFA grubu molar dişlerde tüberküller üzerindeki mine yüzeyinde dikey yarık alanlar (ok). Pürüzlü ve mat mine yüzeyi (*)	55
Resim 21: Amoksisilin grubu molar dişlerde tüm tüberkül yüzeyi ve çevresinde hipokalsifiye alanlar (*)	56
Resim 22: LPS enfeksiyon grubu molar dişlerin yüzeylerinde geniş, hipoplazik, mat, demarke alanlar (*)	56
Resim 23: Kontrol grubunda düzenli yapıdaki ameloblast hücreleri (a), mine matriksi (m) ve dentin matriksi (d). H&E boyası.	58
Resim 24: Kontrol grubunda düzenli ameloblast (a), mine matriksi (m) ve dentin matriksi (d) yapısı. GT boyası.....	58
Resim 25: Kronik stres grubunda defektif mine matriksi yapısı (ok). a: ameloblast, m: mine matriksi, d:dentin matriksi. H&E boyası.....	59
Resim 26: Kronik stres grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). d: dentin matriksi. GT boyası.	59
Resim 27: BFA grubunda defektif mine matriksi yapısı (ok), ameloblastlarda kopma ve ayrışmalar (ok başı). m:mine matriksi, d: dentin matriksi. H&E boyası.....	60
Resim 28: BFA grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). d: dentin matriksi. GT boyası.	60
Resim 29: Amoksisilin grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında defektif ayrılma (*), ameloblastlarda ayrışma (ok), ameloblast sitoplazmalarında vakuol benzeri yapılar (ok başı). a: ameloblast, m: mine matriksi, d:dentin matriksi. H&E boyası.	61
Resim 30: Amoksisilin grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında ayrılma (*). m: mine matriksi, d: dentin matriksi. GT boyası.	61

Resim 31: LPS enfeksiyon grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında ayrılma (*). a: ameloblast, m: mine matriksi, d: dentin matriksi. H&E boyası.	62
Resim 32: LPS grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). m: mine matriksi, d: dentin matriksi. GT boyası.	62
Resim 33: Negatif kontrol dokusu. AMBN (A), AMELX (B)	64
Resim 34: Kontrol grubunda kuvvetli AMELX immünekspresyonu (ok).....	69
Resim 35: Kontrol grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda kuvvetli AMELX immünekspresyonu.....	69
Resim 36: Kronik stres grubunda orta şiddette AMELX immünekspresyonu (ok) ..	70
Resim 37: Kronik Stres grubunda salgı fazı ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazı ameloblastlarda orta (B) ve olgunlaşma fazındaki ameloblastlarda (C) zayıf boyanma şiddetinde AMELX immünekspresyonu.....	70
Resim 38: BFA grubunda zayıf AMELX immünekspresyonu (ok)	71
Resim 39: BFA grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblast hücrelerinde zayıf AMELX immünekspresyonu.	71
Resim 40: Amoksisilin grubunda orta şiddette AMELX immünekspresyonu (ok) ..	72
Resim 41: Amoksisilin grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblastlarda zayıf AMELX immünekspresyonu.....	72
Resim 42: LPS enfeksiyon grubunda zayıf AMELX immünekspresyonu (ok).....	73
Resim 43: LPS enfeksiyon grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (B) ve olgunlaşma fazındaki ameloblastlarda zayıf (C) AMELX immünekspresyonu.....	73
Resim 44: Kontrol grubunda kuvvetli AMBN immünekspresyonu (ok).....	78

Resim 45: Kontrol grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu.	78
Resim 46: Kronik stres grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)	79
Resim 47: Kronik Stres grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblast hücrelerinde orta şiddette AMBN immünekspresyonu.	79
Resim 48: BFA grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)	80
Resim 49: BFA grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblast hücrelerinde orta şiddette AMBN immünekspresyonu.	80
Resim 50: Amoksisilin grubunda zayıf AMBN immünekspresyonu (ok)	81
Resim 51: Amoksisilin grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda zayıf AMBN immünekspresyonu.	81
Resim 52: LPS enfeksiyon grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)	82
Resim 53: LPS Enfeksiyon grubunda salgı (A) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu, geçiş (B) fazındaki ameloblastlarda orta şiddette AMBN immünekspresyonu.	82

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Albino sıçanlarda dentisyon gelişim kronolojisi	24
Tablo 2: Süt dişlenme kronolojisi (Nelson ve Ash 2010, uyarlanmıştır).....	26
Tablo 3: Daimi dişlenme kronolojisi (Nelson ve Ash 2010, uyarlanmıştır)	27
Tablo 4: Süt dişlerinde ve daimi dişlerde görülen gelişimsel mine defektleri etiyojileri	31
Tablo 5: Mikroorganizmalar üzerinde gösterdikleri etkilere göre antibiyotik grupları	38
Tablo 6: Her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMELX immünekspresyon şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması.....	64
Tablo 7: Grupların her üç fazda AMELX immünekspresyon şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması.....	65
Tablo 8: Grupların her üç fazdaki AMELX immünekspresyon şiddetlerinin gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirilmesi	67
Tablo 9: Her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMBN immünekspresyon şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması.....	74
Tablo 10: Grupların her üç fazda AMBN immünekspresyon şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması.....	74
Tablo 11: Grupların her üç fazdaki AMBN immünekspresyon şiddetlerinin gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirilmesi	76
Tablo 12: Gebelik ilaç kategorileri.....	101

Prenatal Dönemdeki Farklı Etkenlerin Yavru Sıçanlarda Mine Defekti Oluşumuna Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi

Öğrencinin Adı: Canan DUMAN

Danışmanı: Prof. Dr. Ali MENTEŞ

Anabilim Dalı: Pedodonti A.D.

1. ÖZET

Amaç: Kronik stres, bisfenol-A (BFA), amoksisilin veya lipopolisakkarid (LPS) enfeksiyonu gibi dört çevresel faktöre prenatal dönemde maruz kalmış sıçanların mandibular birinci molarlarının histolojik, immünohistokimyasal ve makroskopik olarak incelenmesi. **Gereç ve Yöntem:** 15 hamile sıçan, 4 deney grubu ve kontrol olarak ayrılmıştır. kronik stres grubu prenatal 18. günden doğuma kadar 12:12 aydınlık/aydınlık ortama maruz bırakılmıştır. BFA grubu hamileliğin ilk gününden doğuma kadar oral yolla günlük 5µg/kg BFA'ya maruz bırakılmıştır. Amoksisilin grubuna prenatal 18. günden doğuma kadar günlük 100mg/kg amoksisilin enjekte edilmiştir. LPS enfeksiyonu grubuna prenatal 18. günde tek seferlik 125µg/kg bakteriyel LPS enjekte edilmiştir. Postnatal 10. günde kontrol grubundan 7, diğer gruplardan 10'ar yavru sakrifiye edilmiştir. Sol hemimandibulalardan alınan 3-µm kalınlığında kesitler hematoksisilen-eozin(H&E) ve Gomori'nin tek aşamalı trikrom boyası(GT) ile boyanmış ve ameloblast gelişim aşamalarındaki yoğunluklarını değerlendirmek amacıyla anti-AMELX ve anti-AMBN tavşan primer antikorları ile inkübe edilmiştir. Sağ molarların yüzey morfolojileri stereomikroskopla değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Tüm grupların AMELX ($p=0.008$, $p=0.0001$, $p=0.009$) ve AMBN ($p=0.002$, $p=0.001$, $p=0.0001$) immünekspresyonları bütün ameloblast gelişim fazlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede zayıf bulunmuştur. H&E ve GT boyamada tüm deney gruplarında anormal mine matriks formasyonu gözlenmiştir. Morfolojik incelemede amoksisilin grubunda sarımtırak renk değişikliği gözlenmiştir. **Sonuçlar:** Bu çalışmayla prenatal dönemde maruz kalınan stres, BFA, amoksisilin ve enfeksiyonun mine formasyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mine defektleri, kronik stres, BFA, amoksisilin, enfeksiyon

Histologic Evaluation of Effects of Different Factors in Prenatal Period on Enamel Defect Development in Rats

Student's name: Canan DUMAN

Supervisor: Prof. Dr. Ali MENTEŞ

Department: Pediatric Dentistry

2. SUMMARY

Aim: Histologic, immunohistochemical and macroscopic evaluation of mandibular first molars of rats which were exposed to four environmental factors prenatally such as chronic stress, bisphenol-A (BPA), amoxicillin or lipopolysaccharide (LPS) infection. **Material-methods:** 15 pregnant rats were divided into 4 experimental groups and control. Chronic stress group rats were exposed to a 12:12 light/light cycle (LL) from day E18 until delivery. BPA group rats were orally administered daily 5µg/kg BPA from E1 until delivery. Amoxicillin group rats were daily injected 100mg/kg amoxicillin from day E18 until delivery. LPS infection group rats were injected 125µg/kg bacterial LPS for once on E18. Seven pups from control and ten pups from other groups were euthanized on P10. 3-µm sections from left hemimandibula were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Gomori's one step trichrome staining (GT) and incubated with rabbit polyclonal antibodies to AMELX and to AMBN and staining intensity of ameloblast stages were evaluated. Surface morphology of right mandibular molars were evaluated with stereomicroscope. **Results:** AMELX ($p=0.008$, $p=0.0001$, $p=0.009$) and AMBN ($p=0.002$, $p=0.001$, $p=0.0001$) staining of all groups were significantly lower than control in each developmental stages of ameloblasts. Abnormal enamel matrix formation was observed in H&E and trichrome staining sections of all experimental groups. Yellowish coloration of amoxicillin group was observed in morphologic evaluation. **Conclusions:** This study investigates exposing to stress, BPA, amoxicillin and infection prenatally may affect enamel formation.

Key Words: Enamel defects, chronic stress, BPA, amoxicillin, infection

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Diş minesi yüksek mineral içeriğinden dolayı mineralize dokular içinde taktır. Minenin hacimsel olarak %87'si, ağırlık olarak %95'i yüksek organize, sıkı tutunmuş kristalitlerden oluşur. Diğer mineralize dokular %20 organik materyale sahipken olgun minede bu oran %1'den azdır (Simmer ve Hu, 2001). Diş minesi ektoderm orijinli tek mineralize dokudur (Crombie ve ark., 2009). Mine gelişimi (amelogenesis) dört ana fazdan oluşur. Bu fazlar presekresyon (salgı öncesi), sekresyon (salgı), geçiş ve maturasyon (olgunlaşma)'dır (Bartlett, 2013).

Amelogenesisin başlangıç salgı fazında meydana gelen duraksamalar morfolojik defektlere (hipoplazi); kalsifikasyon veya olgunlaşma fazında meydana gelen duraksamalar morfolojik olarak normal fakat nitelik olarak bozuk mine oluşumuna (hipomineralizasyon) neden olur (William ve ark., 2006). Mine gelişimindeki duraksamalar; genetik, sistemik, lokal veya çevresel bir çok sebebe bağlı olabilir. Mine defektinin şiddeti ve boyutu, sebep olan faktörlere göre değişiklik gösterir. Defektler, tüm dişleri kapsayan şiddetli mine kayıplarından tek dişte oluşan lokal sınırları belirgin opasitelere değişen bir çeşitlilik gösterir (Jacobsen ve ark., 2013).

Yerli ve uluslararası gelişimsel mine defekti prevalans çalışmalarında dikkat çekecek ölçüde yüksek oranlar gözlenmektedir. Neden olabilecek çevresel etiyolojik faktörlerin tam olarak belirlenememiş olması bu konuda yeni çalışmalar yapılması gerekliliğini doğurmaktadır.

Gelişimsel mine defektlerine sahip bireylerin çürük riski sağlıklı bireylere göre daha yüksek olmaktadır. Dental tedavi ihtiyacı ve/veya estetik kaygılar nedeniyle diş hekimine başvurma yaşı düşmekte, bu sebeple defektlerin teşhisi çoğunlukla çocuk diş hekimleri tarafından koyulmaktadır. Yüksek prevelans ve artan dental tedavi ihtiyacı nedeniyle gelişimsel mine defektleri çocuk diş hekimliğinin en temel konularından biri haline gelmiştir. Dental tedavi ve diş kaybının minimum düzeye indirilebilmesi için erken teşhis ve koruyucu tedaviler kritik önem taşımaktadır. Muhtemel etiyolojik faktörlerin belirlenebilmesi ise erken teşhisin kilit noktasıdır.

On dokuzuncu yüzyıldan itibaren birçok bilim dalında olduğu gibi diş hekimliği alanında da deney hayvanı çalışmaları biyomedikal araştırmaların ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir (Zortuk ve Kırac, 2010). İnsan ve hayvanların yararı ile sağlığın korunması, en iyi yöntemlerin bulunması ve biyolojik bilgilerimizin artması gibi farklı

amaçlar için değişik tür hayvanlarda deneye başvurmak zorunludur (Büken, 2006). Sıçanlarda diş dokusu gelişimi ve yapısı insan dişleriyle benzerdir ve diş gelişiminin kompleks genetiğinin anlaşılabilmesine yardımcı olur (Lei ve ark., 2014). Bu benzerliklerin yanı sıra sıçan kesici dişlerinin yaşam boyu sürmesi, molar dişlerin insan molar diş yapısına benzerliği, hayvanların kolay üretilmesi ve maliyetinin ucuz olması diş hekimliği çalışmalarında tercih edilme sebebi olmuştur.

Mine defektlerinin etiyolojisi hakkında bilgi verecek olan çalışmamızda deney gruplarımızdan alınacak örneklerde rastlanan defektler daha sonra yapılacak olan etiyolojik çalışmalara ışık tutacaktır. Belirtilen etkenlere maruz kalmış kişilerin çocukları risk grubu olarak belirlenip takip edilebilecek; böylece erken teşhis ve koruyucu tedavilere imkan sağlanacaktır.

Bu tez çalışmasının amacı hamilelik döneminden itibaren anne sıçanları çeşitli çevresel faktörlere maruz bırakarak, doğan yavru sıçanların molar dişlerinin amelogenesis gelişim fazlarında etkilenmesini incelemektir. Hamileliğin diş gelişimini etkileyen dönemlerinde anne sıçanlarda:

- 1) Kronik stres oluşturarak,
- 2) Bisfenol A'yı içme suyuna katmak suretiyle toksifikasyon meydana getirerek,
- 3) Yüksek dozda amoksisilin enjeksiyonuyla toksifikasyon meydana getirerek
- 4) Enfeksiyon oluşturarak, doğan yavru sıçanların sürmemiş molar dişlerinde,

mine yüzeyinin morfolojik, ameloblastların histolojik ve ameloblastların salgı, geçiş ve olgunlaşma fazlarında amelogenin ve ameloblastin yoğunluğunun immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Mine Kompozisyonu, Formasyonu ve Yapısı

Mine, diş yüzeyini kaplayan epitelyal kaynaklı dokudur. Mine formasyonundan sorumlu olan hücreler ameloblastlardır. Ameloblastlar, diş sürmesiyle beraber kaybolur bu yüzden mine kendini yenileyemez. Bu doğal limitasyonu kompanse edebilmek için, olgunlaşma sürecinde organik matriksi neredeyse tamamen kaybederek kompleks bir yapısal organizasyon ve yüksek derecede mineralizasyon kazanır. Bu karakteristik özellikler, mine yapıcı hücreler olan ameloblastların alışılmamış yaşam döngüsüne ve oldukça uzun olan mine kristallerinin formasyonunu düzenleyen matriks proteinlerinin özgün fizikokimyasal karakteristiklerine etki eder. Bu durum mineyi diğer dokulardan ayırır ve yaygın olarak minenin kollojen bazlı kalsifiye dokuların ana elementlerini azalttığına inanılır. Hücresel olaylar ve ekstraselüler matriks olaylarıyla ilgili sistematik karşılaştırmalar yapılsa da gelişim sürecinde bütün kalsifiye dokularla benzerlikler ve ortak maddeler ortaya çıkmıştır (Nanci, 2008).

4.1.1.Minenin fiziksel karakteristikleri

Gelişimini tamamlamış mine dokusu %96 mineral, %4 organik madde ve su içeriğiyle bilinen en yüksek mineralize ekstraselüler matrikstir. Minenin inorganik içeriği; kemik, kalsifiye kıkırdak, dentin ve sementte bulunan karbonat iyonlarının yerine geçmiş kristalin kalsiyum fosfat (hidroksiapatit)' tır. Strontium, magnezyum, kurşun ve florid gibi iyonlar eğer mine formasyonu esnasında bulunuyorsa kristallerin yapısına katılabilir. Bu kristallerin asit tarafından çözünmeye hassaslığı, diş çürüğünün kimyasal temelini oluşturur (Nanci, 2008).

Yüksek mineral içeriğinin mineye verdiği sertlik özelliği, kompleks yapısal organizasyonuyla birlikte diş fonksiyonu esnasında minenin mekanik kuvvetlere dayanıklı olmasını sağlar. Bu sertlik ayrıca mineye kırılma özelliği verir, bu yüzden daha elastik olan dentin alt tabakayı oluşturarak minenin bütünlüğünü korumasını sağlar. Eğer bu destekleyici dentin tabakası çürük nedeniyle veya kavite preperasyonu esnasında uzaklaştırılırsa desteksiz mine kolayca kırılır (Nanci, 2008).

Mine translusent ve açık sarıdan beyaz-griye değişen bir renktedir. Kalınlığı diş bölgelerine göre çeşitlilik göstermekle beraber en kalın kısmı 2,5 mm olan okluzal

yüzüdür. Bu varyasyon, minenin daha ince olduğu bölgelerde dentinin rengi yansımaları nedeniyle mine rengini etkiler (Nanci, 2008).

4.1.2. Minenin yapısı

Yüksek mineral içeriğinden dolayı minenin yapısı çalışmak için zordur. Geleneksel demineralize kesitlerle çalışıldığında mineralin çözünmesi ve eser miktarda organik materyalin yıkanması sonucu sadece daha önce olgunlaşmış minenin bulunduğu bölgelerde boş alanlar görülebilir. Fakat gelişmekte olan minenin dekalsifiye kesitlerinde yapı hakkında bilgi verecek yeterli organik materyal kalır (Nanci, 2008).

Memeli minesinin ana organizasyonel birimleri çubuklar (prizmalar) ve çubuklar arası mine (interprizmatik mine)'dir. Mine çubukları ilk olarak, enine kesitte hegzagonal ve prizma benzeri yapılar olarak tanımlanmış ve günümüzde sıklıkla mine prizmaları terimi kabul görmüştür. Bu metinde mine çubuklarının düzenli bir geometrisi olmaması ve prizmaya benzememesi nedeniyle bu terim kullanılmayacaktır (Nanci, 2008).

Mine, sıkı bir şekilde birleşmiş, uzun, şerit benzeri 60-70 nm genişliğinde, 25-30 nm kalınlığında karbonoapatit kristallerinden oluşur. Kristaller oldukça uzundur, bazı araştırmacılar uzunluğunun mine tabakası kalınlığını kapsadığına inanır. Kalsiyum fosfat birim hücreleri hegzagonal bir simetriye sahiptir ve kesitsel profilde net bir şekilde görülebilen hegzagonal kristal dış sınırı oluşturmak için yığılırlar. Tam olarak olgunlaşmış minenin kristalleri mükemmel bir hegzagonal yapı göstermeyip daha düzensiz bir dış sınır oluşturur, büyümenin son kısımlarında birbirleri üzerine baskı yaparlar. Bu kristaller kendi aralarında çubuklar veya çubuklar arası mine olarak gruplaşır. Taban kesitlerinde çubukların oryantasyonunu belirlemek kafa karıştırıcıdır çünkü minenin kristalin yapısı optik illüzyona yatkındır; ışık kesit boyunca geçerken dış yüzeyi fark edebilmek zordur. Bunun sonucunda yaklaşık olarak silindirik mine çubuklarından kesit alındığında kesilmiş profiller uzunlamasına görünen çubuklarla karıştırılabilir ve ışık mikroskobu altında çubuk yönü hakkında karar vermek zordur. Daha ince kesitler alan ve daha yüksek ayrıştırma gücüne sahip olan elektron mikroskobu kullanmak bahsedilen zorlukların bir kısmının üstesinden gelinmesini sağlar (Nanci, 2008).

Çubuklar bir miktar silindire benzer ve çoğunlukla çubukların uzun aksına paralel uzanan kristallerden oluşur. Çubuklar arası alan her çubuğun etrafını kaplar ve bu alanın kristalleri çubuğu oluşturanlardan farklı yöne doğru oryantasyon gösterirler. Oryantasyon farkı bir çubuğun çevresinin 3/4'ü kadardır. Mine çubukları ve çubuklar arası bölge arasındaki sınır organik materyal içeren dar bir bölgedir ve çubuk kını (rod sheath) adını alır. Çubuk kını yüksek memelilerde daha net gözlenir. Çubuğun çevresinin küçük bir bölümünde kristaller ve çubuklar arası mine karışır. Bu alanda mine çubuğu ve çubuklar arası bölge arasında bir sınır, alan veya çubuk kını bulunmaz. Mine çubuklarının uzun aksı boyunca birleşme bölgesini de içeren kesitler alındığında kristallerin çubuklar arası mineye doğru genişlediği gözlenir. Bu iki yapının yatay hatları anahtar kilit ilişkisine benzetilmiştir. Fakat bu anahtar kilit benzetmesi; mine komponentlerinin yapısal diziliminin varyasyonlarını yeterince karşılamaması ve mine formasyon paterniyle uyumlu olmaması nedeniyle daha sonra terkedilmiştir. Memeli minesinin temel organizasyon paterni çubuklar arası mineye gömülmüş silindirik çubuklar şeklinde tarif edilmiştir (Nanci, 2008).

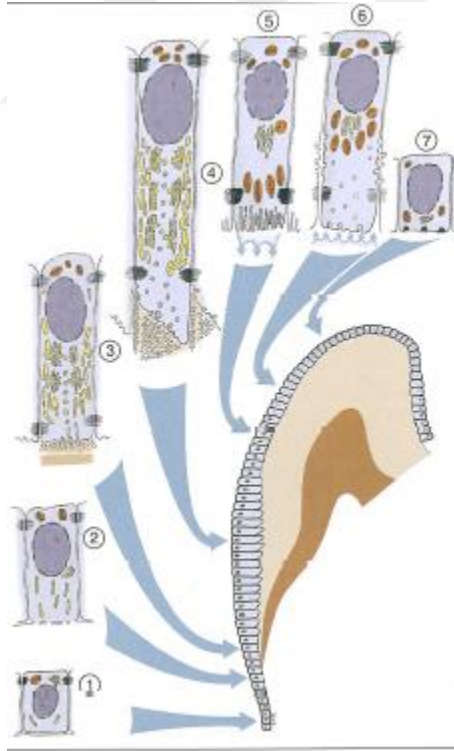
4.2.Amelogenesis

Amelogenesis veya mine formasyonu iki aşamalı bir süreçtir. Mine ilk oluştuğunda %30 kadarı mineralizedir. Daha sonra organik matriks uzaklaştırılır ve kristaller genişler ve kalınlaşır. Organik madde ve suyun kaybedilip minerallerin eklendiği bu sürecin sonunda tam kalınlığına ulaşmış minenin içeriğinin %96'sından fazlası mineral olur (Nanci, 2008).

Ameloblastlar, matriks proteinleri salgılayıp mineral depozisyonuna uygun bir çevre oluşturmakla görevlidirler. Bu epitel hücresi, mine formasyonunun çeşitli zamanlarındaki primer aktivitesini etkileyen fenotip değişiklikleri gösteren benzersiz bir yaşam döngüsüne sahiptir. Amelogenesis 6 faza kadar ayrılmış olsa da genel olarak salgı öncesi faz, salgı fazı ve olgunlaşma fazı olarak üç ana fonksiyonel faza ayrılmıştır (Şekil 1). Klasik olarak ameloblastlar her fazda farklı özelliktedirler. Öncelikle salgı öncesi fazda ameloblastlar fenotiplerini kazanacak şekilde farklılaşır, polarite değiştirir, geniş çaplı bir protein sentetik aparatı oluşturur ve minenin organik matriksini oluşturmaya hazırlanırlar. İkinci olarak salgı fazında (formatif faz da denir) ameloblastlar karmaşılaşarak minenin tüm kalınlığını oluşturur ve yüksek derecede düzenli bir yapı meydana getirir. Son olarak, olgunlaşma fazında ameloblastlar değişir

ve eş zamanlı mineral değişimi için gerekli olan spesifik iyonları taşır. Son 10 yıl içinde her fazda gerçekleşen hücresel olaylar daha iyi anlaşılmış, ameloblastlar yaşam döngüleri boyunca gelişimsel döneme bağlı olarak farklı aktiviteler gösteren hücreler olarak tanımlanmıştır (Nanci, 2008).

Mine formasyonu diş gelişiminin erken kuron döneminde başlar ve iç mine epiteli hücrelerinin tüberkül tepelerinden başlayarak farklılaşmasını içerir. Daha sonra bu süreç diş kuronunun eğimleri boyunca ilerleyip tüm epitel hücreleri ameloblastlara farklılaşana kadar devam eder. Ameloblastlar farklılaşıp dentin oluşmaya başladığında bu hücreler iç mine epitelinin dışında uzanan kan damarlarından uzaklaşır. Kan damarlarına olan bu uzaklığı kompanse etmek için damarlar dış mine epiteline invagine olur ve aradaki yıldızlı retikulum kaybolur. Böylece ameloblastlar kan damarlarına yaklaşır (Nanci, 2008).



Şekil 1: İnsan dişinde ameloblastların hayat döngüleri boyunca oluşan çeşitli fonksiyonel safhalar.

1. Histolojik farklılaşma,
2. Salgı öncesi,
3. Salgı (Tomes' uzantıları),
4. Olgunlaşma (dalgalı sonlanan),
5. Olgunlaşma (düzgün sonlanan),
6. Koruyucu safha (Nanci, 2008)

4.2.1.Salgı öncesi faz

4.2.1.1.Morfogenetik faz

Diş gelişiminin çan safhasında kuronun şekli belli olur. Dış mine epiteliyle dental folikül; iç mine epiteliyle dental papilla arasında bazal lamina bulunur. İç mine epiteli hücreleri hala mitotik aktivite gösterebilir. Kübik görünümlü bu hücrelerin merkezinde büyük bir çekirdek, bağlantı kompleksinin olduğu proksimalinde az gelişmiş bir golgi cisimciği vardır. Mitokondri ve sitoplazmik elemanlar hücre içerisine dağılmıştır (Nanci, 2008).

4.2.1.2.Diferansiyasyon fazı

İç mine epiteli hücreleri ameloblastlara farklılaşır, uzarlar ve çekirdekleri stratum intermediuma doğru proksimale kayar. Manto dentin yapım sürecinde ameloblastları destekleyen bazal lamina, sitoplazmik uzantılarla bölünür. Her hücrenin golgi cisimciği hacmini artırır ve supranükleer sitoplazmanın büyük bir bölümünü işgal etmek için proksimal pozisyonundan distale doğru hareket eder. Endoplazmik retikulumun miktarı artar ve mitondrielerin çoğu, birkaç tanesi hücreye dağılacak şekilde proksimal alanda yoğunlaşır. Hücrenin distal uzantısında bir bağlantı kompleksi daha oluşarak, ameloblastları gövde ve distal bölümde yer alan Tomes' uzantısı olarak ikiye ayırır. Böylece ameloblast, organelleri çekirdeğin distalinde hücre gövdesinde bulunan polarize bir hücre halini alır. Bu hücreler daha fazla bölünmez (Nanci, 2008).

Eski çalışmalar bu diferansiye olmuş ameloblastları salgı yapmayan hücreler olarak kabul etse de, günümüz çalışmalarında mine proteinlerinin beklenen aksine bazal laminanın preameloblastlarını ayırdığı, preodontoblastların kaybolduğu dönemden önce salgılanmaya başladığı açıkça gösterilmiştir. İlginç olarak preameloblastlar kısa süreliğine de olsa bir odontoblast ürünü olan dentin sialoproteini salgılar. Karşıt matriks proteinlerinin hücre diferansiyasyonu sırasında resiprokal salgılanması ve bunun yanında daha sonraki aşamalarda mine organı kökenli hücrelerden tipik ektomezenkimal proteinler salgılaması; kraniofasial bölgedeki tüm sert doku oluşturan hücrelerin ortak ektodermal orijiniyle uyumludur (Nanci, 2008).

Komşu ameloblastlar birbirlerine yakın olarak hizalanır ve ataşman özelleşmesi veya bağlantı kompleksiyle aralarındaki hiza oluşturulur. Bu kompleksler hücreleri distal (mineye komşu) ve proksimal (stratum intermediuma komşu) uzantılarında

çevreler. İnce aktin içeren filamentler, bağlantı kompleksinden ameloblastların sitoplazmasına doğru saçılır ve distal ve proksimal sonlanma ağlarını oluşturduğu gözlenebilir. Bu bağlantı kompleksleri ameloblastları sıkıca bağlayarak ve farklı zamanlarda aralarından mineye girmek veya çıkmak için nelerin geçip geçemeyeceğini belirleyerek amelogenesisinde önemli rol oynarlar (Nanci, 2008).

4.2.2.Salgı fazı

Salgı fazı ameloblastlarının ince yapısı, onların yoğun sentetik ve salgısal aktivitelerini yansıtır. Golgi kompleksi yaygındır, granüler endoplazmik retikulumun çok sayıda boşluğuyla çevrelenmiş silindirik organel form verir ve supranükleer kompartmanın büyük parçasını işgal ederler. Mine proteinleri için mRNA granüler endoplazmik retikulumun membranındaki ribozomlar tarafından çevrilir ve sentezlenen ürün kendi alanlarına taşınır. Daha sonra proteinler dönüşüm sonrası modifikasyonların devamı için golgi kompleksine taşınır ve membrana bağlı salgı granüllerinin içine paketlenir. Bu granüller hücrenin distal uzantısı olan Tomes' uzantılarına yönelir. Ameloblastlar tarafından yapılan salgı esastır ve devamlıdır, salgı granülleri çok uzun zaman saklanmazlar (Bartlett ve ark., 2006).

Mine formasyonu başladığında Tomes' uzantısı sadece proksimal parçayı kapsar. Salgı granüllerinin içeriği, mine çubuğu içermeyen başlangıç mine tabakasını oluşturmak için uzantı yüzeyi boyunca yeni yapılmış manto dentine karşı salınır. Mine matriksi salgılanması ve mineralizasyonu arasında yok denecek kadar az zaman geçer. İlk oluşan hidroksiapatit kristalleri dentin kristalleriyle birbirine kenetlenir (Bartlett ve ark., 2006).

Başlangıç mine tabakası oluştuğunda ameloblastlar dentin yüzeyinden uzaklaşır ve proksimal bölümün fazla büyümesiyle Tomes' uzantısının distal parçasını oluştururlar. Proksimal parça distal bağlantı kompleksinden mine tabakası yüzeyine uzanırken, distal parça başlangıç tabakasının ötesindeki mineye penetre olur. Her bir Tomes' uzantısının sitoplazması ameloblastın gövdesiyle devam eder. Mine kristallerinin çubuklar ve çubuklar arası bölge konfigürasyonları ameloblastların ve Tomes' uzantılarının ürünüdür. Çubukların ve çubuklar arası bölgenin organizasyonel çerçevesi tüm türlerde aynıdır fakat, boyutları ve dış hatları hücre geometrisini etkiler (Bartlett ve ark., 2006).

Tomes' uzantısının distal uzantısı oluştuğunda, mine proteinlerinin salgısı aşamalı hale gelir ve iki bölgeyle sınırlanır. Mine proteinlerinin ekstraselüler olarak salgılandığı bölgeler çok sayıda membran kıvrımlarının olmasıyla kolayca tespit edilir. Bu kıvrımların, bu bölgelere hızlı füzyon gösteren çok sayıda salgı granülü sebebiyle membranın aşırı büyümesini sınırlandırdığına inanılır. İlk bölgeden yapılan sekresyon (uzantının proksimal bölümü, bağlantı kompleksine yakın bölüm, hücre periferi), bitişik olan ameloblastlarla birlikte, Tomes' uzantısının distal bölümüne bağlı olan bir pitte sınırlanan mine bölümlerinin oluşmasını sağlar. Bu bölümler belirgin üniteler değildir, gerçekte çubuklar arası mine denilen boydan boya devam eden mine tabakasını oluştururlar. İkinci bölgeden yapılan sekresyon (Tomes' uzantılarının distal bölümünün bir yüzü), matriksle birlikte piti dolduracak olan mine çubuklarının formasyonunda rol alırlar. Çubuklar arası mine oluşumu her zaman daha sonradır çünkü mine çubukları kavitesiyle sınırlandırmak gerekir. Minenin her tarafı aynı kompozisyona sahiptir, mine çubukları ve çubuklar arası minenin sadece kristalit oryantasyonu farklıdır (Bartlett ve ark., 2006).

Tomes' uzantısının distal parçasının genel olarak mine tabakasının kalınlaşması esnasında uzadığına, çubuk çapının artması esnasında çubuklar arası kaviteye doğru sıkıştırılarak yavaş yavaş inceldiğine inanılır. Tomes' distal uzantısı sonunda dışarıya sıkışır, çubuklar ve çubuklar arası minenin arası boyunca dar bir alan oluşturup organik materyal doldurur ve çubuk kınını oluşturur. Tomes' uzantısının salgı yapan distal yüzeyi çubuk kını olmayan taraftadır. Salgı yüzeyiyle ilişki halinde oluşan çubuk kristalleri direk olarak çubuklar arası bölüme karşı oluşur ve sonuç olarak dar bir alanda çubuklar ve çubuklar arası kristaller birbirine karışır. Mine tabakasının dış kısmı oluştuğunda Tomes' uzantılarının distal parçasının şekli ve hücre gövdesiyle oryantasyonu değişir. Sonuç olarak mine tabakasının dış 1/3'ündeki mine çubukları biraz daha farklı bir profile ve düz bir yörüngeye sahiptir. Daha sonra ameloblastlar kısılır ve Tomes' uzantılarının distal bölümünü kaybeder; hücreler artık başlangıç mine tabakasının oluşturulduğu bu dönemde aynı görünüme sahiptir. Çünkü çubuklar Tomes' uzantısının distal bölümüyle ilişkide oluşur ve final mine tabakaları ilk baştakiler gibi çubuk içermez. Artık mine tabakası ince başlangıç ve final çubuk içermeyen (aprizmatik) mine tabakaları arasındaki çubuklu (prizmatik) mine şeklindedir. Başlangıç, çubuklar arası ve final minesini Tomes' uzantısının

proksimalinde bulunan aynı salgı yüzeyinden oluşur ve aslında bir süreci oluşturduklarına inanılmaktadır (Bartlett ve ark., 2006).

4.2.3.Olgunlaşma fazı

Mine, dişin oral kaviteye sürmesinden önce sertleşir. Fizikokimyasal özelliklerdeki bu değişim, yeni kristallerin oluşmasından değil amelogenesisin formasyon fazında oluşan kristallerin kalınlaşıp genişlemesinden kaynaklanır. Olgunlaşma sürecindeki kristal büyümesi matriks proteinleri ve mine sıvısının kaybedilmesiyle gerçekleşir. Amelogenesis, insan daimi dentisyonundaki bazı dişlerin kuren oluşumunun 5 yıl aldığı uzun bir süreçtir ve bu sürecin 2/3 kadarı olgunlaşma fazıdır. Olgunlaşma fazı ameloblastları kısadır ve tekrar eden gelişimsel tabakalar şeklinde çökelirler (Aoba ve ark., 1998).

Olgunlaşma fazı ameloblastları salgı sonrası hücreler olarak kabul edilse de hala protein sentezler ve salgılar. Bu ameloblastların golgi kompleksleri, bu tip bir aktiviteye uygun olarak, belirgin gözükürler. İlginç olarak bazı türlerdeki ameloblastlar bu fazın erken safhalarına kadar mine proteini salgılamaya devam ederler. Olgunlaşma fazı ameloblastlarında amelogenin ve ameloblastin için mRNA ve protein sinyali bulunmuştur. Bu proteinler protein sentezleyen ve yıkan organellerde immün saptacıydırlar. Amelogenin sinyallerinin sadece erken olgunlaşma döneminde bulunmasına rağmen ameloblastininkiler geç dönemlere kadar görülür. Major matriks uzaklaşması esnasında devam eden protein üretiminin önemi henüz belirlenememiştir (Aoba ve ark., 1998).

4.2.3.1.Geçiş fazı

Olgunlaşmamış mine tam kalınlığına ulaştıktan sonra ameloblastlar bir sonraki fonksiyonları olan mine olgunlaşması için belirgin morfolojik değişimlere girerler. Geçiş fazı kısaca ameloblastların boylarının kısalması, hacimlerinin ve organel içeriklerinin azalmasını içerir. Olgunlaşma fazı boyunca ameloblastlar programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) girerler. Sıçan dişlerinin özellikleri araştırmacılara bu olayla ilgili sayısal bilgi edinme imkanı vermiştir ve hücre ölümlerinin %25'inin geçiş fazında %25'inin olgunlaşma fazında olduğu bulunmuştur. İnsan dişlerindeki hücre kaybı miktarı bilinmemektedir. Sürmesi sınırlı ve sınırsız olan dişlerin amelogenesisindeki benzerliklerden dolayı tüm dişlerdeki ameloblast sayısının

olgunlaşma fazında düştüğü kolaylıkla tahmin edilebilir. Apoptoz da morfogenetik olayların bir parçası olarak mine düğümlerinde gerçekleşir (Aoba ve ark., 1998).

Hücre ölümü embriyonik gelişim ve organizma yaşamı boyunca gerçekleşen ana mekanizmadır. Embriyogenezde hücreler gelişimin belli zamanlarında sistemli morfogenezde izin vermek için ölür. Hücre ölümünün iki ana yolu, kazara hücre ölümü (nekroz) ve programlı hücre ölümü (apoptoz) 'dür. Şu an anlaşılmıştır ki programlı hücre ölümü, apoptozda tipik olan yapısal değişiklikler gösterilmeden de olabilir. Proteinlerin Bcl-2 ailesi apoptoz karşıtı ve apoptoz lehine proteinler içerir ve apoptozun ana düzenleyicisidir. Özelleşmiş proteinazlar (kaspaz) ayrıca hücresel yaşam yollarını inaktive eder ve ölümü destekleyen faktörleri aktive eder (Aoba ve ark., 1998).

4.2.3.2.Tam olgunlaşma

Ameloblastların bir sonraki aktivitesi suyun ve organik materyalin çoğunun uzaklaştırılması ve inorganik materyalin girişine izin verilmesidir. Bu hücrelerin görsel olarak en belirgin aktivitesi modülasyon, siklik yapımı, kaybı ve yüksek derecede invagine olmuş dalgalı sonlu apikal yüzey veya düzgün yüzeylerin tekrar yapımıdır. Modülasyon, özel zincirlerle ve gelişmekte olan dişin en az olgunlaşmış bölgesinden en olgun bölgesine geçen dalgalarla görülebilir. Mevcut çalışmalar ameloblastların bazı türlerde hızlı modüle olduğunu –her 8 saatte bir- dolayısıyla günde 3 tam modülasyon olduğunu gösterir. Modülasyonun önemi belirsizdir fakat mine organının geçirgenliğinin değiştirilmesi suretiyle mineral girişi ve organik matriks çıkışının gerçekleşmesi ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bir düşünceye göre, olgunlaşma esnasında devam eden mineral katılımıyla alakalı olan asidifikasyon, dalgalı sonlu ameloblastların bikarbonat üretmesiyle sonuçlanır. Bu süreç devamlı mine sıvısını alkalize ederek büyüyen kristallerin demineralizasyonunu önler, matriks azaltıcı enzimlerin fonksiyonu için gerekli pH seviyesini sağlar; bu pH nötrale yakın hafif asidiktir. Dalgalı sonlu ameloblastların proksimal bağlantıları gevşek, distal bağlantıları sıkıyken; düzgün sonlu ameloblastların distal bağlantıları gevşek, proksimal bağlantıları sıkıdır. Dalgalı sonlu ameloblastlar hatırı sayılır miktarda endositotik aktivite gösterirler ve çok sayıda lizozom, kalsiyum bağlayıcı proteinler ve membran ilişkili kalsiyum- adenozintrifosfataz (ATP) içerirler; olgun mineye kalsiyum pompalanmasına destek olurlar. Düzgün sonlanmalı ameloblastlarda ise

gevşek küçük proteinler ve diğer molekülleri içerir, az miktarda endositotik aktivite gösterir ve neredeyse hiç membran kalsiyum- ATP aktivitesi göstermezler. Düzgün sonlanma fazında doku içi sıvılar olgun mine içine sızabilir ve mine sıvısının pH nötralizasyonuna katkıda bulunabilir (Aoba ve ark., 1998).

Mevcut verilere göre aktif kristal büyümesi için kalsiyum iyonları gereklidir ve dalgalı sonlu ameloblastlardan geçiş zor olduğundan, bu iyonlar daha gevşek olan düzgün sonlu ameloblastlar boyunca geçerler. Mineral iyonlarının kristalle birleştirilmesi, dalgalı sonlu hücrelerle ilişki içinde gerçekleşir. Olgun mineden organik materyalin uzaklaştırılmasına gelecek olursak, güvenilir kaynaklara göre proteinlerin aktif ameloblastlar tarafından rezorbe edilmesi mine olgunlaşması sırasında gözlenen organik matriks kaybının ana mekanizması değildir. Bu mekanizma daha çok proteinleri mine tabakasını terk edebilecek kadar küçük fragmanlara ayıran, ekstraselüler çalışan büyütücü-küçültücü enzimlerin aktivitesine bağlanır. Mineyi terkeden polipeptit fragmanları düzgün sonlanmalı hücrelerin zayıf distal bağlantılarından geçer ve laterale diffüz ederek bazolateral yüzeylerinden alınmak için ameloblastların arasında ilerler. Hücreler dalgalı sonlu olduklarında proksimal bağlantı kompleksleri artık zayıf olduğundan laterale diffüz etmiş peptitlerin bazıları papiller tabakaya ve bazen daha da ötesine yayılır. Mine tabakasının bazı fragmanları dalgalı sınırın membran katlantıları tarafından endositoza uğrayabilir (Aoba ve ark., 1998).

Ameloblastlar geçiş fazını tamamlayıp modülasyon döngülerinin ilk serilerine geldiğinde artık düz olan apekslerinde bir bazal lamina oluşturur (bu aşamada Tomes' uzantısı bulunmaz). Bazal lamina, mine yüzeyine yapışır ve ameloblastlar da bazal laminaya hemidesmozomlar yardımıyla tutunur. Bu lamina glikoz bileşenlerinden zengin olarak bilinir fakat tam olarak doğasını anlamak için araştırmalara ihtiyaç vardır. Tip IV kollojen gibi bazal laminanın tipik bileşenleri henüz kesin olarak gösterilememiştir. Fakat bazal laminanın, hemidesmozom formasyonunda önemli, heterotrimer bir molekül olan laminin-5 içerdiği gösterilmiştir. Laminin-5 defekti olan hastalarda fokal mine hipoplazileri gözlenmiş ve laminin-5 fonksiyon duraksamasını hedef alan fare çalışmalarında ameloblastların ve mine formasyonunun görüntüsünün değiştiği görülmüştür. Bu esnada, özgün bir ameloblast salgı ürünü olan amelotinin salgı sonrası geçiş fazında salgılanmaya başladığı ve bazal laminada immünolokalize

olduğu görülmüştür. Bu durum kompozisyon ve fonksiyonda yapısal olarak özgünlüğü; adeziv rolün yanında yüksek glikozillenmiş moleküllerin varlığının laminaya, mine içine ve dışına geçecek olan materyalleri düzenlemeyi sağlayan yük seçici özellikler verdiği düşünülmektedir. Ayrıca bazal lamina, ameloblastlara dinamik mine kompartmanının durumu hakkında bilgi verebilecek şekilde konumlanmıştır (Aoba ve ark., 1998).

Bu noktada, iç mine epitelindeki hücrelerin yaşam döngüleri boyunca gerçekleşen fonksiyonları tekrarlamak faydalı olacaktır: Başlangıç olarak, hücreler dişin kuron paterninde yer alırlar (morfogenez); bu dönemde küçük, çekirdeği merkezde olan alçak bir sütun şeklindedir ve sık mitozla uğrarlar. Daha sonra hücreler morfolojik değişikliklere uğrayarak ameloblast olurlar (histodiferansiyasyon). Bu değişiklikler aktif mine proteini salgısının olduğu ve Tomes' uzantısı denilen hücre uzantılarının geliştirildiği bir sonraki faza hazırlık amacıyladır. Salgı fazı, mine olgunlaşması için hücrelerin yeniden yapılandığı kısa bir geçiş fazıyla devam eder ve ameloblastlar mine yüzeyine karşı düzgün ve dalgalı sonlanmalar oluşturdukları bir döngüsel varyasyona girer; dalgalı sonlanmalar inorganik materyal girişi yaparken düzgün sonlanmalar protein fragmanları ve su çıkışını sağlar. Son faz sürme zamanına kadar yeni oluşmuş mine yüzeyinin korunmasıdır (Aoba ve ark., 1998).

4.3.Ekstraselüler Protein Matrisi

Ekstraselüler matriks, salgılanma zamanı birçok gen ve sinyal yolları tarafından kontrol edilen protein ve proteinazlardan oluşur (Hu ve ark., 2005). Ameloblastlar tarafından salgılanan ana yapısal proteinler, amelogenin, enamelin, ameloblastin ve amelotin; proteinazlar, matriks metalloproteinaz-20 (MMP-20 veya enamelinisin) ve kallikrein-4 (KLK-4)'tür. Mine matriks proteinlerinin cDNA sıralarının izole edilmesini takiben mine formasyonunun moleküler temeli hakkındaki bilinenler belirgin derecede artmıştır. Bu proteinleri kodlayan genlerin kromozomal lokalizasyonları, eski çağlardaki genlerin orijinlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Amelogenin, enamelin ve ameloblastini kodlayan genler (AMEL, ENAM ve AMBN), salgısal kalsiyum bağlayıcı fosfoprotein (SCPP) gen ailesine aittir ve hepsi tek bir soy genden (SPARCL1) köken alır. AMEL, ENAM'ın dublikasyonu ile oluşan AMBN'den meydana gelir (Sire ve ark., 2007). Büyük olasılıkla amelotini kodlayan AMTN de ENAM'dan köken almaktadır. X kromozomunda lokalize olan AMEL

dışındaki tüm genler aynı kromozomda lokalize olmaktadır. Tüm bu mine proteinlerinin zamansal ve mekânsal ekspresyonu anlaşılmış ve nakavt ve tranjenik hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarla normal mine formasyonundaki kritik fonksiyonları belirlenmiştir. Fakat bu proteinlerin birbirleriyle, büyüyen kristallerle ve hücrelerle, memeli vücudundaki belirgin hiyerarşik yapıları oluşturmak için nasıl etkileşime girdikleri hala açıklığa kavuşmamıştır. Ameloblastlar normalde mine proteinleri içinde bulunmayan fakat amelogenesis esnasında önemli fizyolojik roller oynadığı düşünülen başka protein ve glikoproteinler de salgılamaktadır. Biglikan adı verilen küçük bir proteoglikan ve dentin sialofosfoprotein (DSPP) bunların arasında sayılabilir (Bartlett ve ark., 2006). DSSP genellikle amelogenesisin erken fazlarında salgılanır (Oldak, 2012).

4.3.1.Mine proteinleri

4.3.1.1.Amelogenin

Amelogenin, mine protein içeriğinin %90'dan fazlasını oluşturan organik mine matriksinin ana yapısal proteinidir. İnsan ve ineklerde amelogenin geni hem X hem Y kromozomunda bulunurken, kemirgenlerde sadece X kromozomunda bulunur. Bu durum, Y kromozomunda kodlanan amelogeninlerin etkileri ortadan kalktığı için, belli durumlardaki Amelx fonksiyonunu araştırmada fareleri en iyi hayvan modeli haline getirmiştir (Oldak, 2012). Amelx geni insanda, farede, inekte ve birçok farklı türde Arhgap6 geninin intronunun içinde lokalize olur (Prakash ve ark., 2005). İnsanda ve inekte, X kromozomu kaynaklı amelogenin proteini erkekte dominanttır. X ve Y kromozomlarındaki amelogenin genleri yedişer ekzon içerir ve en büyük olanı ekzon 6'dır. Amelogenin primer RNA transkripti, ekzon 1,2,3,5,6 ve 7'yi içeren en sık görülen amelogenin mesajıyla birçok türde geniş alternatif diziler oluşturur. Farede 16 farklı alternatif dizi ürünü tanımlanmıştır. Fare ve sıçanda ek olarak tanımlanan ekzon 8 ve 9 ve bunların protein ürünleri, amelogeninin sinyal fonksiyonuyla ilişkilidir (Baba ve ark., 2002). Amelogeninin N- ve C- terminal sonlanmaları yüksek derecede korunmuştur ve 360 milyon yıldır değişmemiş, kritik fonksiyona sahip kalıntılar içerir (Sire ve ark., 2005). Santral kısım dizilim açısından daha fazla varyasyon gösterir fakat lokasyonları korunmuştur. Gelişmekte olan minedeki amelogenin polipeptit popülasyonu, alternatif dizilimli varyantlar ve stabil izoformlar üreten proteolitik aktivitelerin varlığı nedeniyle heterojendir (Oldak, 2012).

İnsan genetik analizleri ve genetik olarak amelogenini çıkarılmış fare çalışmalarıyla bu proteinin tam bir mine formasyonu için kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Gibson ve ark., 2001). Araştırmacılar, hayvanda ve organ kültüründe amelogenin proteinin fonksiyon kaybını araştırmak için birbirinden bağımsız üç strateji geliştirmişlerdir: Yenidoğan farede kimyasal olarak modifiye edilmiş ribozomla amelogenin gen ekspresyonunun spesifik inhibisyonu (Lyngstadaas ve ark., 1995); organ kültürü (Diekwisch ve ark., 1993) ve gen çıkarılmış fare modelinde (Gibson ve ark., 2001) amelogenin translasyonunun antisens inhibisyonu. Tüm bu çalışmalar, amelogeninin mine kristali organizasyonu ve büyümesini kontrol etme fonksiyonu olduğu ve varlığının normal mine formasyonu için kritik olduğu hipotezini desteklemektedir. Ek olarak amelogenin dizilim defektlerinin defektli mine kristal formasyonu ve organizasyonuna yol açması ve korunmuş sonlanmaların silinmesinin bozuk yapıda kristal oluşumuna sebep olması, bu korunmuş alanların protein-protein veya protein-mineral etkileşimindeki önemini göstermektedir (Paine ve ark., 2003).

Amelogeninin, çok çeşitli hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmesi sonucu sinyal aktivitelerine sahip olduğu görülmüştür (Gibson, 2008; Veis, 2003). Bu özelliği, küçük bir izoform olan lōsin (Leu)’den zengin amelogenin peptidi (LRAP) vermektedir (Warotayanont ve ark., 2008). Amelogenin, kemik hücreleriyle de etkileşime geçer ve hücre diferansiyasyonunu indüklemeye potansiyelinden dolayı periodontal rejeneratif tedavilerde kullanılır (Deutsch ve ark., 2006). Yumuşak dokularda da amelogenin ekspresyonu rapor edilse de amelogenin geni çıkarılmış farelerde dental dokular dışındaki dokularda herhangi bir defekt gözlenmemiştir (Oldak, 2012).

4.3.1.2.Ameloblastin

Ameloblastin, SPARC (asidik ve sisteinden zengin salgı proteini)’den köken alan salgısal kalsiyum bağlayıcı protein grubundandır. Saf ameloblastin, 395 aminoasitlik bir glikoprotein olarak salgılanır (Chun, 2009). Organik matrikste en sık görülen ikinci proteindir ve total protein miktarının %5’ini oluşturur. Mine olgunlaşması fazında ekspresyon miktarı belirgin bir şekilde düşer (MacDougall ve ark., 2000). Sekresyonunu takiben MMP-20 proteinazı tarafından hızla parçalandığı için *in vivo* kaynaklardan izole edilemez (Chun, 2009). Bu sebeple amelogeninin yapısı ve fonksiyonu ile ilgili birçok deneysel veri mevcutken, ameloblastin için yapılan

alışmalar sınırlı sayıdadır (Iwata ve ark., 2007). Bu prolinden (Pro) zengin proteinin, salgı granüllerinden amelogeninle birlikte ekspresyonu, amelogenin ve non-amelogenin proteinlerin dizilimi ve transportunu düzenleyen mekanizmalar olduğunu ve ayrıca bu iki protein arasında fonksiyonel bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir (Zalzal ve ark., 2008). İki protein arasındaki etkileşim *in vitro* deneysel çalışmalarla saptanmıştır. Ameloblastin geni (AMBN) SCPP gen bulutunun bir üyesidir ve insan 4q kromozomunda bulunur (MacDougall ve ark., 2000).

Ameloblastin, yüksek oranlarda Pro (%15.2), Leu (%10.2) ve Glisin (Gly) (%9) içeren bir glikoproteindir. Ameloblastin ayrıca fosforillenmiştir ve hidroksi-prolin içerir (Yamakoshi ve ark., 2001). Alternatif dizilimli mRNA'dan iki izoform elde edilmiştir ve dizilim, ameloblastinin glikozilasyon durumunu belirler (Kobayashi ve ark., 2007). Amfibi hayvanlardan insanlara birçok türde, 86 aminoasit içeren N-sonlanma alanı ameloblastinin en korunmuş bölgesidir. İlginç bir şekilde, ameloblastin dizisinin, 129 aminoasitlik N-sonlanması ve 66 aminoasitlik C-sonlanması sebebiyle bipolar bir yapısı vardır. Bu iki alan 'yapısal olmayan' alan olarak adlandırılır ve proteolize uygun bölgelerdir (Vymetal ve ark., 2008). Domuzdaki ana ameloblastin izoformu 395 aminoasite sahiptir (Hu ve ark., 1997). N-sonlanması polipeptitleri stabilken, C-sonlanması polipeptitleri hızla çözünüp organik matriksten uzaklaşır (Oldak, 2012).

Nakavt fare modelinde, gerçek mine tabakası formasyon eksikliğinden dolayı, ameloblastinin apatit mineralizasyon kontrolündeki direk fonksiyonunu öğrenmek mümkün olmamıştır. Bu nakavt fare modelinde gen ve protein ekspresyonu tamamen ortadan kaldırılmamış, ekzon 5 ve 6 silinerek yüksek derecede korunan bir alan olan N-sonlanması eksik bir protein sekresyonu sağlanmış (Fukumoto ve ark., 2004; Wazen ve ark., 2009). Bu modelde, dentin üzerinde ince hipoplastik bir mineralize materyal birikimi olduğu görülmüştür. Bu hayvanlarda, ameloblast tabakasında gözlenen patoloji ve bağlantı epitelindeki defektler nedeniyle, ameloblastinin mine formasyonunda kritik bir öneme sahip olduğu sonucuna varılmış (Fukumoto ve ark., 2004). Ameloblastin, hücre adezyon özellikleri göstermektedir ve bu proteinin ameloblast hücre farklılaşmasını kontrol ettiğine inanılmaktadır. Fakat hücre ataşmanından sorumlu olduğu düşünülen motif, türler arasında korunmamaktadır. Domuz minesinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalara göre, ameloblastin N-

sonlanması parçalanma ürünleri (13- ve 17-kDa) kında veya çubuklar arası alanda görülür ve minenin çubuklu yapısının kontrolünde görev alır (Uchida ve ark. 1997). Sıçanlarda kın boşluğunda immüno-lokalizasyon gözlenmezken, ameloblast dış hattını takip eden balık ağına benzer bir bölünme görüntüsü rapor edilmiştir. C-sonlanma alanından kaynaklanan ameloblastin proteolitik ürünlerinin kalsiyum iyonlarına yüksek afinitesi vardır ve bu da mineralizasyon kontrolündeki muhtemel etkisini düşündürmektedir (Oldak, 2012).

4.3.1.3.Enamelin

İnsan enamelin geni (ENAM), 9 ekzon ve 8 introndan oluşur ve 1103 amino asitlik bir protein ile 39 amino asitlik bir sinyal peptidi kodlar. Enamelin, 186 kDa fosforlanmış prekürsör glikoproteindir. Büyük çoğunlukla mine organından ve az miktarda da odontoblastlardan eksprese olan dişe özel bir gendir (Oldak, 2012). Enamelin ekspresyonu mine formasyonunun üç ana fazı boyunca devam eder fakat amelogenin ekspresyonlarından önce sona erer (Hu ve ark., 2001). Daha bol miktarda ve genel olarak hidrofobik olan amelogenine kıyasla, enamelin daha az miktarlarda bulunur ve hidrofilik karakterlidir. Bilinen en büyük mine glikoproteindir ve amelogenin gibi enamelin kodlayan gen de SCPP gen ailesindendir. İnsan ENAM geni 4q21 kromozomunda bulunur (Hu ve ark., 2000). Olgun enamelin, salgılandıktan hemen sonra sisteinden zengin karboksi sonlanma peptitinden parçalanır ve parçalanma ürünleri izole edilmiş ve tanımlanmıştır (domuzdan) (Fukae ve ark., 1993). Enamelin parçalanma ürünleri orijinal amino sonlanmalarını korumaktadır ve 155, 142 ve 89 kDa molekül ağırlığındadır. 89 kDa enamelin, 32 ve 25 kDa enamelin meydana getirmek için işlenir. Domuzlarda en stabil olan ve tek çalışılan enamelin 32 kDa formudur ve iki fosfoserin ve üç glikozillenmiş asparagin içerdiği bilinir (Yamakoshi ve ark., 1998). Sisteinden zengin karboksi sonlanması ameloblast distal membranında konsantre olurken, 32 kDa enamelin gelişmekte olan domuz minesinin tüm kalınlığı boyunca gözlenir ve çubukta ve çubuklar arası minede birikim yapar. 36 türün enamelin dizilimlerini analiz eden evrimsel çalışmalar, memeli türlerinin 32 kDa segmentinde yüksek korunma gösterdiğini rapor etmekte ve bu polipeptidin kritik role sahip olduğu düşüncesini desteklemektedir (Al-Hashimi ve ark, 2009). 32 kDa alanındaki birikim fosforilasyon, glikozilasyon alanları ve proteolitik alanlar içerir.

32 kDa enamelin hidrofilik ve asidiktir. Pro (%18.8), Gly (%12.3), treonin (Thr) (%10.4) ve glutamik asitten (%9.4) zengindir (Hu ve Yamakoshi, 2009).

Enamelin proteininin sentezlenmediği nakavt farelerde gerçek bir mine tabakasının oluşmadığı görülmüştür (Hu ve ark., 2008). Heterojen hayvanlarda, başlangıç mineral depozisyonu gözlenmemiş, ‘tanımlanamayan’ kalsifiye materyal olarak tanımlanan patolojik ekstraselüler matriks mineralizasyonu görülmüştür. Heterojen fare deneyi, mineral miktarındaki hızlı düşüşün azalan enamelin ekspresyonu sebebiyle olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca nakavt fare modelinde ameloblastların organizasyon bozukluğu ve apoptozu rapor edilmiştir (Oldak, 2012).

4.3.1.4.Amelotin

Amelotin, en son keşfedilen mine glikoproteinidir ve fonksiyonu henüz tam olarak açıklanamamıştır (Iwasaki ve ark., 2005). Amelotinin, ameloblastlar ve mine matriksi arasında, bazal laminanın bir komponenti olarak, olgunlaşma fazı ameloblastları tarafından salgılandığı ve bağlantı epiteli hücreleri çevresindeki alanda lokalize olduğu rapor edilmiştir (Moffatt ve ark., 2006). Daha sonraki çalışmalar, amelotinin de diğer ekstraselüler matriks proteinleri gibi mine gelişiminin salgı fazında da salgılandığını ve lokalizasyonunun bazal laminayla sınırlı olmadığını göstermiştir (Gao ve ark., 2010). Ayrıca alternatif dizilim varyasyonlarına sahip amelotinler de tanımlanmıştır. İnsanlarda amelotin geni ameloblastin ve enamelinin salgılayan gen bulutunun yakınında olan 4q kromozomal alanında lokalize olur. Salgı fazından olgunlaşma fazına geçiş döneminde ekspresyon seviyesi hızla artan amelotin, ameloblastların azalmasıyla birlikte azalır (Oldak, 2012).

4.3.2. Mine proteinazları

Matriks metalloproteinaz-20 (MMP-20 veya enamelinin) ve serin proteinaz kallikrein-4 (KLK-4), amelogenin ve diğer mine proteinlerini işleme ve çözme fonksiyonuna sahip iki proteinazdır. Bu iki proteinazın mRNA ekspresyonlarının pik yaptığı dönemlerin ameloblastların farklı gelişim döneminde olması nedeniyle fonksiyonlarını amelogenesisin farklı fazlarında gösterirler (Lu ve ark., 2008). MMP-20, salgı fazının başlangıcından erken olgunlaşma fazına kadar salgılanırken, KLK-4 geçiş fazının başından olgunlaşma fazı sonuna kadar salgılanır. MMP-20, amelogenin, enamelin ve ameloblastini stabil ara ürünlere dönüştürürken, KLK-4, ekstraselüler matriks proteinlerini tamamen çözer. Son olarak kimotripsin C adı verilen ve mine

gelişimiyle ilişkili olduğu düşünülen yeni bir serin proteinaz tanımlanmıştır fakat mine proteinlerine karşı spesifik proteolitik aktivitesinin ne olduğuyla ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Lacruz ve ark., 2011).

4.3.2.1. Matriks metalloproteinaz 20 (MMP-20)

Enamelisin de denilen MMP-20, MMP'ler içinde dişe özgü olan tek proteinazdır ve farklı gelişimsel orijine sahip hücreler tarafından (ektoderm kaynaklı ameloblastlar ve mezenkim kaynaklı odontoblastlar gibi) salgılanırlar (Bartlett ve ark., 1996). İnsan MMP-20 geni 10 ekzondan oluşur ve insan kromozom 11q.22.3'te lokalize olan matriks metalloproteinaz gen bulutunun bir parçasıdır. MMP-20 yokluğunda oluşan mine ince ve hipoplastiktir, normal minenin 1/3 'ü kadar mineral, daha fazla protein ve su içerir (Caterina ve ark., 2002). MMP-20'si çıkarılmış farelerde, mine tabakası dentinden ayrılır ve defektif amelogenin yapım sürecine benzer bir şekilde organize olamamış çubuk paterni gözlenir. Bu farelerde, olgunlaşma fazının ortalarındaki mineral kazancı oranları normal mineden anlamlı derecede düşüktür (Smith ve ark., 2011). Genel kanı, MMP-20'nin erken salgı fazında kristallerin uzunlamasına büyümesini düzenlediği şeklindedir fakat bu fizyolojik fonksiyonun detaylı moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Fakat yapılan *in vitro* çalışmalar, MMP-20 fonksiyon mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacak bir takım bilgiler sunmaktadır. Genel olarak, MMP-20 fonksiyonu, spesifik bölgelerde mine matriks proteinlerinin çözünmesini sağlamaktır. MMP-20, amelogenini ilk olarak C-sonlanması alanından parçalayarak, hidrofilik C-sonlanma alanı eksik, kırılmış bir '20K' amelogenin oluşturur. Daha sonra N-sonlanmasıdaki TRAP, '13' amelogenini oluşturmak üzere çözünür (Ryu ve ark., 1999). Bu proteolitik aktiviteler, apatite daha az afinite gösteren ara ürünler oluşturmak suretiyle amelogenin-apatit etkileşimini etkiler (Sun ve ark., 2008). TRAP'in MMP-20 tarafından ortadan kaldırılması ayrıca amelogenin proteinin birleşmesini veya ayrılmasını da kontrol eder. Ayrıca apatit varlığı, reaksiyonu yavaşlatarak amelogeninin MMP-20 tarafından proteoliz oranını da etkiler (Sun ve ark., 2008). *In vitro* çalışmalar, proteoliz ve mineralizasyon süreci arasında yakın bir ilişki olduğuna dair ipuçları vermektedir (Uskokovic ve ark., 2008). Mine formasyonunun erken aşamalarındaki MMP-20 aktivitesi sonucu oluşan protein ara ürünleri, amorf kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin mineralize hidroksiapatite dönüşümünü tetikler (Oldak, 2012).

4.3.2.2.Kallikrein-4 (KLK4)

İnsan KLK4 geni 5 ekzon içerir ve 19q13 kromozomunda bulunan kallikrein gen bulutunun bir üyesidir. Prostat kontrolünde bir ekspresyonu olduğu için ‘prostaz’ olarak da adlandırılır (Nelson ve ark., 1999). Birincil fonksiyonu, MMP-20 aktivitesiyle ortaya çıkan amelogenin, ameloblastin ve enamelin proteolitik ürünlerini sindirmektir (Ryu ve ark., 2002). Mine proteinlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan bu sindirim fonksiyonu, minenin olgunlaşma sürecinde sertleşmesini sağlar. Bu görüşü destekleyen ilk kanıt, KLK4 ekspresyonunun mine proteinlerinin mine matriksinden uzaklaşmasıyla eş zamanlı olmasıdır. 32-kDa enamelin fragmanının MMP-20 aktivitesine karşı dirençliyken, KLK4’e karşı dirençli olmaması bu iki proteinazın birbirini tamamlayıcı özellikte olduğunu kanıtlar (Yamakoshi ve ark., 2006). KLK4 amelogenini parçalar ve MMP-20’nin aksine aktivitesi apatit kristallerinin varlığından belirgin bir şekilde etkilenmez. KLK4 nakavt farelerin fenotipi MMP-20 nakavt farelere göre daha az şiddetlidir (Simmer ve ark., 2009). KLK4’ü olmayan farelerin mine kalınlığı ve çubuk yapısı normaldir fakat sertleşmesinde gecikme ve mine-dentin sınırına yakın alanda daha çok göze çarpan bir mineralizasyon defekti mevcuttur. Fenotipinin şiddetinin az olmasının sebebinin, üçüncü enzimle birbirlerini tamamlayıcı etki göstermelerinin olabileceği düşünülmektedir (Oldak, 2012).

4.3.2.3.Kimotripsin C

Kimotripsin C, elastaz 4 olarak da bilinen bir serin proteazdır. Ana fonksiyonu pankreastaki tripsinin eliminasyonu ile ilgilidir. Sıçan ve farelerde büyük oranda mine formasyonunun olgunlaşma fazında salgılanan kimotripsinin ekspresyon paterni KLK4’e benzer, fakat ekspresyon miktarı daha azdır. Mine mineralizasyonunda rol aldığı düşünülmekle birlikte mine matriksi uzaklaştırılmasındaki spesifik fonksiyonu henüz açıklığa kavuşmamıştır (Lacruz ve ark., 2011).

4.4.Sıçanlarda Diş Gelişimi

Modern tıp biliminin ve biyomedikal araştırmaların gelişmesinde hayvan deneyleri önemli yer tutmaktadır. Deney hayvanlarının insan modeli olarak kullanılması, tıp bilimiyle paralel olarak ilerlemiştir (Zutphen, 2001).

Sıçan, maymun, domuz ve köpeklerin temel mekanizmaları insanlarla benzerlik gösterse de farklılıklar gözlenmektedir. Domuzların bakımı ve kooperasyonları zor olduğundan bu tür çalışmalarda nadiren tercih edilmektedir. Köpeklerin son yıllarda

deneylere dahil edilmesi sınırlandırılmış olup, maymunlar da pahalı olmaları ve bakımlarının zor olması nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Sıçanlar kolay üretilbilir olmaları, kolay barındırılabilirmeleri ve beslenmelerinin kolay, masraflarının az olması, histolojik hazırlık süreçlerinin diğer deney hayvanlarına oranla daha kolay olmasından dolayı sık olarak tercih edilmektedir (Ren ve ark., 2004). Ayrıca diş dokularındaki yapısal benzerlikler ve gelişim safhalarının benzer olması nedeniyle sıçanlar diş hekimliği çalışmalarında da tercih edilen hayvanlardır (Poole, 1987).

Prensip olarak tavşanımsıların ve kemirgenlerin diş yapıları diğer memeliler ve insanlarla benzer yapıları içerir. Bu yapılar mine, dentin, sement ve pulpadır (Poole, 1987).

Sıçanlarda dentisyon, süt ve daimi şeklinde ayrılmaz. Kesici ve molar dişlerden oluşan tek settir. Alt ve üst çenede ikişer tane olmak üzere toplam 4 kesici diş ve her çenede sağda ve solda üçer adet olmak üzere toplam 12 molar diş mevcuttur. Küçük azı ve köpek dişleri bulunmamaktadır (Poole, 1987).

4.4.1. Kesici dişler

Sıçan kesicilerinin formu lateral kesilmiş logaritmik spiral segmentine benzer. Kesici dişlerin kökleri yoktur fakat longitudinal olarak ikiye ayırabileceğimiz güçlü bir kurona sahiptirler. Labial konveks kısmı mineyle kaplıyken, kalan lingual konkav kısmı sementle kaplıdır. kuronun büyük bir kısmını oluşturan dentin ise mediolateral olarak sıkıştırılmıştır bir koni şeklindedir ve hafif lateralde konumlanır. Fonksiyon esnasında bu koninin apeksi atrizyon ile aşınır (fonksiyonel aşınma). Kemirme esnasındaki birbirini takip eden çenelerin öne ve arkaya hareketi sebebiyle lingual taraftaki yumuşak olan sement ve dentin hızla aşınırken labialdeki sert mine dokusu daha az aşınarak keskin bir bitiş sınırı oluşturur (Güner, 2012).

Diş, odontojenik epitel adı verilen merkezde bulunur ve primitif pulpanın bağ dokusunu içeren eliptik kından gelişir. Kesitsel alanı ve gelecek dişin dış hatlarını belirleyen bu epitel halkası hayvanın yaşamı boyunca proliferer olur. 150 günlük olana kadar belirli bir oranda boyu artan diş, hayvanın yaşını belirleyebilmektedir. Diş sürmesi oranları üst kesicilerde haftada 2.1 mm, alt kesicilerde haftada 2.8 mm'dir (Güner, 2012).

4.4.2.Molar dişler

Molar dişler de kesicilerle aynı gelişim safhalarına sahiptir fakat mine ve dentin büyümesi sürekli değildir (Güner, 2012).

Dental dokuların formatif organlarının proliferasyonu ve formatif hücrelerin histodiferansiyasyonu insan molarlarının gelişimine çok benzer. Büyüme paternindeki tek fark sıçanlarda tüberkül tepelerinin mineyle kaplı olmamasıdır. Bu minesiz alanlar esas olarak prenatal olarak oluşmuştur fakat fonksiyonel atrizyonla genişler. En büyük olan birinci moların formasyonu intrauterin 21. günde başlar. İkinci ve üçüncü molarların formasyonu sırasıyla 2. ve 14. günlerde başlar. Birinci moların apozisyonel büyümesi sıçan 10 günlükken tamamlanır. Dejenere olan mine organı nedeniyle daha sonra yeni mine oluşumu görülmez. Günlük primer dentin oluşumu tüberkül tepelerinde maksimum 16 µm, köklerde maksimum 2 µm'dur. 125 günde primer dentin oluşumu bittikten sonra dentinin merkezinde bulunan pulpadaki pulpal hücreler atrizyon stimulusuyla farklılaşıp sekonder dentini oluşturmaya başlar (Güner, 2012).

Sement oluşumu 35. günde, dişe gelen fonksiyonel stresin bir sonucu olarak başlar ve yaşam boyu devam eder. Bu yüzden molar dişlerin uzun köklerinin 1/3 veya daha fazlası sementten oluşur. Kök sayıları 3-5'tir (Güner, 2012).

Tablo 1: Albino sıçanlarda dentisyon gelişim kronolojisi

	Kesici dişler	Molar dişler		
		M ₁	M ₂	M ₃
Başlangıç	İU 14.gün	İU 13.gün	İU 14-15.gün	İU 20.gün
Histodiferansasyon	İU 18-19.gün	İU 20.gün	İU 21-22.gün	8-10.gün
Dentin apozisyonu	İU 20-21.gün	İU 20-21.gün	1-2.gün	13-14.gün
Kuronun tamamlanması	Ömür boyu	11.gün	13.gün	21.gün
Bifurkasyon başlaması	-	14-16.gün	16-18.gün	24.gün
Oral kaviteye sürme	10.gün	19.gün	22.gün	35.gün
Fonksiyonel okluzyon	16.gün	25.gün	28.gün	40.gün
Pigmentasyon	28-30.gün	-	-	-

4.5.Gelişimsel Mine Defektleri

Mine formasyonu veya amelogenesis, diş gelişiminin geç çan safhasında iç mine epitelinden özel mine formasyon hücreleri olan ameloblastların farklılaşmasıyla başlar. Mine formasyonunun başlangıç aşaması, ameloblastlar tarafından amelogenin ve ameloblastin gibi daha sonra mineralize olacak olan mine matriksini oluşturan mine proteinlerinin salgılanmasıdır. Mine matriksi oluşuktan sonra, ameloblastlar su ve proteinlerin çıkışı ve mineral girişini regüle eder. Amelogenesis sırasında oluşan hücresel ve biyokimyasal olaylar komplekstir ve genetik değişikliklerin yanında sistemik ve lokal çevresel faktörlerden de etkilenebilirler (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine formasyonu sırasında oluşan anomalilere genel olarak gelişimsel mine defektleri denir. Defektin tanımı ve şiddeti hasarın mine gelişiminin hangi safhasında gerçekleştiğinin yanı sıra hasara maruz kalınan süreye de bağlıdır. Kantitatif eksiklikler genellikle matriks formasyonu esnasındaki bozukluklardan kaynaklanır ve mine hipoplazileri olarak bilinir. Pitler, yarıklar, ince veya eksik mine şeklinde kendini gösterebilir. Kalitatif değişiklikler ise minenin mineralizasyon eksiklikleridir ve diffüz veya sınırları belirgin translusentlik veya opasite ve beyaz, sarı veya kahverengi renklenme şeklinde görüntü verirler. Genel olarak minenin gelişiminin erken fazlarında hasar etkenlerine karşı daha hassas olduğuna inanılmaktadır. Mine formasyonunun salgı fazında meydana gelen duraksamalar genellikle oluşan minenin miktarını azaltır ve mine hipoplazisi olarak adlandırılır. Son aşamalarda meydana gelen duraksamalar mine mineralizasyonunda azalmayla sonuçlanır ve klinik olarak opasiteler şeklinde görüntü verir (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Tablo 2: Süt dişlenme kronolojisi (Nelson ve Ash 2010, uyarlanmıştır)

Diş Çeşidi	Sert Doku Formasyonu Başlangıcı (İntrauterin-Hafta)	Doğumda Oluşmuş Mine Miktarı	Minenin Tamamlanması (Doğum sonrası-Ay)	Sürme (Ay)	Kök Gelişiminin Tamamlanması (Yıl)
<i>Maksillar</i>					
Santral Kesici	13 - 16	Altıda beş	1½	8 - 12	1½
Lateral Kesici	14⅔ - 16½	Üçte dört	2½	9 - 13	2
Kanin	15 -18	Üçte bir	9	16 - 22	3
Birinci Molar	14½ - 17	Oklüzal kalsifikasyon tamamlanmış ve kuron hacminin yarısı veya dörtte üçü tamamlanmış	6	13 - 19	2½
İkinci Molar	16 - 23½	Oklüzal kalsifikasyon tamamlanmamış ve kalsifiye doku kuron hacminin beşte biri	11	25 - 33	3
<i>Mandibular</i>					
Santral Kesici	13 - 16	Beşte üç	2½	6 - 10	1½
Lateral Kesici	14⅔ - 16	Beşte üç	3	10 -16	1½
Kanin	16 - 17	Üçte bir	9	17 - 23	3
Birinci Molar	14½ - 17	Oklüzal yüzey kalsifikasyonu tamamlanmış	5½	14 - 18	2
İkinci Molar	17 - 19	Oklüzal yüzey kalsifikasyonu tamamlanmamış	10	23 - 31	3

Tablo 3: Daimi dişlenme kronolojisi (Nelson ve Ash 2010, uyarlanmıştır)

Diş Çeşidi	Sert Doku Formasyonu Başlangıcı (İntrauterin- Hafta)	Minenin Tamamlanması (Yıl)	Sürme (Yıl)	Kök Gelişiminin Tamamlanması (Yıl)
<i>Maksillar</i>				
Santral Kesici	3 - 4 ay	4 - 5	7 - 8	10
Lateral Kesici	10 - 12 ay	4 - 5	8 - 9	11
Kanin	4 - 5 yıl	6 - 7	11 - 12	13 - 15
Birinci Premolar	1½ - 1¾ yıl	5 - 6	10 - 11	12 - 13
İkinci Premolar	2 - 2¼ yıl	6 - 7	10 - 12	12 - 14
Birinci Molar	Doğumda	2 - 3	6 - 7	9 - 10
İkinci Molar	2½ - 3 yıl	7 - 8	12 - 13	14 - 16
Üçüncü Molar	7 - 9 yıl	12 - 16	17 - 21	18 - 25
<i>Mandibular</i>				
Santral Kesici	3 - 4 ay	4 - 5	6 - 7	9
Lateral Kesici	3 - 4 ay	4 - 5	7 - 8	10
Kanin	4 - 5 ay	6 - 7	9 - 10	12 - 14
Birinci Premolar	1¾ - 2 yıl	5 - 6	10 - 12	12 - 13
İkinci Premolar	2¼ - 2¾ yıl	6 - 7	11 - 12	13 - 14
Birinci Molar	Doğumda	2½ - 3	6 - 7	9 - 10
İkinci Molar	2½ - 3 yıl	7 - 8	11 - 13	14 - 15
Üçüncü Molar	8 - 10 yıl	12 - 16	17 - 21	18 - 25

4.5.1.Süt dentisyonda mine defektleri

Mine formasyonu bireylerin hayatının hatırı sayılır bir süresinde devam eden bir süreçtir. Süt dentisyonda intrauterin hayatın 15-19. haftalarında kesici dişlerin insizal kenarlarından başlar ve 25-33. aylarda ikinci süt molarların mine oluşumuyla sona erer. Bu uzun mine gelişimi sürecinde birçok faktör mine formasyonu sağlayan hücreleri etkileyerek anomalilere sebep olabilir. Minenin kendini yenileme özelliği olmadığı için formasyon sürecinde oluşan bozukluklar yüzeyde görünür defektler olarak kalırlar. Minenin bu tip gelişimsel defektleri klinik olarak belirgin bir görüntü verir. Anterior dişlerdeki defektler estetik problemlere yol açar, şiddetli hassasiyete sebep olur ve çiğneme fonksiyonunu etkiler. Süt dişi mine defektleri günümüzde erken çocukluk çağı çürüklerinin majör risk faktörü olarak gösterilmektedir (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine formasyonu veya amelogenesis ameloblastların iç mine epitelinden farklılaştığı geç çan safhasında başlar. Mine formasyonunun başlangıç safhalarında ameloblastlar, daha sonraki süreçlerde mineralize olacak olan amelogenin ve ameloblastin gibi spesifik proteinleri salgılar. Mine matriksinin oluşumundan sonra ameloblastlar su ve proteinlerin uzaklaştırılıp mineral depolanmasını regüle ederler. Amelogenesis sürecinde görülen kompleks hücresel ve biyokimyasal olaylar çok hassas olup genetik, sistemik ve lokal çevresel koşullardan kolaylıkla etkilenebilirler (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine formasyonu sırasında oluşan anomalilere ortak olarak gelişimsel mine defektleri adı verilir. Defektin görünümü ve şiddeti minenin gelişim sürecinin hangi aşamasında ve ne kadar süreyle etkene maruz kaldığına göre değişir. Kantitatif eksiklikler genelde matriks formasyonu sırasında oluşur, mine hipoplazisi olarak adlandırılır, pit ve fissürlerde görülebilir, ince mine oluşumuna ve mine eksikliklerine sebep olur. Kalitatif mine defektleri ise genelde gecikmiş mine mineralizasyonu ile ilgilidir. Minenin translusentliği veya opasitesi etkilenir, diffüz veya sınırları belirgin, beyaz, sarı veya kahverengi olabilir. Genel olarak mine formasyonunun erken safhalarında oluşan defektlerin daha şiddetli olduğu düşünülür. Salgı fazındaki duraksamalar mine oluşum miktarını azaltır ve mine hipoplazisi oluşturur. Final aşamalarındaki duraksamalar ise azalmış mineralizasyonla karakterizedir ve minede opasiteler görülür (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine defektleri minedeki değişimi gösteren kalıcı kayıtlardır ve defektin lokalizasyonu mine formasyonunun duraksadığı zaman hakkında ipucu verir. Tam zamanı belirlemek zor olsa da süt dişi kuronlarının gelişim kronolojisini bilmek defekt etkeninin zamanlamasını tahmin etmemize yardımcı olur. Tablo 2’de görüldüğü üzere süt dişi mineralizasyonu intrauterin hayatta 15-19. haftalarda kesici dişlerle başlar, 16-22. haftalarda kaninler, 19-22. haftalarda birinci süt molarlar ve 20-22. haftalarda ikinci süt molarlarla devam eder. Doğumda santral kesicilerin 3/4’ü , lateral kesicilerin 2/3’ü, kaninlerin 1/3’ü oluşmuştur. Ayrıca doğumda birinci süt molarların tüberkül tepeleri oluşmuş, ikinci süt molarların tüberkül tepeleri başlangıç mineralizasyon fazındadır. Tablo 2 ayrıca kuron oluşumlarının süt kesicilerde 3. ayda, birinci süt molarlarda 6. ayda ve ikinci süt molarlarda 12. ayda tamamlandığını göstermektedir. Kuron tamamlanmasından sonra yeni oluşmuş mine olgunlaşma sürecine girer ve bu süreç erüpsiyon sonrası dönemde de devam eder (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Prenatal ve postnatal oluşan mine arasında neonatal çizgi denilen bir alan vardır. Bu anormal mine bandı komşu mineye göre daha fazla organik materyal içerir ve mine çubukları organize değildir. Süt dentisyonun kalsifikasyonu doğumdan önce başlar ve neonatal çizgi genelde tüm süt dişlerinde bulunur. Eğer doğumda bir zorluk veya fetal stres olduysa bu alan klinik olarak da görülebilir. Perinatal hastalıklarla ilgili olan mine defektleri neonatal çizgide konumlanır (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.5.1.1.Prevalans

Gelişimsel mine defektlerini sınıflamak için bir çok indeks bulunmasına rağmen en popüler olanı açıklayıcı bir indeks olan ve etiyolojiye göre sınıflama yapmayan Gelişimsel Mine Defektleri İndeksidir. Bu indeksin basitleştirilmiş hali gibi birçok modifikasyonu yapılmıştır. Gelişimsel mine defektlerindeki bölgesel prevalans farklılıklarının defekti tanımlayan kriterlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca populasyonlar arasındaki genel sağlık, florid kullanımı gibi faktörler arasındaki farklılıkların da prevalans varyasyonlarına neden olduğu düşünülmektedir. Ek olarak bir çok çalışmada çürük lezyonu veya yapılan restorasyonlar nedeniyle defekti klinik olarak teşhis edip kayıt altına almada zorluklar yaşanmıştır. Son olarak çalışmanın yapıldığı sahadaki ışık yeterliliği, dişin kurutulup incelenmesi gibi faktörler de rapor edilmiş prevalansta farklılıklar yaratmıştır (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Sadece birkaç yüksek kalitede çalışma olması nedeniyle süt dişi mine defektlerinin gerçek prevalansı belirsizdir. Çoğu prevalans çalışması genel veya medikal olarak riskli özel bir popülasyondan alınmış müsait örneklerle dayanır. Süt dişlerinde gelişimsel mine defektleri prevalans çalışmaları incelendiğinde farklı ülkelerin ve popülasyonların prevalansları arasında önemli farklılıklar görülmüştür (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.5.1.2.Dağılım

3200 süt dişinde yapılan bir çalışmada süt dişlerinin %5 'inde gelişimsel mine defektine rastlanmıştır. Sırasıyla en sık görülen alt ikinci süt molardan sonra, üst ikinci süt molar, alt süt kanin, alt birinci süt molar, üst birinci süt molar, üst süt santral ve lateral kesiciler ve üst süt kanin gelmektedir. Alt süt lateral ve kaninlerde çok az oranda mine opasiteleri şeklinde defektlere rastlanmıştır. Süt dişlerinde en sık görülen defekt şekli sınırları belirgin opasitelerdir. Bu defektleri diffüz opasiteler ve mine hipoplazileri izler. Başka bir çalışmada mine hipoplazilerinin en sık üst süt santral ve laterallerde (%41 ve %39), daha sonra üst süt kaninler (%26), üst süt birinci molarlar (%22) ve alt birinci süt molarlarda (%19) görüldüğü bildirilmiştir (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.5.1.3.Etiyoloji

Tablo 4'te süt dişlerinde ve daimi dişlerde görülen gelişimsel mine defektleriyle ilgili olan bir çok durum gösterilmektedir. Amelogenesis imperfekta gibi herediter durumlar mine formasyonunda rol alan genlerdeki anomaliler sonucu oluşmaktadır. Diğer herediter formları ailesel bozukluklar ve sendromlar sonucu görülür. Kazanılmış sistemik durumlar perinatal, neonatal veya postnatal olabilir. Doğum travması, metabolik durumlar ve enfeksiyonlar örnek olarak gösterilebilir. Hamilelik döneminde görülen şiddetli D vitamini eksikliği ve sifilis de şiddetli gelişimsel mine defektlerine neden olur. Travma ve radyasyon gibi oral kavitenin lokal faktörleri de süt dentisyonu etkileyebilir. Fakat kazanılmış sistemik durumlar ve gelişimsel mine defektleri arasındaki ilişkinin kanıtları ana olarak klinik çalışmalara ve vaka raporlarına dayanır. Kesin olarak mine üzerindeki etkisi kanıtlanmış tetrasiklin gibi birkaç etken vardır (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Tablo 4: Süt dişlerinde ve daimi dişlerde görülen gelişimsel mine defektleri etiyojileri

GENERALİZE FAKTÖRLER
1. Kalıtsal
Amelogenesis imperfekta
Mine defektiyle görülen generalize sendrom
2. Kazanılmış perinatal, neonatal ve postnatal durumlar
Hamilelik sürecindeki sitomegalovirüs enfeksiyonu, D vitamini eksikliği gibi maternal durumlar
Doğum travması
Prematüre doğum
Dudak damak yarığı
Beslenme yetersizlikleri
Böbrek ve karaciğer bozuklukları: renal yetmezlik, biliar atrezi gibi
Çölyak hastalığı
Endokrin bozukluklar: hipokalsemi, hipoglisemi gibi
Bakteri, virüs ve mantar enfeksiyonları
Kimyasallar ve toksinler
Diğer sistemik durumlar
LOKALİZE FAKTÖRLER
Travma
Radyasyon
Lokal enfeksiyonlar

4.5.2.Daimi Dentisyonda Mine Defektleri

Kalsifikasyona başlayan ilk daimi diş birinci molardır. Bu olay doğumla birlikte başlar ve daha sonra santral kesicilerden kaninlere doğru ön dişlerde 4. ve 6. aylar arasında devam eder. 10-12. aylar arasında kalsifiye olan üst lateral kesiciler istinadır. 6 yaş civarı birinci molarlar sürmeye başlar ve 14 yaşlarında çoğu çocuğun 3. molarları

hariç tüm daimi dişleri ağızındadır (Tablo 3). Daimi dişlerde gelişimsel mine defekti etiyolojisi olarak birçok faktör gösterilmiştir (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.5.2.1.Prevalans

Gelişimsel mine defektlerinin prevalansını rapor etmek için en sık kullanılan sistemler ağız ve diş prevalans sistemleridir. Ağız prevalans sisteminde bir bireyin en az bir etkilenmiş dişinin olması dikkate alınırken diş prevalans sistemi her insanın etkilenmiş diş oranını da gösterir. Ağız prevalansı figürleri bir popülasyondaki mine defekti dağılımını yansıtır, hafif veya şiddetli etkilenen bireyler aynı gruptadır. Diş prevalansı etkilenen diş oranını yansıttığı için durumun şiddetini de ortaya koyar (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.5.2.2.Etiyoloji

Mine morfogenezi mine matriks proteinlerinin salgılanmasıyla başlayan mineralizasyon ve olgunlaşmayla devam eden kesintisiz kompleks bir süreçtir. Bu süreç molarlarda tüberkül tepelerinden, kesici dişlerde insizal uçlardan başlayarak servikal alanlara doğru devam eder. Mineralizasyonun kuronlar boyunca nasıl ilerlediği hala tam olarak anlaşılamamıştır. Oluşan defektin oluşma zamanını belirlemek, sistemik bozukluklar sebebiyle olan spesifik duraksamalarla ilişkilendirmek açısından önemlidir. Mine oluşumunun farklı fazlarında oluşan duraksamalar, farklı klinik görünüm ve yapısal değişiklik gösteren mine defektleri ile sonuçlanır. Mine matriksinin defektif oluşumu kantitatif bir defekt olan hipoplazi ile sonuçlanır ve genel bir kalınlık azalması veya pit oluşumu şeklinde görülür. Defektif kalsifikasyon tamamen oluşmuş organik mine matriksinde görülen kalitatif bir defektir ve hipomineralizasyon adını alır. Klinik olarak mine rengi ve translusentliğinde değişiklik olarak görüntü verir ve sınırları belirgin veya diffüz mine opasiteleri görülür (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine defektlerinin etiyolojisi lokal, sistemik, genetik veya çevresel faktörler olarak sınıflandırılrsa da genellikle multifaktoriyal olarak gelişir. Bu da birçok gelişimsel mine defekti vakasında tek bir sebep tanımlamayı zorlaştırır. Etkene maruz kalınan zaman dilimi ve sebep olan faktörü destekleyen mekanizmalar bu defektlerin tanımlanmasında önemlidir. Bir veya birkaç diş kapsayan defektler, o bölgedeki süt dişinin hasar görmesi gibi (travma, enfeksiyon vb.) lokal etiyolojik faktörleri akla getirir. Sistemik faktörler ise etkenin oluşma zamanında gelişmekte olan tüm dişleri

etkiler ve kronolojik defekt olarak da tarif edilebilir. Genetik faktörler ise ayrı olarak değerlendirilebilir. Genetik faktörler sebebiyle olan defektler genele dağılmıştır ve hem süt hem de daimi dentisyonu etkiler. Sadece mine defekti olarak görülebileceği gibi genel genetik bozukluklar/sendromlar olarak da görülebilmektedir (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

Mine defektleri klinik olarak sınırları belirgin veya diffüz opasiteler ve hipoplazi olarak sınıflanır. Defektin lokasyonu etkenin amelogenesisin hangi evresinde ortaya çıktığına göre değişir. Genel kanı, sınırları belirgin veya diffüz, rengi beyaz, krem rengi veya sarı olan izole mine defektlerinin amelogenesisin mineralizasyon fazında oluşan bir duraksamadan kaynaklandığı yönündedir. Bu defektin bütün diş yüzeyinde değil izole bir alanda oluşmasının sebebi ise hala açıklanamamıştır. Hipoplazi ise minenin parsiyel olarak mineralize olduğu salgı fazında oluşan bir duraksamadır. Aynı görünümdeki mine defektleri, çeşitli etiyolojik faktörler nedeniyle oluşabilmektedir. Ayrıca aynı etiyolojik faktör ortaya çıkış zamanına bağlı olarak farklı defektler de oluşturabilmektedir. Süt dişi travmaları bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Üst anterior süt dişlerinin yaşamın ilk yılından önce intrüze olduğu durumlarda daimi dişin kuronunda mine kayıpları ve kökte veya kuronda dilerasyonlar gözlenirken aynı travma geç okul öncesi dönemde daimi dişte sadece izole labial hipomineralize mine opasiteleri oluşturur (Drummond ve Kilpatrick, 2014).

4.6.Kronik Stres

Hamilelik sürecindeki stres oluşturan durumlar, yavrularda büyüme ile ilgili, davranışsal ve fizyolojik yanıtlara yol açabilmektedir (Liaudat ve ark., 2015). Kraniofasiyal gelişim, düzenleyici ve yapısal genler ile çevresel faktörler arasındaki dinamik etkileşim sonucu gerçekleşmektedir. Genetik olarak sıkı kontrol altındaki bu etkileşim, gebelik dönemi travmalarını da içeren çevresel faktörlere karşı oldukça hassastır. Intrauterin hayatın majör ve en sık karşılaşılan, uzun dönem etkileri görülebilen durumu, strese maruz kalmaktır. Stres, değişen çevrelerde hemostaz devamlılığını psikolojik, çevresel ve/veya fizyolojik kaynaklarla tehdit eden allostatik yüklem olarak tanımlanmaktadır. Stresin farklı çeşitleri büyüme ve gelişimi etkileyecek çeşitli yanıtlara sebep olabilmektedirler (Aminabadi ve ark., 2015).

Deneyisel çalışmalar ve insan epidemiyolojik çalışmalarını da içeren bir çok araştırma, prenatal dönemde maruz kalınan çevresel faktörlerin, yaşam boyu gelişim

sürecini etkilediğini göstermiştir. Bu çevresel faktörler, organizmaların ontogenezeine etki eder ve postnatal plastisiteyi oluşturmada önemlidir. Bununla uyumlu olarak memelilerin, hipotalamik üst kıyazmatik çekirdekte bulunan sirkadiyen saatle ilişkili çevresel ışık döngüsüyle senkronize oldukları bilinmektedir. Sonuncu çekirdek çevresel sinyalleri birleştirerek günlük varyasyonlara uyumlu sirkadiyen ritimler oluşturur. Bu karmaşık süreç, nörotransmitterler, sitokinler ve hormonlar vasıtasıyla çevresel bilgiler verdiği üç fizyolojik sistemi (sinir, immün ve endokrin) birbirleriyle birleştirir veya birbirlerinden ayırır. Bu çevresel bilgiler anneden fetusa erken gelişim sürecinde geçer ve yenidoğanın postnatal yaşamdaki plastisitesini programlar. Prenatal çevre, zayıf plasental fonksiyon, maternal enfeksiyon veya annenin strese maruz kalması gibi belirli durumlardan olumsuz etkilenebilmektedir. Bu yüzden fetal hayatta maruz kalınan kronik stres optimal yavru gelişimi için yıkıcı bir faktördür ve uzun veya kısa dönem nöroendokrin, biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal süreçlerde temporal organizasyon eksikliklerine sebep olabilirler (Fontanetti ve ark., 2013).

4.7.Bisfenol A

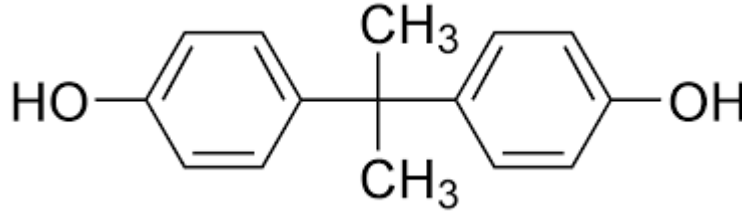
Evsel ürünlerde kullanılan polikarbonat plastiklerin yapı malzemesi, polivinil klorid (PVC) plastiklerin katkı maddesi olan yiyecek içecek kaplarının iç kaplaması ve diş tedavi malzemelerinde bulunan BFA'nın ilk keşfi 1891 yılında gerçekleşmiştir. 1930'lu yıllarda östrojenik etkileri bulunmuştur. CD, DVD, elektronik malzemelerin kaplanması, kağıt kaplamaları, spor malzemeleri ve otomobillerde de ek kullanım alanlarına sahip olan BFA, bugün en fazla kullanılan kimyasallardan biridir (Markey ve ark., 2001).

Günlük hayatta sıklıkla kullanılan plastikler, polimerik yapılardır. Polimerler, yapısında karbon, hidrojen, oksijen atomları ve silikon bulunduran monomerlerden meydana gelirler. Bu polimerler pek çok monomerin ısıtılıp birlikte polimerize edilmesiyle oluşturulurlar (Halden, 2010). Bu plastiklerin ucuz olması, üretimi için az enerjiye gereksinim duyması, hafif olması ve biyoyumlu olması medikal ekipmanların %85'ini oluşturan tek kullanımlık malzemeler için ideal olmasını sağlamıştır. Plastikler ayrıca yumuşak, transparan, esnek veya biyolojik olarak bozulan ve çeşitli tipleriyle yeniliğe açık bir materyal olması sayesinde doku mühendisliğinde, absorbe olan suturlarda, protezlerde ve diğer medikal

aplikasyonlarda da kullanılabilmişlerdir (North ve Halden, 2013). Fakat bu maddelerin çok geniş kullanımları, insan sağlığı ve çevre açısından, BFA gibi monomerik yapı taşlarının yanında içerdikleri çok miktardaki katkı maddesinden kaynaklanan riskler teşkil etmektedir (Halden, 2010).

4.7.1.BFA'nın yapısı

Moleküler formülü; $C_{15}H_{16}O_2$. Beyaz veya açık kahverengi görünümlü tanecikler veya pudralar şeklinde görünür.



Şekil 2: BFA'nın kimyasal yapısı

BFA, parapozisyon durumunda iki hidroksil grubu içeren bir difenil bileşiği şeklinde kimyasal bir yapıdan oluşur (Kadoma ve Fujisawa, 2000). İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH ve yüksek sıcaklıktaki kondensasyonu ile elde edilen, sonuçta iki fonksiyonel fenol grubu bulunan organik bir çevresel ajandır.

BFA elde etmek için asitle ve alkaline katalizlenen reaksiyonlar şeklinde iki yol mevcuttur. Ancak endüstriyel üretimde oluşan yan ürünü en aza indirmek için asitle katalizleme tercih edilir. BFA, yüksek saflıkta polikarbonat imalatında ve daha düşük saflıkta epoksi reçine imalatında kullanılan olmak üzere iki farklı kalitede üretilmektedir (Michalowicz ve Duda, 2007).

4.7.2.BFA'nın genel sağlık üzerine etkileri

BFA, polikarbonat plastik üretimi, yiyecek ve içecek kutuları ve ambalajları, fissür örtücülerde ve diğer plastıklara ek olarak kullanılan bir monomerdur. BFA, dünya çapında en fazla üretilen kimyasallardan biri olup, 2003'teki üretim kapasitesi 2.2 milyon metrik ton olarak tespit edilmiştir ve yılda %6-10 artış beklenmektedir (Richter ve ark., 2007). Bu artışla birlikte insan popülasyonu devamlı ve kaçınılmaz bir şekilde günlük yaşamlarında BFA'ya maruz kalmaktadır (Song ve ark., 2014). BFA'nın polimerizasyonu tamamlanmadığı için ürünler içerisinde bağlanmamış BFA

monomerleri bırakmaktadır. Bu nedenle BFA özellikle ısı varlığında, asidik ortamlarda veya normal koşullarda yiyecek ve içeceklere geçiş yapmaktadır. Ayrıca solunum yoluyla da geçiş olabilmektedir. Fakat ürede tespit edilen yüksek BFA düzeyleri, birincil alım yolunun sindirim olduğunu göstermektedir (Gao ve Wang, 2014; Ranjit ve ark., 2010).

BFA endokrin bozucu kimyasal olarak tanımlanmaktadır ve östrojen benzeri yapıya sahiptir. Bu ekzojen ürün, hormon dengelerini ve normal endokrin sistemi kesintiye uğratarak insan ve hayvanlarda sağlık sorunlarına yol açar (Bonefeld-Jørgensen ve ark., 2007). Artan çalışmalar ışığında BFA'nın insan sağlığına etkisinin karmaşık, maruz kalma süresiyle ve dozuyla bağlantılı ve cinsiyete bağlı değişken olduğu söylenebilmektedir. (Song ve ark., 2014).

BFA'nın etkileri maruz kalan hayvanın gelişiminin hangi evresinde olduğuna göre değişir. Yetişkin dönemdeki maruz kalımlarda görülen etkiler genellikle geri dönüşümlüdür ve 'aktivasyonel etkiler' adını alır. Organ gelişimi sürecindeki alımlar sistemleri etkileyerek kalıcı hasarlar oluşturabilir ve 'organizasyonel etkiler' adını alır. Bu etkilerin bazıları maruz kalınan dönemde gözlenebilirken, bazıları yetişkin dönemde ortaya çıkar (Richter ve ark., 2007).

Son yıllarda yapılar çalışmalarda BFA'ya maruz kalmanın birçok sistemi etkilediği gösterilmiştir. Diabet, obezite, infertilite, kanser ve otizm gibi prevalansı artan birçok hastalığın BFA ile ilişkisi araştırılmıştır. BFA birçok organı ve üreme, cinsiyet belirlenmesi, beyin gelişimi ve davranışlar gibi fizyolojik fonksiyonları etkiler. Göğüs kanseri riskini arttırdığı ve obeziteye yatkınlığa sebep olduğu da gösterilmiştir (Jedeeon ve ark., 2013). Lihong Jia ve arkadaşlarının hamile sıçanlarla yaptıkları çalışmada BFA verilen sıçanların yavrularının ağırlıklarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu, kan glikoz ve insülin seviyelerinin daha yüksek olduğu ve adiposit hücrelerinin daha büyük olduğu bulunmuştur (Song ve ark., 2014). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda üre BFA seviyeleri yüksek olan kişilerin koroner kalp hastalıkları, anjina pektoris ve kalp krizi oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Gao ve Wang, 2014). Hayvan çalışmalarında prenatal dönemde BFA'ya maruz kalmış anne sıçanların yavrularında meme bezi gelişiminde gecikme görülmüştür (Kass ve ark., 2014). Jessica J. Connelly ve arkadaşları prenatal dönemde yüksek doz BFA'ya maruz kalmış erkek sıçanların hafızasının negatif etkilendiğini belirtmiştir

(Wolstenholme ve ark., 2011) BFA'nın hiperprolaktinemi, östrojenik immün sinyalleri, sitokrom P450 enziminde bozulma, immün sinyal iletim yollarını geciktirme, sitokin polarizasyonu, Th-17 reseptörlerinde aril hidrokarbon aktivasyonu, makrofaj aktivasyonu, lipopolisakkarit aktivasyonu ve immunoglobulin patofizyolojisi yoluyla otoimmün sistemi etkilediği belirtilmiştir (Kharrazian, 2014).

4.7.3. Diş hekimliğinde BFA

BFA türevleri, koruyucu veya restoratif diş hekimliğinde kullanımı giderek artan rezin esaslı fissür örtücüler ve kompozitlerin yapısında bulunmaktadır. Estetik nedenler ve civa içeren amalgamın tartışılan nörotoksik ve nefrotoksik etkileri nedeniyle kompozit rezin esaslı dental materyallerin kullanımı artmıştır (Fleisch ve ark., 2010).

BFA tanım olarak, bisfenol A glisidilmetakrilat (Bis-GMA) majör komponentiyle birlikte diş hekimliğinde kullanılan kompozit ve sealantların ana molekülü olarak bilinmektedir. Uluslararası bazı literatürler, BFA ve/veya türevlerinin kompozit veya sealantlarda oral kaviteye östrojenik etkiler yaratacak dozlarla salındığını göstermektedir (Eramo ve ark., 2010).

BFA, Bis-GMA molekülünün tamamlayıcı parçası olması nedeniyle neredeyse tüm kompozit ve sealantların yapısında önemli role sahiptir (Eramo ve ark., 2010). BFA bu dental materyallerin yapısına 3 yolla katılabilir:

- a) direk bileşen olarak
- b) diğer bileşenlerin bozunma ürünü olarak
- c) diğer bileşenlerin üretiminden kaynak olarak (Eramo ve ark., 2010).

4.8. Amoksisilin

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi ve bu tedavilerde bazı maddelerin, bitkilerin kullanılmasına ilişkin bilgilerin en eskisi 2500 yıl öncesine dayanır. Çin'den elde edilen kaynaklarda o zamanlar enfeksiyon tedavisinde kullanılan bu maddelerin sadece özellikleri ve tedavilerinden söz edilmiştir. 19. yüzyılda ise enfeksiyon tedavisinde ancak cilt üzerine uygulanan iyot, fenol, gibi maddelerin kullanıldığı görülmektedir. Kemoterapi kavramı ilk kez Paul Ehrlich tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır. Bununla birlikte spesifik kemoterapi devri 1930'ların sonunda başlamış, 1936'da sülfonamidlerin klinik etkinliği saptanmıştır. En çarpıcı gelişme ise penisilinin 1941 yılında enfeksiyon tedavisinde kullanılmasıyla elde edilmiştir. Aslında penisilinin

1929’da Fleming tarafından bulunmasına karşın biyosentezinin klinik kullanıma uygun şekilde gerçekleşmesi uzun süre gerektirmiştir. Penisilinlerin ardından birçok doğal ve yarı sentetik kemoterapik ilaç geliştirilmiştir. Böylece yaşam tehlikesi oluşturan birçok hastalığın başarıyla tedavisi sağlanmıştır. Bugün, bakteriyolojik etkileri bilinen bir hastalığın, antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilebilme olasılığı oldukça fazladır (Dural, 2008).

Antibiyotikler; bazı bakteriler (*aktinomiçes* v.b.) veya mantar türünden mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan, mikroorganizmalar üzerine öldürücü (bakterisidal) veya üremelerini durdurucu (bakteriyostatik) etki gösteren maddelerdir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar (Tablo 5). Etki tarzlarına ve etki şekillerine göre çok sayıda antibiyotik bulunmaktadır (Akkan ve Karaca, 2003; Dökmeci ve ark., 1992; Kayaalp, 1991).

Tablo 5: Mikroorganizmalar üzerinde gösterdikleri etkilere göre antibiyotik grupları

Bakterisid	Bakteriyostatik
Aminoglikozidler	Makrolidler
Betalaktamlar	Kloramfenikol
Metronidazol	Linkozamidler
Basitrasin	Sülfonamidler
İzoniazid	Tetrasiklinler
Polimiksinler	Trimetoprim
Kinolonlar	Nitrofurantoin
Rifampin	Etambutol
Vankomisin	

Amoksisilin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı bakterisidal etki gösteren semisentetik geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bu özelliklerinden dolayı solunum, gastrointestinal, genital, dermatolojik ve nörolojik enfeksiyonların tedavisinde ilk tercih edilen antibiyotiktir. Bunların yanında diş hekimliği alanında da dental-alveolar abseler, yumuşak doku, maksiller ve oral sinüs bağlantıları

enfeksiyonlarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca enfeksiyöz endokardit profilaksi tedavisinde de ilk tercih edilen antibiyotiktir (Gottberg ve ark., 2014).

Hamilelik sürecinde gelişen enfeksiyonlarda ilk prosedür enfeksiyonu ortadan kaldırmaktır. Antibiyotik kullanımının endike olduğu sistemik yayılım ve ateş gibi belirtiler gösteren enfeksiyonlarda penisilin (penisilin V veya amoksisilin) kullanımı önerilmektedir. Amoksisilini içeren penisilin grubu, sefalosporinle beraber genel olarak gebelikte güvenli kabul edilmektedir (Fagoni ve ark., 2014).

Bu antibiyotiğin en sık görülen yan etkileri hipersensitiviteler ve gastrointestinal bozukluklardır. Ek olarak son yıllarda amoksisilinin dental fluorosis benzeri dental patolojiler oluşturduğunu öne süren klinik vaka raporları ve epidemiyolojik çalışmalar yayınlanmaktadır. (Gottberg ve ark., 2014)

Amoksisilin gibi birçok ilacın amelogenesis prosesini değiştirdiği *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Amoksisilin tedavisi görmüş çocuklarda mine defekti gelişme riskinin arttığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur fakat bu mine defektlerinden sorumlu olan hücresel ve moleküler kaskatlar hala belirsizliğini korumaktadır (De Souza ve ark., 2015).

4.9.Enfeksiyon

Diş gelişim sürecinde anomali oluşturan lokal faktörlerden biri de bakteri enfeksiyonlarıdır. Periapikal lezyonlar ve alveol kemiği bozulmaları da bakterilerden ve/veya lipopolisakkaritler (LPS) gibi bakteri ürünlerinden etkilenir. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarının ana yapısında bulunarak bakteriyal yapı bütünlüğünü sağlar ve bakteriyi konak immünitesinden korur. LPS ek olarak, birçok hücre tipinden sitokin proenflamatuar salgı oluşmasını sağlayan bir endotoksindir. Bu da LPS'nin periapikal lezyonlarda önemli rol oynadığını göstermektedir (Indahyani ve ark., 2007).

Ateş, enfeksiyona karşı konak savunmasının majör komponentidir. Azalmış febril yanıt bireylerde enfeksiyonun toksik etkilerinin görülme eğiliminin artmasına sebep olabilir. LPS gibi enfeksiyöz ajanlara neonatal olarak maruz kalmak yetişkin febril yanıtı kalıcı olarak azaltabilir (Mouihate, 2012).

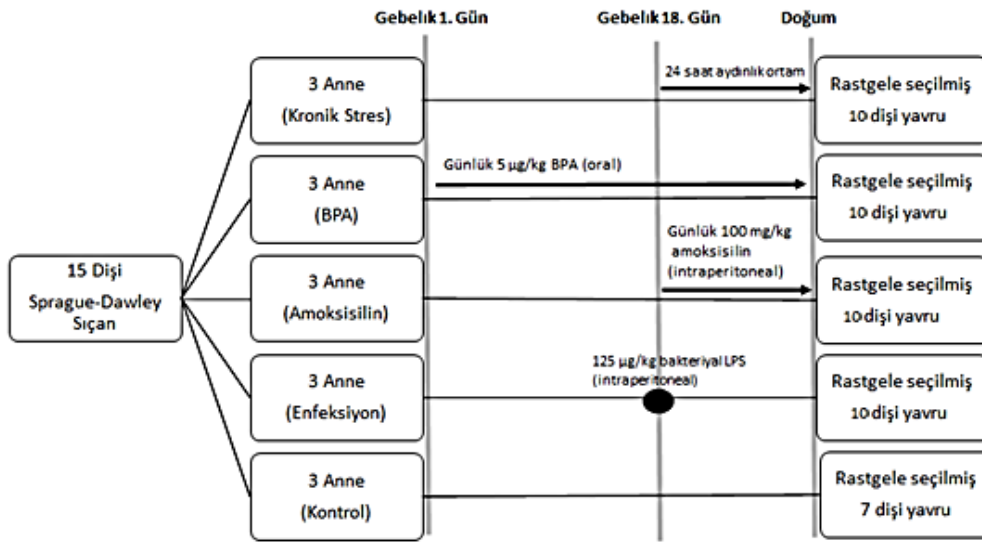
Mine, etkilerini diş gelişimi süresince gösteren çevresel ve genetik zararlı etkenlere karşı çok hassastır. Ameloblastların çevresel hasar faktörlerine karşı en hassas olduğu dönem geçiş fazı ve erken olgunlaşma fazıdır. Matriks üretimi kesintiye

uğradığında minenin kalınlığı ve/veya miktarı azalırken mineralizasyonla ilgili problemlerde hipomineralizasyon gibi kalitatif değişiklikler görülür. Yüksek ateş hastalıktan korunmamıza yardımcı olmaktadır fakat klinik ve deneysel çalışmalar yüksek ateşin diş gelişimine zarar verdiğini göstermektedir. Pnömoni ve orta kulak iltihabı gibi genellikle yüksek ateşin eşlik ettiği çocukluk çağı hastalıklarının gelişimsel mine defektleri oluşumu açısından risk oluşturduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Tung ve ark., 2006).

Ateşin sıçanlarda oluşuma sürekli devam eden dentin ve mine gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Ekzojen pirojenler kullanarak vücut ısısını arttırmanın yüksek ateş süresince oluşan mine bölümünde radyolusentlik, anormal gelişim ve defektif mineralizasyon oluşturduğu gözlenmiştir. Yüksek ateşten etkilenen yaklaşık 100 adet gen ekspresyonu bulunmuştur. Bunların yaklaşık yarısı ekspresyon seviyeleri ısı stresle artan ve çoğu hücre fizyolojisinde önemli rol oynayan ısı şok proteinlerdir. Hipertermi ayrıca hamilelikte teratojenik etki gösteren bir durumdur. Hiperterminin oluşturduğu defektler etkenin zamanına ve süresine göre değişir. Kraniofasiyal ve santral sinir sistemi gelişimi hasara uğratarak kleflere ve malforme dişlere sebep olur (Tung ve ark., 2006).

5.GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamız proje onayı 006.2017.mar protokol koduyla Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verildi. Araştırmamızda, M.Ü. Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen 15 adet dişi Sprague-Dawley sıçan rastgele seçilip yine rastgele seçilen 5 erkek Sprague-Dawley sıçanla çiftleştirildi. Hamile sıçanlardan doğum sonrası sakrifiye edilmek üzere kontrol grubundan 7, diğer gruplardan 10'ar dişi yavru sıçan rastgele seçilip toplam 47 yavru sıçan kullanıldı (Resim 1,2).



Şekil 3: Sıçan deney gruplarının oluşturulması

Çalışmamızda hayvan deney gruplarının oluşturulması, bakım ve beslenmeleri, etkenlerin uygulanması ve deney hayvanlarının sakrifiye edilmesi M.Ü. Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, yavru sıçanlardan alınan yarım alt çene (hemimandibula) örneklerinden kesit alınması ve immünohistokimyasal incelemeler M.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Patoloji Laboratuvarı'nda, sıçanların alt yarım çenesinden çıkarılan alt birinci molar dişlerin stereomikroskop değerlendirilmesi M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ar-Ge Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

5.1.Sıçan Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada, M.Ü. Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilen toplam 47 adet Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Çalışma grupları, kontrol, kronik stres, BFA, amoksisilin ve enfeksiyon olarak belirlendi. Grupların prenatal dönemden itibaren oluşturulabilmesi için rastgele seçilen 15 dişi (~250 gr) ve 5 erkek (~300- 350 gr) Sprague-Dawley sıçan her kafeste 3 dişi ve 1 erkek sıçan olacak şekilde belirlenen gruplara ayrıldı (Resim 3). Dişi sıçanlarda gebeliğin başlaması vajinal tıkaçın oluşması ile tespit edildi. Ayrı kafeslere ayrılan gruplardan kronik stres grubu dışındakiler 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda tutulup, BFA grubu dışındaki tüm gruplar ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi (Şekil 3).



Resim 1: Yeni doğan sıçanların görüntüsü



Resim 2: Postnatal 10. gündeki sıçanların görüntüsü



Resim 3: Çiftleşme için gruplanan Sprague-Dawley sıçanlar

5.1.1.Kronik stres grubu

Hamileliğin belirlenmesinden sonra aynı kafese alınan 3 sıçan hamileliğin 18. gününe kadar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup, ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Sıçanlar, kronik stres oluşturmak amacıyla 18. günden doğuma kadar ayrı bir odaya alınıp 12/12 saat aydınlık ortamda tutuldu (Resim 4). Ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslemeye devam edildi. Hamilelik süresince suları günlük olarak değiştirilip, kafes temizlik ve bakımları yapıldı. Doğumdan sonra yavruların sütten kesildiği güne kadar anne sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup; ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Yavrular 10. güne kadar anne sütüyle beslendi. Postnatal 10. gün 3 anneden rastgele seçilen 10 dişi yavru kurban edildi.

5.1.2.BFA grubu

Hamileliğin belirlenmesinden sonra bu gruba ait sıçanlar kontaminasyonu önlemek amacıyla cam kafeslere alınıp (Resim 5), 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutuldu ve standart diyetle beslendi. Bu gruptaki sıçanlara kafese koyuldukları günden itibaren içme suyu olarak cam damacana içindeki içme suyu (Taşdelen, İstanbul, TÜRKİYE) verildi. Günlük tüketilecek ad libitum şişe içme suyundan önce %0.0001'lik etanolde çözülmüş yaklaşık 5 µg/kg BFA (Sigma-Aldrich,. Louis, MO) içeren solüsyon suya eklenip (Resim 6), günlük olarak sıçanlara oral yolla verildi. Hamilelik süresince suları günlük olarak değiştirilip, kafes temizlik ve bakımları yapıldı. Doğumdan sonra yavruların sütten kesildiği güne kadar anne sıçanlar 12 saat

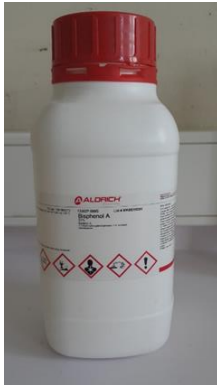
aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup; ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Yavrular 10. güne kadar anne sütüyle beslendi. Postnatal 10. gün 3 anneden rastgele seçilen 10 dişi yavru sakrifiye edildi.



Resim 4: 24 saat aydınlık ortamda tutulan sıçanların odası



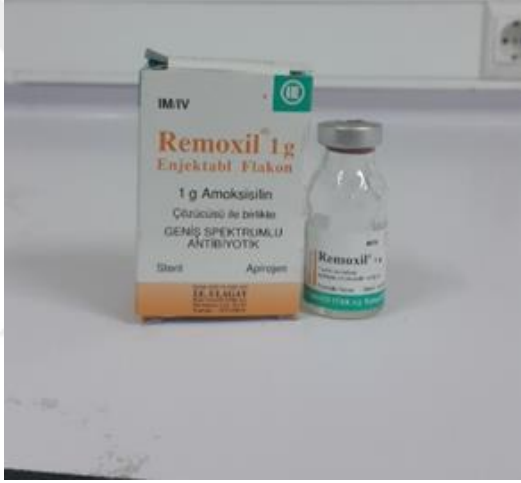
Resim 5: BFA grubunun cam kafesleri



Resim 6: BFA

5.1.3. Amoksisilin grubu

Hamileliğin belirlenmesinden sonra aynı kafese alınan sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup, ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Hamileliğin 18. gününden doğuma kadar intraperitoneal (ip) yolla günde 100 mg/kg amoksisilin (Remoxil 1 g enjektabl flakon Ulagay IE, İstanbul, Türkiye) (Resim 7) enjekte edildi (Resim 8). Hamilelik süresince suları günlük olarak değiştirilip, kafes temizlik ve bakımları yapıldı. Doğumdan sonra yavruların sütten kesildiği güne kadar anne sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup, ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Yavrular 10. güne kadar anne sütüyle beslendi. Postnatal 10. gün 3 anneden rastgele seçilen 10 dişi yavru sakrifiye edildi.



Resim 7: Amoksisilin enjektabl flakon



Resim 8: Amoksisilin'in intraperitoneal enjeksiyonu

5.1.4.Enfeksiyon grubu

Hamileliğin belirlenmesinden sonra aynı kafese alınan sıçanlar 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ortamda tutulup, ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Hamilelik süresince suları günlük olarak değiştirilip, kafes temizlik ve bakımları yapıldı. Hamileliğin 18. gününde kiloları ve vücut ısıları kaydedildikten sonra ip olarak 125 µg/kg bakteriyal LPS (E.coli, 0111: B4, Sigma, St. Louis,MO,USA) (Resim 9) enjekte edildi (Resim 10). Enjeksiyonu takiben saatte 1 kez olacak şekilde vücut ısıları normale dönene kadar termometreyle (Plusmed dijital termometre) (Resim 11) rektal olarak ölçülüp kayıt altına alındı (Resim 12). Uygulamanın yapıldığı 18. günden yavruların sütten kesildiği güne kadar anne sıçanlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutulup; ad libitum musluk suyu ve standart diyetle beslendi. Yavrular 10. güne kadar anne sütüyle beslendi. Postnatal 10. gün 3 anneden rastgele seçilen 10 dişi yavru sakrifiye edildi.



Resim 9: Bakteriyal LPS



Resim 10: LPS doz ayarlaması ve intraperitoneal enjeksiyonu



Resim 11: Dijital termometre



Resim 12: LPS enjekte edilmiş sıçanda rektal ateş ölçümü

5.2.Deney Hayvanlarını Bakımı ve Beslenmesi

Çalışma süresince deney hayvanlarının bakımı ve beslenmesi M. Ü. Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deney hayvanları kronik stres grubu hariç deney süresince $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$, 12 saat aydınlık, havalandırılmalı bir odada, BFA grubu hariç standart kafeslerde barındırıldı. İçme suyu ve günlük yemleri verilerek, günlük düzenli kafes bakımları yapıldı. Kafeslerin içerisinde yataklık olarak talaş kullanıldı. Her kafese 3 deney hayvanı yerleştirildi. Deney hayvanlarına içme suyu ad libitum verildi ve deney hayvanları pellet formdaki,

standart sıçan yemi ile beslendi. Deney hayvanlarının ağırlıkları ve tükettikleri su miktarları haftada 2 kez düzenli olarak ölçülüp, kaydedildi. Yemin içeriği şu şekildedir:

Ham protein% 24, Ham selüloz % 7, Ham kül% 8, HCl’ de çözülmeyen kül% 2, Kalsiyum %1-2,8 Fosfor% 0,9Sodyum% 1, Sodyum Klorür % 1, Lizin % 1, Metiyonin% 1.

5.3.Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu

Doğumdan itibaren postnatal 10. günde kontrol grubundan 7, diğer gruplardan 10’ar adet rastgele seçilen toplam 47 yavru alt molar dişlerinin incelenmesi için overdoz ketamin (Ketalar) ve ksilazin (Rompun) ile sakrifiye edildi (Resim 13).



Resim 13: Ketamin ve ksilazin

5.4.Deney Hayvanlarından Doku Örneklerinin Alınması

Sakrifiye edilen sıçanların (deney n=10, kontrol n=7) mandibulaları temporo-mandibular eklem bölgesinden bisturi yardımıyla ayrılıp (Resim 14) önceden numaralandırılmış, içerisinde %10’luk nötral tamponlu formol çözeltisi bulunan plastik kaplara alındı. Daha sonra mandibula örnekleri sagittal yönde ikiye ayrılarak sol hemimandibula immunohistokimyasal inceleme ve histolojik incelemeler, sağ hemimandibula stereomikroskop incelemesi için daha önceden numaralandırılmış içinde %10’luk nötral tamponlu formol çözeltisi bulunan plastik kaplara alındı (Resim 15).



Resim 14: 10 günlük sıçanın mandibulası



Resim 15: Grupların ve çenelerin numaralandırılması

5.4.1.Stereomikroskop incelemesi

Tampon çözeltisinde fikse edilen sağ hemimandibulalar sürmemiş birinci molar dişlerini çıkarmak için bistüri yardımıyla aksiyel yönde ikiye ayrıldı. Çıkarılan molar dişler, bukkal yüzeyleri açıkta kalacak şekilde parafine gömüldü. Yumuşak dokuların uzaklaştırılması için örnekler bir gece %50'lik NaClO çözeltisinde bekletilip basınçlı hava ile kurutuldu. Diş yüzeyleri stereomikroskopta 102,81 ve 64,26 büyütmede incelendi.

5.4.2.Histolojik inceleme

Dokular %10'luk tamponlu formaldehite alınarak fiske edildi. Ardından %10 EDTA çözeltisinde 7 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Dokular; %70, %96, Absolü alkol ve Ksilen serilerinden geçirilerek takip edildi ve parafine gömüldü. Mikrotomda 3µm kalınlığında kesitler alındı ve 60° C' de 1 saat deparafinize edildi. Histomorfolojik değerlendirme için lamalar H&E ve GT boyasıyla boyandı.

5.4.3.İmmünohistokimyasal inceleme

Amelogenin (AMELX) ve ameloblastin (AMBN) protein immünekspresyonu polimer bazlı horseradish peroksidaz (HRP) immünohistokimya boyama yöntemi ile gösterildi. Bu amaçla, formalin fikse parafine gömülü dokulardan pozitif şarjlı lamalara 3 µm kalınlığında kesitler alınarak 37° C' lik etüvde 1 gece bekletildi. Ardından 5'er dakikalık sürelerle 3 ayrı ksilende deparafinizasyon tamamlandı. Lamalar iki ayrı %96 etanolde 10'ar dakika bekletilerek hidrate edildi. Metanolde hazırlanmış %3 hidrojen peroksit ile 20 dakika süreyle dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi baskılandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra antijen geri kazanım işlemi için 200 W güçte mikrodalga fırında sitrat tampon çözeltisi (pH 6.0) ile 20 dakika muamele edildi. Lamalar oda ısısında 20 dakika soğutulurken iki ayrı fosfat tampon çözeltisinde (pH 7,4 PBS) 5'er dakika yıkandı. Spesifik olamayan boyanmayı önlemek için dokulara 10 dakikalık protein blokaj (EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit; ab80436, Abcam, Cambridge, UK) işlemi yapıldı. Blokaj çözeltisi uzaklaştırıldı ve kesitlere 1:2000 dilüsyon oranında tavşan anti-AMBN (bs-12467R; Bioss Antibodies Inc.; Massachusetts, USA) ve aynı dilüsyon oranında tavşan anti-AMELX (ab59705; Abcam, Cambridge, UK) primer antikorları damlatılarak 4°C'de

1 gece inkübe edildi. İki ayrı PBS ile 5'er dakika yıkanan kesitler HRP-Polimer'de (EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit; ab80436, Abcam, Cambridge, UK) 15 dakika inkübe edildi. Tekrar iki ayrı PBS ile 5'er dakika yıkanan kesitler 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeninde 5 dakika bekletildi. Mayer Hematoksilen ile 1 dakikalık nükleer zıt boyama yapıldı ve lamalar %96 'lık etanol ile dehidrate edilerek kapama maddesi ile kapatıldı. Boyanmada spesifik bağlanmayı tespit edebilmek için eş zamanlı olarak negatif kontrol de çalışıldı. Negatif kontrol olarak kullanılan molar diş kesitinde, yöntemin primer antikor aşaması dışındaki tüm aşamaları uygulandı, bu dokuda herhangi bir boyanma izlenmedi.

Molar dişlerdeki amelogenin ve ameloblastin immünekspresyonu, ameloblastlardaki kahverengi sitoplazmik boyanma ve negatif kontrol dokusu dikkate alınarak ışık mikroskobunda (Olympus CX41) 40X objektif ile semikantitatif olarak değerlendirildi. Osawa ve ark. (2007) çalışmasından modifiye edilerek yapılan skorlamaya göre, amelogenesisin farklı aşamalarındaki ameloblastlarda boyanma şiddeti: 0: boyanma yok, 1: zayıf boyanma, 2: orta şiddette boyanma, 3: kuvvetli boyanma şeklinde değerlendirildi. Kesitlerden, Kameram Dijital Görüntüleme Sistemi kullanılarak 20x büyütmede fotoğraf görüntüsü alındı.

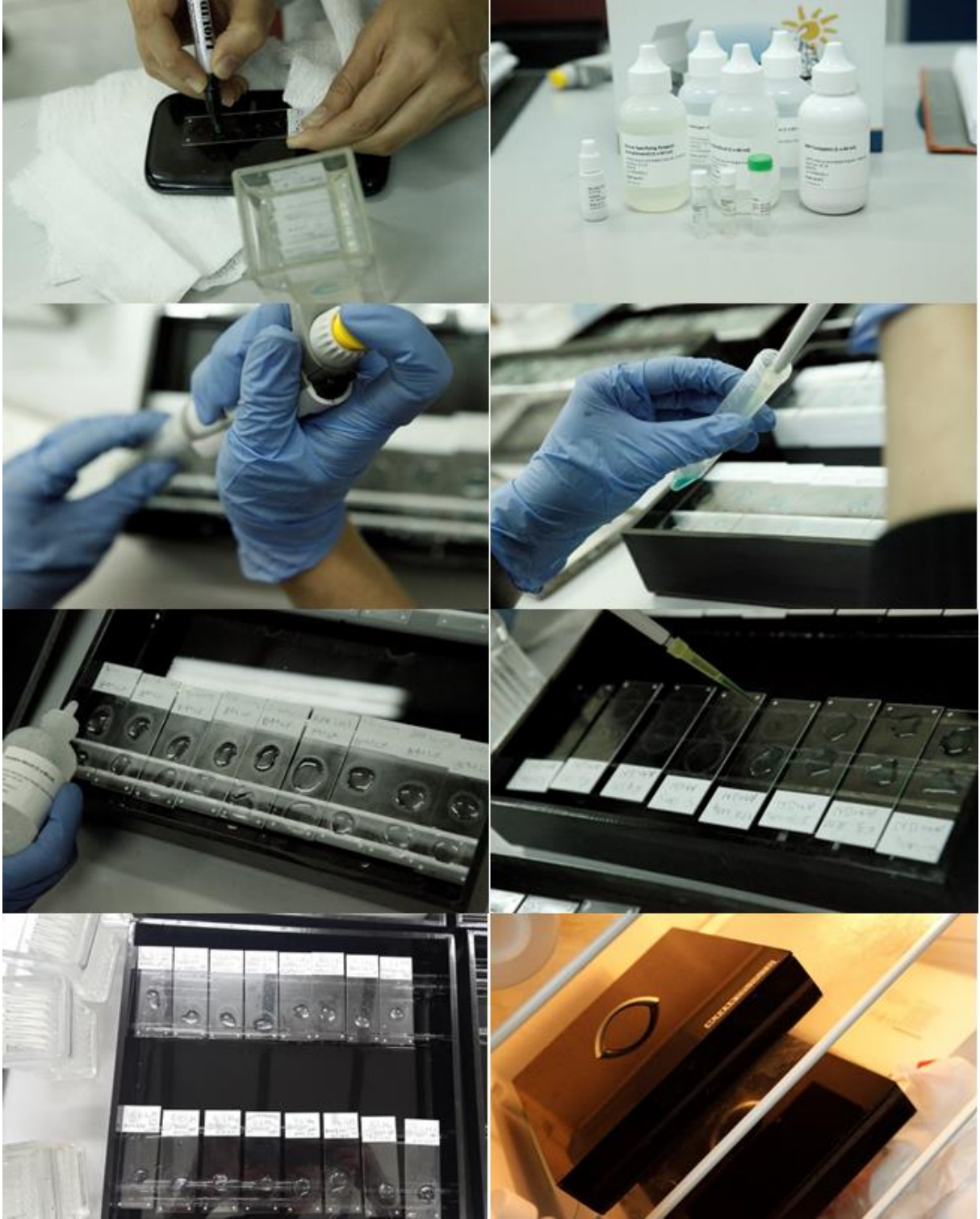
5.5.İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapıldı.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (sıklık ve yüzde dağılımları) yanı sıra nitel verilerin karşılaştırmalarında Fisher's kesin olasılık testinin Freeman-Halton $r \times c$ tablosuna uzantısı, tekrarlayan değişkenlerin değerlendirilmesinde McNemar's test kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.



Resim 16: İmmünohistokimyasal boyama aşamaları



Resim 17: İmmünohistokimyasal inceleme aşamaları

6. BULGULAR

6.1.Stereomikroskop İncelemesi Bulguları

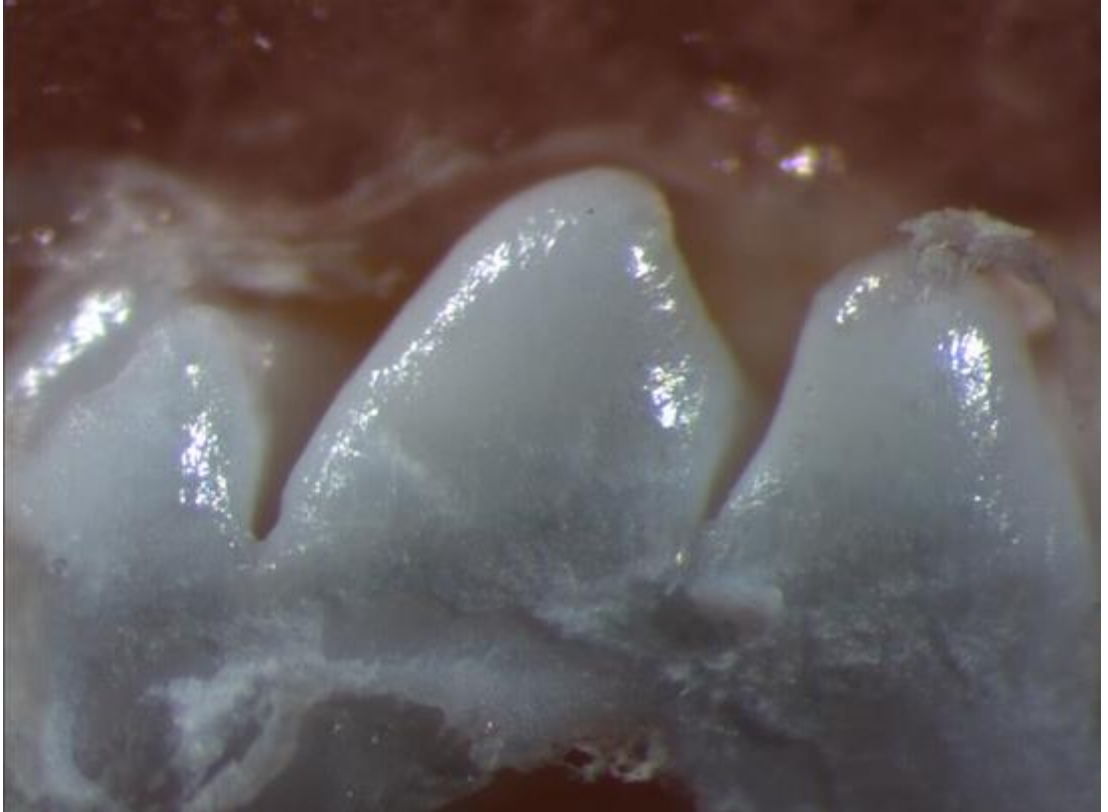
Kontrol grubu molar dişlerin parlak, şeffaf, beyaz ve pürüzsüz mine yüzeyine sahip olduğu görüldü (Resim 18).

Kronik stres grubu molar dişlerin tüberküllerinde geniş pit şeklinde mine kayıpları ve etrafında mat hipoplazik görünüm tespit edildi (Resim 19).

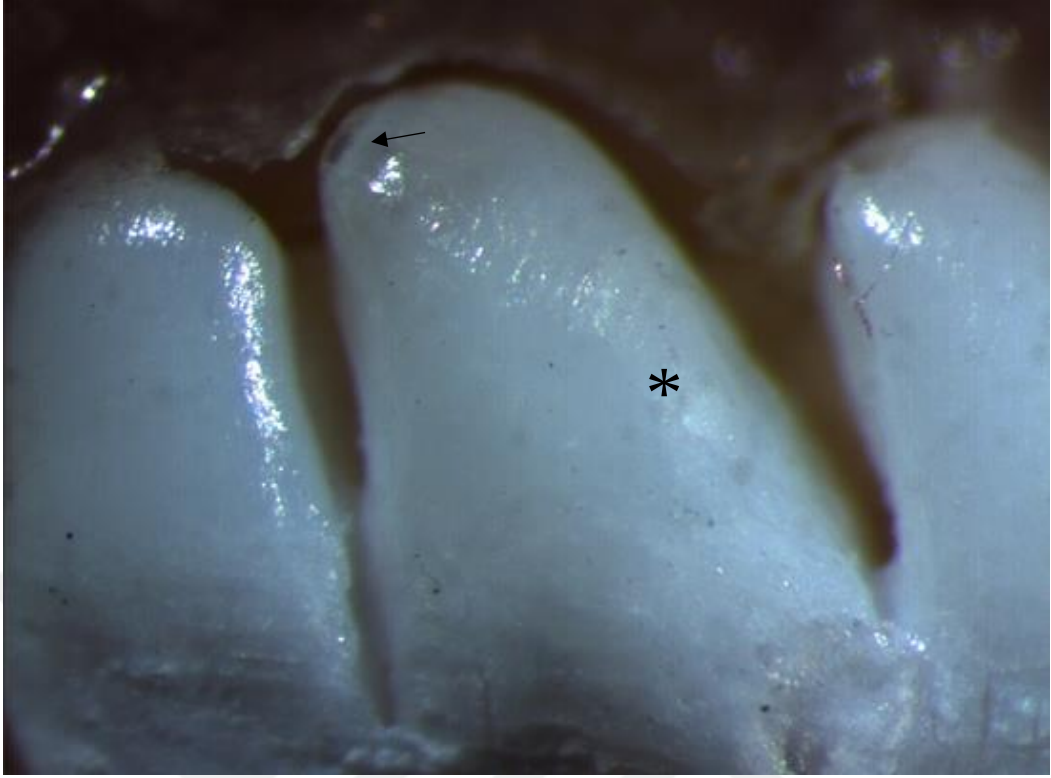
BFA grubu molar dişlerde tüberküller üzerindeki mine yüzeyinde dikey yarık alanlar görüldü. Mine yapısının da pürüzlü ve mat olduğu tespit edildi (Resim 20).

Amoksisilin grubu molar dişlerde tüm tüberkül yüzeyinin ve çevresinin hipokalsifiye olduğu görüldü (Resim 21).

LPS enfeksiyon grubu molar dişlerin yüzeylelerinde geniş, hipoplazik, mat, demarke alanlar oluştuğu görüldü (Resim 22).



Resim 18: Kontrol grubu molar dişlerin parlak, şeffaf, beyaz ve pürüzsüz mine yüzeyi



Resim 19: Kronik stres grubu molar dişlerin tüberküllerinde geniş pit şeklinde mine kayıpları (ok) ve etrafında mat hipoplazik görünüm (*)



Resim 20: BFA grubu molar dişlerde tüberküller üzerindeki mine yüzeyinde dikey yarık alanlar (ok). Pürüzlü ve mat mine yüzeyi (*)



Resim 21: Amoksisilin grubu molar dişlerde tüm tüberkül yüzeyi ve çevresinde hipokalsifiye alanlar (*)



Resim 22: LPS enfeksiyon grubu molar dişlerin yüzeylerinde geniş, hipoplazik, mat, demarke alanlar (*)

6.2.Histomorfolojik İnceleme Bulguları

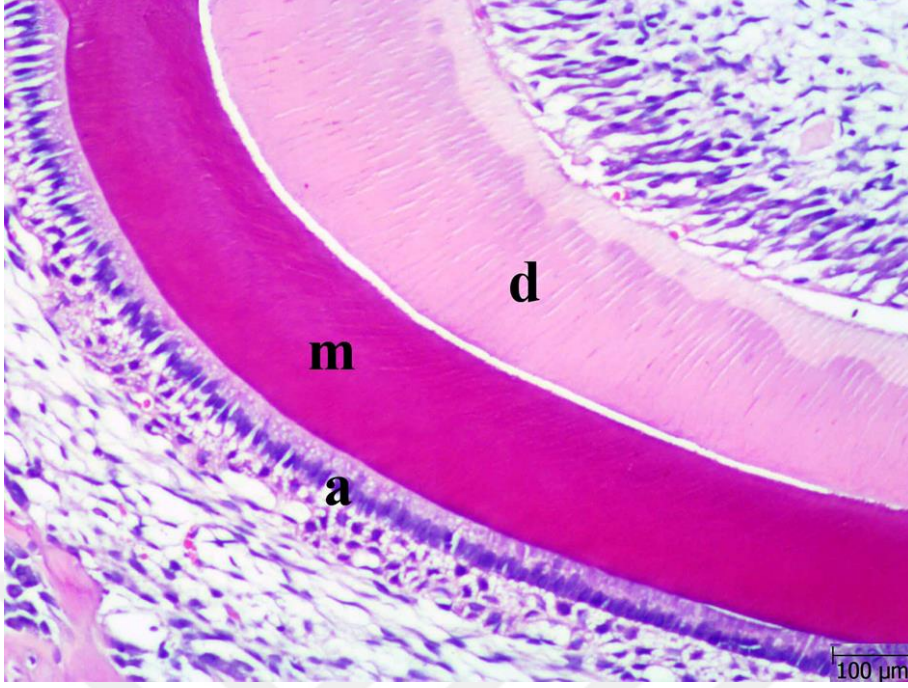
Alt birinci mandibular molar dişlerde yapılan H&E ve GT boya kesitlerinde, kontrol grubuna ait dokularda düzenli mine ve dentin matriks yapısı izlendi (Resim 23 ve Resim 24). GT boyasında mine matriksinin parlak kırmızı, dentin matriksinin yeşil renkte boyandığı görüldü. Mine matriksinin bitişğinde ise proksimal yerleşimli nükleuslara sahip düzenli yapıdaki ameloblast hücreleri görüldü (Resim 24).

Kronik stres grubuna ait dokuların H&E kesitlerinde dentin matriksi ve ameloblastlarda düzenli yapı korunurken, **mine matriksinde defektif yapı** izlendi (Resim 25), aynı grubun GT kesitinde de **mine matriksinde soluk renkte boyanma ve defekt** izlendi (Resim 26). Bu defektlerin kist benzeri oluşumlar olduğu düşünülmektedir.

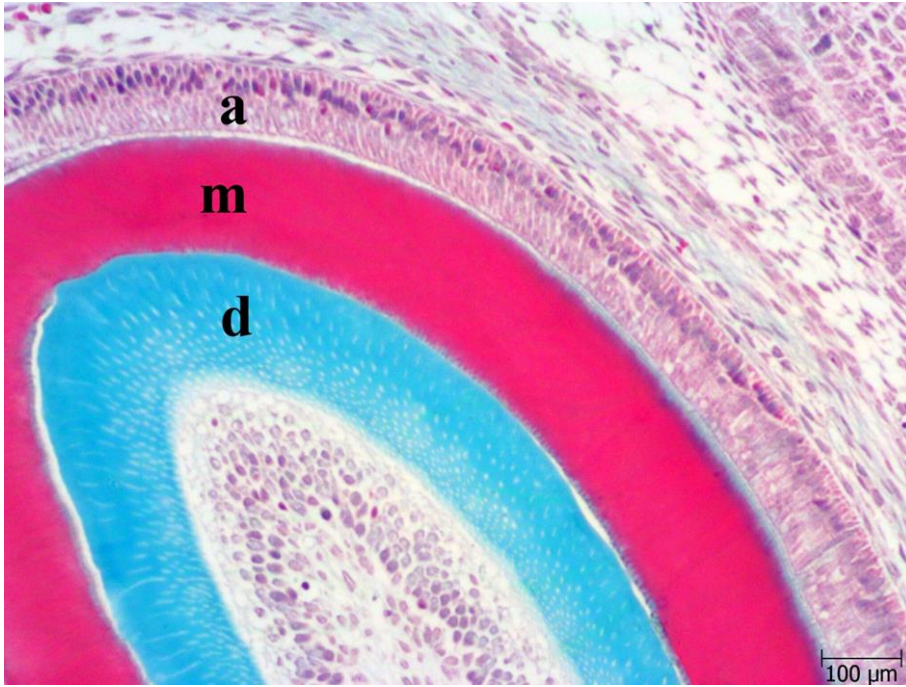
BPA grubuna ait dokuların H&E ve GT kesitlerinde **mine matriksinde düzensiz yapı** izlendi. Bu gruba ait kesitlerde **defektif mine matriks yapısının** yanı sıra **ameloblastlarda kopma ve ayrışmalar** görüldü (Resim 27 ve Resim 28).

Amoksisilin grubuna ait dokuların H&E ve GT kesitlerinde **ameloblastlar ve mine matriksi arasında ayrışma** izlendi (Resim 29 ve Resim 30). Bununla birlikte ameloblast sitoplazmalarında değişen boyutlarda **yoğun vakuol benzeri küçük yuvarlak yapılar** tespit edildi (Resim 30).

LPS enfeksiyon grubuna ait dokuların H&E kesitlerinde **ameloblastlar ve mine matriksi arasında ayrışma** izlendi, yine GT boyası ile **mine matriksinin soluk renkte boyandığı** görüldü (Resim 31 ve Resim 32).



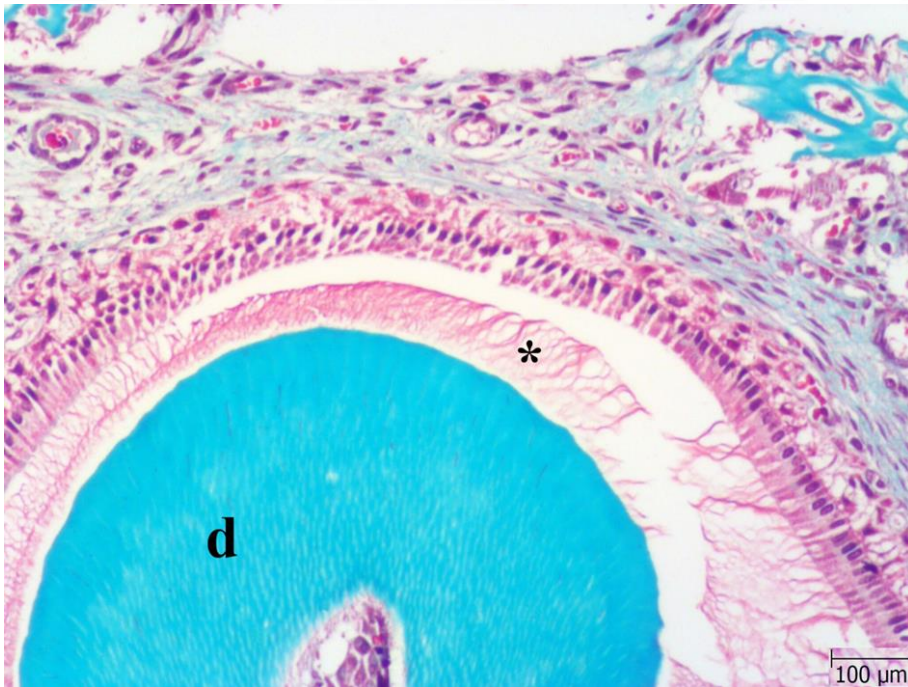
Resim 23: Kontrol grubunda düzenli yapıdaki ameloblast hücreleri (a), mine matriksi (m) ve dentin matriksi (d). H&E boyası.



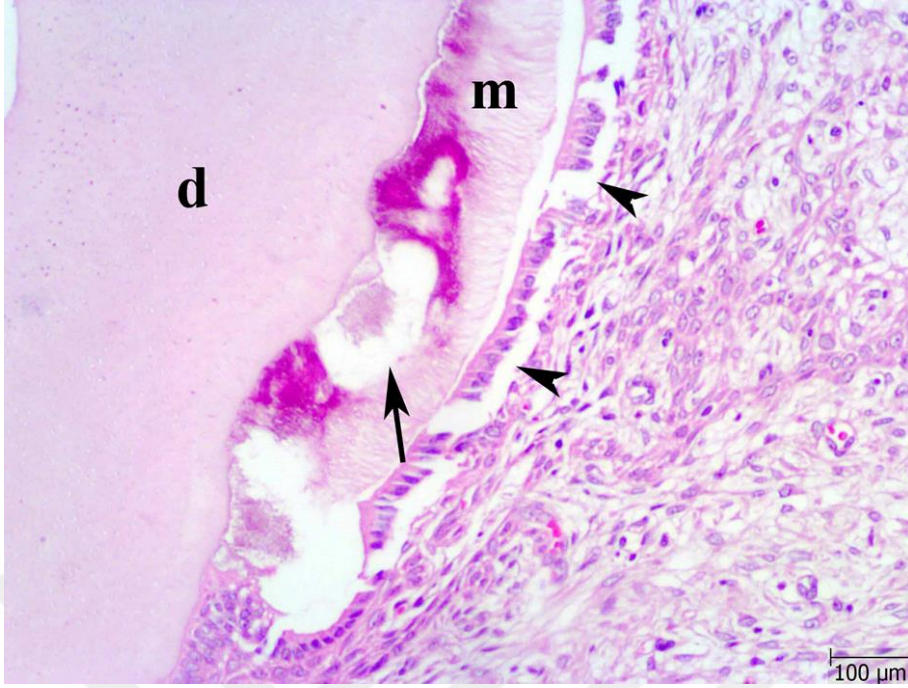
Resim 24: Kontrol grubunda düzenli ameloblast (a), mine matriksi (m) ve dentin matriksi (d) yapısı. GT boyası.



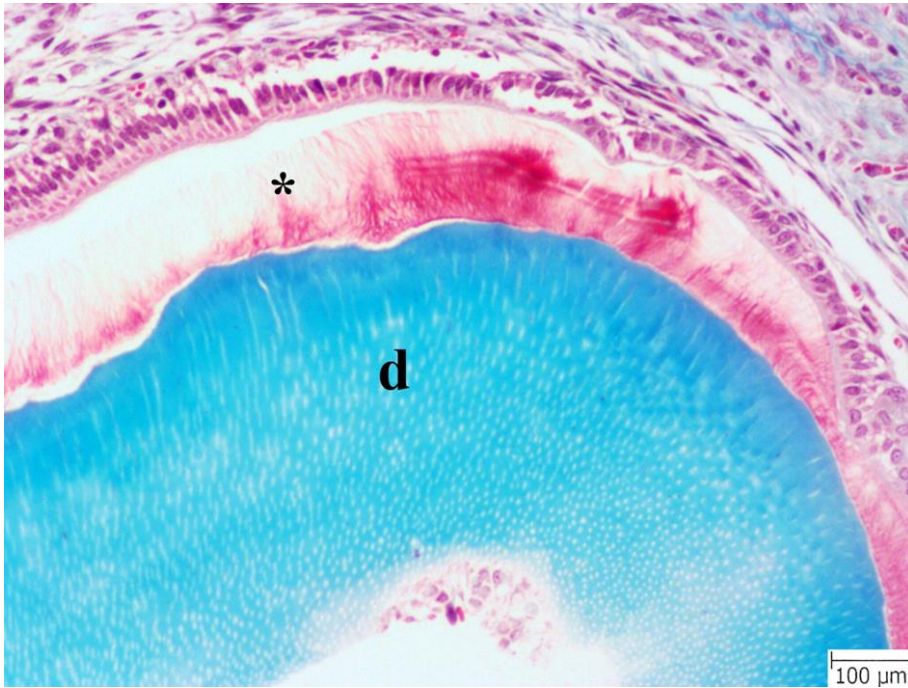
Resim 25: Kronik stres grubunda defektif mine matriksi yapısı (ok). a: ameloblast, m: mine matriksi, d:dentin matriksi. H&E boyası.



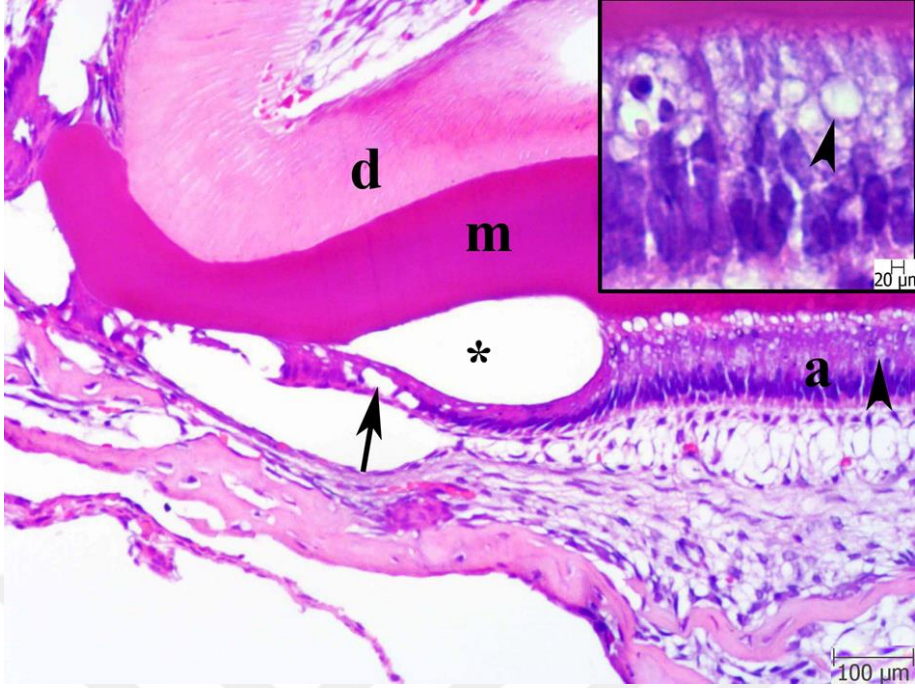
Resim 26: Kronik stres grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). d: dentin matriksi. GT boyası.



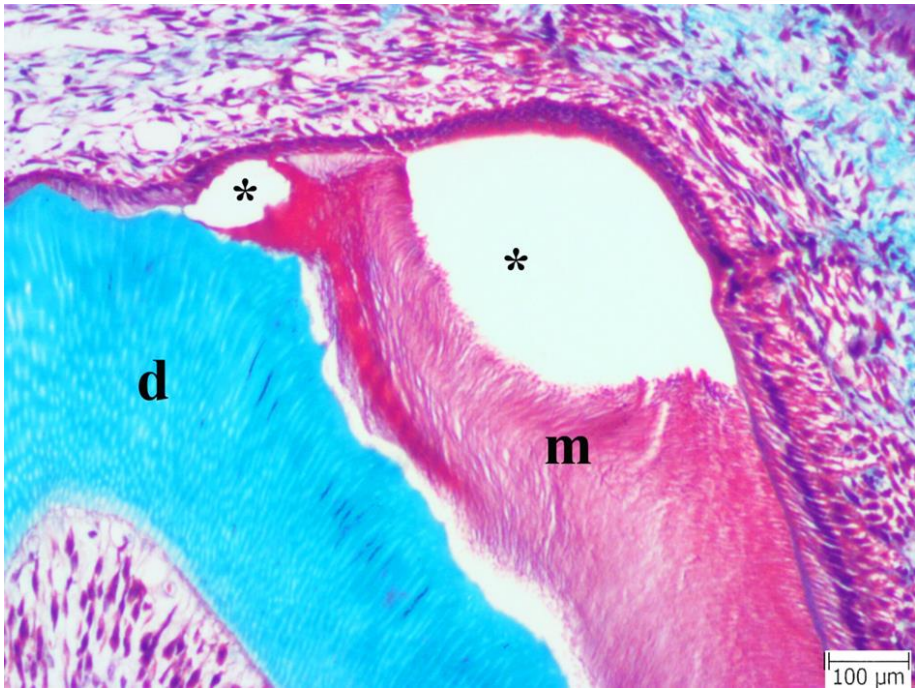
Resim 27: BFA grubunda defektif mine matriksi yapısı (ok), ameloblastlarda kopma ve ayrışmalar (ok başı). m:mine matriksi, d: dentin matriksi. H&E boyası.



Resim 28: BFA grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). d: dentin matriksi. GT boyası.



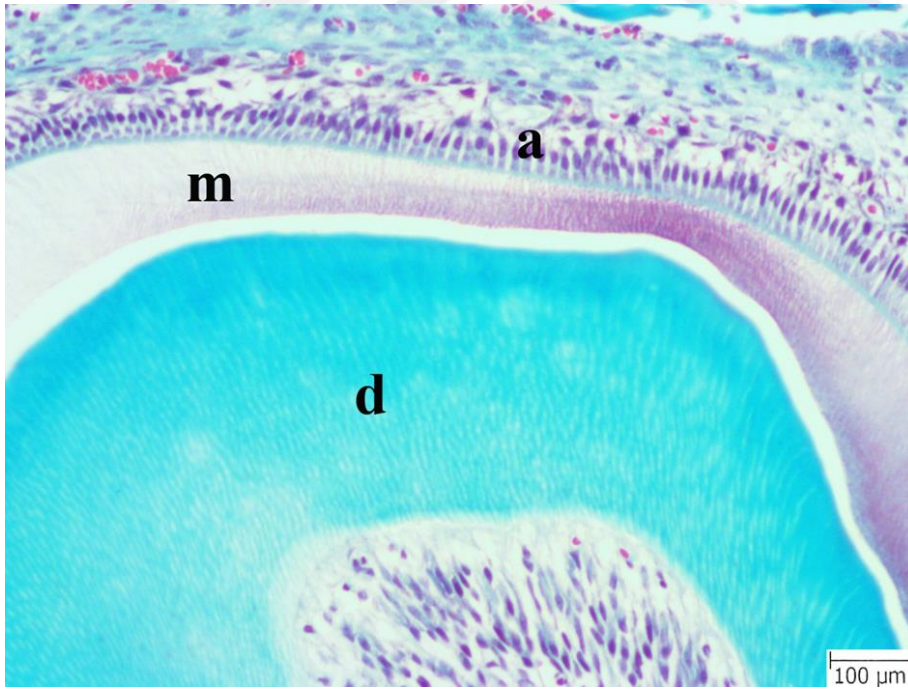
Resim 29: Amoksisilin grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında defektif ayrılma (*), ameloblastlarda ayrışma (ok), ameloblast sitoplazmalarında vakuol benzeri yapılar (ok başı). a: ameloblast, m: mine matriksi, d:dentin matriksi. H&E boyası.



Resim 30: Amoksisilin grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında ayrılma (*). m: mine matriksi, d: dentin matriksi. GT boyası.



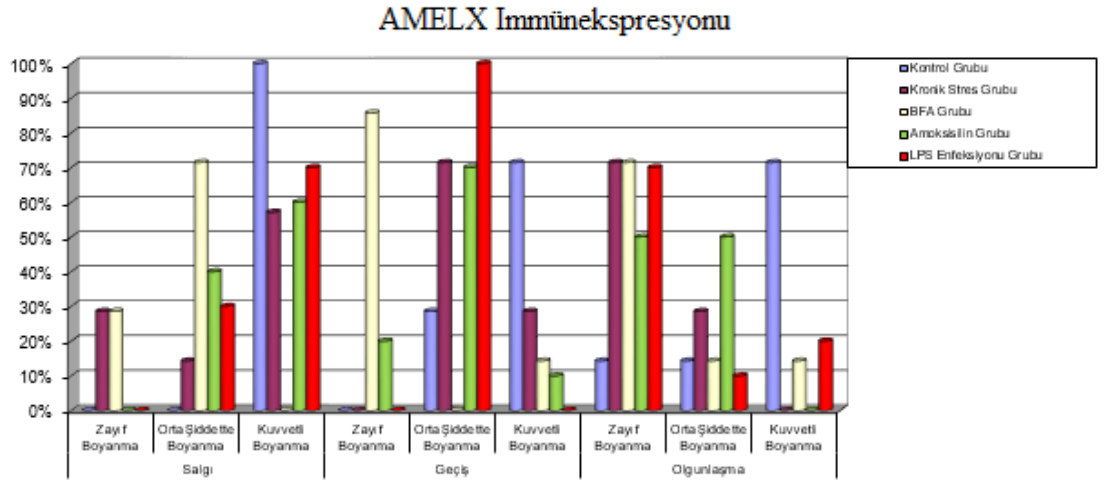
Resim 31: LPS enfeksiyon grubunda mine matriksi ve ameloblastlar arasında ayrılma (*). a: ameloblast, m: mine matriksi, d:dentin matriksi. H&E boyası.



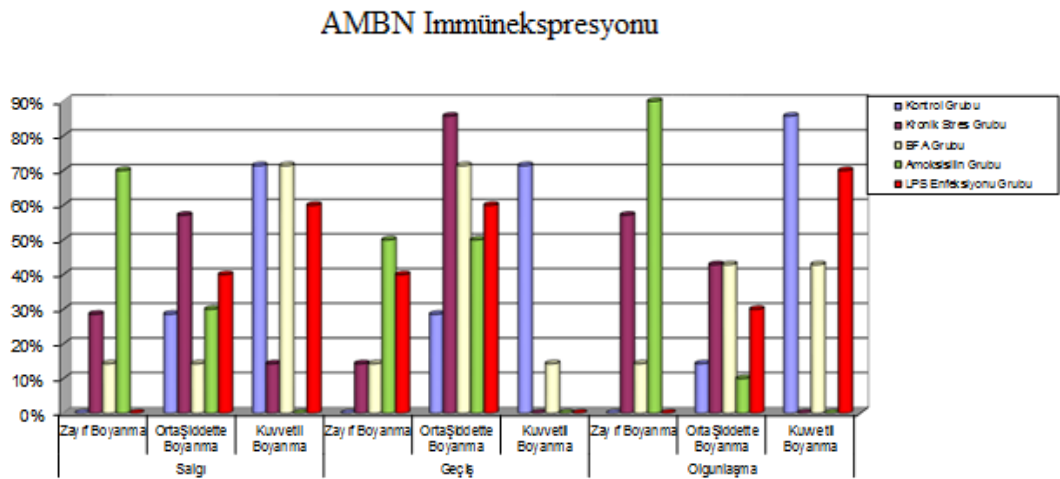
Resim 32: LPS grubunda defektif mine matriksi yapısı (*). m: mine matriksi, d: dentin matriksi. GT boyası.

6.3.İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları

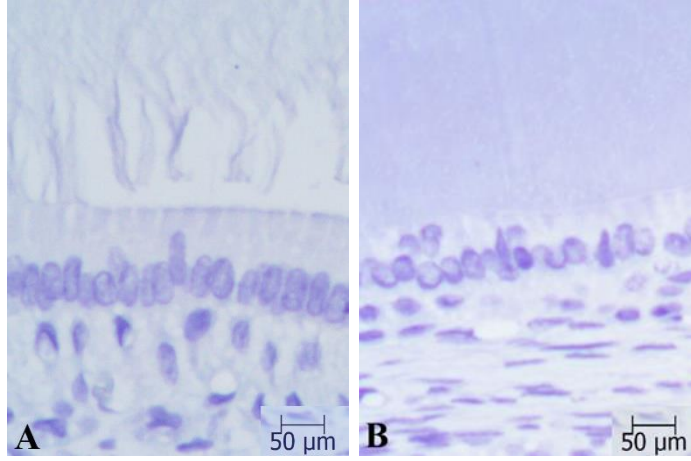
AMBN ve AMELX immünoekspresyonunun değerlendirilmesinde spesifik boyanma olarak ameloblastlardaki kahverengi sitoplazmik boyanma referans olarak alındı, negatif kontrol dokusunda ise ameloblastlarda immünreaktivite izlenmedi (Resim 33). Kronik stres ve BFA gruplarından üçer kesit fiksasyon problemleri nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. Alt birinci molar dişlerinden alınan kesitlerde, ameloblastların üç ana gelişim fazındaki AMELX ve AMBN boyanma şiddetinin grupların kendi içinde ve birbirleri arasında değerlendirilmesi sonucu ortaya çıkan bulgular şu şekildedir (Şekil 4 ve 5):



Şekil 4: Grupların gelişim fazlarına göre AMELX immünoekspresyonu



Şekil 5: Grupların gelişim fazlarına göre AMBN immünoekspresyonu



Resim 33: Negatif kontrol dokusu. AMBN (A), AMELX (B)

6.3.1.AMELX immünekspresyonu

Tablo 6’da her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMELX boyanma şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir. Tablo 7’de grupların her üç fazda AMELX boyanma şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir.

Tablo 6: Her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMELX boyanma şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması

AMELX İmmünekspresyonu		Kontrol		Kronik Stres		BFA		Amoksisilin		LPS		p
Salgı	Zayıf	0	0,00%	2	28,57%	2	28,57%	0	0,00%	0	0,00%	0,008
	Orta	0	0,00%	1	14,29%	5	71,43%	4	40,00%	3	30,00%	
	Kuvvetli	7	100,00%	4	57,14%	0	0,00%	6	60,00%	7	70,00%	
Geçiş	Zayıf	0	0,00%	0	0,00%	6	85,71%	2	20,00%	0	0,00%	0,0001
	Orta	2	28,57%	5	71,43%	0	0,00%	7	70,00%	10	100,00%	
	Kuvvetli	5	71,43%	2	28,57%	1	14,29%	1	10,00%	0	0,00%	
Olgunlaşma	Zayıf	1	14,29%	5	71,43%	5	71,43%	5	50,00%	7	70,00%	0,009
	Orta	1	14,29%	2	28,57%	1	14,29%	5	50,00%	1	10,00%	
	Kuvvetli	5	71,43%	0	0,00%	1	14,29%	0	0,00%	2	20,00%	
		0,346		0,013		0,04		0,004		0,0001		

Fisher’s kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

Tablo 7: Grupların her üç fazda AMELX boyanma şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması

	Kontrol	Kronik Stres	BFA	Amoksisilin	LPS
Salgı/ Geçiş	0,127	0,070	0,019	0,041	0,002
Salgı/ Olgunlaşma	0,311	0,061	0,084	0,005	0,005
Geçiş/ Olgunlaşma	0,513	0,016	0,580	0,270	0,003

Fisher's kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

Kontrol grubunda salgı fazında kuvvetli, geçiş fazında orta şiddette ve kuvvetli, olgunlaşma fazında ise en fazla kuvvetli olmak üzere bütün seviyelerde AMELX immünekspresyonu tespit edildi ve fazlar arasındaki immünekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,346$) (Tablo 6) (Resim 34, Resim 35). Kontrol grubunun salgı fazı AMELX boyanma şiddeti ile geçiş ve olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,127$, $p=0,311$). Geçiş fazı AMELX boyanma şiddeti ile olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,513$) (Tablo 7).

Kronik stres grubunda, salgı fazında bütün seviyelerde, geçiş fazında orta ve kuvvetli, olgunlaşma fazında ise tam tersi olarak zayıf ve orta şiddette AMELX immünekspresyonu tespit edildi ve bu fark **istatistiksel olarak anlamlı** bulundu ($p=0,013$) (Tablo 6) (Resim 36, Resim 37). Kronik stres grubunun geçiş ve olgunlaşma fazı AMELX boyanma şiddeti, salgı fazı boyanma şiddetinden daha düşük bulundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,070$, $p=0,061$). Olgunlaşma fazı AMELX boyanma şiddeti, geçiş fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,016$) (Tablo 7).

BFA grubunda, salgı fazında zayıf ve orta, geçiş fazında zayıf ve olgunlaşma fazında zayıf boyanma yoğunlukta olmak üzere tüm seviyelerde AMELX immünekspresyonu tespit edildi ve bu fark **istatistiksel olarak anlamlı** bulundu ($p=0,04$) (Tablo 6) (Resim 38, Resim 39). BFA grubunun salgı fazı AMELX boyanma şiddeti, geçiş fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,019$). Salgı fazı AMELX boyanma şiddeti, olgunlaşma fazı boyanma

şiddetinden daha kuvvetli bulundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,084$). Geçiş fazı AMELX boyanma şiddeti, olgunlaşma fazına göre **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,016$) (Tablo 7).

Amoksisilin grubunda, salgı fazında kuvvetli ve orta, geçiş fazında orta ve düşük, olgunlaşma fazında orta ve düşük seviyede AMELX immünekspresyonu tespit edildi ve bu fark **istatistiksel olarak anlamlı** bulundu ($p=0,004$) (Tablo 6) (Resim 40, Resim 41). Amoksisilin grubunun hem geçiş hem de olgunlaşma fazının AMELX boyanma şiddeti, salgı fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,041$, $p=0,005$). Geçiş fazı AMELX boyanma şiddeti ile olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,270$) (Tablo 7).

LPS grubunda, salgı fazında kuvvetli ve orta, geçiş fazında orta, olgunlaşma fazında zayıf boyanma yoğunlukta olmak üzere tüm seviyelerde AMELX immünekspresyonu tespit edildi ve bu fark **istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı** bulundu ($p=0,0001$) (Tablo 6) (Resim 42, Resim 43). LPS enfeksiyonu grubunun geçiş fazı AMELX boyanma şiddeti, salgı fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,002$). LPS enfeksiyonu grubunun olgunlaşma fazı AMELX boyanma şiddeti, salgı fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,005$). LPS enfeksiyonu grubunun olgunlaşma fazı AMELX boyanma şiddeti, geçiş fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,003$) (Tablo 7).

Tablo 8'de bu değerlerin her grup için kendi arasında istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir.

Tablo 8: Grupların her üç fazdaki AMELX boyanma şiddetlerinin gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirilmesi

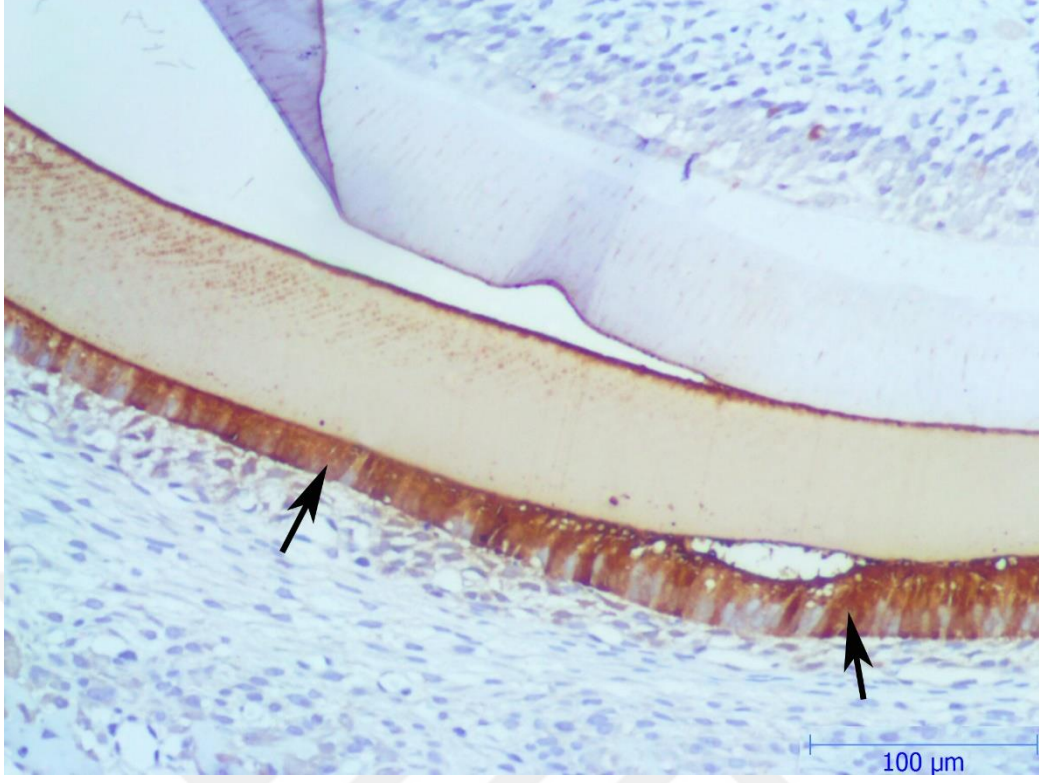
	Salgı	Geçiş	Olgunlaşma
Kontrol/ Kronik Stres	0,148	0,108	0,018
Kontrol/ BFA	0,009	0,005	0,069
Kontrol/ Amoksisilin	0,055	0,028	0,006
Kontrol/ LPS	0,110	0,001	0,066
Kronik Stres/ BFA	0,036	0,003	0,513
Kronik Stres/ Amoksisilin	0,150	0,332	0,377
Kronik Stres/ LPS	0,183	0,072	0,332
BFA/ Amoksisilin	0,021	0,013	0,198
BFA/ LPS	0,009	0,0001	0,932
Amoksisilin/ LPS	0,639	0,171	0,082

Fisher's kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

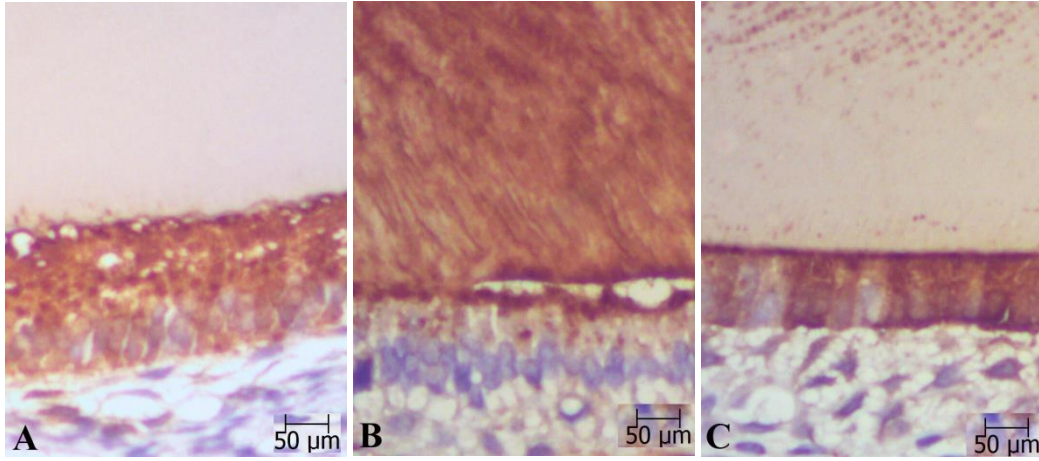
Salgı fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak anlamlı** fark bulundu ($p=0,008$) (Tablo 6). BFA grubunun AMELX immünekspresyonu, kontrol, kronik stres, amoksisilin ve LPS enfeksiyonu gruplarından **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,0092$, $p=0,036$, $p=0,021$, $p=0,009$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 8). Salgı fazında en yüksek AMELX immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırayla LPS enfeksiyonu, amoksisilin, kronik stres ve en düşük BFA grubunda bulundu.

Geçiş fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı** fark bulundu ($p=0,0001$) (Tablo 6). BFA, amoksisilin, ve LPS enfeksiyonu gruplarının AMELX immünekspresyonu, kontrol grubundan **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,005$, $p=0,028$, $p=0,001$). BFA grubunun AMELX immünekspresyonu, kronik stres, amoksisilin ve LPS enfeksiyonu gruplarından **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,003$, $p=0,013$, $p=0,0001$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 8). Geçiş fazında en yüksek AMELX immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırasıyla LPS enfeksiyonu, amoksisilin, kronik stres ve en düşük BFA grubunda bulundu.

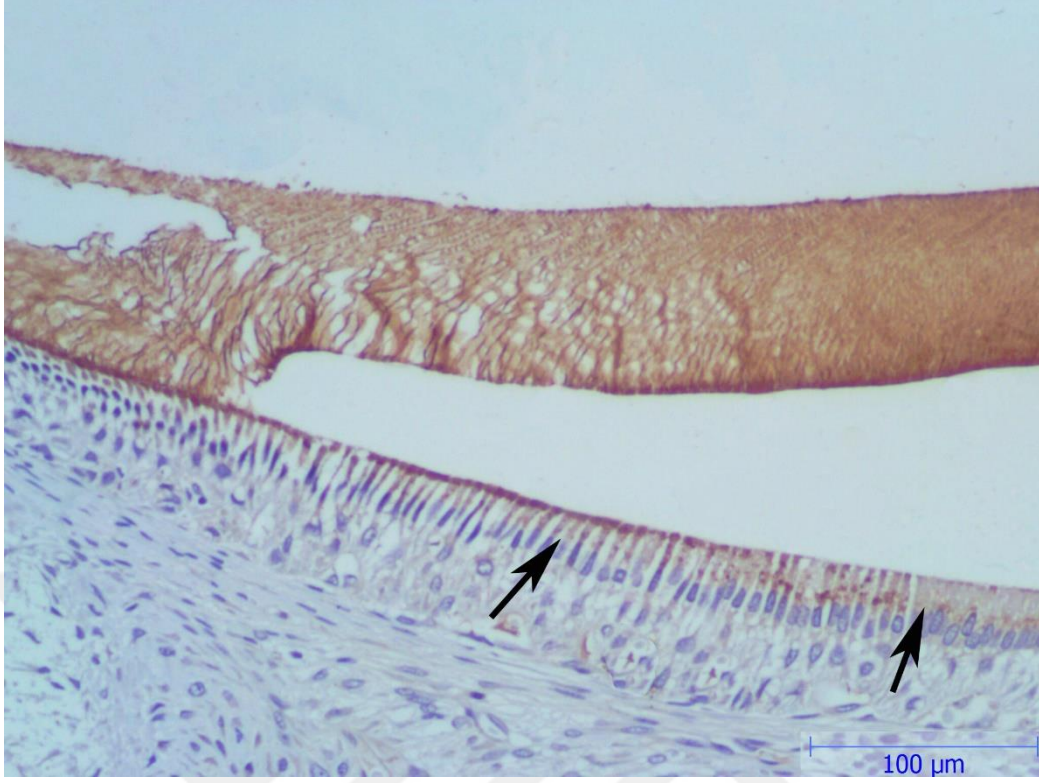
Olgunlaşma fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak anlamlı** fark bulundu ($p=0,009$) (Tablo 6). Tüm grupların AMELX immünekspresyonu, kontrol grubuna göre zayıf bulundu, kronik stres ve amoksisilin gruplarının immünekspresyonu kontrole göre, **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,018$, $p=0,006$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 9). Olgunlaşma fazında en yüksek AMELX immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırasıyla LPS enfeksiyonu, BFA ve en düşük amoksisilin ve kronik stres gruplarında bulundu.



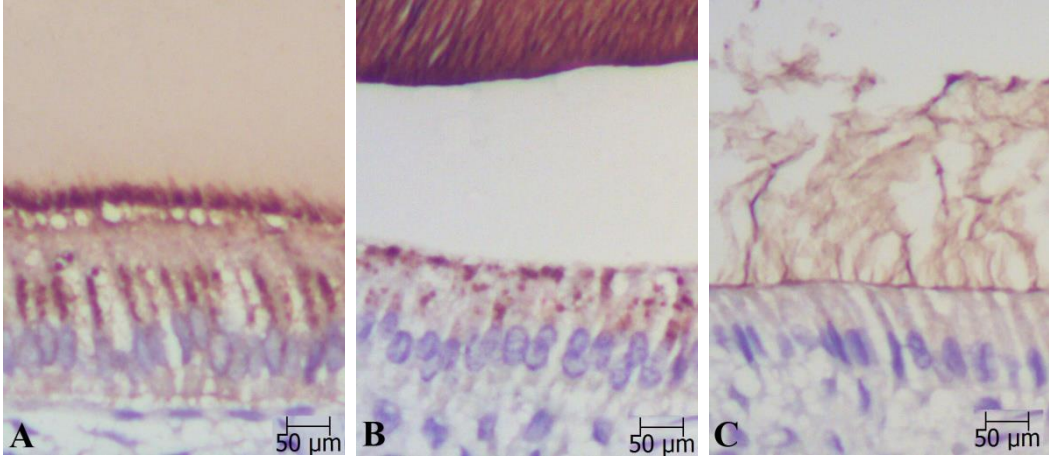
Resim 34: Kontrol grubunda kuvvetli AMELX immüekspresyonu (ok)



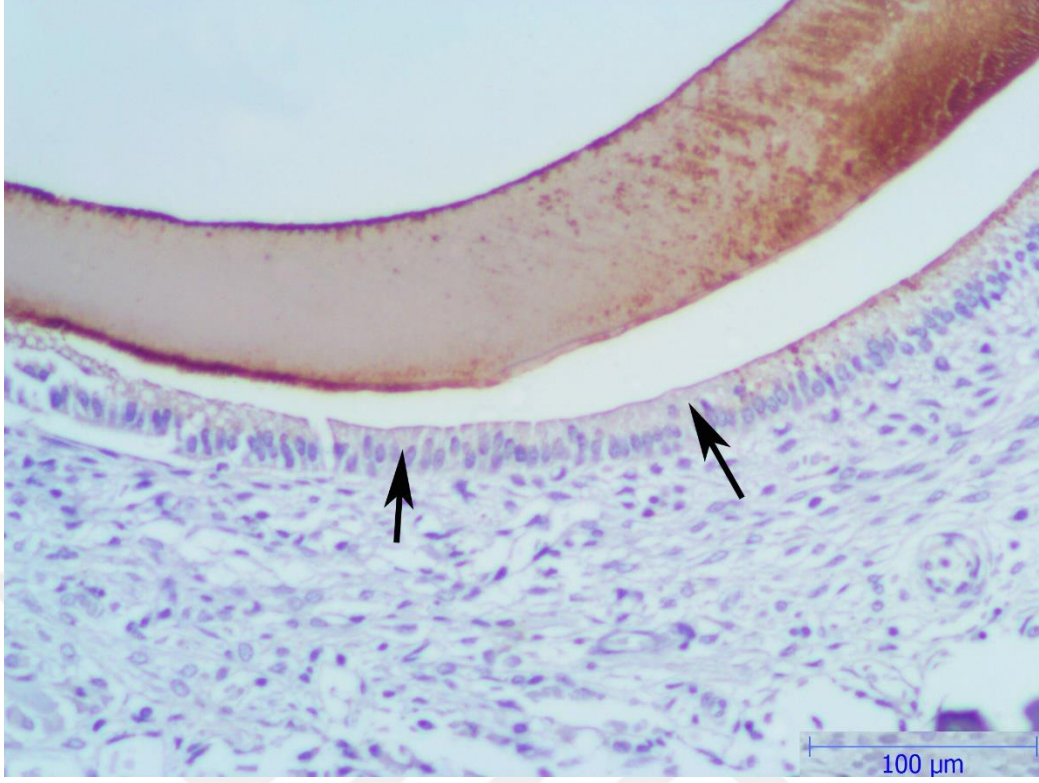
Resim 35: Kontrol grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda kuvvetli AMELX immüekspresyonu.



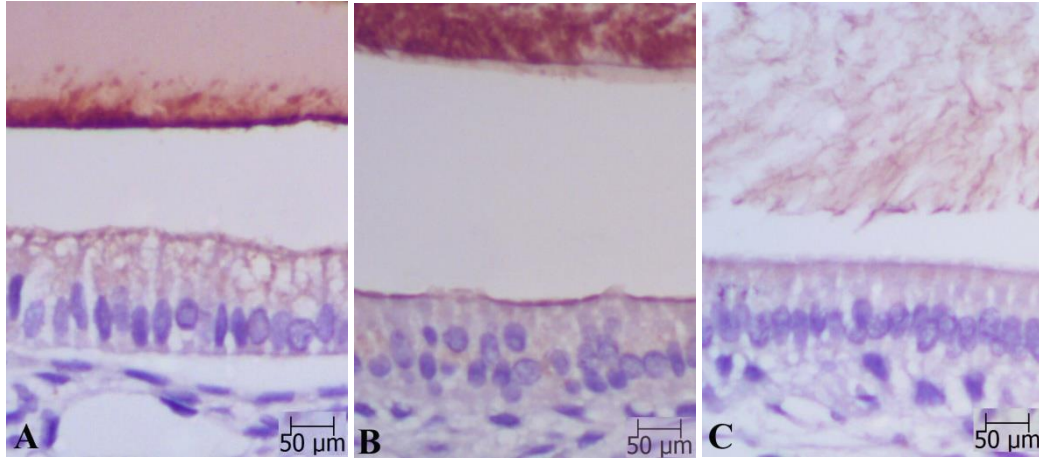
Resim 36: Kronik stres grubunda orta şiddette AMELX immünekspresyonu (ok)



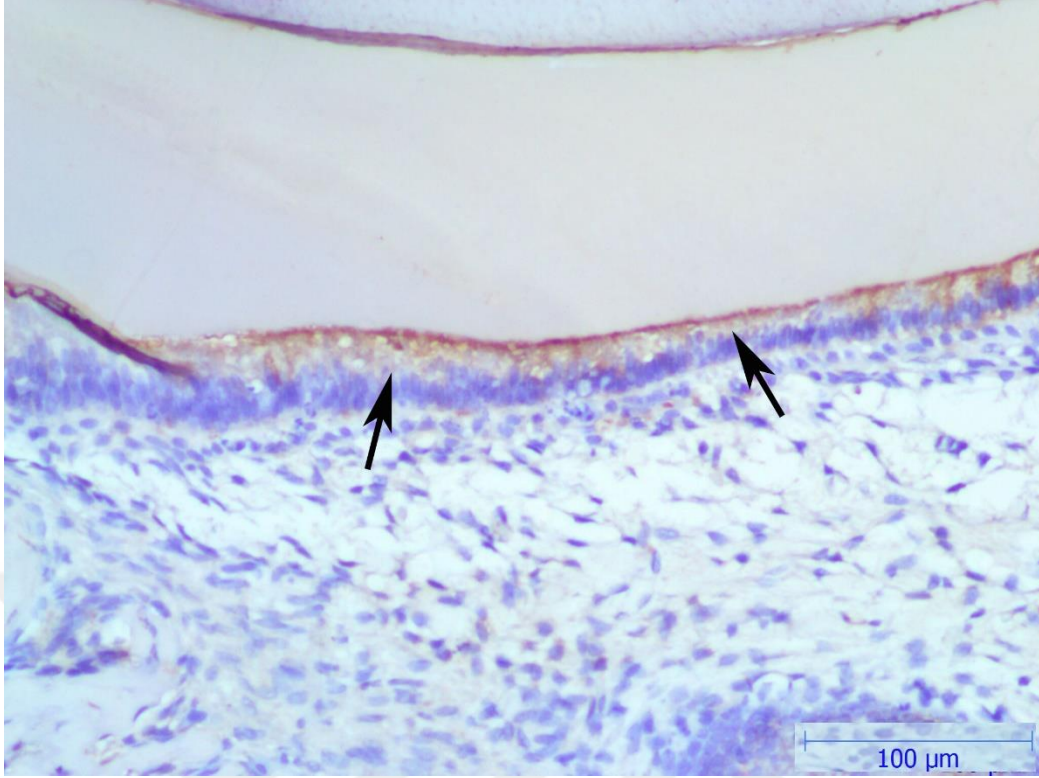
Resim 37: Kronik Stres grubunda salgı fazı ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazı ameloblastlarda orta (B) ve olgunlaşma fazındaki ameloblastlarda (C) zayıf boyanma şiddetinde AMELX immünekspresyonu.



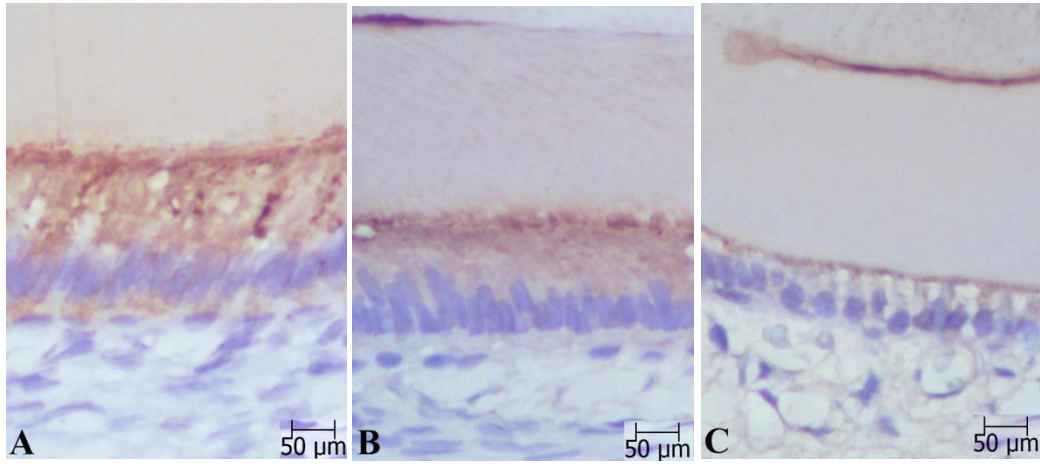
Resim 38: BFA grubunda zayıf AMELX immünekspresyonu (ok)



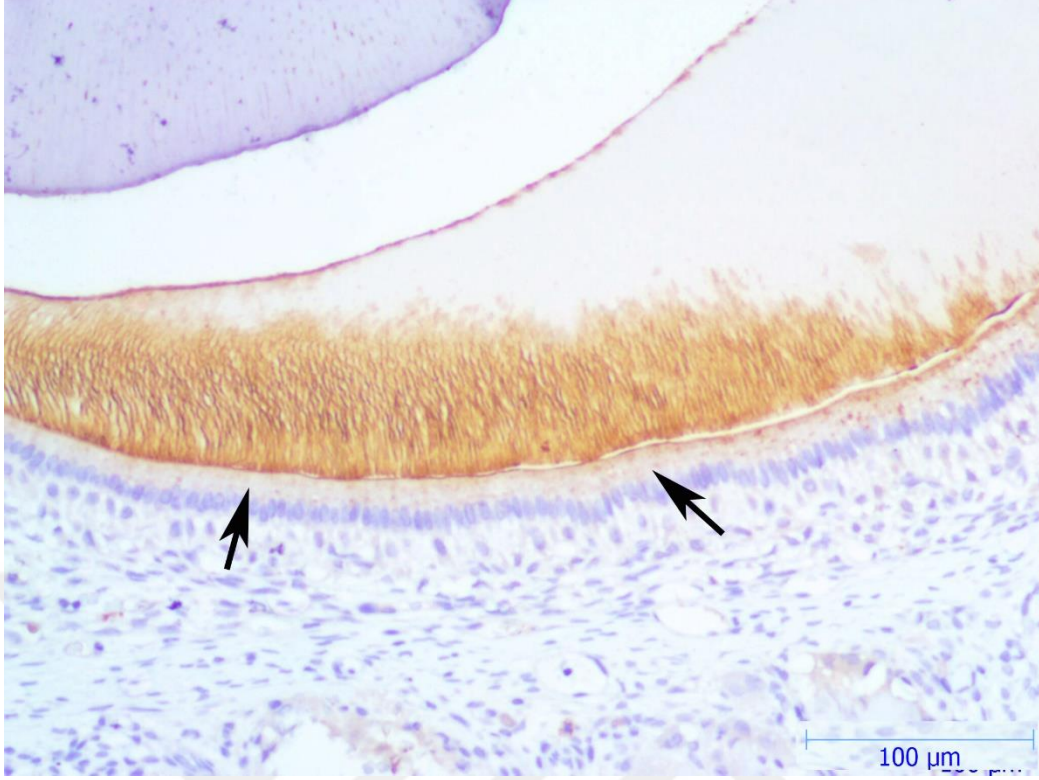
Resim 39: BFA grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblast hücrelerinde zayıf AMELX immünekspresyonu.



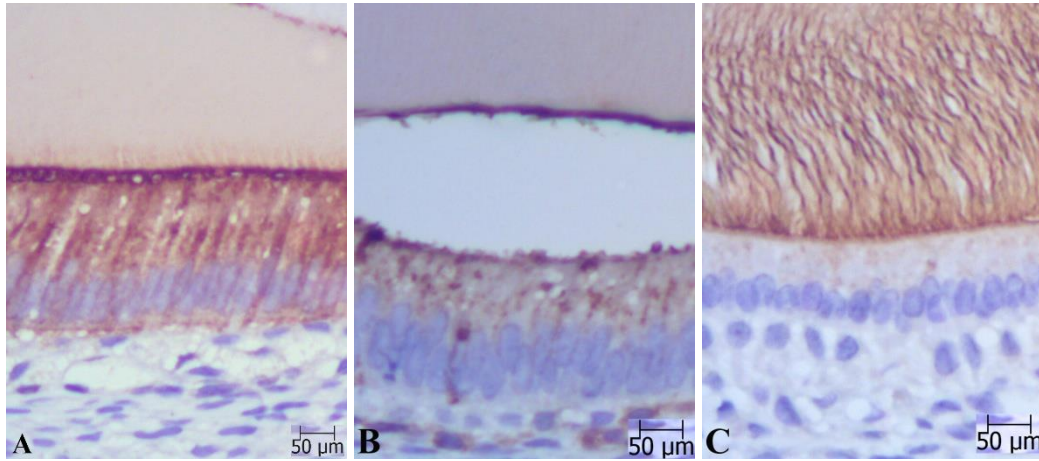
Resim 40: Amoksisilin grubunda orta şiddette AMELX immünekspresyonu (ok)



Resim 41: Amoksisilin grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblastlarda zayıf AMELX immünekspresyonu.



Resim 42: LPS enfeksiyon grubunda zayıf AMELX immünekspresyonu (ok)



Resim 43: LPS enfeksiyon grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli (A), geçiş fazındaki ameloblastlarda orta şiddette (B) ve olgunlaşma fazındaki ameloblastlarda zayıf (C) AMELX immünekspresyonu.

6.3.2.AMBN immünekspresyonu

Tablo 9’da her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMBN boyanma şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir. Tablo 10’da grupların her üç fazda AMBN boyanma şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir.

Tablo 9: Her grubun kendi içinde ameloblast gelişim fazlarının AMBN boyanma şiddetinin istatistiksel olarak kıyaslanması

AMBN İmmünekspresyonu		Kontrol		Kronik Stres		BFA		Amoksisilin		LPS		p
Salgı	Zayıf	0	0,00%	2	28,57%	1	14,29%	7	70,00%	0	0,00%	0,002
	Orta	2	28,57%	4	57,14%	1	14,29%	3	30,00%	4	40,00%	
	Kuvvetli	5	71,43%	1	14,29%	5	71,43%	0	0,00%	6	60,00%	
Geçiş	Zayıf	0	0,00%	1	14,29%	1	14,29%	5	50,00%	4	40,00%	0,001
	Orta	2	28,57%	6	85,71%	5	71,43%	5	50,00%	6	60,00%	
	Kuvvetli	5	71,43%	0	0,00%	1	14,29%	0	0,00%	0	0,00%	
Olgunlaşma	Zayıf	0	0,00%	4	57,14%	1	14,29%	9	90,00%	0	0,00%	0,0001
	Orta	1	14,29%	3	42,86%	3	42,86%	1	10,00%	3	30,00%	
	Kuvvetli	6	85,71%	0	0,00%	3	42,86%	0	0,00%	7	70,00%	
		0,769		0,279		0,175		0,148		0,003		

Fisher’s kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

Tablo 10: Grupların her üç fazda AMBN boyanma şiddetlerinin birbirleriyle istatistiksel olarak kıyaslanması

	Kontrol	Kronik Stres	BFA	Amoksisilin	LPS
Salgı/ Geçiş	1	0,420	0,069	0,650	0,005
Salgı/ Olgunlaşma	0,584	0,405	0,472	0,582	0,639
Geçiş/ Olgunlaşma	0,584	0,264	0,473	0,141	0,002

Fisher’s kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

Kontrol grubunda salgı, geçiş ve olgunlaşma fazlarında kuvvetli ve orta şiddette AMBN immünekspresyonu tespit edildi ve fazlar arasındaki immünekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,769$) (Tablo 9) (Resim 44, Resim 45). Salgı fazı AMBN boyanma şiddeti ile geçiş ve olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=1$, $p=0,584$). Geçiş fazı AMBN boyanma şiddeti ile olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,514$) (Tablo 10).

Kronik stres grubunda salgı fazında tüm seviyelerde, geçiş ve olgunlaşma fazlarında orta ve zayıf şiddette AMBN immünekspresyonu tespit edildi ve fazlar arasındaki immünekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,279$) (Tablo 9) (Resim 46, Resim 47). Salgı fazı AMBN boyanma şiddeti ile geçiş ve olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,420$, $p=0,405$). Olgunlaşma fazı AMBN boyanma şiddeti, geçiş fazı boyanma şiddetinden daha düşük bulundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,264$) (Tablo 10).

BFA grubunun gelişim fazlarında tüm seviyelerde AMBN immünekspresyonu tespit edildi ve fazlar arasındaki immünekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,175$) (Tablo 9) (Resim 48, Resim 49). Boyanma şiddetinin, geçiş fazında ani bir düşüş gösterirken olgunlaşma fazında tekrar arttığı görüldü. Geçiş ve olgunlaşma fazı AMBN boyanma şiddetleri, salgı fazı boyanma şiddetinden daha düşük bulundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,069$, $p=0,472$). Geçiş fazı AMBN boyanma şiddeti, olgunlaşma fazı boyanma şiddetinden daha düşük bulundu fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,473$) (Tablo 10).

Amoksisilin grubunun gelişim fazlarında orta ve zayıf şiddette AMBN immünekspresyonu tespit edilirken, hiçbir fazda kuvvetli boyanma gözlenmedi ve fazlar arasındaki immünekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,148$) (Tablo 9) (Resim 50, Resim 51). Salgı fazı AMBN boyanma şiddeti ile geçiş ve olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,650$, $p=0,582$). Geçiş fazı AMBN boyanma şiddeti ile olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,141$) (Tablo 10).

LPS enfeksiyonu grubunda salgı fazında kuvvetli ve orta, geçiş fazında orta ve zayıf, olgunlaşma fazında kuvvetli ve orta şiddette AMBN immünekspresyonu tespit edildi ve bu fark **istatistiksel olarak anlamlı** bulundu ($p=0,003$) (Tablo 9) (Resim 52, Resim 53). Boyanma şiddetinin, geçiş fazında ani bir düşüş gösterirken olgunlaşma fazında tekrar arttığı görüldü. Geçiş fazı AMBN boyanma şiddeti, salgı fazı boyanma şiddetinden **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,005$). Salgı fazı AMBN boyanma şiddeti ile olgunlaşma fazı boyanma şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,639$). Geçiş fazı AMBN boyanma şiddeti, olgunlaşma fazından **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,002$) (Tablo 10).

Tablo 11’de ise bu değerlerin her grup için kendi arasında istatistiksel olarak kıyaslanması görülmektedir.

Tablo 11: Grupların her üç fazdaki AMBN boyanma şiddetlerinin gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirilmesi

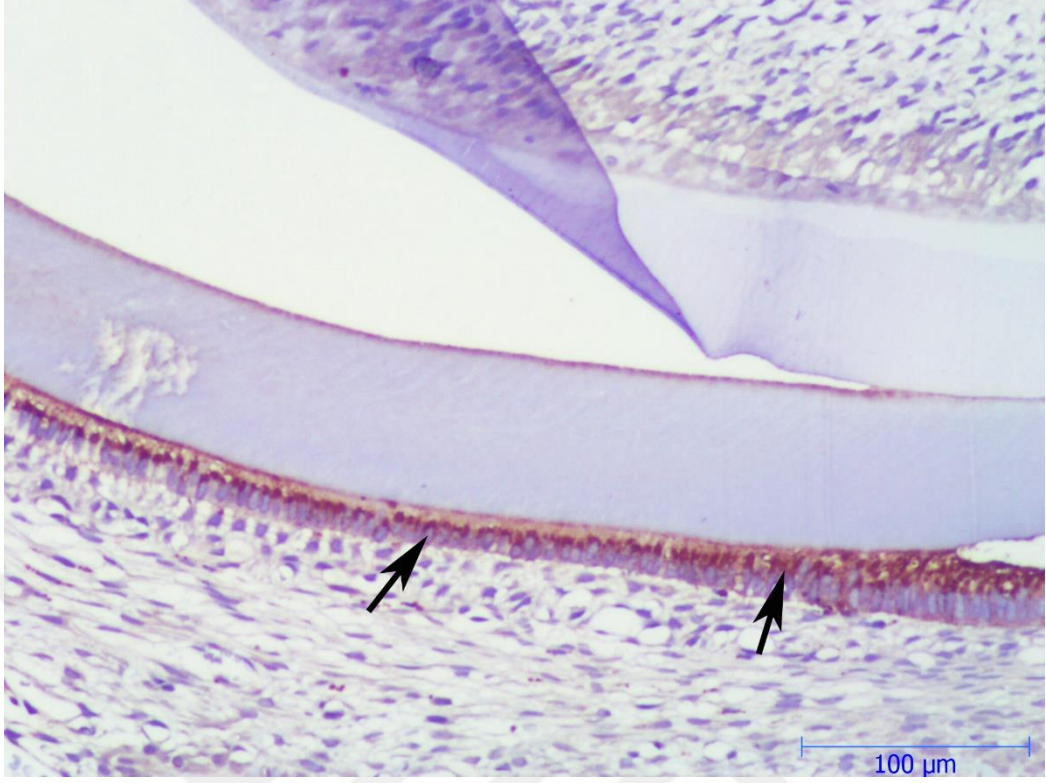
	Salgı	Geçiş	Olgunlaşma
Kontrol/ Kronik Stres	0,069	0,018	0,004
Kontrol/ BFA	0,513	0,084	0,223
Kontrol/ Amoksisilin	0,002	0,004	0,006
Kontrol/ LPS	0,627	0,005	0,442
Kronik Stres/ BFA	0,091	0,579	0,091
Kronik Stres/ Amoksisilin	0,174	0,129	0,116
Kronik Stres/ LPS	0,074	0,252	0,005
BFA/ Amoksisilin	0,005	0,198	0,006
BFA/ LPS	0,295	0,296	0,343
Amoksisilin/ LPS	0,001	0,653	0,002

Fisher’s kesin olasılık testinin Freeman-Halton uzantısı

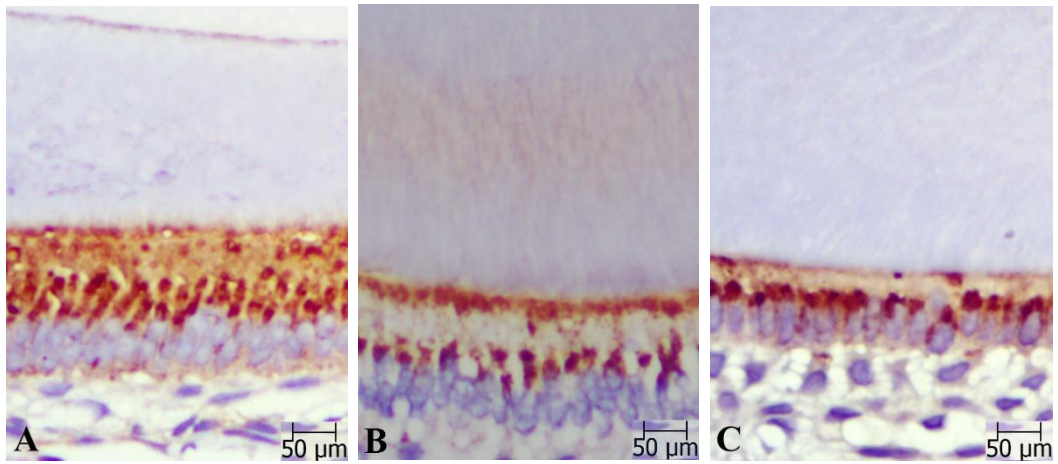
Salgı fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark** bulundu ($p=0,002$) (Tablo 9). Amoksisilin grubunun AMBN immünekspresyonu, kontrol, BFA ve LPS enfeksiyonu gruplarından **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,002$, $p=0,005$, $p=0,001$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 11). Salgı fazında en yüksek AMBN immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırayla BFA, LPS enfeksiyonu, kronik stres ve en düşük amoksisilin grubunda bulundu.

Geçiş fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark** bulundu ($p=0,001$) (Tablo 9). Kronik stres, BFA, amoksisilin ve LPS enfeksiyonu gruplarının AMBN immünekspresyonu, kontrol grubundan **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,018$, $p=0,004$, $p=0,005$), gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 11). Geçiş fazında en yüksek AMBN immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırayla BFA, kronik stres, LPS enfeksiyonu ve en düşük amoksisilin grubunda bulundu.

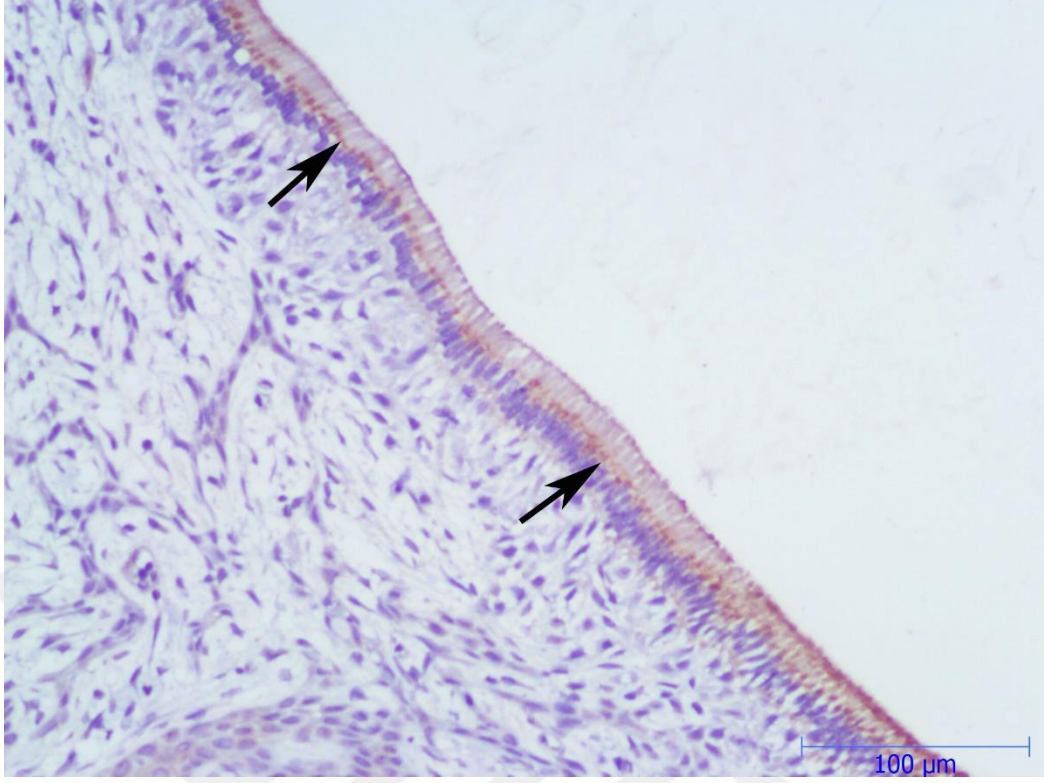
Olgunlaşma fazında, tüm gruplar arasında **istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark** bulundu ($p=0,0001$) (Tablo 9). Kronik stres ve amoksisilin gruplarının AMBN immünekspresyonu, kontrol grubundan **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,004$, $p=0,006$), amoksisilin grubunun AMBN immünekspresyonu, BFA grubundan **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,006$), kronik stres ve amoksisilin gruplarının AMBN immünekspresyonu, LPS enfeksiyonu grubundan **istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük** bulundu ($p=0,005$, $p=0,002$) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo 11). Olgunlaşma fazında en yüksek AMBN immünekspresyonu kontrol grubunda, sonra sırayla LPS enfeksiyonu, BFA, kronik stres ve en düşük amoksisilin grubunda bulundu.



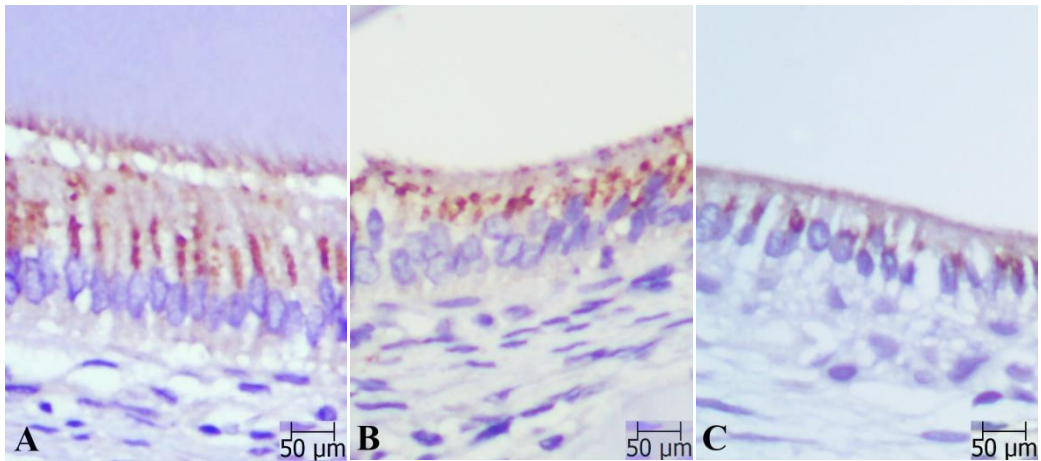
Resim 44: Kontrol grubunda kuvvetli AMBN immünekspresyonu (ok)



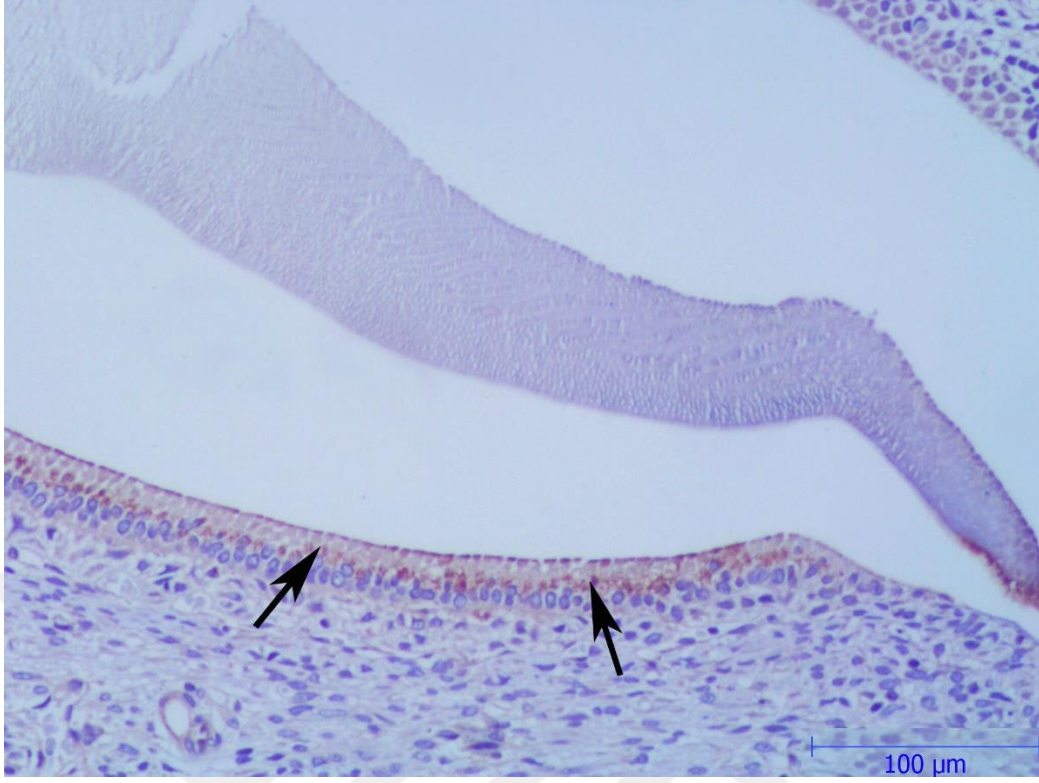
Resim 45: Kontrol grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu.



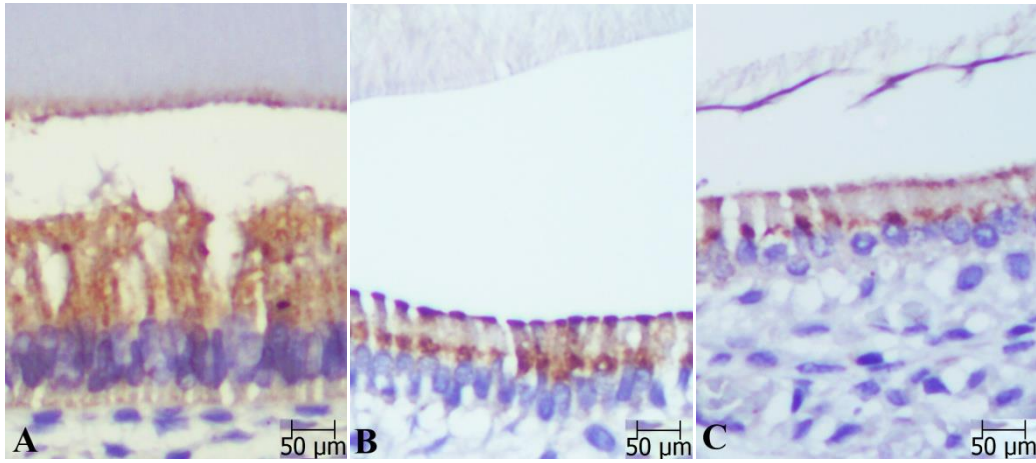
Resim 46: Kronik stres grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)



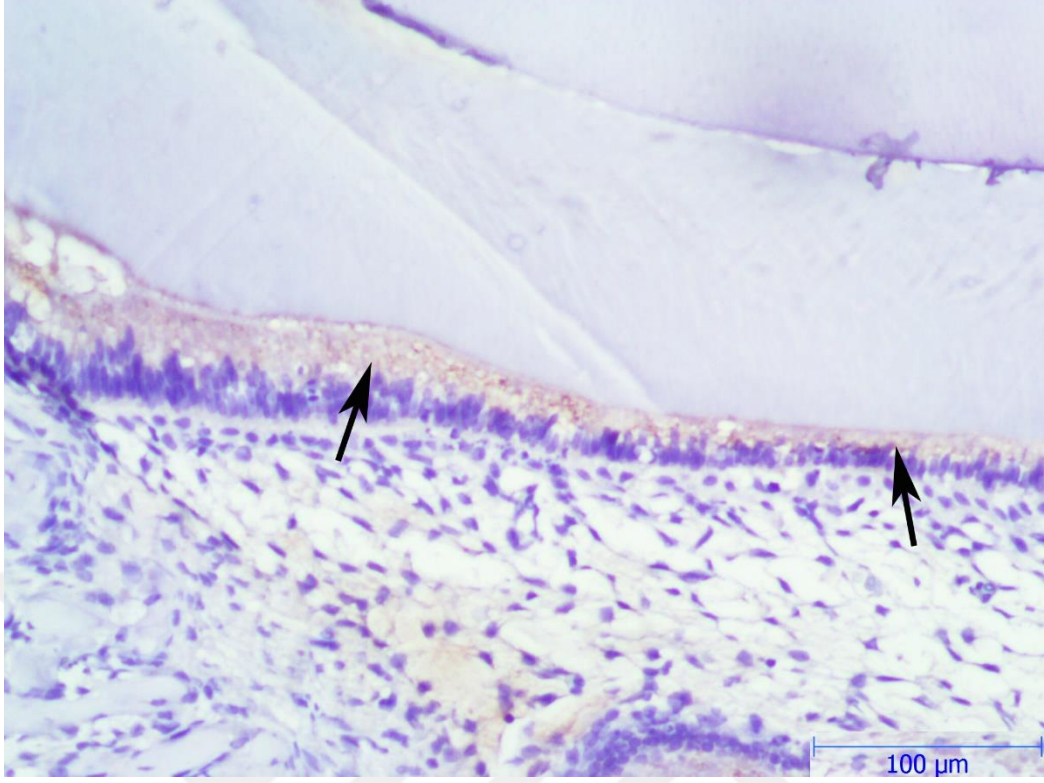
Resim 47: Kronik Stres grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazındaki ameloblast hücrelerinde orta şiddette AMBN immünekspresyonu.



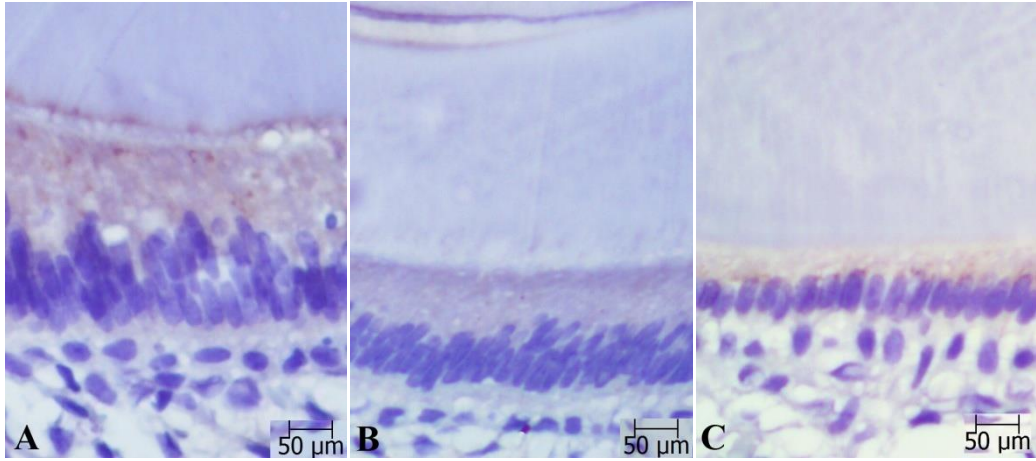
Resim 48: BFA grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)



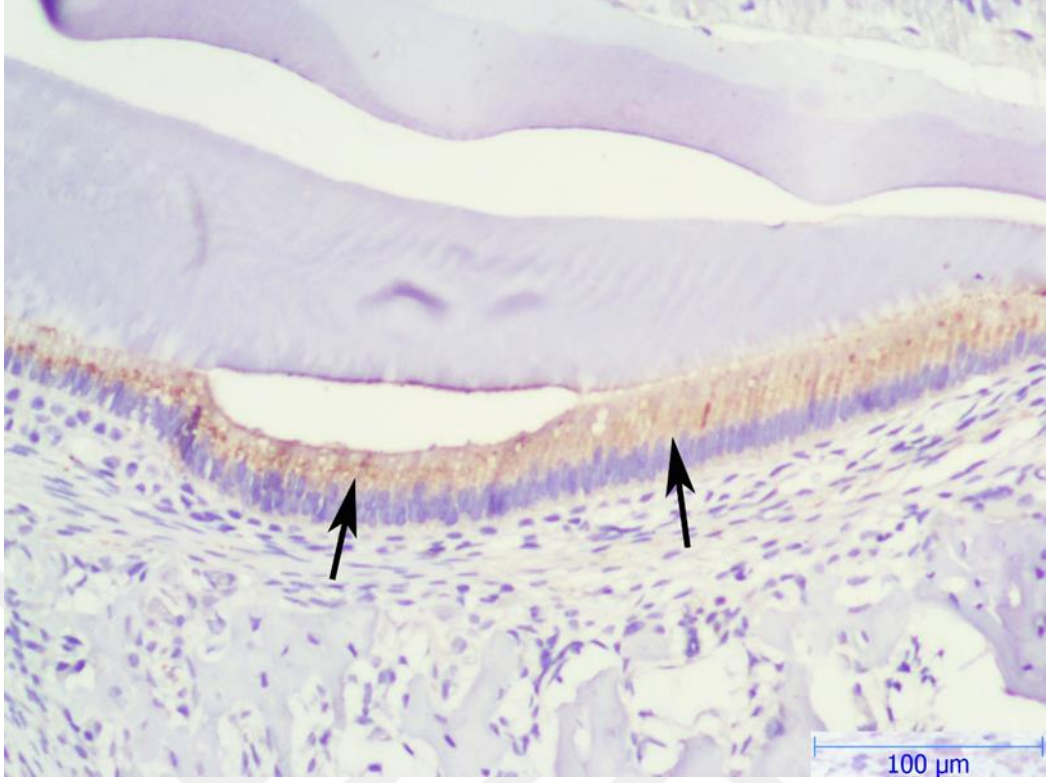
Resim 49: BFA grubunda salgı fazındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblast hücrelerinde orta şiddette AMBN immünekspresyonu.



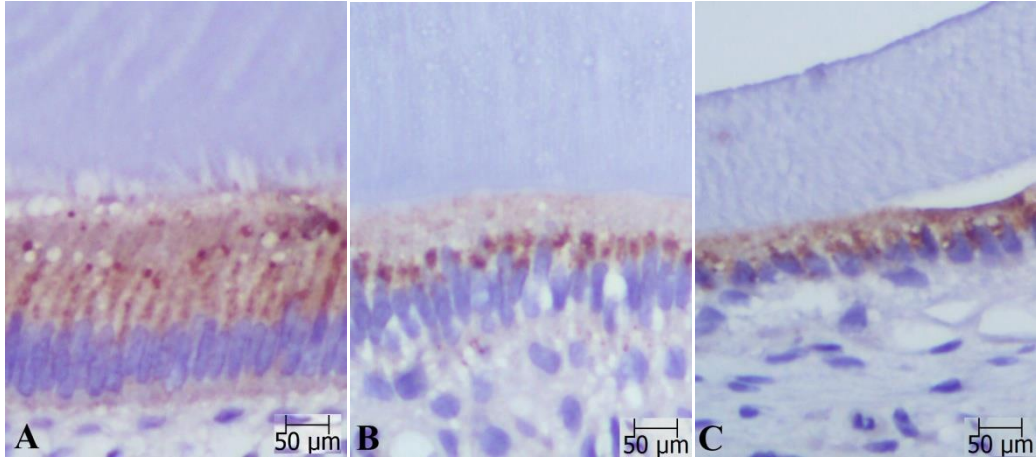
Resim 50: Amoksisilin grubunda zayıf AMBN immünekspresyonu (ok)



Resim 51: Amoksisilin grubunda salgı (A), geçiş (B) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda zayıf AMBN immünekspresyonu.



Resim 52: LPS enfeksiyon grubunda orta şiddette AMBN immünekspresyonu (ok)



Resim 53: LPS Enfeksiyon grubunda salgı (A) ve olgunlaşma (C) fazlarındaki ameloblastlarda kuvvetli AMBN immünekspresyonu, geçiş (B) fazındaki ameloblastlarda orta şiddette AMBN immünekspresyonu.

7.TARTIŞMA

Gelişimsel mine defektleri yüksek prevelansı sebebiyle diş çürüğü ve erken yaşta diş kaybına zemin hazırlayan bozukluklardır (Tourino ve ark., 2016). Defekt oluşumuyla ilgili birçok etiyolojik faktör üzerinde durulmakla birlikte, özellikle prenatal dönemde gelişen molar ve keser dişlerdeki defekt oluşum sıklığı, bu dönemde etki edebilecek olası güncel etiyolojik faktörler üzerinde çalışılma gerekliliğini işaret etmektedir.

Ameloblastlar mine oluşumunu sağlayan hücrelerdir. Temel olarak salgı öncesi faz, salgı fazı ve olgunlaşma fazı olarak üçe ayrılan yaşam döngüleri; bazı kaynaklarda morfogenetik, organizasyon, formasyon, olgunlaşma, korunma ve desmolitik fazlar olarak daha ayrıntılı altı faza ayrılır. Mine formasyonunu sağlayan amelogenesis, formasyon ve olgunlaşma fazlarında gerçekleşir. Formasyon aşamasında mine matriksi salgılanırken olgunlaşma aşamasında mine matriksinin mineralizasyonu gerçekleşir (Kanchan ve ark., 2015).

Patolojik amelogenesisin tanımları başlıca hipoplazi veya hipomineralizasyon şeklindedir. Matriks formasyonu etkilenirse mine hipoplazisi oluşur ve klinik olarak aşınmalar, oyuklar veya total mine kaybı olarak kendini gösterir. Olgunlaşma fazında oluşan bir kesinti hipomineralizasyonla sonuçlanır ve normal kontura sahip mine yüzeyinde opak veya tebeşirimsi alanlar şeklinde kendini gösterir (Kanchan ve ark., 2015).

Gelişimsel mine defektleri, hipoplazi ve diffüz/ sınırları belirgin opasiteler; fluorosis ve amelogenesis imperfekta gibi dental defektleri içerir. Mine hipoplazisi, mine matriks sekresyonunda duraksama, defektli kalsifikasyon veya defektli maturasyon sebebiyle oluşan bir diş kuru yüzeyi defektidir. Mine hipoplazisi veya hipomineralizasyonu kalıtsal faktörler ve çevresel faktörler sebebiyle oluşabilir. Çevresel faktörler olarak düşünülen beslenme faktörleri, kızamık ve su çiçeği gibi döküntülü hastalıklar, kongenital sifilis, hipokalsemi, doğum travması veya prematüre doğum, fluor intoksikasyonu gibi sistemik faktörlerin yanı sıra, enfeksiyon veya süt dişi travması gibi lokal faktörlerin de defekt oluşumuna sebep olabileceği iddia edilmektedir. Kalıtsal hipoplazi veya hipomineralizasyona amelogenesis imperfekta denir (Kanchan ve ark., 2015). Otozomal dominant, otozomal resesif, cinsiyet

bağlantılı geçişler olabileceği gibi nadir görülen kalıtım modelleri ve nadir vakalar da bulunmaktadır (Crawford ve ark., 2007).

Çalışmamızın amacı, prenatal dönemde maruz kalınmasının amelogenesis üzerinde etkisi olduğunu düşündüğümüz dört etiyolojik faktörün mine oluşum sürecine ve mine matriks oluşumunda önemli role sahip olan amelogenin ve ameloblastin üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz faktörlerden BFA toksifikasyonu ve amoksisilin kullanımının amelogenesisise etkisini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur (Indahyani ve ark., 2007; Gottberg ve ark., 2014; Jedeon ve ark., 2013). Kronik stres ve enfeksiyonun mine oluşum sürecine etkisini araştıran bir çalışmaya ise literatürde rastlamadık.

Hayvanlar, milattan önce 300'lü yıllardan beri biyomedikal çalışmalarda kullanılmaktadır (Hajar, 2011). Canlı hayvanların kesilerek incelenmesi, filozoflarca uygulandığı ilk yer olan Yunanistan'a dayanır. Bu dönemde canlıların anatomilerinin öğrenilmesi üzerine yoğunlaşan tıp bilimi, sonraki dönemlerde fizyolojik deneyler uygulamaya başlamıştır. On dokuzuncu yüzyıl sonlarından itibaren, hayvan deneyleri giderek artmış ve biyomedikal araştırmalarının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir (Zortuk ve Kıraç, 2010).

Deney hayvanı olarak kullanılmış ve kullanılmakta olan türler; sıçan(rat), kobay, tavşan, köpek, kedi, domuz, koyun, amfibi, balık, kuş, boğa, primatlar ve sürüngenlerdir (Zortuk ve Kıraç, 2010; Sengupta, 2012). Kullanılan deney hayvanlarının %80'ini kemirgenler, kemirgenlerin %20'sini sıçanlar oluşturmaktadır (Sengupta, 2012). Sıçanlar, diş yapılarının ve dişe ait dokuların gelişiminin, insan dişine benzerliği sebebiyle, diş gelişimini etkileyen faktörlerin araştırılması açısından deneysel çalışmalarda sık kullanılan hayvanlardır (Grift ve Farris, 1942). Biz de çalışmamızda iyi bir deney modeli oluşturmaları, bakımlarının ve üretilmelerinin daha kolay olması, çene ve diş yapılarının deneysel çalışmalara uygun olması sebebiyle sıçanları tercih etmiş bulunmaktayız.

Sıçanlarda 4 kesici ve 12 molar diş olmak üzere tek set dişlenme mevcuttur. İnsan dişleri gibi mine, dentin, sement ve pulpaya sahiptirler ve amelogenesis süreci de insan dişleriyle benzerdir. Kesici dişlerin sadece labial yüzeyi mine ile kaplıdır ve yaşam boyu sürmeye devam ederler. Molar dişlerin tüberkül tepesi hariç tüm kuron yüzeyi mine ile kaplıdır (Grift ve Farris, 1942). Amelogenesisise etki eden faktörlerin

incelenmesinde sıçan kesici ve molar dişleri araştırmalarda kullanılmaktadır (Gottberg ve ark., 2014; Nishikawa ve Abe, 2010; Guo ve ark., 2015). Kesici dişler ömür boyu sürme özellikleri sebebiyle, belli bir dönemde uygulanan etkenin sürme miktarı hesaplanarak incelenebilmesi imkanı sebebiyle tercih edilirken (Bourd-Boittin ve ark., 2004; Yamaguti ve ark., 2005; Miwa ve ark., 2013), prenatal dönemde uygulanan etkenlerin amelogenesise etkisini araştırmak amacıyla molar dişler de geçmiş çalışmalarda kullanılmıştır (Gottberg ve ark, 2014; Chen ve ark., 2012; Correa ve ark., 2014). Biz, hamile sıçanlara çeşitli çevresel toksifikasyonlar uyguladığımız çalışmamızda, yavru sıçanların mine yapılarının iu hayatta oluşuyor olması, 18. güne kadar henüz sürmemeleri ve ilgili ameloblastların tüm fazlarının histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenebilir olması sebebiyle Sant’Anna ve ark. (2005) gibi sürmemiş molar dişlerde çalışmayı tercih ettik ve yine ameloblastların tüm gelişim aşamalarını gözlemleyebilmek amacıyla sıçanları Kondo ve ark.’na (2001) benzer şekilde postnatal 10. günde sakrifiye ettik.

Mine defektlerini tespit etmek ve incelemek için birçok görüntüleme yöntemi ve histolojik yöntemden faydalanılmaktadır. Işık mikroskobu, kontakt mikroradyografi, bilgisayarlı mikrotomografi, taramalı elektron mikroskobu çalışmalarda sıklıkla kullanılan görüntüleme yöntemlerinden bazılarıdır (Kumazawa ve ark., 2012; Jedeon ve ark., 2013; Chen ve ark., 2012). Rutin histolojik boyama yöntemlerinin yanında, immünohistokimyasal yöntem, amelogenesisde rol alan proteinlerin yoğunluğunun incelenmesi var olan defektlerin derecesinin kantitatif olarak belirlenmesine imkan sağlamaktadır (Ping ve ark., 2006; Li ve ark., 2017). Biz de çalışmamızda De Souza ve ark. (2015) gibi immünohistokimyasal yöntemle mine proteinlerinin yoğunluğunu, Porto ve ark. (2009) gibi stereomikroskopla mine yüzeyinin makroskobik görüntüsünü inceledik.

Gelişmekte olan dişlerin mine matriksi, son yıllarda keşfedilen ve henüz çok fazla çalışılmamış bir glikoprotein olan amelotinin dışında uzun yıllardır çalışılan temel yapısal proteinler olan amelogenin, enamelin ve ameloblastini içerir. Bu proteinler SCPP ailesine ait atadan kalma bir genden köken alırlar. Enamelin ve ameloblastin, insan kromozom 4’ün q kolunda küçük bir alandadırlar (4q13). İnsan amelogenin geni X ve Y kromozomlarında bulunur. Amelogenin geni cinsiyet kromozomlarına yer değiştirirken; enamelin ve ameloblastin orijinal kromozomlarında kalır. X- kromozom

amelogenin geni (AMELX) ve enamelin genindeki (ENAM) mutasyonlar nonsendromik mine malformasyonlarına sebep olur. İnsan ameloblastin geninde (AMBN) hastalık oluşturan mutasyonlar gözlenmemiş fakat fare Ambn geninde ekzon 5 ve 6'nın silinmesiyle neredeyse hiç mine formasyonu olmadığı görülmüştür (Bartlett, 2013; Fukumoto ve ark., 2004).

Mine matriks proteinleriyle ilgili aydınlatıcı iki nokta vardır. Birincisi mine formasyonu için gerekli olmaları fakat daha sonra onları matrikse salgılayan ameloblastlar tarafından absorbe edilmeleridir. Bu yüzden proteinler mine formasyonu için gereklidir fakat final olgun ürünün bir parçası değildirler. Olgun minede sadece eser miktarda protein kalır. İkinci önemli nokta ise çoklu diş eksikliği veya mine eksikliği olan türlerde mine matriks proteinlerini kodlayan genler dejenere olduğunun tespit edilmesidir. Dişsiz kuşlarda ve çubuklu balinalarda amelogenin, ameloblastin ve enamelin genlerinin dejenere olduğu görülmektedir. Dişsiz memeli türlerinde fonksiyonel amelogenin geni dejenere olmuştur. Buna göre amelogenin, ameloblastin ve enamelin sadece mine gelişiminde önemlidir ve mine olmayan türlerde bu genlerin olmasının herhangi bir avantajı yoktur. Bazı gruplar spesifik mine matriks proteinlerinin mine formasyonu görevinin yanında molekül iletişimde önemli olduğunu ileri sürmüştür. Fakat dişsiz veya minesiz memelilerde bu genlerin fonksiyonel olmaması bu görüşün doğru olmadığını düşündürmektedir (Bartlett, 2013).

Amelogenin minede en fazla bulunan proteindir ve mine formasyonunda önemlidir (Bartlett, 2013). İnsanlar ve domuzlarda X ve Y kromozomlarında birer tane amelogenin geni varken farelerde sadece X kromozomunda bulunur (Yamakoshi, 2011). Memelilerde amelogenin aminoasit sırasının N- ve C- sonlanmaları çok iyi korunur ve C- sonlanması fazla yüklüdür. İç kısımdaki protein 8.0 pI iken sonlanma 4 pI' dir. Erkek insanların amelogenin mRNA'sının %90'ı X kromozomundan çıkmaktadır. Genlerinden Amelx çıkarılmış farelerde, defektif ve hipoplastik mine ve organize olamamış mine çubuk paterni görülmüştür. Amelogenin sadece Ser16 forsorile olduğunda posttranslasyonel modifikasyon gösterir fakat transkriptleri 16 X-kromozomsal fare amelogenin mRNA'sı oluşturmak için yaygın bir alternatif birleşmeye gider. Amelogenin alternatif birleşmesinin fonksiyonu net değildir (Bartlett, 2013). Önceki çalışmalar amelogenin eksik farelerde en sık görülen Amelx

transkriptini içeren transgenler kullanmıştır. Bu transkriptler fare 180 aminoasit amelogenin proteini (M180) ve fare 59 aminoasit proteini (M59) kodlamaktadır. Amelogeninsiz farenin mine kalınlığı normal fare minesinin %10-20'sidir. M180 mine kalınlığını arttırıp çubuk paternini geliştirirken M59 böyle bir etki göstermemektedir. İki transgen de aynı farede olduğunda, mine kalınlığı ve çubuk yapısı gelişiminin M180'nin tek başına olduğu duruma kıyasla artış gösterdiği görülmüştür. Bu mine, molarlarda normal mine kalınlığının yarısından biraz fazla, keserlerde 1/3'üdür (Gibson ve ark., 2011). Alternatif bağlanmış amelogenin transkriptlerinin kalma sebepleri belirsiz olsa da mine kalınlığı oluşmasında katkı sağladığı ve mine çubuklarının çaprazlanmasını sağladığı görülmüştür (Bartlett, 2013).

İlginç olarak amelogeninle ilgili yapılan birçok *in vitro* çalışmada mine formasyonunu nasıl indüklediği açıklık kazanmamıştır. Daha az miktarlarda bulunan diğer proteinlerle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Glikozillenmiş ameloblastin ve yüksek derecede glikozillenmiş enamelinin aksine amelogenin salgılamak ve saflaştırmak daha kolaydır. Tek fosfat içeren posttranslasyonel modifikasyonu vardır. Bu yüzden bakteri ekspresyon sistemleri veya fazla miktarda olmasından dolayı olgunlaşmamış domuz dişinden ayrıştırılabilir. Bu yöntemlerin hiçbiri *in vitro* kristal büyümesi deneyleri için yeterli miktarda olmadığından enamelin ve ameloblastin için uygun değildir. Nakavt fare modelleriyle yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre amelogenin kendi başına kristal büyümesi ve mine formasyonu başlatmamaktadır (Bartlett, 2013). Ameloblastin ve enamelin genleri çıkarılan farelerde gerçek mine oluşumu ve kristal yapısı gözlenmemektedir (Fukumoto ve ark., 2004; Hu ve ark., 2008). Dikkat çekici bir şekilde amelogeninsiz farelerde normal fare minesine oranla daha az olmakla beraber ölçülebilir kristaller ve kristal organizasyonu görülmüştür (Wright ve ark., 2011). Ameloblastin ve enamelinin izole edilmesi ve saflaştırılması zor olsa da mine gelişimi açısından önemi anlaşılmıştır (Bartlett, 2013).

İnsanda X bağımlı amelogenesis imperfekta sebebi olarak iki tam gen silinmesini içeren on sekiz AMELX mutasyonu gösterilmiştir. X bağımlı amelogenesis imperfekta tüm AI'nın %5'ini oluşturur (Hu ve ark., 2012). Mutasyon lokasyonuna göre mine fenotipi değişir, fakat kadınları etkileyen belli AMELX mutasyonları normal ve hipoplastik mine bantları içeren vertikal çizgiler oluşturmaktadır. Bu, muhtemelen gelişim sürecinde defektif ve normal X-

kromozomlarının random olarak inaktive olmasından kaynaklanmaktadır. Etkilenmiş erkeklerde ise daha şiddetli bir fenotip görülmektedir (Bartlett, 2013). AMELY mutasyonlarında hiç AI vakası rapor edilmemiştir ve AMELY çıkartılan iki bireyde normal mine yapısı gözlenmiştir (Lattanzi ve ark., 2005). AMELX ve AMELY genlerinin ikisi de 7 ekzon içermesine rağmen bu genler ayrılır ve homolog bir yeniden kombinasyona uğramazlar. Bu nedenle bu genler adli tıpta cinsiyet belirlenmesinde kullanılmaktadır (Bartlett, 2013). Amelogenin eksikliği, amelogenin nakavt farelere benzer şekilde, insanlarda da daha ince bir mine tabakası oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu tabaka diş lateral yüzeylerine kıyasla tüberkül tepeleri ve marjinal kenarlarda daha kalındır (Hu ve ark., 2012). Amelogeninin mine kristali nükleasyonunda görev almadığı fakat kristallerin boy uzaması ve organize olmasında gerekli olduğu görülmüştür (Bartlett, 2013).

Ameloblastin, minede en sık görülen ikinci proteindir. AMBN geni 4q21 kromozomunda bulunur ve 13 ekzona sahiptir (Mardh ve ark., 2001). İlk olarak domuz minesinden izole edilen ameloblastin, SDS PAGE’de (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ağırlığı 13-17 kDa arasında değişen nonamelogenin bir protein olarak tanımlanmıştır (Fukae ve Tanabe, 1987). İmmünohistokimyasal çalışmalarda bu proteinin mine çubukları arasında kın boşluğu denilen alanda bulunduğu gösterilmiş, bu nedenle bu proteinlere kın proteinleri denilmiştir (Uchida ve ark., 1991). Kın boşluğunda bulunan proteinler ameloblastinin bozunma ürünleridir. Yeni oluşan mineden en uzakta bulunan bozulmamış ameloblastin, yıkım ürünleri gibi kın boşluğunda değil, mine çubuklarının üzerinde bulunur (Uchida ve ark., 1997). Bu bilgi, tam uzunluktaki ameloblastinin mineralizasyon cephesinde bir rol oynadığını ve ayrışıp kın boşluğunda biriktiğinde farklı bir fonksiyonu olduğunu öne süren ilk veridir (Bartlett ve Simmer, 1999).

Neredeyse eş zamanlı olarak, ikisi sıçandan biri domuzdan olmak üzere üç farklı grup birbirlerinden bağımsız olarak ameloblastin cDNA’sı klonlamıştır. Bu sebeple farklı isimler önerilmiştir. Sıçan proteinine ‘ameloblastin’ (Krebsbach ve ark., 1996) ve ‘amelin’ (Cerny ve ark., 1996), domuz proteinine ‘sheatlin’ (Hu ve ark., 1997) adı verilmiştir. Genin ismine ise ‘ameloblastin’ (Ambn) adı verilmiştir. Domuzda, bozulmamış bir ameloblastin proteini 395 amino asitten oluşur fakat SDS PAGE’de beklenen yaklaşık 62 kDa molekül kütlelerinden daha yüksek şekilde göç etmiştir.

Akabinde ameloblastinin Ser86 ve Thr348'de O-glikozillenmiş, Pro11 ve Pro324'te hidroksillenmiş olduğu ve golgi kazein kinaz ile fosforilasyona ihtiyaç duyan dört serine (Ser15, Ser17, Ser209 ve Ser210) sahip olduğu keşfedilmiştir (Brunati ve ark., 2000). Ameloblastin mRNA'sı farklı bağlanmalar gösterir ve bağlanma şekli ameloblastin proteininin glikozilasyon durumunu belirler (Kobayashi ve ark., 2007). Sinyal peptidi hariç, geçiş ürünleri 380 ve 395 amino asitten oluşur ve daha küçük olan ameloblastin izoformu daha büyük olandan ekzon 5'in 5. sonlanmasında kodlanan 15 amino asit eksikliğiyle ayrılır. Fonksiyonu tam olarak anlaşılamasa da, bu N-sonlanma alanı türler arasında yüksek derecede korunmuştur ve Ser86 O-glikozilasyon alanı içerir. Bu sebeple ameloblastin translasyon sonrası çok sayıda modifikasyon geçirir ve farklı bağlanmıştır. Daha küçük olan bağlanma ürünlerinin translasyonu, ameloblastinin iki O'ya bağlı fosforilasyon bölgesinden birini içeren yüksek derecede korunmuş alanın kaybıyla sonuçlanır (Bartlett, 2013).

Bozunmamış ameloblastin gelişmekte olan minenin işareti olan bir komponenttir ve asla *in vivo* olarak izole edilemez (Chun ve ark., 2010). Ameloblastinin MMP20 tarafından parçalanması, domuz mine matrisindeki tüm ameloblastin yıkım ürünlerini açıklamaktadır. N sonlanma alanından salınan başlangıç yıkım ürünleri, SDS-PAGE jellerinde öncelikle gözlenen 17 ve 13 kDa ürünleri (Fukae ve Tanabe, 1987) ve ayrıca bir 15 kDa yıkım ürününü içerecek şekilde üç tanedir (Fukae ve ark., 2006). Daha sonra MMP20'nin ameloblastin yıkım bölgesi seçimiyle ilgili yapılan detaylı analizlere göre MMP20 yıkım ürünleri meydana getirmek için öncelikle N terminaline yakın olan üç bölgeden birinde bulunan büyük ameloblastin bağlanma ürününü (395 atom grubu) parçalar. Bu başlangıç ürünleri daha sonra aynı alanlarda veya çoğunlukla C sonlanmasına yakın olan sekonder alanlarda ikinci veya üçüncü kez tekrar yıkılır. N sonlanması yıkım ürünleri mine tabakası boyunca kın boşluğunda birikirken, kalsiyum bağlayan C sonlanması yıkım ürünleri mine çubuklarının üzerindedir ve yeni oluşmuş mine yüzeyinden 50 μ m sonraki derinliklerde saptanamazlar (Murakami ve ark., 1997). Bu durum, ameloblastinin bozunmaya elverişli, yapısal olmayan bir bağlayıcıyla bağlanmış N- ve C- sonlanma alanlarına sahip olduğunu gösteren 3 boyutlu insan ameloblastin modeliyle de uyumludur (Vymetal ve ark., 2008). Bu bilgiler, ameloblastinin oluşmakta olan minenin farklı alanlarında bulunan ve mine

gelişiminde farklı roller oynadığı tahmin edilen N- ve C- sonlanma yıkım ürünlerinin olduğu yönündeki geçmiş verileri pekiştirmektedir (Bartlett, 2013).

Ameloblastin, çubuklu balinaların belli türlerinde psödogen olarak bulunur ve diğer dokularda kritik fonksiyonlara sahip olduğunu öne süren yayınlara rağmen, fareden Ambn'in silinmesi sadece mine gelişimini etkilemiştir (Meredith ve ark., 2011). Son zamanlarda ameloblastinin kök gelişimi için de önemli olduğunu ileri süren yayınlar da mevcuttur. Fakat ameloblastin mutasyonlu bir fare çalışmasında mutant farenin kök formasyonunun doğal fenotipli ve Ambn +/- fareden farklı olmadığı rapor edilmiştir. Ameloblastinin hakkında en fazla yayın yapılan alternatif fonksiyonu kemik yapımı ve tamiri ile ilgilidir. Fakat NCBI UniGene veritabanında AMBN arandığında EST profili insan ve fare kemiğinde tek başına AMBN transkripti bulunmadığı görülmektedir. Diğer taraftan EST Profili fare molarlarından bir EST analizi içermektedir ve fare molar dokularında Ambn transkripti bulunmuştur (Bartlett, 2013).

İnsanda AMBN mutasyonlarının AI'ya neden olduğu henüz bulunmasa da, Ambn'den ekzon 5 ve 6'nın silindiği bir fare modeli mevcuttur. Aslında bu fare modelinin gerçek bir nakavt Ambn modeli kabul edilmesinden sonra aynı farede ekzon 5 ve 6'sız bir Ambn mRNA ekspresyonu olduğu ve bu kesilmiş mRNA'nın fare mine organından hücrelere geçiş yaptığı keşfedilmiştir. Fakat daha önce de belirtildiği üzere bu proteinin mutasyonu şiddetli bir mine fenotipine sebep olur. Bu fenotipte, dentin üzerinde çok ince displastik bir mineralize materyali birikir ve bu materyal mine sayılamayacak çubuksuz ve kristalsiz bir yapıdır (Wazen ve ark., 2009). İlginç bir şekilde, ameloblastların minenin oluşacağı bölgeye komşu olan bazal membrana yapıştığı salgı öncesi faz sürecinde, Ambn mutasyonu olan ameloblastlar da normal bir şekilde organize olur ve salgı fazı ameloblastlarına dönüşmek için karakteristik uzama sürecine girerler. Erken salgı fazından sonra bazal membran ortadan kalktığında bu ameloblastlar matriks tabakasından ayrılır, hücre polaritelerini kaybeder ve çok katmanlı bir hücre yapısı oluşturmak için birbirleri üzerine katlanırlar. Bu da ameloblastinin hücre adezyonunda rol oynadığını düşündürmektedir. Fakat enamelin geninin çıkarılması da Ambn mutasyonlu farelerdeki benzer ileri displastik ameloblast tabakası morfolojisine sebep olur. Displastik ameloblast tabakasına getirilebilecek alternatif bir açıklama da, Ambn mutant ve Enam'ı çıkarılmış farelerde

mine tabakası oluşmadığına göre, ameloblastların bağlantı aparatları bozulmamış olsa bile doğal olmayan yüzeylere tutunmada başarısız oldukları şeklindedir. Bazal membran çözüldükten sonra, ameloblastlar mineral yüzeyine komşu bölgelere sıkı bağlantılar yapmamaya başlarlar ve salgı fazına geçince mine yüzeyine gevşek bir şekilde tutunurlar. Buna ek olarak doğal fenotip ameloblastlar, mine tabakası hızla kalınlaşırken geriye hareket eder ve servikal kavisteki hücre proliferasyonu ameloblastların dentinden uzağa doğru olan bu hareketini kompanse eder. Ambn ve Enam mutasyonlarında görülen şekilde mine kalınlığı azaldığında, ameloblastlar normalde kapladıklarından daha küçük bir alan kaplar; bu da diplastik morfolojiye sahip olmalarına sebep olur (Hu ve ark., 2011). Ambn mutasyonlu farelerde erken salgı fazından sonra kesintiye uğrayan bir ameloblast tabakası morfolojisi olmasına rağmen, bu durum hızla kalınlaşması gereken mine tabakasının neredeyse tamamen yok olmasının sekonder bir sonucu olabilir. Ameloblastin ve enamelinin önce kristalit nükleasyonu, daha sonra ise kristalit uzamasında daha etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Bartlett, 2013).

Bu çalışmada, mine oluşumunda direk etkili oldukları birçok çalışmada rapor edilmiş olması nedeniyle, immünohistokimyasal inceleme için amelogenin (Massa ve ark., 2006) ve ameloblastin (Lee ve ark., 2003) proteinleri tercih edilmiştir.

Mental bozukluklar dünya genelinde 450 milyon insanı etkilemektedir (De Brito Guzzo ve ark., 2015). Kronik stresin, popülasyonun büyük bir kısmının maruz kaldığı bir etken olduğu kabul edilmektedir (Glaser, 2005). Üstesinden gelinmeyen küçük problemler günden güne büyüyerek şiddetli hastalık durumlarına yol açmaktadır (Semenoff ve ark., 2013). Depresyon, hamile kadınların %10-20'sini etkileyen bir bozukluktur (Bourke ve ark., 2013). Kadınların, özellikle ergenlik ve menapoz gibi gelişimsel periyodlarında, premenstural dönemlerinde veya östrojen ve progesteron seviyelerinin değiştiği durumlarda duygu durum değişimi ve anksiyete gibi bozukluklar geliştirmeye daha yatkın oldukları bilinmektedir (Solomon ve ark., 2009). Hamilelik de benzer bozukluklara yatkınlığın artabildiği kritik bir süreçtir (Guardino ve Schetter 2014). Hamilelik, bir kadının sosyal, profesyonel, duygusal hayatında ve vücudunda keskin değişikliklerle karakterize bir kriz dönemidir. Bilindiği üzere modern dünya kadına, embriyoyu hamilelik boyunca taşıma, doğum ve emzirmenin dışında anne olma kavramının sosyal rolünü de yüklemektedir. Eklenen bu

sorumluluklar anatomik, fizyolojik ve psikolojik değişimlerle birleştiğinde stres faktörlerinin etkisini arttırarak yaşam kalitesini etkileyebilir (De Brito Guzzo ve ark., 2015).

Organizmanın varlığı, stres etkenleri tarafından sürekli bozulan hemostatik dengenin sağlanmasına dayanır. Beyin, bu stres etkenlerini tehdit edici veya tehdit edici olmayan şekilde sınıflayıp, uygun fizyolojik ve davranışsal yanıtlar oluşturmaktan sorumludur (McEwen, 2007). Hemostazı tehdit eden veya kesintiye uğratan ve stres yanıtı oluşumunu aktive eden her türlü kuvvete stres etkeni denir. Bu etkenlere verilen yanıtlar, çeşitli endokrin, metabolik, immün ve nöral savunma yanıtları şeklindedir (Meaney ve ark., 1985). Stres etkeni elimine edildiğinde, stres yanıtı sona erer ve organizma hemostaza döner. Beynin stres yanıtının birincil biyolojik mekanizması hipotalamus hipofiz adrenal (HPA) akstır. Beyin bir stres uyarını aldığında, hipotalamustaki paraventriküler çekirdek, kotrikotropin salgı faktörü (CRF) ve arginin vazopresin (AVP) salgılar. CRF ve AVP ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgısını stimüle ederek, adrenal bezlerden glukokortikoid (GC) ve mineralokortikoid salınımını aktive eder. GC kan dolaşımına katılır ve enerji substratlarının yararlanılabilirliklerini arttırmak suretiyle katabolik prosesi uyarır. HPA aksı, negatif feedback ile regüle edilir; GC seviyesi belli bir noktaya kadar arttığında, ACTH ve CRF salgısı durdurularak yanıt sonlandırılır (Kofman, 2002).

Kemirgenlerdeki major GC kortikosteron iken, insanlarda kortizoldür. HPA aksının aktivasyonu, immün yanıtı ve hücre büyümesi ve üretimi gibi süreçleri geçici olarak baskılayarak, hayvanın tüm kaynakları stres etkenini elimine etmeye harcamasını sağlar (Kofman, 2002). Bu yanıt, akut stresin elimine edilmesi için faydalı ve avantajlıdır. Uzamış ve kalıcı stres sonucunda HPA aksının kronik hiperaktivitesi, uyumsuz bir hemostaz durumuna sebep olur (Talge ve ark., 2007). Uzamış stres ve kronik GC salınımı, doku hasarı, gecikmiş metabolizma ve immün yanıtı sebep olmaktadır (Meaney ve ark., 1985).

Stres yanıtı hamilelik sürecinde aktive olursa HPA aksının etkileri anneyle sınırlı kalmaz. GC gibi annenin adrenal bezinden salgılanan lipofilik steroidler plasenta bariyerini kolaylıkla aşıp, gelişmekte olan fetüse etki edebilirler (White ve ark., 1997). Fetal dönemde maruz kalınan kronik stres, yavrunun gelişimini duraksatırken, nöroendokrin organizasyon, biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal gelişim

süreçlerinde kısa veya uzun vadeli gecikmelere sebep olur (Viltart ve Vanbesien-Mailliot, 2007). Hamilelik sürecinde artan GC seviyesi, azalmış doğum ağırlığı (Meaney ve ark., 2007), dentat girusta hücre proliferasyonu azalması (Lemaire ve ark., 2000), hipertansiyon ve tip 2 diyabet gibi yetişkinlik dönemi hastalıkları (Seckl, 2004), beyin fonksiyonu değişiklikleri (Darnaudery ve Maccari, 2008), şizofreni ve Alzheimer (Sanchez-Cardoso ve ark., 2009) gibi birçok bozuklukla ilişkili bulunmuştur. Ayrıca prenatal stres erken doğum ve düşük doğum ağırlığına da sebep olmaktadır (Wadhwa ve ark., 2004).

Geçmiş çalışmalar, farklı stres türlerinin kemik büyüme gelişimini ve fonksiyonunu etkilediğini göstermiştir (Semenoff-Segundo ve ark., 2012). Dancause ve ark. (2012), prenatal strese maruz kalan yavruların uzun kemiklerinin daha kısa olduğunu; Mooney ve ark. (1985), asimetri geliştirme seviyelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu verilerin tersine Amugongo ve Hlusko (2013), strese maruz kalmış yavrularda kontrol grubuna kıyasla kemik hacmi artışı, Siegel ve ark. (1977), uzuv boylarında genel bir artış tespit etmişlerdir.

Kısa süreli psikolojik stres ajanının etkisi olarak tanımlanan akut stresin, immüniteyi, antijen, antikor ve sitokin üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Dhabhar ve McEwen, 1997). Uzun süreli bir etki olan kronik stresin ise Ig A ve Ig G miktarı, nötrofil fonksiyonu ve sitokin üretimini, dolayısıyla immün yanıtı azalttığı belirtilmektedir (Peruzzo ve ark., 2008). Çok sayıda hayvan (Benatti ve ark., 2008; Takada ve ark., 2004) ve insan (Hilgert ve ark., 2006; Genco ve ark., 1998) çalışması, stresin periodontal hastalık oluşumu ve ilerlemesinde etkili olduğunu rapor etmiştir. Birçok organ ve sistemi etkileyen bu faktörün çevresel faktörlere oldukça hassas olan amelogenesis sürecini de etkileyebileceğini düşündüğümüzden, prenatal kronik stresi de potansiyel etiyolojik faktör olarak deney gruplarımıza dahil ettik.

Günümüze kadar yapılan sıçan çalışmalarında farklı yöntemlerle kronik stres modelleri oluşturulmuştur. Soğuk havada immobilizasyon (Semenoff-Segundo ve ark., 2012), hareket kısıtlaması (Rivera ve ark., 2012; Semenoff ve ark., 2013; Monteleone ve ark., 2014), kafesi 45° eğimlendirme, suda bırakma, kuyruk kısıtma, kirli kafeste bırakma, gürültü (Jiang ve ark., 2014), 12:12 aydınlık ortamda bırakma (Vernikos-Danellis ve ark., 1970; Semenchenko ve ark., 2004; Alterman ve ark., 2012; Fontanetti ve ark., 2013) gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Biz de Fontanetti ve

ark. (2013) gibi 12:12 aydınlık ortamda bırakma modelini tercih ettik. Aydınlık stres stimulusunun erişkin sıçanların sirkadiyen ritme ait nöronlarının senkronizasyonunu bozduğu (Ohta ve ark., 2005) ve prenatal stresin diş sürmesinde gecikmeye yol açtığını gösteren çalışmalar (Meek ve ark., 2000) rapor edilmiştir.

Peruzzo ve ark. (2008) stres oluşturulmuş periodontal hastalık modellerinde, hastalığın ilerleme hızı ve alveolar kemik kaybı miktarını anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Periodontal hastalık oluşturulmuş sıçanlarda histolojik ataşman ve kemik kaybının stres grubunda daha yüksek olduğunu rapor edilmiştir (Semenoff-Segundo ve ark., 2012; Rivera ve ark., 2012). Semenoff ve ark. (2013), kronik stresin apikal periodontitis ve endodontik hastalık ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, stres grubundaki sıçanlarda periodontal yıkımın kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Fontanetti ve ark. (2013), prenatal kronik stresin yavrunun diş sürme sürecine etkisini inceledikleri çalışmalarında, stresin kemik hacminde artış, osteoklast sayısında azalma ve diş sürmesinde gecikmeye sebep olduğunu rapor etmiştir.

Aminabadi ve ark. (2016), prenatal stresin yavrudaki kraniofasial büyümeye etkisini inceledikleri çalışmalarında, deney grubunda ön kafa kaidesi ve yüz kemikleri uzunluklarında artış tespit etmişlerdir. Kranial genişlik, mandibular ölçümler ve posterior kranial yükseklik ve genişlikte ise kontrol grubuna göre anlamlı farklılık bulunamayan çalışmada, prenatal kronik stresin kafa kaidesi ve nazal septumdaki endokondral büyümeyi attırarak kraniofasial büyüme sürecinde gecikmelere yol açabileceği belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızla kıyaslanabilecek tek çalışma olan Tao ve ark. (2016)'nın, sirkadiyen ritmin mine gelişim sürecine etkisini inceledikleri çalışmalarında hem 12:12 karanlık ortam modeli, hem de bizim stres modelimize benzer bir 12:12 aydınlık modeli oluşturulmuştur. Bu araştırmacılar, fare yavrularının alt birinci molar dişlerini inceledikleri çalışmalarında, doğumdan 10. güne kadar 12:12 aydınlık ortamda bırakılmış farelerin ameloblastlarının AMELX immünekspresyonunda ve diş minesi gelişiminde histolojik olarak anlamlı derecede gecikme olduğunu tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızdaki kronik stres modelimizde AMELX immünekspresyonunda tüm fazlarda kontrole göre azalma olduğunu ancak bu azalmanın sadece olgunlaşma fazında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. Ancak bu araştırmacılar 12:12

aydınlık ortamı kronik stresten ziyade sirkadiyen ritmin bozulmasına ve dolayısıyla melatonin sekresyon eksikliğine bağlamışlardır. Nitekim melatonin antagonisti muamelesi yapılan farelerde de benzer sonucu bulmuşlardır. Bunun yanında, AMBN immünekspresyonunu da değerlendirdiğimiz çalışmamızda, tüm fazlarda kontrole göre azalma olduğunu ve bu azalmanın hem geçiş hem olgunlaşma döneminde istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gördük.

Kumasaka ve ark. (2010) melatoninin salgı fazındaki ameloblastlarda eksprese olduğunu ve melatoninin diş germinde odontojenik hücrelerin hücresel fonksiyonlarını düzenleyerek diş gelişiminde fizyolojik bir rol oynadığını ilk defa bildirmiştir. Liu ve ark. (2013) ve Zheng ve ark. (2014) tarafından odontogenesise etkisi araştırılmıştır ancak melatoninin amelogenesis sürecine etkisini inceleyen çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son yıllarda, maruz kalınan kimyasalların, her gün alınan düşük dozlar şeklinde dahi olsa, özellikle erken çocukluk döneminde sağlığınıza düşündüğünden daha fazla zarar verdiği endişesi giderek artmaktadır (Vandenberg, 2014).

BFA, yılda 4.5 milyon ton üretimle plastik endüstrisinde geniş kullanıma sahip olması nedeniyle ilgi çeken, östrojen reseptörüne bağlanan bir kimyasaldır. BFA, suda bir miktar çözünebilen bir bileşiktir ve plastiklerden sızabilmektedir. Bu nedenle çoğunlukla polikarbonat plastikten yapılmış yemek kapları veya plastik pipetler gibi ürünlerden sindirim veya oral mukozadan absorpsiyon yoluyla maruz kalınmaktadır (Vandenberg ve ark., 2007). Avrupa Birliği ülkelerinde, Mart 2011'den beri biberonlarda BFA kullanılması yasaktır. Fakat, yapılan çalışmalar BFA içermeyen plastik materyallerin de östrojen benzeri ürünler sızdığını göstermiştir. Kimyasallar ayrı ayrı düşük dozlarda bulunsalar dahi, birlikte büyük hormonal etkiler yaratmaktadır (Yang ve ark., 2011). Maruz kalınabilecek diğer BFA kaynakları, çöp solunması, fissür örtücüler gibi dental materyallerden sızma ve fatura gibi sıcak kağıtların deriyle ve/veya ağızla teması olarak sayılabilir (Geens ve ark., 2011).

BFA türevleri, koruyucu ve restoratif diş hekimliğinde giderek artan şekilde kullanılan rezin esaslı fissür örtücülerin ve kompozitlerin yapısında da bulunur. Dental rezinler saf BFA'dan çok BFA türevleri içermektedir. Bu BFA türevleri sıvı monomerlerdir ve kimyasal veya ışık polimerizasyonundan sonra katılaşırlar (Fleisch ve ark., 2010). BFA, dental rezinlerde katkı maddesi olarak kullanılabilir fakat tükürüğün iki sonlu hidroksil gruplarını hidrolize etme yoluyla polimerizasyonu

engellemesi nedeniyle formülasyonda kullanılmaz (Tarumi ve ark., 2000). Bu sebeple rezinin bazında sıklıkla BFA'nın hidroksil gruplarına glisidil halkasıyla metil metakrilat grupları ekleyerek oluşturulan BFA glisid dimetakrilat (bis-GMA) kullanılır. Dental rezinlerde genellikle kullanılır diğer BFA türevleri, BFA dimetakrilat (bis-DMA), BFA diglisidileter (BADGE), BFA etoksilat dimetakrilat (bis-DMA) ve üretan-modifiye bis-GMA olarak sayılabilir (Fleisch ve ark., 2010). Trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) ve üretan dimetakrilat (UDMA) gibi diğer monomerler rezine viskoziteyi arttırmak için sıklıkla eklenir (Soderholm ve Mariotti, 1999). Dental rezinin bir bileşeni olmamasına rağmen, bis-DMA'nın tükürük esterleri ile hidrolizinin bir sonucu olarak, rezinin uygulanmasından sonra tükürükte saf BFA tespit edilmiştir (Schmalz ve ark., 1999). Bis-DMA'nın BFA'ya hidrolize olduğu görülürken, bis-GMA muhtemelen kimyasal yapısı ester bağlantılarından hidrolize olmasını engellediği için bu reaksiyona girmez (Fleisch ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda rezin esaslı materyallerin uygulanmasından hemen sonra tükürükte düşük miktarlarda BFA'ya rastlansa da, kan örneklerinde BFA'ya rastlanmaması, bu materyallerin sistemik etkiler oluşturacak düzeylerde salınmadığını düşündürmektedir (Rathee ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda, sindirim yoluyla alınabilecek ortalama BFA miktarı, çocuklar için 0.04 µg/kg/gün, yetişkinler için 0.48-1.6 µg/kg/gün şeklinde hesaplanmıştır. Serumda ölçülen serbest halde bulunan, biyolojik olarak aktif BFA konsantrasyonu 0.2-20 ng/mL arasındadır (Vandenberg ve ark., 2007). Çevre Koruma Ajansı'nın (EPA) belirlediği yan etki oluşturmada alınabilecek maksimum BFA dozu (NOAEL) olan 50 mg/kg, çalışmalarda hesaplanan normal günlük alım dozundan oldukça yüksektir. Günlük maksimum kabul edilebilir referans doz (RfD), bu değer binde biri olan 50 µg/kg/gün olarak kabul edilmiştir (Vom Saal ve Myers, 2008). Dental materyallerden BFA salınımı yaşam boyunca günlük olarak gerçekleşecek bir reaksiyon değildir ve bunun yanında rapor edilen en yüksek BFA dozu da günlük kabul edilebilir maksimum dozun altındadır. Salınımı akut toksisite olayı olarak düşündüğümüzde ise dental materyallerden tükürüğe salınan rapor edilmiş en yüksek BFA dozunun, letal BFA dozundan 50 000 kez düşük olduğu görülmektedir. Bu veriler de dental rezinlerden BFA salınımının insan sağlığına etkisinin minimal olduğunu düşündürmektedir (Rathee ve ark., 2012).

BFA, gastrointestinal sistem ve karaciğerdeki hızlı metabolizması nedeniyle dokularda birikim yapmasa da (Doerge ve Fisher, 2010), her gün maruz kalınması kanda her zaman düşük konsantrasyonlarda bulunmasına sebep olur (Vandenberg ve ark., 2007). Ayrıca sindirim dışında bir yolla alındığında karaciğer ve bağırsak metabolizmasını atladığı için biyoyararlanımı artmaktadır (Gayrard ve ark., 2013).

BFA alımının ‘güvenli’ seviyelerine karar vermede karşımıza birçok problem çıkmaktadır. BFA’nın hormon benzeri davrandığı düşünüldüğünde, hormonların çok düşük dozlarda da etki gösterdiği göz önünde bulundurularak BFA’nın da çok düşük dozlarda etki gösterebileceği tahmin edilebilir. Yapılan çalışmalarda düşük dozlarda yüksek etkiler gösterilmiş ve bu etkiler monoton olmayan doz cevap eğrileriyle sonuçlanmıştır (Vom Saal ve Myers, 2008). Monoton olmayan doz cevap eğrileri U şeklindedir ve muhtemelen yüksek dozların düşük doz cevabını engellemesinden dolayı çok yüksek ve çok düşük dozlarda daha yüksek yanıt oluşturur. Ayrıca BFA dışındaki endokrin duraksatıcı kimyasallar eklendiğinde toplam etkileri daha da artmaktadır.

NOAEL ve RfD dozlarından düşük dozlarda yapılan birçok çalışmada BFA alımının beyin gelişimi, davranış, üreme, büyüme ve metabolizmayı etkilediği gösterilmiştir (Vom Saal ve Myers, 2008). Ayrıca, hormonların etkilerinin maruz kalınan zamana bağlı olduğu ve gelişim sürecindeki bireyleri daha fazla etkilediği düşünülürse, kabul edilen dozların çocuklarda daha da düşük olması gerekmektedir (Vandenberg ve ark., 2013).

Puberte dönemini takiben BFA’ya maruz kalmanın sağlık açısından olumsuz sonuçları olmasının yanında, birincil olarak gelişmekte olan organizmaların hormon benzeri aktivite gösteren kimyasallara aşırı hassas olduğu neonatal dönemdeki etkilerinden endişe edilmektedir. Yetişkin dönemdeki etkiler genellikle geri dönüşümlüdür ve bu sebeple bu dönemdeki etkiler için ‘aktivasyonel’ etkiler terimi kullanılmaktadır (Richter ve ark., 2007). Diğer yandan BFA alımı, organ gelişiminin gerçekleştiği prenatal dönemin başından başlayıp puberteye doğru devam ettiğinde, daha sonradan alım dursa dahi, etkilenen sistemlerde bozulmalarla sonuçlanan kalıcı ‘organizasyonel’ etkiler göstermektedir (Hijazi ve ark., 2015). Ayrıca, yetişkin bir bireyde olumsuz etki oluşturabilecek BFA dozları nispeten yüksekken (kilogram başına miligramlar), uterusu çok daha düşük dozların (kilogram başına nanogramlar)

sonraki yıllarda da gözlenebilecek organ hasarlarına sebep olduğu görülmüştür. Sonuç olarak yetişkinlerde hasar oluşturan dozların çok altındaki dozlar gelişmekte olan fetüste zarar verici etkiler ortaya çıkarabilmektedir. BFA plasentadan geçip gelişmekte olan fetüse ulaştığının bilinmesi nedeniyle (Nishikawa ve ark., 2010), düşük dozlarda prenatal BFA alımının etkilerini inceleyen araştırmalar yapılmış ve BFA'nın beyin (Elsworth ve ark., 2013), kalp (Chapalamadugu ve ark., 2014), meme bezleri (Wadia ve ark., 2013), yumurtalıklar (Veiga-Lopez ve ark., 2013), uterus (Calhoun ve ark., 2014) ve testisleri (Horstman ve ark., 2012) içeren birçok organın gelişiminde değişiklik yaptığı rapor edilmiştir. Bu defektler veya malformasyonlar genelde doğumda görülmemekte fakat yetişkinlik döneminde hastalık riskini arttıran fonksiyonel değişimlere (bozulmuş gen ekspresyonu, hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve apoptozunda artış gibi) yol açmaktadır (Hijazi, 2016).

Prenatal dönemde maruz kalınan BFA'nın birçok dokuda ve organda hasar oluşturduğunu gösteren çalışmalar, son yıllarda araştırmacıları dış etkenlere karşı oldukça hassas olan amelogenesis süreci üzerindeki etkilerini de araştırmaya yöneltmiştir (Houari ve ark., 2016; Jedeon ve ark., 2016). Biz de çalışmamızda prenatal dönemde alınan BFA'nın mine oluşumuna etkisini değerlendirmek için Jedeon ve ark. (2014) gibi mine proteinlerini inceledik.

BFA çalışmalarında kontrolsüz kontaminasyonu engellemek amacıyla hayvanlar, polipropilen (Ménard ve ark., 2014; Jedeon ve ark., 2016; Quan ve ark., 2017), paslanmaz çelik (Durando ve ark., 2007; Altamirano ve ark., 2015; Kass ve ark., 2015; Vigezzi ve ark., 2016), polistiren (Hijazi ve ark., 2015), polisülfon (Lejonklou ve ark., 2016) kafeslerde barındırılmışlar ve tüm çalışmalarda cam şişelerden beslenmişlerdir. Biz de sıçanları, deney süresi boyunca özel yapılmış cam kafeslerde muhafaza edip, sularını cam şişelerde vererek kontrolsüz BFA kontaminasyonunu engelledik.

Sıçanlarda önceki yıllarda yapılan çalışmalarda kullanılmış BFA uygulama yolları; çeşitli konsantrasyonlarda etanolde çözüp içme suyuna ekleme (Rubin ve ark., 2001; Kass ve ark., 2012; Song ve ark., 2014; Altamirano ve ark., 2015; Santamaría ve ark., 2016; Vigezzi ve ark., 2016) , susam yağında çözüp gavaj (Ahmed ve ark., 2014), mısır yağında çözüp gavaj (Menard ve ark., 2014; Lejonklou ve ark., 2016; Quan ve ark., 2017), mısır yağında çözülmüş BFA'yı kurabiyeye ekleme (Sadowski ve ark., 2014), subkutan olarak BFA salan minyatür ozmotik pompa implante etme

(Durando ve ark., 2007; Dhimolea ve ark., 2014; Kass ve ark., 2015) ve diyet ekleme (Hijazi ve ark., 2015) şeklindedir. Biz de çalışmamızda Kass ve ark.'na (2012) benzer şekilde etanolde çözdüğümüz BFA solüsyonunu içme suyuna ekledik.

Sıçan çalışmalarında 0.5 µg/kg/gün (Vigizzi ve ark., 2016; Santamaría ve ark., 2016), 5 µg/kg/gün (Ménard ve ark., 2014; Jedeon ve ark., 2016), 25 µg/kg/gün (Durando ve ark., 2007), 50µg/kg/gün (Santamaría ve ark., 2016;), 250 µg/kg/gün (Kass ve ark., 2014), 50 mg/kg/gün (Ahmed ve ark., 2014) gibi çok çeşitli dozlar kullanılmıştır. Biz de çalışmamızda Jedeon ve ark.'nın (2013, 2014, 2016) mine dokusunun incelendiği çalışmalarına benzer şekilde 5 µg/kg/gün dozunu kullandık.

Prenatal dönemde maruz kalınan BFA'nın mine gelişim sürecine etkisini araştıran aynı gruba ait çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Jedeon ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada prenatal dönemden postnatal 100. güne kadar BFA'ya maruz kalmış sıçan kesici dişlerini, kontrol grubuyla karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar 30. günde gördükleri beyaz leke benzeri mine defektlerini 100. Gün örneklerinde tespit edememişler ve amelogenesisin BFA'ya bir duyarlılık penceresi olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, BFA mine yüzeyinde MIH benzeri asimetrik beyaz mat alanlar oluşmasına sebep olmaktadır. Taramalı elektron mikroskop incelemeleri bu iki grupta da benzer şekilde mine prizmatik yapısında azalma ve keserlerin insizal yüzeyleri ve molarların tüberkül tepelerinde mine kırılma alanları olduğunu göstermiştir. Kontrol ve deney grubu sıçanların mine element kompozisyonu incelenmiş ve BFA'nın Ca/P ve Ca/C oranlarında azalma ve organik materyal konsantrasyonunda artışa sebep olduğu bulunmuştur. Western blotting ve IHC bulgularında, BFA'nın amelogenin, ameloblastin, amelotin, tuftelin ve MMP-20 seviyelerinde değişikliğe yol açmazken, enamelin seviyesini arttırdığı ve KLK4 seviyesini azalttığını gösterilmiştir.

2013 yılında yapılan çalışmadan elde edilen mine protein ve proteinaz seviyeleriyle ilgili bu bulgular aynı grubun 2014 yılında yaptıkları BFA'yı da içeren farklı endokrin bozucu ajanların mine hipomineralizasyonu üzerine etkisinin incelendiği iki farklı çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. BFA'nın diğer kimyasallarla birlikte kullanılmasının mine defekti oluşum şiddetini azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca BFA'nın erkek sıçan mine oluşumunu etkilediği ve ameloblast proliferasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Jedeeon ve ark. (2016), BFA'nın tek başına veya floridle kombine şekilde uygulanmasının yavrularda mine gelişim sürecine etkilerini inceledikleri çalışmalarında alt keser dişleri μ CT ve taramalı elektron mikroskobunda incelemişler, ayrıca mine defekti oluşumundan sorumlu olan genlerdeki değişimleri de araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre BFA, morfolojik olarak orta şiddette mine yıkımı oluştururken florid ile birlikte daha şiddetli bir fenotip oluşturmaktadır. μ CT analizleri, BFA'nın tek başına veya floridle birlikte kullanılmasının mine dansitesinde ve hacminde azalmaya sebep olduğunu göstermiştir. Taramalı elektron mikroskop incelemeleri sonucu, BFA grubunda mine prizmatik yapısında azalma tespit edilmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda amelogenesis sürecinde önemli rol oynayan mine matriks protein ve proteinazlarının gen ekspresyonlarında azalma olduğu bulunmuştur. İmmüno floresans incelemesinde AMELX seviyesi salgı fazı ameloblastlarında geçiş ve olgunlaşma fazına göre daha yüksek bulunmuş, gelişim fazları arasında AMBN seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bizim de çalışmamızda bu araştırmacılara benzer şekilde, özellikle ameloblastların tüm gelişim fazlarında AMELX immünekspresyonunda anlamlı derecede düşüş olduğu ve bu grubun AMELX immünekspresyon yoğunluğunun tüm gruplar içinde en düşük seviyedeki grup olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda AMBN immünekspresyonunda anlamlı bir düşüş tespit edilmemiş. Stereomikroskop görüntülerinde de minenin pürüzlü yapısı bariz bir şekilde görülmektedir. Histolojik incelemelerde de defektif mine matriksi ile mine-dentin sınırında düzensiz yapılar tespit edilmiştir. BFA'nın AMBN'den ziyade AMELX üzerine etkili olmasının nedenlerinden birinin bu proteinin geninin X kromozomu üzerinde olması ve BFA'nın da östrojen reseptörlerine bağlanıp östrojen benzeri davranış göstermesi olabileceğini düşünmekteyiz.

Hamilelik döneminde prenatal vitaminlerden sonra en sık yazılan ilaçlar antibiyotiklerdir. Çocuk doğurma yaşlarındaki kadınlarda sıklıkla rastlanan solunum yolları ve idrar yolları enfeksiyonu gibi hastalıkların tedavisi için en sık tercih edilen antibiyotikler de amoksisilinlerdir (Lin ve ark., 2012). Hamilelikte güvenli ilaç kullanımı yıllar boyu üzerine çalışılan bir konu olmuştur. Bu dönemde kullanılan ilaçlar yenidoğanda malformasyon oluşturma riskine göre beş kategoriye ayrılmaktadır (Pernia ve De Maagd, 2016):

Tablo 12: Gebelik ilaç kategorileri

Kategori A	Yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla, ilacın gebeliğin ilk üç ayındaki (ilk trimesterindeki) fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve sonraki iki trimester için bir risk oluşturduğuna ilişkin veri de yoktur.
Kategori B	Hayvan üreme çalışmalarında ilacın fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve gebe kadınlarda yeterli ve iyi kontrollü çalışmalar yapılmamıştır ya da hayvan çalışmalarında bir yan etki ortaya çıkmıştır ama gebe kadınlarda yapılan yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla herhangi bir trimesterde fetüs için bir risk olduğu gösterilememiştir.
Kategori C	Hayvan üreme çalışmalarıyla fetüs üzerinde bir yan etki olduğu gösterilmiştir ve insanlarda yeterli ve iyi kontrollü çalışmalar yapılmamıştır ama olası yararlar, olası risklere rağmen, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasını haklı kılabilir.
Kategori D	Araştırma veya pazarlama deneyimlerinden ya da insanlardaki çalışmalardan elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır ama olası yararlar, olası risklere rağmen, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasını haklı kılabilir.
Kategori X	Hayvan ya da insanlardaki çalışmalar fetal anormallikler göstermiştir ve/veya araştırma ya da pazarlama deneyimlerinden elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır ve söz konusu riskler, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasının olası yararlarından açıkça daha fazladır.

Amoksisilin, gram-pozitif ve gram negatif bakterilere karşı bakterisid etki gösteren geniş spektrumlu yarı sentetik bir antibiyotiktir (Gottberg ve ark, 2014). Gebelik kategorisi FDA tarafından ‘B’ olarak belirlenmiştir (Lin ve ark., 2012). Solunum yolları, gastrointestinal sistem, deri ve nörolojik enfeksiyonlarda ilk tercih edilen antibiyotiktir (Gottberg ve ark, 2014). Diş hekimliği alanında da dental-alveolar abseler, yumuşak doku enfeksiyonları, maksiller ve oral sinüs bağlantı enfeksiyonlarıyla ilişkili mikroorganizmalara karşı sıklıkla kullanılır (Bascones Martínez ve ark., 2004). Ayrıca bakteriyel endokardit profilaksisinde de ilk tercih edilen antibiyotiktir. Bu antibiyotiğin en sık yol açtığı yan etkiler hipersensitivite ve

gastrointestinal bozukluklardır (Gottberg ve ark, 2014). Birçok epidemiyolojik çalışmada, gebelikte amoksisilin kullanımının çoğu spesifik konjenital malformasyonla ilişkili olmadığı gösterilse de gebeliğin erken dönemlerinde kullanımında dudak damak yarığı gibi bir takım malformasyonların oluşum riskini arttırdığı yönünde çalışmalar da mevcuttur (Lin ve ark., 2012). Ayrıca son yıllarda, amoksisilin dental fluorosis benzeri dental patolojiler oluşturduğunu öne süren klinik vaka raporları ve epidemiyolojik çalışmalar da yayınlanmıştır (Hong ve ark., 2004, 2005; Arrow, 2009; Laisi ve ark., 2009; Hong ve ark., 2011). Epidemiyolojik çalışma yazarları, hipomineralizasyon epidemiyolojisinin tam olarak açıklığa kavuşmadığını söyleseler de amoksisilin tedavisi görmüş çocukların dental bozukluk geliştirme riskinin daha yüksek olduğunu kabul etmektedirler (Gottberg ve ark, 2014).

Hayvan deneylerinde daha önce kullanılan amoksisilin uygulama yolları, oral uygulama (Abe ve ark., 2003; Gottberg ve ark, 2014; Atlı ve ark., 2015; De Souza ve ark., 2015), intraperitoneal enjeksiyon (Kuşçu ve ark., 2013; Rotimi ve ark., 2015) ve subkutan enjeksiyondur (Mihalas ve ark., 2016). Biz de çalışmamızda Kuşçu ve ark. (2013) gibi intraperitoneal enjeksiyonu tercih ettik.

Çalışmalarda sıklıkla kullanılan deney dozları, 25 mg/kg/gün (Atlı ve ark., 2015), 50 mg/kg/gün (tedavi edici terapötik doz) (Kuşçu ve ark., 2013; Gottberg ve ark, 2014; Atlı ve ark., 2015; Mihalas ve ark., 2016), 90 mg/kg/gün (deneysel yüksek doz) (Kuşçu ve ark., 2013), 100 mg/kg/gün (deneysel yüksek doz) (Gottberg ve ark, 2014; De Souza ve ark., 2015; Mihalaş ve ark., 2016), 150 mg/kg/gün (deneysel yüksek doz) ve 500 mg/kg/gün (deneysel yüksek doz) (De Souza ve ark., 2015; Mihalaş ve ark., 2016) şeklindedir. Biz de çalışmamızda Mihalaş ve ark. (2016) gibi 100 mg/kg/gün'lük deneysel yüksek dozu tercih ettik.

Prenatal dönemde veya erken çocukluk döneminde amoksisilin kullanımının mine oluşumuna etkisini çeşitli yöntemlerle inceleyen ve farklı sonuçlar elde eden birçok epidemiyolojik çalışma ve hayvan deneyi mevcuttur. Bazı epidemiyolojik çalışmalar erken çocukluk döneminde amoksisilin kullanımı ile mine defekti oluşumu arasında ilişki olduğunu öne sürerken (Hong ve ark., 2005; Laisi ve ark., 2009; Wuollet ve ark., 2016); Phipps (2012), amoksisilin kullanımıyla defekt oluşum riskinin diğer antibiyotiklerle benzer olduğunu belirtmiş ve mevcut defektin antibiyotik kullanımına sebep olan hastalık durumuyla da ilgili olabileceği yorumunu yapmıştır.

Kuşçu ve ark., (2013) prenatal dönemde farklı dozlarda amoksisilin uygulanmış domuz dişleriyle MIH teşhisi koyulmuş insan dişlerini klinik olarak ve X-ray mikrotomografi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, amoksisilin kullanımı sonucu diş minesinde gözle görünür bir değişiklik olmadığını fakat mikroskopik olarak mineral dansitesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Gottberg ve ark., (2014) farklı dozlarda prenatal amoksisilin uygulamasının sıçan minesine etkilerini kontrol ve tetrasiklin gruplarıyla klinik ve histolojik olarak karşılaştırmışlardır. Yüksek doz amoksisilin grubunun tüm örneklerinde tetrasikline benzer şekilde hipomineralizasyon alanları gözlenirken, bu alanlara düşük doz amoksisilin örneklerinin sadece %50'sinde rastlanması amoksisilin mine oluşumuna etkisinin doza bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışmayla dikkat çekilmek istenen bir başka nokta da gruplar arasında mine kalınlığı açısından farklılık olmadığı fakat antibiyotik gruplarının hepsinde kırılabilirliğin arttığıdır.

De Souza ve ark., (2015) prenatal dönemde düşük ve yüksek dozlar olarak tanımlanan iki farklı dozda amoksisilin uygulaması yapılmış sıçanların üst molar minelerini bizim çalışmamıza benzer şekilde H&E boyama ve IHC yöntemleriyle incelemişlerdir. Histolojik incelemede iki amoksisilin dozunda da mine kalınlığının belirgin bir şekilde azaldığı ve yine bizim çalışmamıza benzer şekilde ameloblastların proksimal bölümlerinde vakuol benzeri yapılar bulunduğu gözlenmiştir. AMELX immünoekspresyonu da bizim çalışmamıza benzer şekilde salgı fazı ameloblastlarında diğer fazlara göre yüksek, tüm fazların immünoekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Ancak biz çalışmamızda AMBN immünoekspresyonunu da değerlendirilip, amoksisilin grubunun ekspresyon şiddetinin kontrol ve diğer deney gruplarını arasında en düşük olduğunu tespit edilmiştir. Bu protein ile antibiyotik ilişkisinin daha detaylı olarak incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Mihalaş ve ark., (2016) farklı dozlarda prenatal amoksisilin uygulamasının fare kesici dişlerinde mine gelişimine etkisini araştırmışlardır. Morfolojik inceleme sonucu amoksisilin uygulanan grupların minelerinde saydamlığın ve sarımsak rengin değiştiği ve yer yer beyaz alanlar bulunduğu gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskop incelemelerinde amoksisilin gruplarında düzensiz çizgilere sahip bir mine paterni ve çeşitli büyüklüklerde sınırları düzgün izole mine kayıpları olduğu ve amoksisilin dozu arttıkça gözlemlenen bozuklukların şiddetlendiği rapor edilmiştir.

Minenin element kompozisyonu incelendiğinde ise, amoksisilin gruplarının minesindeki demir içeriğinin doza bağlı bir şekilde azaldığı ve bu azalmanın sarımsak renk kaybının sebebi olabileceği, artan flor içeriğinin de saydamlık kaybından sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Ek olarak tüm amoksisilin gruplarının mine Ca ve P içeriğinin azaldığı tespit edilmiş ve bu değişiklik hipomineralizasyon olarak yorumlanmıştır. Histolojik incelemede sadece olgunlaşma fazı ameloblastlarında organizasyon azalması ve vakuol benzeri yapılar gözlenmiştir.

Amoksisilin türevi antibiyotikler hamilelik döneminde en sık tercih edilen antibiyotiklerdir. Biz çalışmamızda amoksisilin AMBN'i etkilediğini tespit ettik. AMBN'in mine oluşumuna etkisi AMELX kadar incelenmemiştir ve antibiyotiklerin AMBN üzerine etkileri konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Mine defektlerinden sorumlu olabileceği düşünülen 90'dan fazla kalıtsal ve çevresel etkiden biri de enfeksiyondur (Small ve Murry, 1978). Ateş ise, enfeksiyon ve yaralanmaya karşı, vücut ısı dengesini geçici olarak bozup öz ısıyı arttırmak suretiyle verilen kompleks bir fizyolojik yanıttır (Singh ve Hasday, 2013). Bu yanıtın memeliler ve kuşlarla sınırlı bir akut faz yanıtı olduğu düşünülse de eklem bacaklılar, alt omurgalılar ve solucanlar gibi farklı türlerde de rastlanmıştır (Kluger ve ark., 1996). Kemirgenlerde bakteriyel veya viral enfeksiyon modeli oluşturma çalışmalarında günümüze kadar üç immünolojik yaklaşım kullanılmıştır (Meyer ve ark., 2010; Boksa, 2010; Brown ve Derkits, 2010). Maternal bakteriyel enfeksiyon için kabul görmüş en yaygın yaklaşım LPS uygulamasıdır (Borrell ve ark., 2002; Fortier ve ark., 2004; Fortier ve ark., 2007; Romero ve ark., 2007). Prenatal viral enfeksiyon oluşturmak için ise poliinosinik:polisitidlik asit (Zuckerman ve Weiner, 2005; Meyer ve ark., 2006) veya influenza virüsü (Fatemi ve ark., 2008; Shi ve ark., 2003) kullanılmıştır. Biz de çalışmamızda enfeksiyon modeli oluşturmak için Fortier ve ark.'na (2004) benzer şekilde LPS uygulamasını tercih ettik.

LPS 3 parçadan oluşur: O- polisakkarid zinciri, polisakkarid çekirdeği ve lipid A. Lipid-A CD 14 ve TLR4 reseptörü nedeniyle endotoksik olan parçadır (Indahyani ve ark., 2007). LPS aktivitesini, makrofajlar gibi periferik immün hücrelerinde bulunan çan benzeri reseptörlere (TLR2 ve 4) bağlanarak gösterir (Caroff ve ark., 2002). CD 14, makrofaj ve monositler için yüzey reseptörüdür (Akashi ve ark., 2000). CD 14 varlığı nedeniyle bakteriyel bağlanma yapan makrofajlar ve monositler sitokin ve lipid

enflamasyon mediatörü salgılayabilirler. Hamile sıçanlara LPS enjeksiyonu, hamile olmayan dişi veya erkek sıçanlarla aynı şekilde bir immün yanıt oluşturur (Luheshi, 1998; Golan ve ark., 2005; Ashdown ve ark., 2006). LPS deney uygulamaları, uygulamanın yapıldığı hamilelik dönemi (erken veya geç) ve günlük enjeksiyonlar veya tek doz şeklinde değişen dozajlar açısından çeşitlilik gösterir (Borrell ve ark., 2002; Fortier ve ark., 2004). Neonatal dönemde uygulanması sonucu yavruda enflamasyon oluşturan minimum LPS dozu 100 µg/kg'dır (Fortier ve ark., 2007; Cui ve ark., 2009; Beloosesky ve ark., 2010; Ginsberg ve ark., 2012; Pohl ve ark., 2013; Soto ve ark., 2013). Biz çalışmamızda Tiwari ve ark.'na (2016) benzer şekilde tek seferde 125 µg/kg toksik dozunu tercih ettik.

LPS, kalıtsal bağışıklığın en güçlü uyarılarından biridir (Chen ve ark., 2015). Geçmiş yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında prenatal LPS enfeksiyonun, yavrularda hipertansiyon, kardiomegali, obezite ve Alzheimer hastalığı oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Hao ve ark., 2010; Wei ve ark., 2013). Ayrıca E.coli LPS'inin osteoklast sayısı ve aktivitesini arttırarak alveol kemik rezorbsiyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Urdezu ve ark., 1989). Yapım ve yıkım sürecinde olan mine prizmaları da bu durumdan etkilenebilir (Indahyani ve ark., 2007). Osteoklastları etkileyerek rezorbsiyona sebep olan LPS aktivitesinin, çevresel değişikliklere karşı çok hassas olan ameloblast hücrelerini etkilemesinin olası olduğu düşünülmektedir (Navarro ve ark., 1999). Fizyolojik değişiklikler ameloblastları etkiler ve minede yapısal değişikliklere sebep olur. Bu değişiklikler klinik olarak gözlemlenmeyen mikroskobik değişiklikler de olabilir. Enfeksiyon, ameloblastların mine matriks sekresyonunu kesintiye uğratma veya ameloblast ölümüne sebep olma şeklinde etki gösterebilir. Diş gelişimi sürecinde periodontal dokularda kronik veya akut lokal enfeksiyon varlığı diş germinin gelişim sürecini etkileyebilir (Indahyani ve ark., 2007).

Enfeksiyon oluşumunun mine üzerine etkisini araştıran tek grup olan Indahyani ve ark., (2007) postnatal 5. gündeki sıçanlara LPS uyguladıkları çalışmalarında enfeksiyon grubundaki molar dişlerde makroskobik olarak inceledikleri hipoplazi görülme oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu; bu dişlerin radyoopaklık derecesinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğunu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde prenatal dönemde uygulanan LPS enfeksiyonunun mine gelişimine etkisini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlamadık. AMELX immünekspresyonu açısından kontrole göre en fazla azalmayı geçiş dönemi ameloblastlarında tespit ettik. Deney gruplarımız arasında AMELX immünekspresyonunun kontrole kıyasla en az etkilendiği grup enfeksiyon grubudur. AMBN immünekspresyonu açısından kontrole göre en fazla azalmayı geçiş dönemi ameloblastlarında tespit ettik. Histolojik ve stereomikroskopik olarak da kontrole en yakın bulgular bu grupta görüldü. Diğer defekt oluşturan gruplara göre enfeksiyon grubunun en az etki gösteriyor olmasının nedeni sıçan metabolizmasının insana göre daha hızlı ve enfeksiyona daha dirençli olması ile açıklanabilir. Ayrıca enfeksiyon oluşturulan hamile sıçanlarda insanlarda görülenin aksine literatürle uyumlu olarak hipertermi yanıtı oluşmadığını tespit ettik. Enfeksiyonu mine üzerinde etkisi üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Pedodontinin temel konularından biri olan mine defektlerinin erken teşhisi ve dolayısıyla noninvaziv yöntemlerle tedavisi için muhtemel etiyolojik faktörlerin bilinmesi önem taşımaktadır. Prenatal ve natal dönemde oluşan dişlerin mine yapılarının çevresel faktörlerden etkilendiğini göstermeyi amaçladığımız bu tez çalışmamız sonucunda bu etkilenme açık bir şekilde histolojik ve immünohistokimyasal olarak görülmektedir. Ameloblastların çevresel etkenlere bağlı olarak defektif mine oluşturmaları, aynı zamanda çocuğun çevresel toksifikasyonlara maruz kaldığını da göstermesi açısından bir çeşit biomarker olma özelliği taşımaktadır. Günümüzde prenatal dönemde BFA ve amoksisilin türü antibiyotiklere maruz kaldığı düşünüldüğünde bu çevresel faktörler sonucu etkilenmiş dişlerin tespiti, diş dokularında olduğu kadar diş dışı dokularda oluşan muhtemel hasarların ve hastalıkların araştırılması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca BFA içeren dental materyallerin hamilelerde kullanılmasından kaçınılmasına ve antibiyotik kullanırken kar zarar hesaplarının doğru yapılmasına özen gösterilmelidir. Bu konuda hayvan deneylerinin yanında insan çalışmalarına da ihtiyaç vardır.

8.SONUÇLAR

Prenatal dönemde kronik stres, BFA toksifikasyonu, amoksisilin veya LPS enfeksiyonuna maruz bırakılan yavru sıçanların 10 günlük mandibular molar diş germelerini kontrol grubuna göre incelediğimiz çalışmamızın sonucunda;

- 1) Stereomikroskop incelemesinde minede en fazla defekt BFA ve amoksisilin grubunda görülmüştür. Kronik stres ve LPS enfeksiyonu gruplarının diğer gruplara göre daha az etkilendiği ve kontrole daha yakın görüntüye sahip olduğu gözlemlenmiştir.
- 2) Histomorfolojik incelemede tüm çalışma gruplarında kontrole göre hem mine matriks yapısında hem de ameloblastlarda defektif görüntülere rastlanmıştır.
- 3) İmmünohistokimyasal bulgularda
 - a. Salgı fazında, tüm deney gruplarının AMELX immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup BFA, daha sonra sırasıyla kronik stres, amoksisilin ve LPS gruplarıdır.
 - b. Geçiş fazında, tüm deney gruplarının AMELX immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup BFA, daha sonra sırasıyla kronik stres, amoksisilin ve LPS gruplarıdır.
 - c. Olgunlaşma fazında, tüm deney gruplarının AMELX immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup kronik stres ve amoksisilin, daha sonra sırasıyla BFA ve LPS gruplarıdır.
 - d. Salgı fazında, tüm deney gruplarının AMBN immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup amoksisilin, daha sonra sırasıyla kronik stres, LPS enfeksiyonu ve BFA gruplarıdır.
 - e. Geçiş fazında, tüm deney gruplarının AMBN immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup amoksisilin, daha sonra sırasıyla LPS enfeksiyonu, kronik stres ve BFA gruplarıdır.
 - f. Salgı fazında, tüm deney gruplarının AMBN immünekspresyonu kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. En fazla düşüş gösteren grup amoksisilin, daha sonra sırasıyla kronik stres, BFA ve LPS enfeksiyonu gruplarıdır.
- 4) Sonuç olarak, en fazla etkilenme AMELX için BFA grubunda, AMBN için amoksisilin grubunda görülmüştür.

9.KAYNAKLAR

Abe T, Miyajima H, Okada K. Effects of a macrolide antibiotic on enamel formation in rat incisors--primary lesion of ameloblast at the transition stage. *J Vet Med Sci.* 2003; 65(9): 985-8.

Ahmed RAM, Elghamrawy TA, Salama EAE. Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the vagina of albino rats: immunohistochemical and ultrastructural study. *Folia Morphol (Warsz).* 2014; 73(4): 399-408

Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kirnoto M, Miyake K. Cutting edge: Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-5.

Akkan HA, Karaca M. Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 2003; 14(2): 72-77.

Al-Hashimi N, Sire JY, Delgado S. Evolutionary analysis of mammalian enamelin, the largest enamel protein, supports a crucial role for the 32-kDa peptide and reveals selective adaptation in rodents and primates. *J Mol Evol.* 2009; 69(6): 635–56.

Altamirano GA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Gómez AL, Delconte MB, Kass L. Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Aug 15;411:258-67.

Alterman A, Mathison R, Coronel CE, Stroppa MM, Finkelberg AB, Gallara' RV. Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(6): 663–9.

Aminabadi NA, Behroozian A, Talatahari E, Samiei M, Sadigh-Eteghad S, Shirazi S. Does prenatal restraint stress change the craniofacial growth pattern of rat offspring? *Eur J Oral Sci.* 2016; 124(1): 17–25.

Amugongo SK, Hlusko LJ. Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis.* 2013; 5: 1–16.

Aoba T, Komatsu H, Shimazu Y, Yagishita H, Taya Y. Enamel mineralization and an initial crystalline phase. *Connect Tissue Res.* 1998; 38(1-4): 129-37.

Arrow P. Risk factors in the occurrence of enamel defects of the first permanent molars among school children in Western Australia. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009; 37: 405–415.

Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2006; 11: 47–55.

Atli O, Demir-Ozkay U, Ilgin S, Aydin T, Akbulut E, Sener E. Evidence for neurotoxicity associated with amoxicillin in juvenile rats. *Hum Exp Toxicol.* 2016; 35(8): 866-76.

Baba O, Takahashi N, Terashima T, Li W, DenBesten PK, Takano Y. Expression of alternatively spliced RNA transcripts of amelogenin gene exons 8 and 9 and its end products in the rat incisor. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(9): 1229–36.

Bartlett J, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine M, Snead M, Wen X, White S, Zhou Y. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol.* 2006; 74:57–115.

Bartlett JD, Simmer JP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. *Gene.* 1996; 183: 123–128.

Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10(4): 425-41.

Bartlett JD. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dentistry.* 2013; 2013: 24 pages

Bascones Martínez A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, Blanco Carrión A, Gay Escoda C, González Moles MA. Consensus statement on antimicrobial treatment of

odontogenic bacterial infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9(5): 369-76; 363-9.

Beloosesky R, Maravi N, Weiner Z, Khatib N, Awad N, Boles J, Ross MG, Itskovitz-Eldor J. Maternal lipopolysaccharide-induced inflammation during pregnancy programs impaired offspring innate immune responses. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 203(2): 185.e1-4.

Benatti BB, Nogueira Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An *in vivo* study in rats. *J Periodontal Res*. 2003; 38: 351-353.

Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(6): 881-97.

Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol a, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: new data and a brief review. *Environ Health Perspect*. 2007; 115 Suppl 1:69-76.

Borrell J, Vela JM, revalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 26: 204-215.

Bourd-Boittin K, Septier D, Hall R, Goldberg M, Menashi S. Immunolocalization of enamelysin (matrix metalloproteinase-20) in the forming rat incisor. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52(4): 437-45.

Bourke CH, Stowe ZN, Neigh GN, Olson DE, Owens MJ. Prenatal exposure to escitalopram and/or stress in rats produces limited effects on endocrine, behavioral, or gene expression measures in adult male rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2013; 39: 100-9.

Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*. 2010; 167: 261-280.

Brunati AM, Marin O, Bisinella A, Salviati A, Pinna LA. Novel consensus sequence for the Golgi apparatus casein kinase, revealed using proline-rich protein-1 (PRP1)-derived peptide substrates. *Biochem J.* 2000; 351: 765-8.

Büken NÖ. Hayvan deneylerinde araştırmacı sorumluluğu ve deney hayvanının hakları. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2006; 37: 1-5

Calhoun KC, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Liu L, Gerrish KE, Young SL, Wood CE, Hunt PA, Vandevort CA, Williams CJ. Bisphenol A exposure alters developmental gene expression in the fetal rhesus macaque uterus. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85894.

Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002; 4: 915-926.

Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (MMP-20) deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002; 277: 49598–49604.

Cerný R, Slaby I, Hammarström L, Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res.* 1996;11(7): 883-91.

Chapalamadugu KC, VandeVoort CA, Settles ML, Robison BD, Murdoch GK. Maternal bisphenol A exposure impacts the fetal heart transcriptome. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89096.

Chen HS, Tsai YC, Chen KK, Tseng YC, Hsu KJ. Detrimental effects of maternal lead exposure during pregnancy and lactation on molar development in the young rat. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2012; 89(2): 240-4.

Chen X, Tang Y, Gao M, Qin S, Zhou J, Li X. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial fibrosis in rat offspring. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(5): 10986-96.

Chun YH, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Fukae M, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *J Dent Res.* 2010; 89(8): 785-90.

Chun YHP. Ameloblastin: Evolution, Structure and Function in Enamel Formation. The University of Michigan, Oral Health Sciences, pHd thesis, 2009, Michigan

Corrêa MG, Gomes Campos ML, Marques MR, Bovi Ambrosano GM, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Outcome of enamel matrix derivative treatment in the presence of chronic stress: histometric study in rats. *J Periodontol*. 2014; 85(7): e259-67.

Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*. 2007; 2: 17.

Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19(2): 73-83.

Cui K, Ashdown H, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res*. 2009; 113(2-3): 288-97.

Dancause KN, Cao XJ, Veru F, Xu S, Long H, Yu C, Laplante DP, Walker CD, King S. Brief communication: prenatal and early postnatal stress exposure influences long bone length in adult rat offspring. *Am J Phys Anthropol*. 2012; 149: 307–311.

Darnaudey M, Maccari, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews*. 2008; 57: 571-585.

De Brito GSF, Rafael C, Matheus FB, Amarylis GA, Vinícius DK, Luiz YJ, Fernando F, Telma GCSA. Impact of chronic stressors on the anxiety profile of pregnant rats. *Physiol Behav*. 2015; 142: 137-45.

De Brito Guzzo SF, Rafael C, Matheus Fitipaldi B, Amarylis Garcia A, Vinícius Dias K, Luiz YJ, Fernando F, Telma Gonçalves Carneiro Spera de A. Impact of chronic stressors on the anxiety profile of pregnant rats. *Physiol Behav*. 2015; 142: 137-45.

De Souza JF, Gramasco M, Jeremias F, Santos-Pinto L, Giovanini AF, Cerri PS, Cordeiro Rde C. Amoxicillin diminishes the thickness of the enamel matrix that is deposited during the secretory stage in rats. *Int J Paediatr Dent*. 2016; 26(3): 199-210.

Deutsch D, Haze-Filderman A, Blumenfeld A, Dafni L, Leiser Y, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Rosenfeld E, Fermon E, Zimmermann B, Haegewald S, Bernimoulin JP, Taylor AL. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(Suppl 1): 183–9.

Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity *in vivo*: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 1997; 11: 286-306.

Dhimolea E, Wadia ER, Murray TJ, Settles ML, Treitman JD, Sonnenschein C, Shioda T, Soto AM. Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to Neoplastic development. *PLoS One.* 2014; 9(7): e99800

Diekwisch TG, David S, Bringas P, Santos V, Slavkin HC. Antisense inhibition of AMEL translation demonstrates supramolecular controls for enamel HAP crystal growth during embryonic mouse molar development. *Development.* 1993; 117: 471–482.

Doerge DR, Fisher JW. Background paper on metabolism and toxicokinetics of bisphenol A. WHO 2010

Dökmeci D, Akçasu A, Banoglu N, Berkarda S. Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar. Nobel Tıp Kitabevleri; 1992, 705-785

Drummond BK, Kilpatrick N. Planning and care for children and adolescents with dental enamel defects: etiology, research and contemporary management. 1st ed. Springer; 2014, p:1-30

Dural EAÖ. Farmakoloji. Nobel tıp kitapevi 2008

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in wistar rats. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(1): 80-6.

Elsworth JD, Jentsch JD, VandeVoort CA, Roth RH, Leranath C. Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *Neurotoxicology*. 2013; 35: 113-20.

Eramo S, Urbani G, Sfasciotti GL, Brugnoletti O, Bossù M, Polimeni A. Estrogenicity of bisphenol A released from sealants and composites: a review of the literature. *Ann Stomatol (Roma)*. 2010; 1(3-4): 14–21.

Fagoni TG, De Vasconcelos RA, Cardoso PE, Gomes APM, Camargo CHR, Gonçalves SHF. Dental treatment for the pregnant patient. *Braz Dent Sci*. 2014; 17(3): 3-10.

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K, Mori S, Smee DF, Pearce DA, Winter C, Sohr R, Juckel G. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res*. 2008; 99: 56-70.

Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010; 126(4): 760-768

Fontanetti PA, De Lucca RC, Mandalunis PM, Vermouth NT. Impairment of rat tooth eruption in pups born to mothers exposed to chronic stress during pregnancy. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(11): 1643-1651.

Fortier ME, Joobar R, Luheshi GN, Boksa P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res*. 2004; 38: 335-345.

Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res*. 2007; 181: 270-277.

Fukae M, Kanazashi M, Nagano T, Tanabe T, Oida S, Gomi K. Porcine sheath proteins show periodontal ligament regeneration activity. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114 Suppl 1: 212-8.

Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Yamakoshi Y, Shimizu M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53(4): 257–61.

Fukae M, Tanabe T. Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. *Calcif Tissue Int.* 1987; 40(5): 286-93.

Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol.* 2004; 167(5): 973-83.

Gao X, Wang HS. Impact of bisphenol A on the cardiovascular system - epidemiological and experimental evidence and molecular mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2014; 11: 8399-8413.

Gao Y, Wang W, Sun Y, Zhang J, Li D, Wei Y, Han T. Distribution of amelotin in mouse tooth development. *Anat Rec (Hoboken).* 2010; 293(1): 135–40.

Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH, Viguié C, Bousquet-Melou A, Toutain PL, Picard-Hagen N. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect.* 2013; 121(8): 951-6.

Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health.* 2011; 214(5): 339-47.

Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol* 1998; 3: 288-302.

Gibson CW, Li Y, Suggs C, Kuehl MA, Pugach MK, Kulkarni AB, Wright JT. Rescue of the murine amelogenin null phenotype with two amelogenin transgenes. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 Suppl 1: 70-4.

Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni AB. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2001; 276: 31871–31875.

Gibson CW. The amelogenin “enamel proteins” and cells in the periodontium. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008; 18(4): 345–60.

Ginsberg Y, Lotan P, Khatib N, Awad N, Errison S, Weiner Z, Maravi N, Ross MG, Itskovitz-Eldor J, Beloosesky R. Maternal lipopolysaccharide alters the newborn oxidative stress and C-reactive protein levels in response to an inflammatory stress. *J Dev Orig Health Dis.* 2012; 3(5): 358-63.

Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun.* 2005; 19: 3-11.

Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology.* 2005; 48: 903-917.

Gottberg B, Berné J, Quiñónez B, Solórzano E.. Prenatal effects by exposing to amoxicillin on dental enamel in wistar rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014; 19(1): 38-43.

Grifith JQ, Farris EJ. The rat laboratory investigation. L:B: Lippincott Company Philia, Montreal, London, 1942: 102-140

Guardino CM, Schetter CS. Understanding pregnancy anxiety: concepts, correlates, and consequences, *Zero Three.* 2014; 34 (4): 12–21.

Guo J, Lyaruu DM, Takano Y, Gibson CW, Den Besten PK, Bronckers AL. Amelogenins as potential buffers during secretory-stage amelogenesis. *J Dent Res.* 2015; 94(3): 412-20.

Güner Ş. Prenatal Dönemden İtibaren Farklı Konsantrasyonlarda kronik Olarak Sistemik Fluorid Verilen Sıçanların Diş ve Beyin Dokularının Histolojik Yöntemlerle İncelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2012, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. A. Menteş).

Hajar Rachel. Animal testing and medicine. *Heart Views.* 2011; 12(1): 42.

Halden RU. Plastics and health risks. *Annu Rev Public Health*. 2010; 31: 179-194.

Hao LY, Hao XQ, Li SH, Li XH. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience*. 2010; 166(3): 763-70.

Hijazi A, Guan H, Cernea M, Yang K. Effects of prenatal exposure to bisphenol A on fetal lung development. *FASEB J*. 2015; 29(12): 4968-77.

Hijazi A. Effects of Prenatal Exposure to Bisphenol A on Fetal Lung Development. The University of Western Ontario, Pharmacology and Toxicology, pHd thesis, 2016, Ontario. (Supervisor: Dr. Kaiping Yang).

Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC. Stress, cortisol, and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res* 2006; 85: 324-328.

Hong L, Levy SM, Warren JJ, Bergus GR, Dawson DV, Wefel JS. Primary tooth fluorosis and amoxicillin use during infancy. *J Public Health Dent*. 2004; 64: 38-44

Hong L, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Amoxicillin use during early childhood and fluorosis of later developing tooth zones. *J Public Health Dent*. 2011; 71: 229-35.

Hong L, Levy SM, Warren JJ, Dawson DV, Bergus GR, Wefel JS. Association of amoxicillin use during early childhood with developmental tooth enamel defects. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005; 159: 943-8.

Horstman KA, Naciff JM, Overmann GJ, Foertsch LM, Richardson BD, Daston GP. Effects of transplacental 17- α -ethynyl estradiol or bisphenol A on the developmental profile of steroidogenic acute regulatory protein in the rat testis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2012; 95(4): 318-25.

Houari S, Loiodice S, Jedeon K, Berdal A, Babajko S. Expression of steroid receptors in ameloblasts during amelogenesis in rat Incisors. *Front Physiol*. 2016; 7: 503.

Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP. Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide

sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res.* 1997; 76(2): 648–57.

Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP. Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res.* 1997; 76(2): 648-57.

Hu CC, Hart TC, Dupont BR, Chen JJ, Sun X, Qian Q, Zhang CH, Jiang H, Mattern VL, Wright JT, Simmer JP. Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. *J Dent Res.* 2000; 79: 912–919.

Hu JC, Chan HC, Simmer SG, Seymen F, Richardson AS, Hu Y, Milkovich RN, Estrella NM, Yildirim M, Bayram M, Chen CF, Simmer JP. Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52052.

Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter GK, Feng JQ, Yamakoshi F, Simmer JP. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem.* 2008; 283(16): 10858-71.

Hu JC, Lertlam R, Richardson AS, Smith CE, McKee MD, Simmer JP. Cell proliferation and apoptosis in enamelin null mice. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 Suppl 1: 329-37.

Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 125–132.

Hu JC, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Krebsbach PH, Simmer JP. Proteomics and genetics of dental enamel. *Cells Tissues Organs.* 2005; 181(3–4): 219–31.

Hu JC, Yamakoshi Y. Enamelin and autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(6): 387–98.

Indahyani DE, Santoso AS, Utoro T, Soesatyo M. Lipopolysaccharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia. *Dent J (Mal Ked Gigi)*. 2007; 40: 85-88.

Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin- a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J Dent Res*. 2005; 84(12): 1127–32.

Iwata T, Yamakoshi Y, Hu JC, Ishikawa I, Bartlett JD, Krebsbach PH, Simmer JP. Processing of ameloblastin by MMP-20. *J Dent Res*. 2007; 86(2): 153–7.

Jacobsen PE, Henriksen TB, Haubek D, Ostergaard JR. Developmental enamel defects in children prenatally exposed to anti-epileptic drugs. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58213

Jedon K, De La Dure-Molla M, Brookes SJ, Loiodice S, Marciano C, Kirkham J, Canivenc-Lavier MC, Boudalia S, Bergès R, Harada H, Berdal A, Babajko S. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol*. 2013; 183(1): 108-18.

Jedon K, Houari S, Loiodice S, Thuy TT, Le Normand M, Berdal A, Babajko S. Chronic exposure to bisphenol A exacerbates dental fluorosis in growing rats. *J Bone Miner Res*. 2016; 31(11): 1955-1966.

Jedon K, Marciano C, Loiodice S, Boudalia S, Canivenc Lavier MC, Berdal A, Babajko S. Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. *Connect Tissue Res*. 2014; 55 Suppl 1: 43-7

Jiang P, Dang RL, Li HD, Zhang LH, Zhu WY, Xue Y, Tang MM. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014: 729827.

Kadoma Y, Fijisawa S. Kinetic evaluation of reactivity of bisphenol A derivatives as radical scavengers for methacrylate polymerization. *Biomaterials*. 2000; 21: 2125–30.

Kanchan T, Machado M, Rao A, Krishan K, Garg AK. Enamel hypoplasia and its role in identification of individuals: A review of literature. *Indian J Dent.* 2015; 6(2): 99-102.

Kass L, Altamirano GA, Bosquiazzo VL, Luque EH, Toro M. Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 2012; 33(3): 390-400

Kass L, Durando M, Altamirano GA, Manfroni-Ghibauda GE, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Prenatal bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reprod Toxicol.* 2015; 54: 37-46.

Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 6. baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara; 1991, 826- 863.

Kharrazian D. The potential roles of bisphenol A (BPA) pathogenesis in autoimmunity. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 743616.

Kluger MJ, Kozak W, Conn CA, Leon LR, Soszynski D. The adaptive value of fever. *Infect Dis Clin North Am* 1996;10: 1–20.

Kobayashi K, Yamakoshi Y, Hu JC, Gomi K, Arai T, Fukae M, Krebsbach PH, Simmer JP. Splicing determines the glycosylation state of ameloblastin. *J Dent Res.* 2007;86(10):962-7.

Kobayashi K, Yamakoshi Y, Hu JC, Gomi K, Arai T, Fukae M, Krebsbach PH, Simmer JP. Splicing determines the glycosylation state of ameloblastin. *J Dent Res.* 2007; 86(10): 962-7.

Kofman, O. (2002). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 457-470.

Kondo S, Tamura Y, Bawden JW, Tanase S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(6): 557-68.

Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem.* 1996; 271(8): 4431-5.

Kumasaka S, Shimosuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, Davaadorj P, Saito I, Satomura K. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(5): 577-84.

Kumazawa K, Sawada T, Yanagisawa T, Shintani S. Effect of single-dose amoxicillin on rat incisor odontogenesis: a morphological study. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3): 835-42.

Kuscu OO, Sandalli N, Dikmen S, Ersoy O, Tatar I, Turkmen I, Çağlar E. Association of amoxicillin use and molar incisor hypomineralization in piglets: Visual and mineral density evaluation. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1422-33.

Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Hu P, Bringas P Jr, Sahin-Toth M, Moradian-Oldak J, Paine ML. Chymotrypsin C (caldecrin) is associated with enamel development. *J Dent Res.* 2011; 19(10): 1228–33.

Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2009; 88: 132-6.

Laisi S, Ess A, Sahlberg C, Arvio P, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Amoxicillin may cause molar incisor hypomineralization. *J Dent Res.* 2009; 88: 132–136.

Lattanzi W, Di Giacomo MC, Lenato GM, Chimienti G, Voglino G, Resta N, Pepe G, Guanti G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Hum Genet.* 2005;116(5): 395-401

Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci.* 2003; 75: 40–46.

Lei H, Liu H, Ding Y, Ge L. Immunohistochemical localization of Pax6 in the developing tooth germ of mice. *J Mol Histol*. 2014; 45(4): 373-9.

Lejonklou MH, Christiansen S, Örberg J, Shen L, Larsson S, Boberg J, Hass U, Lind PM. Low-dose developmental exposure to bisphenol A alters the femoral bone geometry in wistar rats. *Chemosphere*. 2016; 164: 339-346.

Tourino LF, Corrêa-Faria P, Ferreira RC, Bendo CB, Zarzar PM, Vale MP. Association between molar incisor hypomineralization in schoolchildren and both prenatal and postnatal factors: a population-based study. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0156332.

Lejonklou MH, Christiansen S, Örberg J, Shen L, Larsson S, Boberg J, Hass U, Lind PM. Low-dose developmental exposure to bisphenol A alters the femoral bone geometry in wistar rats. *Chemosphere*. 2016; 164: 339-346.

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous D. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(20): 11032-11037.

Li Z, Chen G, Yang Y, Guo W, Tian W. Bcl11b regulates enamel matrix protein expression and dental epithelial cell differentiation during rat tooth development. *Mol Med Rep*. 2017; 15(1): 297-304.

Liaudat AC, Rodriguez N, Chen S, Romanini MC, Vivas A, Rolando A, Gauna H, Mayer N. Adrenal response of male rats exposed to prenatal stress and early postnatal stimulation. *Biotechnic & Histochemistry*. 2015; 90(6): 432–438.

Lin KJ, Mitchell AA, Yau WP, Louik C, Hernández-Díaz S. Maternal exposure to amoxicillin and the risk of oral clefts. *Epidemiology*. 2012; 23(5): 699-705.

Liu J, Huang F, He HW. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):10063-74.

Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*. 2008; 389(6): 695–700.

Luheshi GN. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. Ann NY Acad Sci. 1998; 856: 83-89.

Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS, Thrane PS, Prydz HP. A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel *in vivo*. EMBO J. 1995; 14(21): 5224–5229.

MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Forsman-Semb K, Mårdh CK, Mesbah M, Forest N, Krebsbach PH, Yamada Y, Berdal A. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. Eur J Oral Sci. 2000; 108(4): 303–10.

Mårdh CK, Bäckman B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, MacDougall M, Forsman-Semb K. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. Eur J Oral Sci. 2001; 109(1): 8-13.

Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. Biol Reprod. 2001; 65(4): 1215-23.

Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. J Histochem Cytochem. 2006; 54: 713–725.

McEwen B. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. Physiological Review. 2007; 87: 873-904.

Meaney M, Aitken D H, Bodnoff SR, Iny LJ, Tatarewicz JE, Sapolsky R. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. Behavioral Neuroscience. 1985; 99(4): 765-770.

Meaney M, Szyf M, Seckl J. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. Trends in Molecular Medicine. 2007; 13(7): 269-277.

Meek LR, Burda KM, Paster E. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. Physiol Behav 2000; 71(5): 543–9.

Ménard S, Guzylack-Piriou L, Lencina C, Leveque M, Naturel M, Sekkal S, Harkat C, Gaultier E, Olier M, Garcia-Villar R, Theodorou V, Houdeau E. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol A impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLoS One*. 2014; 9(11): e112752.

Meredith RW, Gatesy J, Cheng J, Springer MS. Pseudogenization of the tooth gene enamelysin (MMP20) in the common ancestor of extant baleen whales. *Proc Biol Sci*. 2011; 278(1708): 993-1002.

Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. Immunological stress at the maternal-foetal interface: a link between neurodevelopment and adult psychopathology. *Brain Behav Immun*. 2006; 20: 378-388.

Meyer U, Knuesel I, Nyffeler M, Feldon J. Chronic clozapine treatment improves prenatal infection-induced working memory deficits without influencing adult hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010; 208: 531-543.

Michałowicz J, Duda W. Phenols- sources and toxicity. *Polish J. of Environ. Stud*. 2007; 16 (3): 347-362.

Mihalaş E, Matricala L, Chelmuş A, Gheţu N, Petcu A, Paşca S. The role of chronic exposure to amoxicillin/clavulanic acid on the developmental enamel defects in mice. *Toxicol Pathol*. 2016; 44(1): 61-70

Miwa T, Matsuzaka K, Inoue T. Effect of interrupted eruption on the enamel organ of the rat incisor. *Zoology (Jena)*. 2013; 116(2): 90-8.

Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Simmons D, Wright JT, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J*. 2006; 399(1): 37–46.

Monteleone MC, Adrover E, Pallarés ME, Antonelli MC, Frasci AC, Brocco MA. Prenatal stress changes the glycoprotein GPM6A gene expression and induces epigenetic changes in rat offspring brain. *Epigenetics*. 2014; 9(1): 152-60.

Mooney MP, Siegel MI, Gest TR. Prenatal stress and increased fluctuating asymmetry in the parietal bones of neonatal rats. *Am J Phys Anthropol* 1985; 68: 131–134.

Mouihate A. Prenatal immune stress in rats dampens fever during adulthood. *Dev Neurosci*. 2012; 34(4): 318-26.

Murakami C, Dohi N, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Wakida K, Satoda T, Takahashi O, Shimizu M, Ryu OH, Simmer JP, Uchida T. Immunochemical and immunohistochemical study of the 27- and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. *Histochem Cell Biol*. 1997; 107(6): 485-94.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. 8th ed. Elsevier, Missouri; 2008, p:122-165

Navarro LF. Garcia AA. Marco JM. Llana-Puy MC. A study of the clinical, histopathologic and ultrastructural aspects of enamel agenesis: Report of case. *J Dent for Child* 1999; 20: 12.

Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L, Wang K. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 3114–3119.

Nelson S. J, Ash M. M. Wheeler's dental anatomy, physiology, and occlusion. 9th ed., St. Louis; Saunders Elsevier; 2010. p: 88-151.

Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(9): 1196-1203.

Nishikawa S, Abe M. Immunocytochemical localization of claudin-1 in the maturation ameloblasts of rat incisors. *Front Physiol*. 2010; 1: 150.

North EJ, Halden RU. Plastics and environmental health: the road ahead. *Rev Environ Health*. 2013; 28(1): 1-8.

Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.* 2005; 8(3): 267–9.

Oldak JM. Protein- mediated enamel mineralization. *Front Biosci.* 2012; 17: 1996–2023.

Osawa M, Kenmotsu S, Masuyama T, Taniguchi K, Uchida T, Saito C, Ohshima H. Rat wct mutation induces a hypo-mineralization form of amelogenesis imperfecta and cyst formation in molar teeth. *Cell Tissue Res.* 2007; 330(1): 97-109.

Paine ML, Luo W, Zhu DH, Bringas PJ, Snead ML. Functional domains for amelogenin revealed by compound genetic defects. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 466–472.

Pernia S, De Maagd G. The new pregnancy and lactation labeling rule. *P T.* 2016; 41(11): 713-715.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Nogueira-Filho GR. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol.* 2008; 79(4): 697-704.

Phipps KR. No evidence to support the claim that amoxicillin causes molar-incisor hypomineralization. *J Evid Based Dent Pract.* 2012; 12(3 Suppl): 73-5.

Ping LV, Hong TJ, Xue JG. Immunohistochemical localization of transcription factor Sp3 during dental enamel development in rat tooth germ. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(1): 93-5.

Pohl J, Luheshi GN, Woodside B. Effect of obesity on the acute inflammatory response in pregnant and cycling female rats. *J Neuroendocrinol.* 2013; 25(5): 433-45.

Poole T. *The ufaw handbook on the care and management of laboratory animals.* (6th ed.) Harlow, Longman Group, UK, p 322, 1987.

Porto IM, Merzel J, De Sousa FB, Bachmann L, Cury JA, Line SR, Gerlach RF. Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. Arch Oral Biol. 2009; 54(4): 313-21.

Prakash SK, Gibson CW, Wright JT, Boyd C, Cormier T, Sierra R, Li Y, Abrams WR, Aragon MA, Yuan ZA, van den Veyver IB. Tooth enamel defects in mice with a deletion at the Arhgap 6/Amel X locus. Calcif Tissue Int. 2005; 77(1): 23–9.

Quan C, Wang C, Duan P, Huang W, Yang K. Prenatal bisphenol a exposure leads to reproductive hazards on male offspring via the Akt/mTOR and mitochondrial apoptosis pathways. Environ Toxicol. 2017; 32(3): 1007-1023.

Ranjit N, Siefert K, Padmanabhan V.. Bisphenol-A and disparities in birth outcomes: a review and directions for future research. J Perinatol. 2010; 30(1): 2–9.

Rathee M, Malik P, Singh J. Bisphenol A in dental sealants and its estrogen like effect. Indian J Endocrinol Metab. 2012; 16(3): 339–342.

Rathee M, Malik P, Singh J. Bisphenol A in dental sealants and its estrogen like effect. Indian J Endocrinol Metab. 2012; 16(3): 339-42.

Ren Y, Van Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and proposed solution. Eur J Ort. 2004; 26: 483-490

Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenbergh JG, Walser-Kuntz DR, Vom Saal FS. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. Reprod Toxicol. 2007; 24(2): 199-224.

Rivera C, Monsalve F, Suazo I, Becerra J. Stress increases periodontal inflammation. Exp Ther Med. 2012; 4(5): 883-888.

Romero E, Ali C, Molina-Holgado E, Castellano B, Guaza C, Borrell J. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. Neuropsychopharmacology. 2007; 32: 1791-1804.

Rotimi SO, Ojo DA, Talabi OA, Ugbaja RN, Balogun EA, Ademuyiwa O. Amoxillin- and pefloxacin-induced cholesterogenesis and phospholipidosis in rat tissues. *Lipids Health Dis.* 2015; 14: 13.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(7): 675-80

Ryu O, Hu JC, Yamakoshi Y, Villemain JL, Cao X, Zhang C, Bartlett JD, Simmer JP. Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(5): 358–65.

Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, Simmer JP. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res.* 1999; 78: 743–750.

Sadowski RN, Park P, Neese SL, Ferguson DC, Schantz SL, Juraska JM. Effects of perinatal bisphenol A exposure during early development on radial arm maze behavior in adult male and female rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 42: 17-24

Sanchez-Cardoso P, Higuera-Matas A, Martín S, Miguens M, Del Olmo N, Garcia-Lecumberri C. Strain differences between Lewis and Fischer 344 rats in the modulation of dopaminergic receptors after morphine self-administration and during extinction. *Neuropharmacology.* 2009; 57(1): 8–17.

Santamaría C, Durando M, De ToroMM, Luque EH, Rodriguez HA. Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2016; 158: 220-30.

Sant'Anna LB, Tosello DO, Pasetto S. Effects of maternal ethanol intake on immunoexpression of epidermal growth factor in developing rat mandibular molar. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(7): 625-34.

Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D. Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig.* 1999; 3(3): 114-9.

Seckl, J. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming European Journal of Endocrinology, 151, U49-U62.

Semenchenko GV, Anisimov VN, Yashin AI. Stressors and antistressors: how do they influence life span in HER-2/neu transgenic mice? Exp Gerontol. 2004; 39(10): 1499–511.

Semenoff TADV, Da Silva-Junior AR, Pedro FLM, Borges ÁH, Porto AN and Semenoff-Segundo A. Chronic stress increases bone resorption in apical periodontitis stress and endodontic disease in rats. Oral Biol Dent. 2013; 1: 1.

Semenoff-Segundo A, Delle Vedove Semenoff TA, Borges ÁH, Pedro FL, Caporossi LS, Bosco ÁF. The influence of chronic stress imposed on pregnant rats on the induced bone loss in their adult offspring. Arch Oral Biol. 2012; 57(5): 477-82.

Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. Int J Prev Med. 2013; 4(6): 624–630.

Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH.. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. J Neurosci. 2003; 23: 297-302.

Siegel MI, Doyle WJ, Kelley C. Heat stress, fluctuating asymmetry and prenatal selection in the laboratory rat. Am J Phys Anthropol. 1977; 46: 121–126.

Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. J Dent Educ. 2001; 65(9): 896-905.

Simmer JP, Hu Y, Lertlam R, Yamakoshi Y, Hu JC. Hypomaturational enamel defects in *Klk4* knockout/*LacZ* knockin mice. J Biol Chem. 2009; 284(28): 19110–21.

Singh IS, Hasday JD. Fever, hyperthermia and the heat shock response. Int J Hyperthermia. 2013; 29(5): 423-35.

Sire JY, Davit-Beal T, Delgado S, Gu X. The origin and evolution of enamel mineralization genes. Cells Tissues Organs. 2007; 186(1): 25–48.

Sire JY, Delgado S, Fromentin D, Girondot M. Amelogenin: lessons from evolution. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(2): 205–12.

Small BW, Murry JJ. Enamel opacities: prevalence, classifications and aetiological considerations. *J Dent.* 1978; 6: 33-42.

Smith CE, Richardson AS, Hu Y, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. Effect of kallikrein 4 loss on enamel mineralization: comparison with mice lacking matrix metalloproteinase 20. *J Biol Chem.* 2011; 286(20): 18149–60.

Solomon MB, Herman JP. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness, *Physiol. Behav.* 2009; 97(2): 250–258.

Song S, Zhang L, Zhang H, Wei W, Jia L. Perinatal BPA exposure induces hyperglycemia, oxidative stress and decreased adiponectin production in later life of male rat offspring. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2014; 11: 3728-3742.

Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. *Hum Genet.* 2014; 133: 117-24.

Soto AM, Kirsten TB, Reis-Silva TM, Martins MF, Teodorov E, Flório JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM, Bondan EF. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. *Life Sci.* 2013; 92(14-16): 852-8.

Söderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc.* 1999; 130(2): 201-9.

Sun Z, Fan D, Fan Y, Du C, Moradian-Oldak J. Enamel proteases reduce amelogenin-apatite binding. *J Dent Res.* 2008; 87(12): 1133–7.

Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2004; 75: 306-315.

Talge N, Neal C, Glover V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: How and why? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2007; 48(3/4): 245-261.

Tao J, Zhai Y, Park H, Han J, Dong J, Xie M, Gu T, Lewi K, Ji F, Jia W. Circadian rhythm regulates development of enamel in mouse mandibular first molar. *PLoS One*. 2016; 11(8): e0159946.

Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S. Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *J Dent Res*. 2001; 80(6): 1505.

Tiwari V, Singh M, Rawat JK, Devi U, Yadav RK, Roy S, Gautam S, Saraf SA, Kumar V, Ansari N, Saeedan AS, Kaithwas G. Redefining the role of peripheral LPS as a neuroinflammatory agent and evaluating the role of hydrogen sulphide through metformin intervention. *Inflammopharmacology*. 2016; 24(5): 253-264.

Tung K, Fujita H, Yamashita Y, Takagi Y. Effect of turpentine-induced fever during the enamel formation of rat incisor. *Archives of Oral Biology*. 2006; 51: 464-470.

Uchida T, Murakami C, Dohi N, Wakida K, Satoda T, Takahashi O. Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45(10): 1329–40.

Uchida T, Murakami C, Dohi N, Wakida K, Satoda T, Takahashi O. Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45(10): 1329-40.

Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M. Immunocytochemical and immunochemical detection of a 32 kDa nonamelogenin and related proteins in porcine tooth germs. *Arch Histol Cytol*. 1991; 54(5): 527-38.

Urnezu A, Kaneko N, Toyama Y, Wanatabe Y, Itoh H. Appearance of osteoclast by injections of lipopolysaccharides in rat periodontal tissue. *J Periodont Res*. 1989; 24: 3711-83.

Uskokovic V, Kim MK, Li W, Habelitz S. Enzymatic processing of amelogenin during continuous crystallization of apatite. *J Mater Res*. 2008; 23(12): 3184–3195.

Van Zutphen LFM. History of animal use. In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. (eds). *Principles of laboratory animal use*. Elsevier, Amsterdam; 2001, 2.

Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, Hunt PA, Newbold RR, Rubin BS, Soto AM, Wang HS, Vom Saal FS. Low dose effects of bisphenol A: An integrated review of *in vitro*, laboratory animal, and epidemiology studies. *Endocr Disruptors*. 2013; e25078: 1-13

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to BPA. *Reprod Toxicol*. 2007 Aug-Sep;24(2):139-77

Vandenberg LN. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors. *Vitam Horm*. 2014; 94: 129-65

Veiga-Lopez A, Luense LJ, Christenson LK, Padmanabhan V. Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression. *Endocrinology*. 2013;154(5): 1873-1884.

Veis A. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(1): 38–55.

Vernikos-Danellis J, Winget CM, Hetherington NW. Diurnal rhythm of the pituitary–adrenocortical response to stress: effect of constant light and constant darkness. *Life Sci Space Res*. 1970; 8: 240–6.

Vigizzi L, Ramos JG, Kass L, Tschopp MV, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Bosquiazzi VL. A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 426: 33-42.

Viltart O, Vanbesien-Mailliot CCA. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. *Scientific World Journal*. 2007; 7: 1493–537.

Vom Saal FS, Myers JP. Bisphenol A and risk of metabolic disorders. *JAMA*. 2008; 300(11): 1353-5

Vymetal J, Slaby I, Spahr A, Vondrasek J, Lyngstadaas SP. Bioinformatic analysis and molecular modelling of human ameloblastin suggest a two-domain intrinsically unstructured calciumbinding protein. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116(2): 124–34.

Vymetal J, Slabý I, Spahr A, Vondrásek J, Lyngstadaas SP. Bioinformatic analysis and molecular modelling of human ameloblastin suggest a two-domain intrinsically unstructured calcium-binding protein. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116(2): 124-34.

Wadhwa PD, Garite TJ, Porto M, Glynn L, Chicz-De Met A, Dunkel-Schetter C, Sandman CA. Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: a prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 191: 1063-9.

Wadia PR, Cabaton NJ, Borrero MD, Rubin BS, Sonnenschein C, Shioda T, Soto AM. Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS One*. 2013; 8(5): e63902.

Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367(1): 1–6.

Wazen RM, Moffatt P, Zalzal SF, Yamada Y, Nanci A. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix Biol*. 2009; 28(5): 292–303.

Wazen RM, Moffatt P, Zalzal SF, Yamada Y, Nanci A. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix Biol*. 2009; 28(5): 292-303.

Wei Y, Du W, Xiong X, He X, Ping Y, Deng Y, Chen D, Li X. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial remodelling in adult murine offspring. *J Inflamm (Lond)*. 2013; 10:35.

White PC, Mune T, Agarwal A. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine Reviews*. 1997; 18(1): 135-156.

William V, Messer LB, Burrow MF.. Molar incisor hypomineralization: review and recommendations for clinical management. *Pediatr Dent*. 2006; 28(3): 224-32.

Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav*. 2011; 59(3): 296–305.

Wright JT, Li Y, Suggs C , Kuehl MA, Kulkarni AB, Gibson CW. The role of amelogenin during enamel-crystallite growth and organization *in vivo*. *Eur J Oral Sci*. 2011; 119 Suppl 1: 65-9.

Wuollet E, Laisi S, Salmela E, Ess A, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralization and the association with childhood illnesses and antibiotics in a group of Finnish children. *Acta Odontol Scand*. 2016; 74(5): 416-22.

Yamaguti PM, Arana-Chavez VE, Acevedo AC. Changes in amelogenesis in the rat incisor following short-term hypocalcaemia. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(2): 185-8.

Yamakoshi Y, Hu JC, Fukae M, Yamakoshi F, Simmer JP. How do enamelysin and kallikrein 4 process the 32-kDa enamelin? *Eur J Oral Sci*. 2006; 114(Suppl 1): 45-51.

Yamakoshi Y, Pinheiro FH, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M. Sites of asparagine-linked oligosaccharides in porcine 32 kDa enamelin. *Connect Tissue Res*. 1998; 39(1-3): 39–46.

Yamakoshi Y, Tanabe T, Oida S, Hu CC, Simmer JP, Fukae M. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. *Arch Oral Biol*. 2001; 46(11): 1005–14

Yamakoshi Y. Porcine amelogenin alternative splicing, proteolytic processing, protein-protein interactions, and possible functions. *J Oral Biosci.* 2011; 53(3): 275-283.

Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, Bittner GD. Most plastic products release estrogenic chemicals: a potential health problem that can be solved. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(7): 989-96.

Zalzal SF, Smith CE, Nanci A. Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biol.* 2008; 27(4): 352-9.

Zheng L, Ehardt L, McAlpin B, About I, Kim D, Papagerakis S, Papagerakis P. The tick tock of odontogenesis. *Exp Cell Res.* 2014; 325(2): 83-9.

Zortuk M, Kırac E. Laboratuvar hayvanlarının deneysel amaçla protetik diş tedavisi alanında kullanım prosedürleri. *Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2010; 19(3): 226-231

Zuckerman L, Weiner I. 2005. Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J Psychiatr Res* 39:311-323.

.

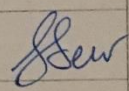
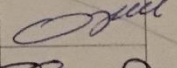
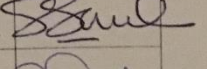
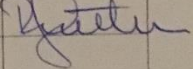
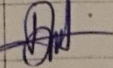
10.EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	006.2017.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL		
	PROJE ADI	Prenatal Dönemdeki Farklı Etkenlerin Yavru Sıçanlarda Mine Defekti Oluşumuna Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Ali MENTEŞ			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ	BAPKO			
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 16.01.2017 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ÇALIŞMA ESASI Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı	CANAN	Soyadı	DUMAN
Doğum Yeri	DENİZLİ	Doğum Tarihi	1986
Uyruğu	TC	Tel	+905360340786
E-mail	drcananduman@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı	2017
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2010
Lisans		
Lise	Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesi	2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
62.5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	94.290	90.544	92.532

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

11.1. Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1) Duman C., Kuru L., Pekiner F., Akyüz S. Multidisciplinary Dental Approach in a Patient with Waardenburg Syndrome. 11th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry. Strasbourg, France. 24-26 Mayıs 2012.
- 2) Duman C., Tzifa V., Menteş A. 3d-Volumetric Tomography of External Resorption as a Result of Intrusion. 18th World Congress on Dental Traumatology. Istanbul, Türkiye. 19-21 Haziran 2014.
- 3) Haznedaroğlu E., Duman C., Menteş A. Traumatic Injuries due to Natal Teeth: Report of Three Cases. 18th World Congress on Dental Traumatology. Istanbul, Türkiye. 19-21 Haziran 2014.
- 4) Tzifa V., Duman C., Menteş A. Localised Gingival Recession Caused by Traumatic Crossbite: A Case Report. 18th World Congress on Dental Traumatology. Istanbul, Türkiye. 19-21 Haziran 2014.
- 5) Duman C., Kalyoncu I., Olus G., Menteş A. Regional Odontodysplasia: An Unusual Case Report and Two Years Follow up. 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry. Glasgow, UK. 1-4 Temmuz 2015.
- 6) Duman C., Özkan N., Menteş A. Effect of Prenatal BPA Exposure or Chronic Stress to Ameloblasts. Enamel 9 Symposium. Harrogate, UK. 30 Ekim- 3 Kasım 2016.

11.2. Ulusal ve uluslararası yayınlar

- 1) Haznedaroğlu E, Güner Ş, Duman C, Menteş A. A 48-month randomized controlled trial of caries prevention effect of a one-time application of glass ionomer sealant versus resin sealant. Dent Mater J. 2016 Jun 1;35(3):532-8. doi: 10.4012.
- 2) Haznedaroğlu E., Menteş A., Duman C. Natal and neonatal teeth: Report of four cases. The Journal of Rare Disorders 2015, Cilt 1. sf 16-19 .