T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

45S5 ve S53P4 BİYOAKTİF CAMLARIN TEK BAŞINA VE KLORHEKSİDİNLE KOMBİNE KULLANIMININ MATRİKS METALLOPROTEİNAZ EKSPRESYONUNA VE DENTİN YÜZEY ÖZELLİKLERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ASLIHAN YELKENCİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜNSELİ GÜVEN POLAT

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2024

İTHAF

“Canım kızım Asya’ya ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tüm aşamalarda yol gösterici olan ve üzerimde büyük emeği olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, akademik başarısı ile kendime örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Günseli Güven Polat'a,

Öğrencilik yıllarımdan beri bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, akademik başarıları ve vizyonuyla bana örnek olan değerli hocam Prof. Dr. Hakan Özyuvacı'ya,

Tez çalışmam süresince bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, yönlendirmeleri ve her konuda sağladığı destekten dolayı değerli hocam Doç. Dr. Eray Metin Güler'e,

Doktora eğitimim boyunca destekleri, bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Başak Kızıltan Eliaçık, Doç. Dr. Barış Karabulut, Doç. Dr. Emine Kaya ve Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Kayacı'ya,

Birlikte mesaimizin geçtiği tüm Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı ailesine,

İyi bir hekim olmanın esaslarını öğrendiğim, mesleki hayatımda bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili babam Dt. Ahmet Uğur Zihni'ye,

Hayatımın her aşamasında ve tez çalışmam boyunca bana gösterdikleri sonsuz sevgi, destek ve fedakarlıklarıyla yanımda olan, fikirleriyle yol gösteren sevgili annem Türkan Zihni ve abim Uğur Cenk Zihni'ye,

İhtiyaç duyduğum her konuda, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, bana sürekli motivasyon kaynağı olan, zorlukları birlikte aştığımız sevgili eşim Burak Yelkenci'ye teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışmasını bilimsel araştırmalar projesi kapsamında 2024/031 numaralı proje ile destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
RESİMLER LİSTESİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. DENTİN YAPISI 4
2.2. DENTİN ÇÜRÜĞÜ 6
2.3. MİNERALİZASYON DİNAMİKLERİ 8
2.3.2. Remineralizasyon 10
2.3.3. Dentin Biyomineralizasyonu 11
2.4. BİYOMİMETİK DENTİN REMİNERALİZASYONUNDA KULLANILAN AJANLAR 12
2.4.1. Biyoaktif Camlar 12
2.4.1.1. Biyoaktif camların bileşimi 13
2.4.1.2. Biyoaktif cam 45S5 15
2.4.1.3. Biyoaktif cam S53P4 15
2.4.1.4. Hidroksiapatit oluşum mekanizması 15
2.4.1.5. Biyoaktif camların hazırlanması 16
2.4.2. Kazein Fosfopeptid- Amorf Kalsiyum Fosfat 17
2.4.3. Florür Bileşikleri 17
2.4.4. Çinko Oksit İçeren Materyaller 18
2.4.5. Kolajen Dışı Protein Anologları 18
2.4.5.1. Polidopamin 18
2.4.5.2. Polielektrolitler 18
2.4.5.3. Poliamidoamin dendrimeri 19
2.4.5.4. Sodyum trimetafosfat 19
2.5. PROTEOLİTİK ENZİMLER 19
2.5.1. Matriks Metalloproteinaz 20
2.5.2. Adeziv Rezin Kaynaklı Fibril Yıkımı 22

2.6. PROTEOLİTİK AKTİVİTE İNHİBİTÖRLERİ 24
2.6.1. Klorheksidin 24
2.6.2. Kuarterner Amonyum Bileşikleri 24
2.6.3. Bifosfonat Türevleri 25
2.6.4. Çinko ve Çinko İçeren Materyaller 26
2.6.5. Alkoller 26
2.6.6. Hidroksamat Bazlı İnhibitörler 27
2.6.7. Tetrasiklinler 27
2.6.8. Kolajen Çapraz Bağlayıcılar 27
2.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. DENEY ÖNCESİ HAZIRLIK SÜRECİ 30
3.1.1. Örnek Sayısının Belirlenmesi 30
3.1.2. Diş Örneklerinin Hazırlanması 30
3.1.3. Dentin Dokusunun İn-vitro Demineralizasyonu 32
3.1.5. Ultraviyole Dezenfeksiyon 35
3.2. DENEY SÜRECİ 37
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 38
3.2.2. S53P4 ve 45S5 Biyoaktif Camlar 40
3.2.3. S53P4 ve 45S5 Biyoaktif Camların Klorheksidin ile Kombine Kullanımı 42
3.2.4. Klorheksidin 43
3.2.5. Distile Su 43
3.2.6. Dentin Disklerinin Homojenizasyonu ve Protein Ölçümü 44
3.2.8. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi 46
3.2.9. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi 47
3.1. İSTATİKSEL YÖNTEM 48
4. BULGULAR 49
4.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU 49
4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER 53
4.2.1. Matriks Metelloproteinaz 2 53
4.2.2. Matriks Metalloproteinaz 9 56
4.2.3. Matriks Metalloproteinazlara Spesifik Doku İnhibitörü-1 59
4.2.4. Matriks Metalloproteinazlara Spesifik Doku İnhibitörü-2 62
4.2.5. Tip I Kolajenin C-terminal Telopeptitleri 65
5. TARTIŞMA 69

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 82
KAYNAKLAR 84
EKLER 102

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Biyoaktif cam bileşimindeki varyasyonlar..... 14

Tablo 3.1: Çalışma grupları ve kullanılan materyaller.....39

Tablo 4.1: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinaz-2 değerleri.....55

Tablo 4.2: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinaz-9 değerleri 58

Tablo 4.3:'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 değerleri..... 61

Tablo 4.4: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 salınım değerleri 64

Tablo 4.5: 'Refresh' numunelerin tip I kolajen C-terminal telopeptit salınım değerleri.... 67

,

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Demineralizasyon ve remineralizasyon süreçleri 9

Şekil 2.2: Matriks metalloproteinazların temel yapısı 20

Şekil 2.3: Matriks metalloproteinazların parçalanma mekanizmaları 21

Şekil 2.4: Taramalı elektron mikroskobunun sistematik şeması..... 29

Şekil 3.1: Deney akış şeması.....37

Şekil 4.1: Homojenatların matriks metalloproteinaz 2 değerleri..... 54

Şekil 4.2: Matriks metalloproteinaz salınımının zamana bağlı değişimi 56

Şekil 4.3: Homojenatların matriks metalloproteinaz-9 salınım değerleri 57

Şekil 4.4: Matriks metalloproteinaz 9 salınımının zaman içerisindeki değişimi 59

Şekil 4.5: Homojenatların matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 salınım değerleri 60

Şekil 4.6: Matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi 62

Şekil 4.7: Homojenatların matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 değerleri 63

Şekil 4.8: Matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi 65

Şekil 4.9: Homojenatların tip I kolajen C-terminal telopeptitleri değerleri 66

Şekil 4.10: Tip I kolajenin C-terminal telopeptitlerinin salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi..... 68

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Çalışmada kullanılan mikro kesme cihazı Mecatome T180..... 31

Resim 3.2: Çalışmada kullanılan polisaj cihazı Minitech Z33 32

Resim 3.3: Demineralizasyon solüsyonu..... 33

Resim 3.4: Demineralize edilen dentin diskleri..... 33

Resim 3.5: Mikroplaklara yerleştirilen dentin diskleri 34

Resim 3.6: Distile suyun filtrelenmesi..... 35

Resim 3.7: Laminar akış kabini 36

Resim 3.8: Ultraviyole ile dezenfekte edilen deney malzemeleri 36

Resim 3.9: S53P4 biyoaktif cam..... 38

Resim 3.10: 45S5 biyoaktif cam..... 39

Resim 3.11: 45S5 ve S53P4 biyoaktif camların hazırlanması..... 40

Resim 3.12: Dentin diskine biyoaktif cam uygulaması 41

Resim 3.13: Kuyulara fosfat salinli tampon ilave edilmesi 41

Resim 3.14: Biyoaktif cam uygulaması öncesi klorheksidinin uygulanması 42

Resim 3.15: İnkübatöre alınan dentin diskleri 43

Resim 3.16: Refreshlerin Eppendorf tüplere alınması..... 44

Resim 3.17: Dentin disklerinin homojenizasyonu..... 45

Resim 3.18: Homojenize dentin disklerinin santrifüjlenme işlemi..... 45

Resim 3.19: Protein analizi..... 46

Resim 3.20: Spektrofotometri cihazı 46

Resim 3.21: Enzime bağlı immünosorbent testi 47

Resim 4.1: S53P4 uygulanmasından sonra demineralize dentin disklerinin; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikrosokobu görüntüleri.....49

Resim 4.2: 45S5 uygulanmasından sonra demineralize dentin disklerinin; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikrosokobu görüntüleri 50

Resim 4.3: Demineralize edilen dentin disklerine klorheksidin ön işlemi ve 45S5 uygulanmasından sonra; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 51

Resim 4.4: Demineralize dentin disklerine klorheksidin ön işlemi ve S53P4 uygulanmasından sonra; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 52

Resim 4.5: Demineralize dentin disklerine klorheksidin uygulaması sonrası; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 53

Resim 4.6: Negatif kontrol grubunun; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP : Amorf Kalsiyum Fosfat

BAC : Benzalkonyum Klorür

BM : Bazal Membran

BisGMA : Bisfenol A-Glisidil Metakrilat

CaF : Kalsiyum Florür

CaO : Kalsiyum Oksit

CHX : Klorheksidin

CPP : Kazein Fosfopeptid

CPP-ACP : Kazein Fosfopeptid-Amorf Kalsiyum fosfat

DMP-1 : Dentin Matriks Protein-1

DOS : Dişeti Oluğu Sıvısı

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

DSPP : Dentin Sialofosfoprotein

EDC : 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid

EDS : Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi

ELISA : Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi

FA : Florapatit

FDA : Gıda ve İlaç İdaresi

HA : Hidroksiapatit

HBSS : Hanks' ın Dengeli Tuz Çözeltisi

HEMA : Hidroksietil Metakrilat

HT : Hibrit Tabaka

ICTP : Tip I Kolajenin C-terminal Telopeptitleri

ISO : Uluslarası Standardizasyon Örgütü

MMP : Matriks Metalloproteinaz

Na_2O : Sodyum Oksit

NCP : Kolajen Dışı Protein

PA : Fosforik Asit

PAA : Poliakrilik Asit

PAMAM : Poliamidoamin Dendrimeri

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PDA : Polidopamin

PDL : Periodontal Ligament

PG : Proteoglikan

P_2O_5 : Di Fosfor Pentoksit

PVPA : Polivinil Fosfonik Asit

SBF : Simüle Edilmiş Vücut Sıvısı

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SiO_2 **:** Silisyum Dioksit

STMP **:** Sodyum Trimetafosfat

TIMP **:** Matriks Metalloproteinazlara Spesifik Doku İnhibitörleri

UV **:** Ultraviyole

QAC **:** Kuarterner Amonyum Bileşikleri

45S5 ve S53P4 BİYOAKTİF CAMLARIN TEK BAŞINA VE KLORHEKSİDİNLE KOMBİNE KULLANIMININ MATRİKS METALLOPROTEİNAZ EKSPRESYONUNA VE DENTİN YÜZEY ÖZELLİKLERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Dentinin biyomimetik remineralizasyon tedavilerinde kullanılan biyoaktif camların ve bu materyallerin bir proteaz inhibitörü olan klorheksidin ile kombine kullanımının dentin yüzey özelliklerine ve matriks matelloproteinaz aktivitesine olan etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: 18-21 yaş arası bireylerin çekilen çürüksüz üçüncü molar dişleri çalışma kapsamında toplanmıştır. Dişlerin, orta koronal bölgesinden 1 mm kalınlığında dentin kesitleri hazırlanmıştır. Demineralizasyon için, %85 H_2PO_4'ün distile su ile seyreltilmesiyle oluşturulan %10 fosforik asit çözeltisi kullanılmıştır. Dentin kesitleri, 24 saat boyunca %10 fosforik asit çözeltisinde demineralize edilmiş ve ardından 8 saat boyunca distile su ile yıkanmıştır. Numuneler dört hafta boyunca fosfat tamponlu salin içerisinde tutulmuş ve %5 CO_2 içeren, 37 °C'de nemlendirilmiş bir ortamda inkübe edilmiştir. Bu süreçte, belirlenen tedaviler uygulanmıştır. Tedavi grupları S53P4, 45S5, klorheksidin ve 45S5, klorheksidin ve S53P4, klorheksidin ve distile su olmak üzere 6'ya ayrılmıştır. Tedavi süresi boyunca, dentin kesitlerini içeren her kuyucuktan her hafta elde edilen çözeltiler biyokimyasal analiz için saklanmıştır. Tedavi süresinin sonunda, her gruptan 5 numune ileri analizler için dentin diskleriyle birlikte homojenize edilmiş ve serum örneklerindeki matriks metalloproteinaz seviyeleri enzime bağlı immunosorbent kit kullanılarak ölçülmüştür. 3 numunenin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: 45S5 ve S53P4 biyoaktif camlar matriks metalloproteinaz ekspresyonunu artırmıştır. Klorheksidin ile kombine kullanımda matriks metalloproteinaz ekspresyonunun düştüğü görülmüştür. 45S5 ve S53P4 uygulamalarının dentin tübüllerini tıkadığı gözlemlenmiştir. Ön işlem olarak klorheksidin uygulanmasının biyoaktif camların dentin yüzey özellikleri üzerindeki etkisini değiştirmediği belirlenmiştir.

Sonuç: Elde edilen bulgular ışığında, 45S5 ve S54P4 biyoaktif camların klorheksidin ile kombine kullanımında dentin biyomineralizasyon etkinliğininin artabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif Cam, Biyomineralizasyon, Klorheksidin, Matriks Metalloproteinaz

IN VITRO EVALUATİON OF THE EFFECTS OF 45S5 AND S43P4 BİOACTİVES GLASSES ALONE AND İN COMBİNATİON WİTH CLORHEXİDİNE ON MATRİX METALLOPROTEİNASE EXPRESSİON AND DENTİN SURFACE PROPERTİES

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to investigate the effects of bioactive glasses used in dentin bioremineralization treatments and their combination with chlorhexidine, a protease inhibitor, on dentin surface properties and matrix metalloproteinase activity.

Materials and Methods: Caries-free third molars from individuals aged 18-21 were collected. 1 mm thick dentin sections were prepared from the middle coronal area. A 10% phosphoric acid solution was used for demineralization, created by diluting 85% H_2PO_4 in distilled water. Dentin sections were demineralized in this 10% phosphoric acid solution for 24 hours, then rinsed with distilled water 8 hours. After this preparation, the samples were placed in phosphate buffered saline for four weeks and incubated in a humidified environment containing 5% CO_2 at 37 °C, where the designated treatments were applied. The treatment groups were divided 6 as follows; S53P4, 45S5, chlorhexidine and 45S5, chlorhexidine and S53P4, chlorhexidine, distilled water. Solution from each well containing dentin sections was collected every week and stored for biochemical analysis. At the end of the treatment period, 5 samples from each group were homogenized along with dentin disks for further analysis, and the levels of matrix metalloproteinases in serum samples were measured using enzyme linked immunosorbent assay kits. The surface properties of 3 samples were evaluated using scanning electron microscope analysis.

Results: 45S5 and S53P4 bioactive glasses were observed to increase matrix metalloproteinase expression. However, when combined with chlorhexidine, a decrease in matrix metalloproteinase expression was noted. Additionally, 45S5 and S53P4 applications were found to occlude dentinal tubules. It was also determined that the application of chlorhexidine as a pretreatment did not alter the effects of bioactive glasses on dentin surface properties.

Conclusion: It has been concluded that the combination of 45S5 and S53P4 bioactive glasses with chlorhexidine could enhance dentin biomineralization efficacy.

Key Words: Bioactive Glass, Bioremineralization, Chlorhexidine, Matrix Metalloproteinase

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, yaygın olarak gözlenen kronik bir hastalıktır. Mevcut geleneksel tedaviler çürüğün mekanik yollarla temizlenmesini ve akabinde dişin restore edilmesini içermektedir. Geleneksel yöntemlerle tedavi edilen diş dokularında geri dönüşümsüz ve yıkıcı bir hasar meydana geldiği bilinmektedir (1). Günümüzde ise dişin yapısal, biyolojik ve fonksiyonel özellikleriyle uyumlu bir restorasyon oluşturmak hedeflenmektedir (2). Çünkü mekanik özellikleri uyumlu olan ve estetik sonuçların elde edildiği bir restorasyonun bile uzun dönemde çözünürlük, zayıf adezyon, diş yapısına bağlandıktan sonra hızlı degredasyon, sekonder çürük ve pulpa nekrozu gibi nedenlerden ötürü tehlike altında olduğu bildirilmektedir (3). Birçok alanda olduğu gibi tıp ve diş hekimliğinde de doğayı taklit etmek bilimsel gelişmelere olanak sağlamaktadır. Doğanın taklit edildiği bu yaklaşım biyomimetik olarak adlandırılmaktadır. Dişin restore edilebilmesi için fazla madde kaybının gerçekleştirildiği geleneksel operatif yöntemlere kıyasla non invaziv bir yaklaşım olması, dokuları doğal yapısına ve işlevselliğine geri döndürmek için mineral depozisyonuna rehberlik etmede hayati rol oynayacağının düşünülmesi sebebiyle biyomimetik remineralizasyon amaçlı kullanılan dental materyallere yönelik ilgi giderek artmaktadır. Biyomimetik remineralizasyon ajanlarının kullanılmasındaki temel amaç mine ve dentin dokularının doğalı taklit eden formda yeniden oluşturarak işlevlerini geri kazandırmaktır. Dentin mineye göre daha az mineralize bir dokudur. Mine ağırlıkça %95-98 inorganik materyal içeren yüksek oranda kristalize bir yapıyken dentin, ağırlıkça yaklaşık %70 inorganik madde ve %20 organik maddeden oluşan mineralize kolajen dokudur (4). Dentinin organik yapısı nedeniyle remineralizasyonunun mineye oranla daha karmaşık olduğu bildirilmektedir (5) .

Son yıllarda, dentin dokusunun biyomimetik remineralizasyonunda kullanılan ajanlardan biri olan biyoaktif cam (BAG) materyallerinin diş hekimliğinde kullanımı gittikçe popüler hale gelmektedir. 1969 yılında Hench, Splinter, Allen ve Greenlee'nin sodyum oksit (Na_2O), kalsiyum oksit (CaO), di fosfor penta oksit (P_2O_5), silisyum dioksit (SiO_2) camlarının bazı bileşimlerinin kemik ile güçlü bir bağ oluşturduğunu keşfetmesi ile BAG'ların çeşitli kombinasyonlarının tıp alanında kullanılmaya başlandığı bildirilmektedir (6). BAG'ların kemik rejenasyonunda kullanımı çok gündemde olmakla birlikte remineralizasyon tedavileri, vital pulpa tedavileri ve dentin hassasiyetinin giderilmesinde de kullanılan biyomateryaller olduğu bilinmektedir (7). BAG

partiküllerinden salınan iyonların dentin yapısındaki kolajenler ile bağlanarak karbonatlanmış, kalsiyumdan fakir Hidroksiapatit (HA) yapıları oluşturduğu ve büyüme faktörü kodlayan genleri düzenleyip osteojenik hücreleri matriks salgılamaya teşvik ettiği belirtilmektedir (8). Yapılan çalışmalarda dentin remineralizasyonunda BAG etkinliği gösterilmektedir (9–11). Kemik ile bağ oluşturduğu tespit edilen ilk malzeme, orijinal BAG bileşimi, 45S5 Bioglass olarak bilinmektedir. İlk 45S5 olmayan kompozisyon ise S53P4'tür (6) .

Restorasyonların uzun ömürlü olabilmesi için remineralizasyon ve biyomimetik yaklaşımla ilgili çalışmalar son hızla devam ederken eş zamanlı olarak rezin ile dentin bağlantısının iyileştirilmesi üzerine de yoğunlaşılmaktadır. Günümüzde hasar görmüş dentin yapısını restore etmek için yaygın olarak rezin materyaller kullanılmaktadır. Rezinin dentin yüzeyine bağlanma mekanizmasının; demineralize dentindeki tübüller arası mikroporozitelerde açığa çıkan kolajenlere rezin monomerlerinin infiltre olmasıyla gerçekleştiği bilinmektedir (12). Adeziv sistem ile dentin kolajeni arasında kurulan bu mikro mekanik kilitlenme Hibrit Tabaka (HT) olarak adlandırılmaktadır. Rezin monomerlerinin demineralize dentine tamamen infiltre olmasının mümkün olmaması nedeniyle ise HT altında kalan ekspoze kolajen fibrillerinin korunmasız kaldığı bilinmektedir (13). Korunmasız kalan bu kolajen yapının rezin infiltre veya mineralize alanlara göre özellikle çiğneme kuvvetleri karşısında daha zayıf mekanik özellik gösterdiği bildirilmektedir (14). Ek olarak, rezinden fakir ve sudan zengin olan mikro çevrede bulunan kolajen fibriller adeziv prosedürlerdeki asidik ajanların etkisiyle aktive olabilecek Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi kolajenolitik enzimler tarafından bozulmaya karşı savunmasız hale gelmektedir (15).

Matriks metalloproteinazlar, çinko ve kalsiyuma bağımlılık gösteren, hücre dışı matriks komponentlerini parçalama yoluyla çeşitli biyolojik ve patolojik sürece katılan bir enzim ailesi olarak tanımlanmaktadır (16). MMP enzim ailesi kolajen ve bağ dokunun yapısında bulunmaktadır. Diş gelişimi sırasında mine ve dentin organik matriksinin oluşumunda rol almakla birlikte mineralizasyonu düzenlemektedir. MMP'ler demineralize dentinin organik matriksini hidrolize etme potansiyeline sahiptir. Bu enzim grubunda, MMP–2, MMP–8, MMP–9 ve MMP–20'nin normal dentin matriksinde bulunduğu, MMP–2 ve MMP–9 enzimlerinin ise intertubüler kolajen fibril ağında yer aldıkları bildirilmektedir. Dentin dokusunda, bu zamana kadar, MMP-2, MMP-9, MMP-

8, MMP-3 ve MMP-20 enzimlerine rastlandığı görülmektedir. MMP-2'nin dentindeki proteazlar içerisinde en çok bulunanı olduğu takibinde ise en çok MMP-9' a rastlanıldığı bildirilmektedir (17). MMP'lerin aktive olması sonucunda dentin ile rezin arayüzündeki kolajenlerin parçalanmaya başladığı ve bu tepkimenin sonucunda restorasyon ömrünün kısaldığı bilinmektedir (18) .

Günümüzde, klorheksidin (CHX) ajanının proteaz inhibitörü olarak HT'yi koruduğuna, MMP'lerin inhibisyonunu sağladığına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmalar, CHX'in %0,1-2'lik konsantrasyonlarının etkili olduğunu ortaya koymaktadır (19). Enzimlerin inhibe edilmesi kolajen matriksin güçlü tutulması için önemli bir yöntem olarak görülmektedir.

Biyoaktif cam 45S5 ile kombine edilen kompozit rezinin dentin remineralizasyonu sırasında ek bir kolajen koruması sağladığını ve dentin kesitlerinde daha düşük MMP aktivitesine neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (20,21). Fakat 45S5 ve S53P4 BAG'ların saf hallerinin ve bu materyallerin CHX ile kombinasyonlarının MMP'ler üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Buna ek olarak, BAG'ların CHX ile kombine edildiğinde dentin yüzey özelliklerine nasıl etki ettiği bilinmemektedir. Araştırmamız bu eksikliğin çözülmesini amaçlamaktadır. Araştırmamızdan elde edilecek olan sonuçlarla remineralizasyon tedavilerinin başarısının artması hedeflenmektedir. Sıfır hipotezi, 45S5 ve S53P4 BAG'ların saf hallerinin kullanımının MMP ekspresyonuna etki göstermeyeceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

Dişlerin öncelikli fonksiyonu besinlerin fiziksel olarak öğütülmesidir. Bundan dolayı, yüksek basınç kuvvetlerine, mekanik ve kimyasal abrazyona karşı direnç göstermek zorundadır (22). Bunun sağlanabilmesi için dişler mine, dentin, sement ve pulpa dokularının oluşturduğu çok katlı mimari bir yapıya sahiptir. Mine, dentin ve pulpayı koruyan, çiğneme için sert yüzey oluşturan dişin dış tabakasıdır. Mine tabakasının altında dişin büyük bir kısmını oluşturan ve diş yapısına destek sağlayan dentin tabakası bulunmaktadır. Dişin merkezinden köklerine doğru uzanan pulpa dokusu canlı odontoblast hücreleri, kan damarları ve bağ dokudan oluşmaktadır. Pulpa, dentin oluşumundan ve mineralize dokulara besin sağlamaktan sorumludur (23). Kök dentinini kaplayan ve dişin alveolar kemiğe bağlanmasını kolaylaştıran dokuya ise sement adı verilmektedir (24). Dişler, gingiva adı verilen, dişlere ve komşuluğundaki kemiğe koruma ve destek sağlayan yumuşak doku ile çevrili halde bulunmaktadır. Gingiva, diş kökünü alveolar kemiğe bağlayan özel bir bağ dokusu lifi olan Periodontal Ligament (PDL) için koruyucu bariyer görevi de görmektedir. PDL'nin en önemli fonksiyonlarından biri ise çiğneme ve diş teması sırasında şok emici görev görmesidir (25).

2.1. DENTİN YAPISI

Dentin, diş yapısının en hacimli bölümünü oluşturan, ektomezenşim kökenli mineralize bir bağ dokudur. Hacimce %40-45 oranda inorganik, %30 oranda organik, %25-30 oranda sudan oluşan; ağırlıkça ise %70 oranda karbonattan zengin apatit, %20 oranda organik bileşen ve %10 oranda sudan oluşan hibrit bir doku olarak tanımlanmaktadır. Dentin organik matriksinin %90'ı çoğunluğu tip I olan kolajenlerden, geri kalan %10'luk bölümü Proteoglikan (PG), Kolajen Dışı Protein (NCP) ve yağdan oluşmaktadır (26,27). Ağırlık olarak, mineden daha az mineralize olan bu dokunun kemik ve semente göre daha mineralize olduğu bilinmektedir (28). Dentinde, HA kristalleri 50 nm uzunluğunda, 20 nm genişliğinde ve 2-5 nm kalınlığındadır (29).

Odontoblastlar, diş gelişimi sırasında dentin yapımından sorumlu olan nöral krest kökenli hücrelerdir. Bu hücreler, dentin organik matriksini oluşturan kolajen, PG ve NCP sentezinde görev almaktadır (30). Odontoblastlar, primer dentini salgıladıktan sonra dişin yaşamı boyunca dentin yapımına devam etmektedir. Bu süreçte, odontoblast hücresinin sitoplazmik uzantısı dentin içinde kalarak dentin tübülünü oluşturmaktadır. Dentinin canlı bir doku olduğunun göstergelerinden biri de dentin tübüllerinde odontoblast uzantılarının

bulunuyor olmasıdır (31). Odontoblastlar, salgılama aktivitelerine ek olarak, savunma mekanizmalarında ve patojen invazyonuna karşı inflamatuar yanıtların stimülasyonunda rol oynamaktadır (32).

Dentin tübüler yapıdadır ve bu yapısı nedeniyle, dentin sıvısının dışarı doğru akışına ek olarak mikrobiyal bileşenlerin içe doğru hareketinin de gerçekleşebileceği, oldukça geçirgen özellik göstermektedir. Dentinin tübüler yapıda olması, bağlanma özelliğini, okluzal kuvvetlere karşı dayanıklılığını ve mekanik özelliklerini belirleyen temel faktördür (33). Mineye yakın bölgelerde ortalama 0,9 μm olan tübül çapları pulpaya yaklaştıkça 2,5 μm'ye kadar genişlemektedir. Bu tübüllerin pulpa etrafındaki yoğunluğu yaklaşık olarak 59.000-76.000 tüp/mm2 civarındadır ve mine dentin sınırına yaklaştıkça bu miktarın yarıya düştüğü bildirilmektedir (34). Dentin tübülleri, ana tübüllere ek olarak çeşitli dallanmalar sergilemektedir. Ana tübül yoğunluğunun az olduğu bölgelerde ise dallanma sayısı artmaktadır (35,36).

Dentin bir bütün olarak kabul edilse de yapısı incelendiğinde farklı işlevleri ve özellikleri olan farklı dentin tiplerinden oluştuğu görülmektedir. Oluşum aşamaları temel alınarak yapılan sınıflamaya göre dentin; mine dentin birleşimi, manto dentin, primer dentin, sekonder dentin ve tersiyer dentin olmak üzere beş farklı türe ayrılmaktadır. Pulpa dokusunu korumak için defansif dentin oluşumunu temsil eden tersiyer dentinin de kendi içinde reaksiyoner ve reperatif dentin olmak üzere ikiye ayrıldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, mineralize ekstraselüler dentin, intertübüler ve peritübüler dentin olarak ikiye ayrılmaktadır. Dentin hacminin büyük bir kısmını oluşturan intertübüler dentin, predentin mineralizasyonu ile oluşmaktadır. Peritübüler dentin ise dentin tübüllerinin duvarlarındaki mineralizasyon sonucu oluşmaktadır (33).

Mine dentin sınırı, mine ve dentini belirgin şekilde ayıran, 7 ila 15 mm genişliğinde, büyük miktarda mineral ve organik maddeden oluşan bir yapıdır (37). Mine dentin sınırının, iç aprizmatik mine ve sirkumpulpal dentin ile bazı benzerlikleri olan ancak yapısal olarak farklı olan manto dentinden oluşan bir kompleks olduğu belirtilmektedir (38). İnsan dişlerinde, mine dentin sınırının yüzeyi dalgalı veya taraklı yapıya sahiptir. Bu taraklı yapının, birleşim bölgesindeki mekanik kenetlenmeyi sağladığı düşünülmektedir (39). Buna ek olarak, organik bağlanma materyalleri ve dentinden mineye uzanan mineralizasyon kristalleri mine dentin sınırındaki mekanik bağlanmayı etkileyen iki önemli faktör olarak görülmektedir (40).

Manto dentin, 5-30 μm kalınlığında bir tabakadır. Bu tabakanın en belirgin özelliği, tipik olarak tip III ve daha az oranda da tip I kolajen içeren Von Korff fibrillerinden oluşmasıdır (41). Bu tabakada dentin tübülleri görülmemekte, yalnızca tübüler dallanmalara rastlanmaktadır (36). Manto dentinin, dişlerin elastik özelliklerinin kazandırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu özellik, dişlerin yüksek okluzal kuvvetlere dayanmasını sağlamaktadır (33).

Sirkumpulpal dentin primer, sekonder ve tersiyer dentinden oluşmaktadır. Diş gelişimi sırasında hızla oluşan, dişe şeklini veren ve dentinin büyük bir kısmını oluşturan yapı primer dentindir (42). Primer dentin oluşup kök gelişimi tamamlandıktan sonra, dentin oluşumu sekonder dentin olarak devam etmekte ve bu süreç primer dentin oluşumuna kıyasla çok daha yavaş gerçekleşmektedir (43). Sekonder dentin, dentin tübüllerinin eğim farkı, düzensiz dentin birikimi ve tübül yapısı gibi minör farklılıklarla primer dentinden ayrılmaktadır (44). Tersiyer dentin oluşumu ise genellikle çürük veya mekanik yaralanma gibi irritanlara yanıt olarak, pulpanın canlılığını korumak amacıyla meydana gelmektedir. Uyaranın süresi ve yoğunluğuna bağlı olarak, tersiyer dentinin yapı ve düzeninde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Tersiyer dentin, primer odontoblastlar tarafından oluşturulan reaksiyoner dentin ve yeni farklılaşmış odontoblastlar tarafından oluşturulan reparatif dentin olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (45,46).

2.2. DENTİN ÇÜRÜĞÜ

Diş çürüğü, asitlerin dişlerin mineral yapısını çözmesi sonucu oluşan infeksiyöz bulaşıcı bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (47). Bu sürece dahil olan bakteriler, Streptococcus Mutans, Streptococcus Sobrinus ve Lactobacilli'dir. Dental plakta bulunan bu bakterilerin hepsi asidojeniktir; yani, fermante edilebilir karbonhidratları metabolize ederek asit oluşturmaktadırlar (48,49). Mutanslar, çürüklerle en çok ilişkilendirilen bakteri türüdür çünkü oldukça asidüriktir, yüksek sükroz diyetiyle beslenmekte ve daha fazla bakteri adhezyonunu sağlayan glukanı üretmektedir. Diş çürüğünün başlamasının ve ilerlemesinin mevcut mikroorganizmaların türüyle birlikte miktarına da bağlı olduğu bilinmektedir (50).

Diş çürüğünün erken aşamalarında görülen beyaz nokta lezyonları geri dönüşümlü olma özelliğini taşımaktadır (47). Eğer bu süreç tersine çevrilmez ve mineral kazanımı sağlanamazsa, çürük lezyonu ilerleyerek dişte kavitasyon oluşumuna yol

açmaktadır (51). Diş çürüğünün oluşması için, uygun diş yüzeyi, bakteriler, fermente edilebilir karbonhidratlar ve zaman olmak üzere 4 ana bileşen gereklidir. Çürük oluşumunda, zayıf oral hijyen, sağlık sigortası gibi kişisel ve davranışsal faktörler ile florür kullanımı ve tükürük yapısı gibi oral çevresel faktörler de etkili olmaktadır (52).

Mine parçalanması pH değeri 5,5'e düştüğünde, dentin parçalanması ise pH değeri 6,4'e düştüğünde meydana gelmekte ve mevcut florapatit (FA) seviyesine bağlı olarak değişmektedir. Fakat, mine ve dentinin çözündüğü kritik pH'ın esasında sabit bir değer olmadığı, tükürük ve plak sıvısındaki kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonlarıyla ters orantılı olarak değişen aralıklı bir değer olduğu bildirilmektedir (53). Çürük lezyonları minede başlayıp dentine ilerleyebilmekte veya ekspoze dentinde başlayabilmektedir (54). Mine çürüğünün başlangıcında belirli bakterilerin sayıca fazla olduğu, ancak dentin seviyesinde daha çok proteolitik bakterilerin bulunduğu bilinmektedir. Lactobacillus, Prevotella ve Streptococcus'un daha derin dentin çürük lezyonlarında sayıca arttığı, Neisseria, Capnocytophaga ve Fusobacterium'un ise sayıca önemli ölçüde azaldığı bildirilmektedir (50). Dentinin mineye kıyasla daha poröz bir yapıya sahip olması, bakterilerin ve onların enzimlerinin dokuya daha hızlı nüfuz etmesine neden olmaktadır (55).

Dentindeki çürük lezyonu, dış, iç ve sağlam dentin olmak üzere üç katmanlı bir yapı olarak görülmektedir. Dentin çürüğünün dış tabakası enfekte dentin olarak adlandırılmaktadır. Kolajen denaturasyonu görülen bu tabakada, kolajen fibrilleri ile odontoblast uzantılarının geri dönüşümsüz hasar almasından dolayı remineralizasyon gözlemlenmemektedir (56–58). Bakterilerle yoğun şekilde enfekte olmuş yumuşak dentin ile ilişkili olan bu bölge, nekrotik veya kontamine bölge olarak tanımlanmaktadır (59,60). Klinik olarak incelendiğinde, yumuşak sarı renkte ve keskin el aletleriyle rahatça çıkartılabilen bir tabaka görülmektedir (61). Dişin restorasyonundan önce bu tabakanın kesinlikle temizlenmesi gerekmektedir (31).

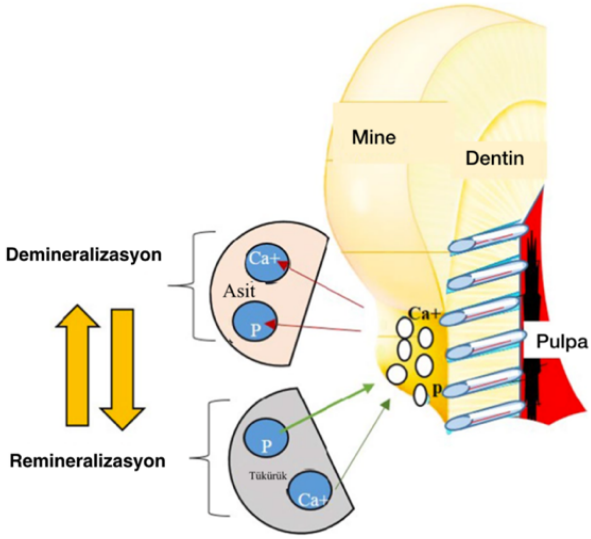
İç çürük dentin, bakteriyel penetrasyon tabakası ve saydam tabakadan oluşmaktadır. Bakteriyel penetrasyon zonu, odontoblastik uzantıların tahrip olmasıyla karakterizedir. Bu durum, dentin tübüllerinin bakterilerin istila edebileceği şekilde boş kalmasına neden olmaktadır. Bakteri istilası sonucu tübül biçimlerinde genişleme ve bozulma gözlemlenmektedir. Bu tabaka remineralize olamayacağı için enfekte dentin tabakası gibi kaldırılması gerekmektedir (31,62).

Pulpa-dentin kompleksinin en yaygın savunma mekanizmalarından biri, dentin tübülleri içerisinde mineral birikimi olmasıdır (63). Bu durum tübüler skleroz veya saydam tabaka olarak adlandırılmaktadır. Saydam tabaka olarak adlandırılmasının nedeni, mikroskop altında incelendiğinde dokunun azalan ışık saçılımı nedeniyle histolojik olarak yarı saydam bir görünüm göstermesidir. Bu tabaka demineralizasyon bölgesi olmasına ragmen kolajen iskelet sağlam kaldığı için remineralize olacağı bildirilmektedir (59,60). Subtransparan dentin tabakası, bakteri içermeyen ve intertübüler dentinde demineralizasyonun meydana geldiği tabakadır (60). Bu tabaka da remineralize olma özelliği göstermektedir (64).

2.3. MİNERALİZASYON DİNAMİKLERİ

Diş, inorganik fazın ana bileşeni olan HA, vücudumuzdaki en sert mineralize dokulardan biridir. HA, temel olarak kalsiyum ve fosfat iyonundan oluşan hekzagonal kristal bir yapı sergilemektedir. Bu mineral faz, dişin sertliğini ve stabilitesini sağlamakta kritik bir öneme sahiptir (65). Apatit yapısında bulunan kalsiyum ile potasyum, sodium, magnezyum ve stronsiyum gibi katyonlar yer değiştirebilirken, hidroksit grubu flor veya klor iyonları ile yer değiştirebilmektedir. Bu iyon değişimlerinin apatit özelliklerini önemli ölçüde etkilediği bildirilmektedir. Örneğin; apatit yapısına eklenen karbonat çözünürlüğü artırırken, florür eklenmesi çözünürlüğü azaltmaktadır (44).

Oral kavitede dişler, sürekli pH dalgalanmalarına maruz kalmaktadır. Bu dalgalanmalarda, kalsiyum ve fosfat gibi iyonların diş yüzeyinden kaybedildiği demineralizasyon süreci ile bu iyonların tekrar kazanıldığı remineralizasyon süreci birbirini takip etmektedir (Şekil 2.1). Normal pH seviyesinde, dişleri besin asitlerinden ve ağızda bulunan bakteriler tarafından üretilen laktik ve asetik asit gibi asitlerden korumak için tükürüğün Kalsiyum ve fosfat iyonları ile doygun halde olması gerekmektedir. Bu asitler, oral kavitede pH seviyesini 4,5-5,5 seviyelerine düşürmektedir. Bu durumda, pH seviyesi normale dönene kadar apatit kristallerinde çözünme meydana gelmektedir (66). Demineralize olan HA kristalleri, koşullar dengelendiğinde yeniden oluşabilmektedir (67). Demineralizasyon ve remineralizasyon süreçleri arasındaki dengenin bozulması çürük oluşumuna neden olmaktadır.



Şekil 2.1: Demineralizasyon ve remineralizasyon süreçleri

Çürük gelişimi, daha fazla karyojenik bakterinin mikrobiyal kompozisyona hakim olduğu yerleşik mikrofloradaki dengesizliğin bir sonucu olarak tanımlanmaktadır. Ağız içindeki pH'ın kritik seviyenin altına düşmesi sonucu diş sert dokularından kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların kaybedildiği süreç demineralizasyon olarak adlandırılmaktadır (68). HA kristallerinin çözünmesi, diyet değişiklikleri ve tükürük akışındaki azalmalar gibi biyofilm pH'ını düşüren faktörlerden etkilenmektedir (69).

Mine demineralizasyonu genellikle diş yüzeyindeki bakteri ile şeker arasındaki etkileşime bağlı olarak görülmektedir. Glukoz, sukroz ve fruktoz gibi fermente olabilen karbonhidratların bakteriler tarafından parçalanması demineralizasyona ve çürük lezyonlarının gelişmesine yol açan asidik bir ortamın oluşmasına yol açmaktadır (70). Aynı zamanda düşük pH ortamının oluşması, demineralizasyonu teşvik eden ve lezyonların gelişimini hızlandıran mutans bakterilerin çoğalmasını desteklemektedir. Şeker fermantasyonu yoluyla yüksek miktarda laktik asit üretme yetenekleri ve düşük pH koşullarına karşı gösterdikleri direnç sebebiyle *S. mutans, S. sobrinus* ve laktobasiller birincil karyojenik patojenler olarak kabul edilmektedir (71,72). Demineralizasyona yol açan pH düşüşü yalnızca beslenmeye bağlı bakteriyel aktivite tarafından tetiklenmemektedir. Astım inhalerleri gibi bazı ilaçlar tükürük pH'ını düşürebilmektedir (73). Ek olarak, bazı ilaçlar tükürük akışını önemli derecede değiştirerek tükürüğün tamponlama kapasitesini düşürebilmektedir (74). Gastroözofageal reflü ve bulimia

nervoza gibi bazı hastalıklarda da, pH değeri yaklaşık 1,2 olan mide asidi oral kaviteye ulaşarak hızlı bir demineralizasyona yol açmaktadır (75,76).

Öncelikle interprizmatik alanda meydana gelen mineral kaybı sonra mine prizmalarına doğru ilerlemektedir (77). Bu süreç, başlangıçta mine yüzeyinin alttaki tabakadan daha az etkilendiği için beyaz nokta lezyonu ile sonuçlanmaktadır (78). Demineralize mine lezyonlarının kontrolsüz ilerlemesi genellikle çürük oluşumuna yol açmakta ve bu ilerleme sonucu lezyon dentine ulaşmaktadır. Lezyon, etkilenen mineral faz, açığa çıkan ve bozulan kolajen fibriller nedeniyle dentinde çok daha hızlı ilerlemektedir. Dentin apatitinin daha geniş yüzey alanına sahip olması, asit maruziyetinde onu çözünmeye daha duyarlı hale getirmektedir (79). Bu duyarlılık, dentinin yüksek karbonat içeren mineral içeriği nedeniyle daha da artmaktadır. Sonuç olarak, dentin mineye oranla daha az mineralize bir doku olduğu için minerallerinin çözünmesi daha hızlı gerçekleşmektedir (80).

2.3.2. Remineralizasyon

Dişin demineralize olmuş sert dokularına dışarıdan temin edilen kalsiyum ve fosfat çökelmesi remineralizasyon olarak adlandırılmaktadır (67). Başlangıç mine lezyonları için en iyi klinik yaklaşım demineralizasyonun erken tespit edilmesi ve önlenmesidir. Remineralizasyonun birçok yöntemi bulunmaktadır. Kalsiyum ve fosfat iyonlarından zengin bir tükürük, tampon görevi görmesiyle demineralizasyon remineralizasyon döngüsü remineralizasyon lehine döndürmede yardımcı olabilmektedir (81,82).

Remineralizasyon tedavilerinde yaygın olarak kullanılan ajanlardan biri de florürdür. Florürün antikaryojenik olduğu ve FA oluşumu yoluyla mine ve dentinin çözünürlüğünü azaltarak mineral çözünmesi için gerekli olan kritik pH değerini 4,5 pH'a düşürdüğü bildirilmektedir (83–85) . Fakat florür konsantrasyonları uygulandığı dış tabakanın 10-20 µm ötesinde önemli ölçüde azalma göstermektedir. Azalan florür konsatrasyonunun, HA'nın çözünürlüğünde önemli bir azalma oluşturabilecek seviyelerin oldukça altında olduğu görülmektedir (86). Bununla birlikte, florür topikal olarak uygulandığında kalsiyum ile birleşerek bir rezervuar görevi gören kalsiyum florür depoziti oluşturmaktadır. Flor salınımı, pH seviyesindeki düşüşle kolayca tetiklenmektedir. Bu durumda, demineralizasyon süreci engellenirken remineralizasyon süreci desteklenmektedir (87). Kazein Fosfopeptid-Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP),

minerallerin sert diş dokusuna çökelmesini teşvik eden başka bir sistemdir (88). Bu sistemde, Amorf Kalsiyum Fosfatın (ACP) plağa ve diş yüzeylerine entegre olmakta ve karyojenik olmayan plak oluşmaktadır (89–91). Plak içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun plağın florürü uzun süre tutma kabiliyeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle günümüzde piyasada bulunan birçok üründe hem florür hem de CPP-ACP veya başka bir kalsiyum fosfat formu bulunmaktadır (92–94).

2.3.3. Dentin Biyomineralizasyonu

Dentin remineralizasyonunda, mevcut mikro yapının yeniden düzenlenmesi, açık dentin tübüllerinin tıkanması ve intrafibriller bölgede HA oluşumuyla birlikte kolajen matriksin remineralize olması hedeflenmektedir (95). Geleneksel remineralizasyon yöntemlerinde, klasik iyon aracılı kristalizasyon teorisine dayanarak kolajen yüzeyine kalsiyum ve fosfat çökelmesine odaklanılmaktadır (96–98). Minerallerin mevcut artık kristallerin üzerine biriktiği kısmen demineralize dentin remineralizasyonu top-down (yukarıdan aşağı) yaklaşım olarak adlandırılmaktadır (99).Fakat dentinde organik kolajen tip I ile inorganik apatit birbirleriyle belirli bir uzamsal ilişki içinde görülmektedir. Bu durum, yalnızca mineral çökelmesinin dentini remineralize etmek için yeterli olmadığının göstergesidir. Dentinde tam olarak remineralizasyonun sağlanabilmesi için kolajen matriks yapının da restore edilmesi gerekmektedir. Dentinin biyomimetik remineralizasyonu (biyoremineralizasyon) ile, dentin çürüklerinde hasarlanan kolajen matriksin remineralize edilemeyeceği yönündeki geleneksel düşüncenin kırılacağı düşünülmektedir (100).

Biyomineralizasyon, çeşitli inorganik ve organik substratların yüzeylerinde HAP'ın kontrollü olarak çekirdeklenmesini ve büyümesini içeren, doğal mineralizasyon sürecini taklit eden karmaşık bir süreçtir (100–102). Bu remineralizasyon süreci, bottom-up (aşağıdan yukarı) yaklaşım olarak adlandırılmaktadır (99). Tip I kolajen, kristallerin büyümesini ve tercih edilen yönde birikmesini yönlendirerek mineralizasyon için bir şablon görevi görmektedir (103). Remineralizasyonun gerçekleşmesi için yapı iskelesi görevi gören kolajen lifler ile birlikte büyüme merkezi görevi görecek mineral kristali mevcut olmalıdır. Dentin tamamen demineralize olmuş ise yeni çekirdeklenme alanının oluşması gerekmektedir. Bunlara ek olarak, ortamda kalsiyum ve fosfat içeren mineral kaynağının bulunması gerekmektedir (104).

İntrafibriler mineralizasyondentinin mekanik özelliklerini nano düzeyde belirlemektedir (105). Biyomimetik materyaller, dentinin intrafibriler mineralizasyonunu indüklemede önemli rol oynamaktadır. Biyomineralizasyon sırasında mineral oluşumu ve prekürsör stabilizasyonunun düzenlenmesinde yakından rol oynayan NCP'leri taklit etmek için çaba sarf edilmektedir çünkü dentin organik matriksinin %10'undan daha azını oluşturmalarına rağmen, NCP'ler kolajen fibrillerin intrafibriller mineralizasyonunu aktif olarak teşvik etmekte ve düzenlemektedir (106). NCP'lerde bulunan karboksilik asit ve fosfat fonksiyonel grupları, mineral çekirdeklenmesinde ve sonrasında kristalleşme sürecinde önemli rol oynamaktadır (98).

Günümüzde, dentin remineralizasyonunu teşvik etmek için NCP analogları ve çeşitli biyokatif materyaller kullanılmaktadır. Bu materyaller, kimyasal sentez yoluyla üretildikleri için biyouyumluluklarının titiz bir şekilde incelenmesi gerekmektedir (107). Bu materyallerin, hem intrafibriler hem de ekstrafibriler mineralizasyonu gerçekleştirilmesi istenmektedir. Dentinin mekanik özellikleri ve bozunma direnci esas olarak mineralizasyon derecesine bağlı olduğu için doğal dentin ile benzer yapılara sahip remineralize dentin oluşumu istenmektedir (108,109). Remineralizasyon sürecinin oral koşullarda hızlı gerçekleşmesi hedeflenmektedir (110).

2.4. BİYOMİMETİK DENTİN REMİNERALİZASYONUNDA KULLANILAN AJANLAR

2.4.1. Biyoaktif Camlar

Larry. L. Hench'in amputasyon vakalarında sıkça karşılaşılan inert metal ve plastik malzemelerle ilişkili konakçı reddi sorunlarını fark ettikten sonra insan vücuduna uygun bir greft malzemesi yaratmayı amaçladığı ve BAG partiküllerini rapor ettiği bildirilmektedir (111). Hench ve çalışma arkadaşlarının 1969'dan 1971'e kadar SiO_2, Na_2O, CaO, P_2O_5 oksit sistemine dayalı farklı cam formülasyonları tasarlayıp inceledikleri bildirilmektedir. Değerlendirmeler sonucunda, yüksek miktarda Na_2O and CaO ile karakterize, ağırlıkça %45 SiO_2, %24.5 Na_2O, %24.5 CaO, %6 P_2O_5 olan cam bileşiminini ve malzemenin yüzeyini fizyolojik ortamda çok reaktif hale getiren yüksek CaO/P_2O_5 oranını seçtikleri rapor edilmektedir (112).

Biyoaktif cam, hasarlı dokuları, özellikle de sert dokuları onarabilen ve yeniden inşa edebilen biyoaktif malzeme olarak tanımlanmaktadır (113). Doğal biyoaktivitesi sayesinde kemikle güçlü bir bağ oluşturan, aynı zamanda biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu bir malzemedir. Birçok çalışmada, Simüle Edilmiş Vücut Sıvısı (SBF) ile temas ettiğinde BAG yüzeyinde bir HA tabakasının oluşması nedeniyle kemik bağlanmasının meydana geldiğini gösterilmektedir (114–116). Osteogenezin, BAG'dan salınan iyonlar tarafından indüklendiği bildirilmektedir. Bu iyonlar, büyüme faktörlerinin üretimi ile hücre çoğalmasını uyarabilmekte ve osteoblastlarda kemik rejerenasyonu ile ilgili gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (117). Bu nedenle, tıp ve diş hekimliği alanlarında devrim yaratan bir materyal olarak görülmektedir. Orijinal formu 45S5 olarak adlandırılan bu bileşim, Bioglass® ticari adıyla marka haline gelerek 1984 yılında monolitik kulak protezi olarak kliniklere girmiştir (118). Günümüzde, çeşitli diş hekimliği ve tıp uygulamalarında, özellikle sert dokuların rejenerasyonunda kullanımına devam edilmektedir (111).

Kemik ve diş yapısına olan bileşimsel benzerliği, sahip olduğu biyoaktivite ve gösterdiği belirgin antimikrobiyal özellikler BAG'ları diş hekimliği klinik uygulamalarında araştırma konusu haline getirmektedir. BAG'ların ilk olarak dentoalveolar ve maksillofasiyal rekonstrüksiyon, periodontal rejenerasyon ve implantlarda kemik ikamesi olarak kullanıldığı bildirilmektedir (119–121). Son yirmi yılda, dental adezivler, remineralizasyon tedavileri, dentin hassasiyeti, air abrazyon, restoratif materyaller, pulpa kapaklanması ve kök kanal tedavileri, kemik rejenerasyonu, periodontal hastalıklar, implant tedavileri ve maksillofasiyal cerrahiler gibi çeşitli uygulama alanlarında BAG kullanımı rapor edilmektedir (7). BAG uygulamasının dentinde gelişmiş apatit oluşumuna yol açtığı bildirilmektedir. Apatit oluşumunda partikül boyutu önem taşımaktadır. Nano partiküllerin daha hızlı apatit oluşum kinetiğine sahip olduğu bildirilmektedir. Apatit oluşumunun yanı sıra yeni mineral faz oluşumunun da göz önünde bulundurulması gerektiği, bu nedenle mineralize dentinin mekanik özelliklerini incelemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (122).

2.4.1.1. Biyoaktif camların bileşimi: Biyoaktif camların mekanik, fiziksel, termal ve kimyasal özellikleri bileşimlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Gıda

ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay alan ve Bioglass® olarak adlandırılan temel bileşimde çeşitli değişiklikler yapılarak farklı varyasyonların geliştirildiği bildirilmektedir. Bu varyasyonlar tablo 2.1'de gösterilmektedir (123).

Tablo 2.1: Biyoaktif cam bileşimindeki varyasyonlar

45S5	S53P4	58S	70S30C	13-93
45 wt% SiO_2	53 wt% SiO_2	58 wt% SiO_2	70 wt% SiO_2	53 wt% SiO_2
24.5 wt% CaO	20 wt% CaO	24.5 wt% CaO	30 wt% CaO	20 wt% CaO
24.5 wt% Na_2O	23 wt% Na_2O	24.5 wt% Na_2O	-	6 wt% Na_2O
6 wt% P_2O_5	4 wt% P_2O_5	6 wt% P_2O_5	-	4 wt% P_2O_5
-	-	-	-	12 wt% K_2O
-	-	-	-	5 wt% MgO

Biyoaktif camlar kimyasal bileşimlerine göre farklı biyouyumluluk davranışı sergilemektedir. Kompozisyon aralığı ağırlıkça %6 P_2O_5 sabit tutularak; %35-60 mol SiO_2, %10-50 mol, %5-40 mol Na_2O aralığında olduğunda, materyal biyoaktif özellik göstermekte ve kemiğe bağlanmaktadır. Bazı formülasyonları yumuşak dokuyla da bağlanma göstermektedir. SiO_2 %35 mol altına düştüğünde materyal biyoaktif özelliğini yitirmektedir. SiO_2 %50 mol üzerinde, CaO %10 mol altında ve Na_2O %35 mol altında olduğunda materyal biyoaktif özellik göstermekte fakat 10 ila 30 gün içerisinde rezorbe olmaktadır. SiO_2 değerinin ağrılıkça %65 mol üzerine çıkması teknik olarak mümkün bulunmamaktadır (124). Özetle, minerallerin oranları değiştirildiğinde, BAG özellikleri değişmektedir. Bu durum sayesinde BAG'lar vücudun farklı bölgelerinde kullanımına uygun hale gelmektedir. Bileşen oranlarının değişmesi BAG'ın biyoinert, biyorezorbe edilebilir veya biyorejeneratif olarak değişmesini sağlamaktadır (125).

Larry. L. Hench, Na2O- CaO- SiO2 faz diyagramına dayanarak A ve B olmak üzere iki farklı biyoaktivite sınıfı tanımlamaktadır. A sınıfı osteokondüktif ve osteoprodüktiftir. A sınıfı, hem yumuşak dokulara hem de kemiğe bağlanmaktadır. Birkaç saat içinde HA tabakasının oluştuğu gözlemlenmektedir. B sınıfı yalnızca osteokondüktiftir. Yumuşak dokulara bağlanmamakta ve kemiğe yavaş bağlanma göstermektedir. HA tabakasının oluşması bir ila birkaç gün sürmektedir (126).

2.4.1.2. Biyoaktif cam 45S5: 45S5, biyomedikal uygulamalarda en sık kullanılan BAG türüdür. 45S5'in işitme kaybını düzeltmek için kulak kanalına implante edilebilir bir monolit olarak FDA onayı aldığı 1985 yılından beri klinik olarak kullanılmaktadır (127). 1990'ların başında, 45S5 partiküllerinin çene ve diş defektlerinde kullanımının FDA tarafından onaylandığı bildirilmektedir (128). 45S5 BAG, dentin aşırı duyarlılığını tedavi etmek için bazı diş macunlarında aktif bileşen olarak da kullanılmaktadır (129). Dental uygulamalar için kullanılan 45S5 içerikli ticari ürünler arasında PerioGlass (NovaBone Osteobiologics, ABD) ve NovaMin (NovaMin Technology, ABD) bulunmaktadır (130). NovaMin, dentin hassasiyetinin tedavisi için diş macununda kullanılan ilk BAG olarak bilinmektedir. Klinik çalışmalar, 45S5'in dentin tübüllerini tıkayan bir HA tabakasının oluşumunu indükleyerek remineralizasyona katkı sağladığını ve ağrının daha uzun süre giderilmesine yardımcı olduğunu bildirmektedir (8,131) .

2.4.1.3. Biyoaktif cam S53P4: S53P4, 45S5 ile benzer bileşimlere sahiptir. S53P4'ün 2008 yılında FDA onayı aldığı bildirilmektedir (132). Günümüzde S53P4, Bonalive® olarak partikül halinde veya önceden hazırlanmış bir macun olarak pazarlanmaktadır. S53P4'ün fizyolojik ortamda dentin ve tübül mineralizasyonunu destekleyecek klinik bir ürün haline getirilebileceği düşünülmektedir (133). BAG'lardan özellikle S53P4'ün, herhangi bir direnç göstermeden geniş spektrumlu antimikrobiyal özellik gösterdiği bildirilmektedir (134). S53P4'ün 17 anaerobik ve 29 aerobik bakteriye karşı antibakteriyel özellik göstermektedir (135,136).

2.4.1.4. Hidroksiapatit oluşum mekanizması: Larry L. Hench, BAG partiküllerinin dentin ile temas ettiğinde yüzeye yapıştığını, hızlı bir şekilde karbonatlanmış HA tabakası oluşturduğunu ve tübülleri tıkadığını belirtmektedir (137). Süreç, hızla meydana gelen bir dizi reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Tükürükteki hidrojen iyonları, BAG'ın silikat matriksi içinde hapsolmuş sodyum ve kalsiyum iyonlarıyla hızlaca yer değiştirerek cam yüzeyinde silanol gruplarını (Si- OH) oluşturmaktadır. İyon değişimiyle birlikte, matriksden fosfat kaybı gözlemlenmektedir. Camın bileşimine bağlı olarak hidroksil iyonu sayısı artarak solüsyonun pH'ında artışa neden olmaktadır. Katyonların kaybı, silika açısından zengin bir iyon tükenme bölgesi oluşturmaktadır. Çözeltide bulunan hidroksit iyonları, silika matriksinin silikon oksijen bağlarına saldırarak çözünmeye ve $Si(OH)_4$ oluşumuyla mikropartikülün kısmen

kaybolmasına neden olmaktadır. Bu bağ kopması, kalan mikro partikülün yüzeyinde silanol gruplarının oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Cam partikülünün yüzeyinde yeni oluşan silanol grupları kondenzasyon reaksiyonlarına uğrayarak, cam partikülü üzerindeki silika bakımından zengin dış tabakanın yeniden polimerleşmesine neden olmaktadır. Kalsiyum ve fosfat mikropartikülün dış yüzeyine daha fazla göç etmesiyle silanol bakımından zengin bölgelerde CaO- P_2O_5 bileşimine sahip bir ACP filmi oluşturmaktadır. Bu ACP tabakası ağız ortamından gelen hidroksil, hidrojen fosfat ve karbonat iyonlarının katılımıyla kristalleşerek kristalin HCA meydana getirmektedir. Zamanla bu HCA tabakası kısmen HA'ya dönüşmekte, dentin ve minede var olan apatit yapısına bağlanabilmektedir (8,138). BAG'dan HA oluşumu ise günler süren bir zaman diliminde gerçekleşmektedir. İlk HCA tabakasının oluşumu ise çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu tabakanın biyocam parçacıklarının kemiklere ve dişlere bağlanmasına neden olan etken olduğu varsayılmaktadır (112).

2.4.1.5. Biyoaktif camların hazırlanması: Cam oluşturmanın geleneksel yöntemi, yüksek viskoziteli erimiş bir sıvının erime noktasının altındaki bir sıcaklığa hızla soğutulmasını içermektedir. Bu süreç, kristalleşme meydana gelmeden cam olarak bilinen viskoelastik katı bir halin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Erimiş sıvı soğudukça, atomik düzenlemesi kademeli değişikliklere uğramaktadır. Bu süreç sonunda; periyodik, uzun menzilli düzenli bir atomik yapıya sahip kristal ya da rastgele, kısa menzilli düzenli bir atomik yapıya sahip cam oluşumu gözlemlenmektedir. Bioglass®45S5 de dahil olmak üzere geleneksel olarak camların üretiminin eriyik söndürme işlemi ile gerçekleştirildiği bildirilmektedir (139). Eriyik söndürme yönteminde, daha yüksek sinterleme sıcaklıklarında biyoaktivitenin azalması ve gözenekli iskelelerin oluşturulamaması gibi dezavantajlar bildirilmektedir (140). 1970'lerin başında cam sentezine alternatif yaklaşım olarak ortaya çıkan sol-jel tekniği ile çeşitli cam bileşimlerinin oluşturulduğu bildirilmektedir. "Sol-jel" terimi, "solution" (çözelti) ve "gelation" (jelleştirme) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmakta ve çözelti hazırlama ile jelleştirme yöntemini ifade etmektedir. Bu teknikte, hidroliz ve yoğuşma reaksiyonları gibi çeşitli işlemlere tabi tutulan öncüller, düşük sıcaklıkta ısıl işleme tabi tutulmaktadır. Sol-jel camlar, eritilerek söndürülmüş camlara kıyasla üstün gözeneklilik, apatit oluşturma kapasitesi ve artan yüzey alanı sergilemektedir (141).

2.4.2. Kazein Fosfopeptid- Amorf Kalsiyum Fosfat

Kazein fosfopeptid- amorf kalsiyum fosfat, kazein proteininden elde edilen bir süt ürünü olan kazein fosfopeptid (CPP) ve HA'nın biyolojik oluşumunda öncü olarak rol oynayan ACP ile formüle edilen biyoaktif bir komplekstir. CPP-ACP'nin mine demineralizasyonunu önlemeyle birlikte mine ve dentin remineralizasyonunu artırma konusunda önemli bir potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir (142). CPP-ACP diş macunları, şekersiz sakızlar, ağız gargaraları ve biyomateryaller (kompozit rezin, cam iyonomer vb.) gibi birçok dental materyalin içerisinde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu materyallerin HA çökelmesi ve doku onarımında etkili olduğunu göstermektedir (143–145). CPP-ACP etki mekanizması, CPP'nin yüksek konsantrasyonlarda kalsiyum ve fosfor iyonlarını koruma ve bu iyonları spontane kristalleşmeden koruyarak ACP formunda stabilize etme yeteneğine dayanmaktadır. Bununla birlikte, CPP- ACP nano-kompleksi kalsiyum, fosfat ve hidroksit iyonlarını diş yüzeyinde lokalize etmekte ve plak sıvısında süpersaturasyon sağlamaktadır (146). CPP-ACP'nin florür ile kombine olarak kullanıldığı durumlarda, çürük ve eroziv lezyonların remineralizasyonuna etkisinin arttığı bildirilmektedir (147).

2.4.3. Florür Bileşikleri

Florür iyonlarının varlığında, HA yerine asit ataklarına daha dirençli olan FA kristalleri oluşmaktadır. Plak sıvısında diş yüzeyi ile temas halinde olan florürün HA kristallerini çözünmeye karşı koruduğu, kalsiyum ve fosfor iyonlarına yapışarak remineralizasyonu teşvik ettiği belirtilmektedir. Günümüzde florür, diş macunlarıyla ve proflaktik vernik olarak doğrudan diş yüzeyine uygulanabilir formda bulunmaktadır. Florür bileşiklerinin doğrudan diş yüzeyine uygulanması, materyalin ağız içinde daha uzun süre kalmasına ve florür rezervuarı oluşturarak tükürüğe yavaşça salınmasına olanak sağlamaktadır. Yakın zamanda, biyomimetik etki mekanizmasına sahip fosfat ve silika ile birlikte florür içeren bir diş macunu olan REFIX teknolojisi tanıtılmıştır. Bu kombinasyon, HA'nın derinlerine işleyen ve dentin tübüllerini tıkayan florlanmış bir apatit ve silikonla zenginleştirilmiş bir tabaka oluşumunu desteklemektedir (148). Diğer ticari 1450 ppm florür içeren diş macunları ile kıyaslandığı bir çalışmada, REFIX içeren diş macununun yüzey altı çürük lezyonlarını etkili şekilde remineralize edebileceği bildirilmektedir (149). Ayrıca, REFIX içeren diş macununun mineral tabakası biriktirerek dentin dokusunu etkili bir şekilde remineralize edebileceği düşünülmektedir (150).

2.4.4. Çinko Oksit İçeren Materyaller

Çinko, demineralize olmuş dentinin onarım kapasitesini artıran biyoaktif bir element olarak kabul edilmektedir. eklenmektedir. Çinko, protein fosforilasyonunu uyarmaktadır. Bununla birlikte, kalsiyum birikimini artırmakta ve kristallerin çökelmesiyle dentin tübüllerinin tıkanmasını kolaylaştırmaktadır (151). Çinko oksit içeren materyaller, MMP'lerin aracılık ettiği kolajen bozulmasını azaltmakta ve dentin remineralizasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır (152).

2.4.5. Kolajen Dışı Protein Anologları

2.4.5.1. Polidopamin: Polidopamin (PDA), dopaminin sulu çözeltilerde okside ve polimerize olması sonucunda oluşan yarı iletken polimerdir (153). Islak ortamlarda, farklı substratlara etkili şekilde bağlanabildiği için biyolojik tutkal olarak adlandırılmaktadır (154). Midye proteininden esinlenerek üretimi yapılan PDA, kalsiyum iyonlarına bağlanmakta ve çekirdeklenme bölgesi görevi görmektedir. Böylece HAP oluşumu hızlanmakta ve dentin tübülleri tıkanmaktadır (155). PDA'nın mine ve dentin remineralizasyonunu etkili bir şekilde desteklediği bildirilmektedir (156).

2.4.5.2. Polielektrolitler: Polielektrolitler, sulu çözeltilerde ayrışarak yüklü hale gelen iyonik grupları içeren makromoleküllerden oluşan polimerler olarak tanımlanmaktadır (157). Polivinil Fosfonik Asit (PVPA), diş hekimliğinde kullanılan polielektrolitlerden biridir. Rezin dentin arayüzünde intrafibriller ve interfibriller remineralizasyonu uyaran nanokristaller oluşturma kabiliyetine sahiptirler. PVPA, kolajen fibrillerinin endojen degradasyonundan sorumlu olan MMP'lerin inhibitörü olarak hareket ettiğinden, dentin bonding sırasında HT'nin degradasyonunu önlemektedir (158). Dentin Sialofosfoprotein (DSPP) ve Dentin Matriks Protein-1 (DMP-1) diş ve kemik gibi sert dokuların düzgün gelişimi için gerekli olan yüksek oranda fosforlanmış ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerdir. PVPA, DMP1 ve DPP gibi fosfoproteinler için biyomimetik bir analog görevi görmektedir (159). Poliakrilik Asit (PAA), dentinin biyomimetik mineralizasyonunda NCP analoğu olarak kullanılan bir başka polielektrolittir. PAA, DMP1'in kalsiyum fosfat bağlanma bölgelerini taklit etmektedir. Ayrıca, PAA'nın demineralize kolajen matrisine sızacak kadar küçük olan ACP nano öncüllerini stabilize edebileceği bildirilmektedir (160,161).

Poliakrilik asit ve PVPA gibi NCP analoglarının kombine kullanımıyla remineralizasyonun değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Hem PAA'nın hem de

PVPA'nın varlığında yapılan çalışmada, dentin kolajeni içindeki intrafibriler apatit kristalitlerinin yüksek düzeyde düzenli hizalandığı bildirilmektedir (162). İkili simülasyonların kullanımına ilişkin birçok rapor olmasına rağmen, iki ajanın aynı anda gerekmesi hazırlama prosedürünü karmaşık hale getirmektedir. Bu nedenle, iki işlevi tek bir molekülde birleştiren yeni moleküller geliştirmeye çalışmanın faydalı olacağı düşünülmektedir (163).

2.4.5.3. Poliamidoamin dendrimeri: Dendrimerler, belirli bir yapısal düzenle dallanma gösteren sentetik makromoleküllerdir (164). Dendrimerler, globüler proteinlere olan benzerlikleri nedeniyle kapsamlı şekilde incelenmektedir (165). Yapısal hiyerarşiyi takip ederek dentinin biyomimetik intrafibriler mineralizasyonunu teşvik etmektedirler (166). Poliamidoamin Dendrimeri (PAMAM), sentezlenen, karakterize edilen ve ticarileştirilen en eski dendrimer tipidir (167). PAMAM, fonksiyonel grupları aracılığıyla kalsiyum ve fosfat absorbe ederek mine ve dentin remineralizasyonunu uyarma ve aktive etme yeteneğine sahiptir (166). Mineral iyonlarının sekestrasyonuna neden olabildikleri ve çekirdeklenme için şablon görevi görebildikleri için güçlü remineralize edici materyaller olarak kabul edilmektedirler (168).

2.4.5.4. Sodyum trimetafosfat: Sodyum Trimetafosfat (STMP), tip I kolajeni fosforilleme potansiyeline sahip bir fosfoforin analoğudur (169). Kolajenin kimyasal fosforilasyonunun, SBF'de kemik benzeri apatitin biyomimetik olarak büyümesini yönlendirmek için olası bir strateji olduğu bildirilmektedir (170). STMP'nin kolajenolitik olmayan proteinlerle etkileşim, kolajen biyodegradasyonunu azaltma, mineral çekirdeklenmesi ve remineralizasyon yoluyla dentini stabilize etmek ve güçlendirmek için kullanılabilecek biyomimetik bir ajan olduğu düşünülmektedir (113).

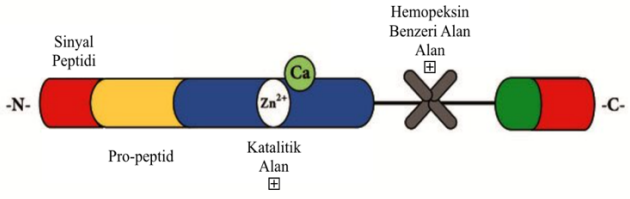
2.5. PROTEOLİTİK ENZİMLER

Proteolitik enzimler, substrat molekülünün terminal peptit bağını kesen ekzopeptidazlar ya da substratın iç peptit bağını kesen endopeptidazlar olarak iki grupta incelenmektedir. Endopeptidazlar, katalitik özelliklerine ve inhibitör duyarlılıklarına göre serin, sistein, aspartik ve metaloproteinazlar olarak ayrılmaktadır (171). Uygulanan restoratif tedavilerde, dentin ve rezin arasındaki bağlantının zaman içerisinde bozulduğu bildirilmektedir (172). Konakçı kaynaklı proteolitik enzimlerin hidrolitik aktivitesi de rezin dentin arasındaki bozulmaya katkı sağlamaktadır. MMP'ler ESM proteinlerini parçalayabilen endopeptidazlardandır (173).

2.5.1. Matriks Metalloproteinaz

Matriks metalloproteinazlar, ESM bileşenlerini ve Bazal Membran (BM) preteinlerini parçalayabilen enzim ailesidir. Tersiyer yapılarını ve fonksiyonel aktif bölgelerini korumak için kalsiyum ve çinko iyonlarına ihtiyaç duyarlar (174). İnsan vücudunda, genel olarak tanımlanan 24 farklı MMP türü bulunmaktadır. Bu enzim grubu embriyonik gelişim, doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır. Fizyolojik süreçlerin yanı sıra kanser, artrit, periodontitis ve fibrozis gibi patolojik süreçlere de katkı sağlamaktadır (175).

Matriks metalloproteinazlar, proteinin hücre dışına salgılanmasını yönlendiren bir sinyal peptidi, proteolitik olarak bölünene kadar enzimi inaktif tutan bir propeptid bölgesi, çinko ve kalsiyum içeren ve propeptid bölgesinin sisteininin inaktif tutmak için bağlandığı bir katalitik alan ve substrat özgüllüğüne ve endojen inhibitörlerle etkileşimlere aracılık eden hemopeksin benzeri bir alan olmak üzere dört ana alandan oluşmaktadır (Şekil 2.2) (176). Substrat özgüllüğü ve homolojisi temel alınarak yapılan sınıflamada MMP'ler kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilizinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğer MMP'ler olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır (175). Gruplar; kolajenazlar: MMP-1, MMP-8 ve MMP-13, MMP18; jelatinazlar: MMP-2 ve MMP-9; stromelisinler: MMP-3, MMP-10 ve MMP-11; matrilizinler: MMP-7 ve MMP-26; membran tipi MMP'ler: MMP14, MMP17, MMP-24 ve MMP-25 ve diğerleri: MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28 olarak ayrılmaktadır (175,177).



Şekil 2.2: Matriks metalloproteinazların temel yapısı

Matriks metalloproteinazların biyolojik aktivitesinin düzenlenmesi, proenzimlerin sentezi ve aktivasyonu, gen transkripsiyonu ve Matriks

Metalloproteinazlara Özgü Spesifik Doku İnhibitörü (TIMP) tarafından inhibe edilmesi gibi birden fazla düzeyde gerçekleşmektedir (178). Enzimin öncül formlarının aktif proteolitik enzimlere dönüştürülmesi, iki yönlü bir süreçtir. Bu süreç membran tip MMP'lerin aracılığıyla gerçekleşebilmektedir (175). Bununla birlikte, asidik adeziv rezin uygulamalarından sonra oluşan düşük pH'lı mikro ortamın enzimleri aktif hale getirdiği bildirilmektedir (75). Enzimin aktif olmayan formunda, katalitik alanın çinko iyonu, sistein kalıntısına bağlanmaktadır. Bu durumda enzim yapısı stabilize olmakla birlikte substrat bağlanması ve parçalanması engellenerek enzim inaktif durumda tutulmaktadır. Sistein anahtarı olarak adlandırılan süreçte ise, sistein ile çinko arasındaki bağ kırılarak enzim kısmen aktif hale gelmektedir. Prodomain'in otolitik veya diğer proteazların aracılığı ile daha fazla parçalanması sonucunda aktif, düşük moleküler kütleli bir endopeptidaz elde edilmektedir (179). MMP'ler kolajen tip I'i tek bir bölgede parçalayarak uzun bir N-terminali ve kısa bir C-terminali olmak üzere iki parça oluşturmaktadır. Kolajen tip I molekülünün MMP tarafından bölünmesi sonucu Tip I Kolajenin C-terminal Telopeptitleri (ICTP) oluşmaktadır (Şekil 2.3) (15,180).



Şekil 2.3: Matriks metalloproteinazların parçalanma mekanizmaları

Matriks metalloproteinaz inhibitörleri kökenlerine göre endojen ve sentetik olarak ikiye ayrılmaktadır. TIMP'ler, normal fizyolojik doku remodelling süreçlerini düzenleyen dört proteaz inhibitöründen (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4) oluşan bir aileyi kapsamaktadır. TIMP'ler farklı glikozilasyon seviyelerine ve 21 ila 29 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahiptir. MMP'lere 1:1 oranında non-kovalent olarak bağlanmaktadırlar. TIMP'ler dokuya özgü gen ekspresyon profilleri, gen düzenleme modelleri ve MMP'ye bağlanma afiniteleri bakımından farklılık göstermektedir. TIMP'lerin çoğu aktif MMP'lerin çoğunu inhibe ederken bazıları proMMP aktivasyonunu

da önlemektedir. TIMP-1'nin proMMP-9, TIMP- 2 ve TIMP-4'ün proMMP-2'ye bağlandığı bildirilmektedir. TIMP-3 sadece ESM'den izole edilebilirken, diğer TIMP'ler çözünür formda bulunmaktadır. TIMP'ler, dokulardaki temel MMP inhibitörü olmalarının yanı sıra, apoptoz, hücre büyümesi, hücre morfolojisi, gonadal steroidogenezin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (181–183). MMP'lerin ana inhibitör mekanizması iki değerlikli metal iyonlarının şelasyonuna dayandığından dolayı sentetik MMP inhibitörlerinin, MMP molekülündeki çinko iyonunu şelatlayarak substratın bağlanmasını ve bölünmesini önleyebilen fonksiyonel bir grup (karboksilik asit, hidroksamik asit, sülfhidril, fosfiniller, tiyoller gb.) içermesi gerekmektedir (184).

Matriks metalloproteinazların, dentin-pulpa kompleksinin hem yumuşak hem de sert dokularında tespit edildiği bildirilmektedir. Dentin-pulpa kompleksinin oluşumunda ve idamesinde çeşitli fizyolojik süreçlere dahil olan enzimler, dentin matriksinin salgılanması sırasında odontoblastlar tarafından üretilmekte ve kolajen matriksin mineralizasyonundan sonra, inaktif proformları kalsifiye matriks içinde hapsolmuş halde kalmaktadır (185,186). MMP–2, MMP–8, MMP–9 ve MMP–20'nin normal dentin matriksinde bulunurken, MMP–2 ve MMP–9 intertübüler kolajen fibril ağında bulunmaktadır. MMP-2'nin dentindeki proteazlar içerisinde en çok bulunanı olduğu takibinde ise en çok MMP-9' a rastlanıldığı bildirilmektedir (17). MMP'lerin dentindeki fizyolojik rollerine ek olarak, fizyolojik olmayan dış uyaranlara bağlı olarak dentin büyüme faktörlerinin salınımı ve aktivasyonu, tersiyer dentin oluşumu, pulpal inflamasyonda doku yıkımı, dental kompozit restorasyonun adeziv tabakasında demineralize kolajenin parçalanması gibi patolojik süreçlerde de yer aldıkları bildirilmektedir (187,188). Bakteriyel asitler tarafından oluşturulan asidik ortam, endojen MMP'lerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Ancak, ortamda bakteri bulunmadığında da demineralize dentinin yavaşça bozulması, MMP'lerin dentin matriksinin bozulmasındaki rolüne dair önemli bir kanıt olarak değerlendirilmektedir (185). Dentin dışında, tükürükte de Dişeti Oluğu Sıvısı (DOS) ve tükürük bezi kaynaklı çeşitli MMP'lerin mevcut olduğu bildirilmektedir. MMP-8 ve MMP-9 tükürük yapısında en çok bulunan MMP'lerdir (185).

2.5.2. Adeziv Rezin Kaynaklı Fibril Yıkımı

Kompozit restorasyonun uygulanması sırasında, restoratif materyal ile dental substrat arasında sızdırmaz ve sıkı bir adaptasyon sağlamak için adeziv rezin kullanılması gerekmektedir (189). Adeziv sistemler, temel olarak total-etch adezivler ve self-etch

adezivler olmak üzere iki sınıflamada incelenmektedir. Bu sistemler, uygulama prosedürleri ve kavite hazırlandıktan sonra dentin yüzeyinde kalan organik ve HA debris partiküllerinden oluşan smear tabakası ile nasıl etkileşime girdikleri açısından farklılık göstermektedir (190). Etch-and-rinse adezivler olarak da bilinen total-etch adezivler birden fazla aşamada uygulanmaktadır. İlk aşamada Fosforik Asit (PA) kullanıldıktan sonra dentin smear tabakasını ve fazla asidi uzaklaştırmak için su ile durulanmaktadır (191). Daha sonra, 2-Hidroksietil Metakrilat (HEMA) gibi bir primer uygulanmaktadır. Dentin hidrofilikken, metakrilat bazlı dental rezinler hidrofobiktir. Bu nedenle, yeterli dentin bağlanması elde etmek için HEMA gibi hidrofilik bir primer uygulanması esastır. HEMA, dentine bağlanabilen hidrofilik bir kuyruk ve adeziv rezine bağlanabilen hidrofobik bir kuyruk içermektedir (192). Genellikle Bisfenol A-Glisidil Metakrilat (BisGMA) içerikli oluşan adeziv rezin son aşamada uygulanmaktadır. Self-etch sistemler ise tek adımda uygulanmakta ve aynı anda asit, primer ve bond görevi görmektedir. Asidik ajan kullanımı, dentinin yüzeysel tabakasını demineralize ederek dentinin kolajen fibrillerini açığa çıkarmaktadır. Rezin kolajen fibrilleriyle mikromekanik kilitlenme göstererek dentine bağlanmakta ve HT meydana gelmektedir (193). Stabil bir HT'nin sağlanması, restorasyonun uzun ömürlü olması için kritik bir faktördür (194) .

Pro-matriks metalloproteinazları aktive etmek için gereken düşük pH hem total-etch hem de self-etch yapıştırıcılardaki asidik ajanlar tarafından sağlanabilmektedir (195). Çalışmalar, hafif self-etch adezivlerin bile MMP aktivasyonunu 14-15 kat arttıracak kadar güçlü olduğunu göstermektedir (196). Asidik ortam ile aktif hale gelen MMP'lerin kolajen fibrilleri yıkması için gereken lokal pH'ın nötralizasyonu, total-etch sistemlerde fazla asidin durulanması ile gerçekleşmektedir (193). Self-etch sistemler de ise pH nötralizasyonu dentin yapısındaki mineralize apatit bileşenlerin, asidik rezin monomerlerini tamponlamasıyla gerçekleşmektedir (196). Özellikle total-etch adezivler kullanıldığında oluşan HT'de, tam olarak infiltre olmamış demineralize kolajen bölgesi görülmektedir. Bu bölge proteaz aracılı bozulmaya karşı oldukça savunmasız kalmaktadır (193). Self-etch sistemlerde asitleme için ekstra bir basamak bulunmamasından dolayı, dentin-rezin bağlantısının MMP aracılı bozulmadan koruyacağı sanılmaktaydı. Ancak, oluşan HT içinde suya karşı geçirgen nanovoidlerin varlığının, dentin-rezin bağlantısını proteaz aracılı hidrolize karşı savunmasız hale getirdiği belirtilmektedir (195,196).

2.6. PROTEOLİTİK AKTİVİTE İNHİBİTÖRLERİ

2.6.1. Klorheksidin

Klorheksidin, katyonik bir bisguanid olup geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır. Diş hekimliğinde, periodontal ve endodontik tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Konsantrasyonuna bağlı olarak, hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etkileri olduğu bildirilmektedir (197). 2004 yılında Pashley ve ark., CHX kullanımıyla dentin MMP'lerinin inhibe edilebileceğini göstermiştir. Bu tarih itibariyle yapılan birçok çalışmada, CHX'in MMP inhibitörü olarak etkinliğinin kanıtlandığı görülmektedir (197–201). 2012 yılında Scaffa ve ark., CHX'in sistein katepsin inhibitörü olarak görev alabileceğini ilk kez göstermiştir (202).

Klorheksidin, asitlenmiş dentine bağlanarak zamanla salınmakta ve gerektiğinde anti-proteolitik etki göstermektedir (203). CHX'in inhibe edici mekanizmasının katyon şelasyonu yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Kalsiyum ve çinko iyonlarının ayrıştırılması, MMP'lerin katalitik bölgelerinin aktivasyonunu engellemektedir (204,205). Klorheksidin, güçlü pozitif iyonik yükleri olan bir bileşiktir ve bu yüklerin mineralize sert dokulardaki fosfat grupları veya demineralize dentindeki karboksilik asitlerle elektrostatik bağlar oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca diş yapısına güçlü bir afiniteye sahiptir (203) . MMP aracılı proteolizinin %0,2 ve %2,0 konsantrasyonlarındaki CHX ile kısmen veya tamamen inhibe edilebileceği gösteren çalışmalar mevcuttur (206–208).

Klinik uygulamalarda, CHX genellikle asit uygulanmasından sonra ve adeziv uygulanmasından önce su içeren bir çözelti olarak topikal olarak uygulanmaktadır (209). CHX'in %0,002 konsantrasyonda 15 saniye süreyle dentine uygulanmasının bile altı ay boyunca rezin-dentin bağlantısını koruma yeteneğini gösterdiği bildirilmektedir (210). Bu nedenle, asitlenmiş dentine bir dakika boyunca %2.0 CHX'in uygulanmanın, kolajen ağın tekrar nemlendirilmesi ve dentin-rezin bağlarının korunması için önemli bir klinik protokol olduğu bildirilmektedir (184).

2.6.2. Kuarterner Amonyum Bileşikleri

Kuaterner Amonyum Bileşenleri (QAC), antimikrobiyal ajan gruplarından biridir. Katyonik moleküller oldukları için CHX'e benzer şekilde anti-MMP özellikleri

gösterdikleri ileri sürülmektedir. Sırasıyla HA ve kolajendeki negatif yüklü fosfat ve karboksilik gruplara bağlanabilmektedir (211). Böylelikle, endojen proteazların aktif bölgesini bloke eden ve onları inaktif formda tutan konformasyonel değişikliklere yol açmaktadır. Ancak gerçekleştirdikleri elektrostatik etkileşimlerin zayıf olduğu bildirilmektedir. Bisguanidlere benzer şekilde, KAB'larin suda çözünür moleküller olması, zaman içerisinde antiproteolitik etkilerini kaybetmelerine neden olabilmektedir (184).

Benzalkonyum klorür (BAC), çeşitli uzunluklarda alkil zinciri içeren QAC sınıfının bir üyesidir. Bir ucunda kuaterner amonyum grubu bulunduran, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip nitrojenli katyonik bir yüzey aktif maddedir. Ağırlıkça %1,0 BAC içeren PA (Etch-37 w/BAC, Bisco Inc., Schaumburg, IL) ticari olarak mevcuttur. BAC içeren asitlerin bağlanma dayanım değerleri üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı belirtilmektedir (212). Benzer şekilde, BAC'nin kavite dezenfektanı olarak kullanıldığında dentin bağlanması üzerinde de olumsuz bir etkisi olmadığı bildirilmektedir (213). CHX içeren PA'lara kıyasla, BAC molekülünün durulama işlemi sonrasında bile demineralize dentine güçlü bir şekilde bağlanmasının avantaj olduğu belirtilmektedir (214).

Kuaterner amonyum bileşenleri ailesine ait bir diğer antibakteriyel monomer olan 12-metakriloloksidodekildipiridinyum bromür (MDPB), uzun zamandır piyasada bulunmaktadır. MDPB'nin dentin primerine eklendiğinde güçlü antibakteriyel ve kavite dezenfektanı özelliği gösterdiği bildirilmektedir (215,216). Clearfil Protect Bond (Kuraray Noritake Dental Inc., Osaka, Japonya), MDPB içeren ilk ticari dentin adezivdir. MDPB'nin diğer önerilen inhibitörlere göre avantajı, adeziv monomerlerle kopolimerleşme yeteneğine sahip olmasıdır. In vitro ve in vivo çalışmalarda, MDPB içeren adezivlerin kullanılmasıyla daha dayanıklı arayüzlerin elde edildiği bildirilmektedir (217,218).

2.6.3. Bifosfonat Türevleri

Geniş spektrumlu proteaz inhibitörlerinden bir diğeri olan bifosfonatlar, enzimlerden çinko ve kalsiyum iyonlarını şelatlayarak inhibitor görevi görmektedir (219). Bu grup içerisinde, PVPA'nın MMP-9'u etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmektedir (220). PVPA 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) aracılığıyla kolajen matrikslerinde hapsolabilmektedir. Bu nedenle, CHX'den daha kuvvetli bir MMP

inhibitörü olabileceği düşünülmektedir (221). Fakat, PVPA ve bisfosfonatların uzun dönem etkisinin incelendiği çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (184).

2.6.4. Çinko ve Çinko İçeren Materyaller

Matriks metalloproteinazların, tersiyer yapısının ve fonksiyonel aktif merkezinin korunması için çinko önemli bir yere sahiptir (222). Optimum MMP aktivitesi için eser miktarda çinko gereklidir fakat birçok araştırmada, yüksek çinko konsantrasyonunun MMP'leri inhibe ettiği rapor edilmektedir (223,224). Çinkodan zengin bir çözeltiye inkübe edilen dentin kesitlerinde MMP aracılı kolajen bozulmasının etkili bir şekilde azaldığı görülmektedir (225–227). Diş hekimliğinde, çinko fosfat simanlar, çinko polikarboksilat ve çinko oksit ojenol gibi çinko salınımı yapan bir çok materyal kullanılmaktadır (228). Bazı kaynaklar, materyalden yavaş çinko salınımın restorasyon ömrünün uzamasıyla ilişkili olabileceğini savunmaktadır (223,224).

Bond materyaline %10 oranında ZnO partiküllerinin eklenmesinin, demineralize dentin disklerinden ICTP salınımını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir (229). Benzer şekilde, $ZnCl_2$ 'nin 3.3 mg/ml (24.4 mM/L) son ortam konsantrasyonuna eklenmesinin de, demineralize dentin disklerinde MMP aktivitesini dört hafta boyunca etkili bir şekilde inhibe ettiğini gösterilmektedir (230). Çinkonun bu başarısı, yüksek konsantrasyonlarda çinkonun MMP'lerdeki peptitlere bağlanarak 3D yapılarını, özellikle de aktif bölgeyi değiştirmesine bağlanmaktadır. Bu durumun moleküler stabiliteyi artırırken enzimatik aktiviteyi azalttığı öngörülmektedir (231).

2.6.5. Alkoller

Farklı alkol türlerinin endojen dentin proteazlarının inhibisyonu üzerindeki etkisi inceleyen çok az araştırma mevcuttur. Çözücü olarak etanol kullanımını inceleyen çalışmalarda, MMP'lerin de inhibe olduğunun görülmesi alkolleri araştırma konusu haline getirmiştir. Metanol, etanol, propanol, bütanol, pentanol, heksanol, heptanol ve oktanol'ün incelendiği çalışmanın sonuçları, MMP-9'un ve endojen dentin MMP'lerinin doza bağımlı bir şekilde inhibe olduğunu göstermektedir. MMP'leri inhibe edebilen alkollerin bu özelliklerinin, MMP yapısındaki katalitik çinko ile alkollerin hidroksil grubundaki oksijen arasında oluşan kovalent bağa bağlı olduğu ifade edilmektedir (232). Fakat, alkol esterlerinin kararsız yapıda olmaları, uzun süreli etkilerinin sorgulanmasına neden olmaktadır (279).

2.6.6. Hidroksamat Bazlı İnhibitörler

Hidroksamat bazlı MMP inhibitörleri, enzimin aktif bölgesindeki çinko atomuna bağlanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanımlarıyla bilinmekte olup, birçok MMP alt türü için güçlü ve geniş spektrumlu sentetik inhibitörleri temsil etmektedir (233). Ilomastat (Galardin), bu grubun en çok bilinen temsilcilerinden biridir. Zimografik çalışmalar, galardinin MMP-2 ve MMP-9'u başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (234,235). Hidroksamatların, oldukça etkili MMP inhibitörleri olarak değerlendirilmesine rağmen, yapılarının optimize edilmediği durumlarda metabolik dönüşümlere maruz kalarak MMP'lerdeki metal iyonlarını işlevsel olmayan şekilde şelatlayabilecekleri öne sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada rezin dentin bağlantısının bozulmasında azalma gözlendiği bildirilmektedir (236). Fakat galardinin kolajen yıkımında azalmaya neden olmadığını bildiren çalışma da mevcuttur (237).

2.6.7. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir ve bunların yarı sentetik analogları olan doksisiklin ve minosiklin ile birlikte MMP inhibitörü olarak da görev almaktadırlar (238). Deney fareleri üzerinde minosiklinin kolajenazları inhibe ettiğinin gösterilmesiyle birlikte tetrasiklinlerin, proteaz inhibisyon etkinlikleri araştırılmaya başlanmıştır (184). Doksisiklin ve minosiklinin de, kolajenaz ve jelatinazları inhibe ettiği gösterilmektedir (239). MMP inhibisyon mekanizmaları tam olarak anlaşılmasa bile, MMP'yi inhibe etmelerinde çeşitli mekanizmaların etkili olduğu bilinmektedir (240). Çinko şelatlamasına ek olarak MMP mRNA'sında aşağı doğru regülasyon (down regulation) yapmaktadırlar. Bununla birlikte, aktivasyon sürecine müdahale etmekte ve MMP'leri bozunmaya karşı daha duyarlı hale getirmektedirler (239). Dişlerde lekelenmelere sebebiyet vermeleri, klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır (184).

2.6.8. Kolajen Çapraz Bağlayıcılar

Hibrit tabakadaki kolajen bozulmasını azaltmak için araştırılan bir diğer konu, adeziv uygulaması öncesi kolajen fibrillerinin çapraz bağlanma düzeyini artırmaktır. Kolajen çapraz bağlanmalarının artırılmasıyla, dentin fiziksel özellikleri iyileşebilmektedir. Böylelikle, dentinin endojen proteazlar tarafından bozulmaya karşı daha dirençli hale geleceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, antiproteolitik özellik gösteren bazı çapraz bağlayıcı ajanlar bulunmaktadır (241). Bu ajanlar, sentetik ve doğal

olmak üzere iki farklı grupta incelenmektedir. Bu ajanlar, kolajeni fiziksel, kimyasal veya fotokimyasal olarak modifiye etmektedir (241,242).

Sentetik çapraz bağlayıcılar aldehit ve karbodiimid olarak iki ana başlık altında incelenmektedir. Aldehit grubu kovalent çapraz bağ yapmaktadır. Aldehit grubundaki gluteraldehit, antimikrobiyal özelliğine ek olarak anti MMP özellik de göstermektedir. Bununla birlikte, çapraz bağlanmamış veya hafif çapraz bağlanmış kolajen matrikslerinin enzimatik bozunmaya karşı direncini artırdığı bildirilmektedir (243,244). Karbodiimidler, kolajen moleküllerinin karboksilik ve amino grupları arasında amin bağları oluşturmaktadır. Suda çözünen ya da N-hidroksisuksinimid ile kombine edilen EDC'ler en yaygın karbodiimid türüdür. Çalışmalar, EDC kullanımında rezin dentin bağlantısının iyileştiğini göstermektedir (245–247).

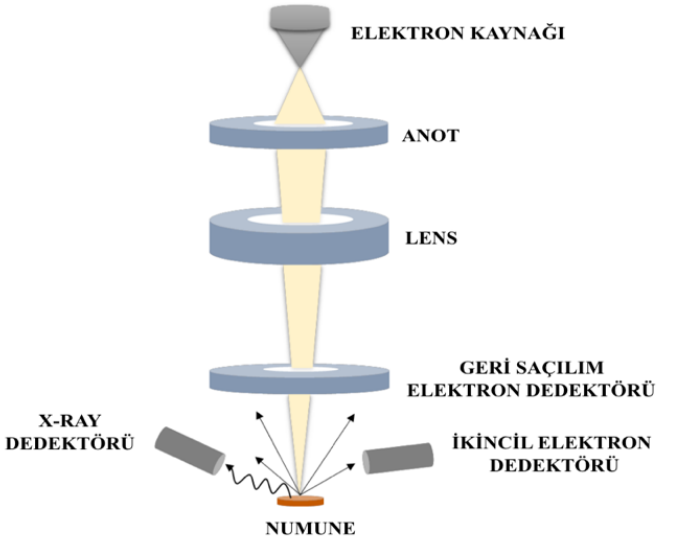
Doğal çapraz bağlayıcı ajanlar arasında genipin, proantosiyanidin, sumak ekstresi, zerdeçal ekstresi (kurkumin) ve yeşil çay ekstresi (epigallokateşin gallat) bulunmaktadır. Bu ajanların yüksek etkili olmaları, düşük toksisite göstermeleri ve kolayca temin edilebilmeleri, kullanımını son derece avantajlı kılmaktadır. Çapraz bağlayıcıların, tüm MMP'leri, sistein katepsinlerini ve matriks içinde bulunan diğer enzimleri aynı anda çapraz bağlayarak, dentin üzerinde ayrı ayrı MMP ve katepsin inhibitörleri kullanma gerekliliğini ortadan kaldırmaları en büyük avantajlarından biri olarak görülmektedir (184).

2.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), malzemelerin yüzey karakterizasyonunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknik, bir elektron tabancası ve çoklu kondansatör mercekleri tarafından üretilen odaklanmış bir elektron demetiyle numunelerin yüzeyini taramakta ve dişlerin yüzey yapısının incelenmesine olanak tanımaktadır. Yüksek enerjili odaklanmış elektron demeti, katı numunelerin yüzeyinden dağılan çeşitli sinyaller üretmektedir. Numune ve elektronlar arasındaki etkileşimden elde edilen bu sinyaller, numunenin yüzey morfolojisi, kimyasal bileşimi veya kristal yapısı ile ilgili bilgi sağlamaktadır (248).

İlk olarak, elektronlar elektron tabancası tarafından hızlandırılmaktadır. Ardından birincil elektron demeti numune ile çarpışımaktadır. Çarpışmanın ardından geri saçılan elektronlar ve ikincil elektronlar yüzeyden yansıtılarak dedektörde toplanmaktadır. Geri saçılan elektronlar, numuneden yansıyan elektronlardır. Çarptıkları enerjinin büyük bir

kısmını koruyarak, numune atomlarının elektrik alanları tarafından saçılma ve yön değiştirme süreçlerinden geçtikten sonra yüzeye ulaşmaktadırlar. Bu elektronlar yüksek enerjilidir. Diğer yandan, ikincil elektronlar numune yüzeyine çarpan birincil elektronların, numunenin atomlarıyla etkileşimi sonucu yüzeyden kaçan düşük enerjili elektronlardır (249). Şekil 2.4'de elektron kaynağı, anot, mercekler ve geri saçılmış elektronların dedektörü ve ikincil elektronların dedektörünü içeren SEM'in basitleştirilmiş şeması gösterilmektedir (250).



Şekil 2.4: Taramalı elektron mikroskobunun sistematik şeması

İncelenen numuneler, vakum basınçlarına ve gelen elektron ışınına dayanabilmeli ve yüzeyleri elektriksel olarak iletken olmalıdır. Numuneler iletken değilse, genellikle altın, platin veya karbon gibi iletken bir malzeme ile kaplanmaktadır. Bu prosedür ile yüzeyde yük birikmesi ve bunun sonucunda bozulmuş bir görüntünün oluşması önlenmektedir (251).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu ‘nun 26.05.2023 tarih ve 2023/11 sayılı toplantısında 11/15 karar sayısı ile çalışmamız etik açıdan uygun bulunmuş (EK-1) ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği Bölümü ‘nde gerçekleştirilmiştir.

Bu doktora tez çalışması, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2024/031 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. DENEY ÖNCESİ HAZIRLIK SÜRECİ

3.1.1. Örnek Sayısının Belirlenmesi

Çalışmamız ile ilgili G*power 3.1 programı ile yapılan güç analizinde çalışma gruplarının etki büyüklüğü 0,484 bulunmuş (alfa hata olasılığı=0,05); güç değeri 0,80 alınarak yapılan örneklem genişliği analizinde toplam alınması gerekli örnek sayısı biyokimyasal parametreler için 3,0 (30/6= her grup için en az 5) olarak bulunmuştur. Her grup için 8 ader dentin diski hazırlanmıştır. Hazırlanan disklerin 5’i biyokimyasal parametlerde, 3’ü SEM analizi için kullanılmıştır.

3.1.2. Diş Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmamız için sürme problemleri nedeniyle çekilen 18-21 yaş arası çürüksüz 3. azı dişler toplanmıştır. Çürüklü ve daha önceden restore edilmiş dişler çalışma dışında tutulmuştur. Çekim işlemi yapılacak hastalara işlem öncesi gerekli bilgilendirmeler yapılarak onam formu (EK-2) imzalatılmıştır. Toplanan dişlerin üzerindeki yumuşak doku kalıntıları, küret yardımıyla temizlendikten sonra deney süresine kadar %0,1’lik timol içeren salin solüsyonunda, +4°C'de saklanmıştır.

Toplanan dişler, kök kısımlarını soğuk akrilik içinde olacak şekilde dikey olarak gömülmüştür. 24 saat akrilik sertleşmesi için beklenmiştir. Dişler, akrilik kalıplara yerleştirildikten sonra dentin kesitleri alınana kadar her gün taze distile suya aktarılmıştır. Dişlerinin mine ve yüzeysel dentinleri, su soğutması altında düşük hızlı su soğutmalı mikro kesme cihazı (Mecatome T180, Fransa) ile çıkarılmıştır (Resim 3.1). Her dişin orta koronal dentininden 1 mm kalınlığında bir adet dentin diski elde edilerek toplam 48 adet

numune hazırlanmıştır. Hazırlanan numunelerin yüzeyi yüzeyi polisaj cihazı (Minitech Z33, USA) kullanılarak, ISO (Uluslarası Standardizasyon Örgütü ,2003) tarafından da önerilen 600 gritli silikon karpit zımpara ile su altında düzgün hale getirilmiştir (Resim 3.2). Hazırlanan dentin kesitleri, deney süresine kadar her gün tazelenen distile su içerisinde bekletilmiştir.



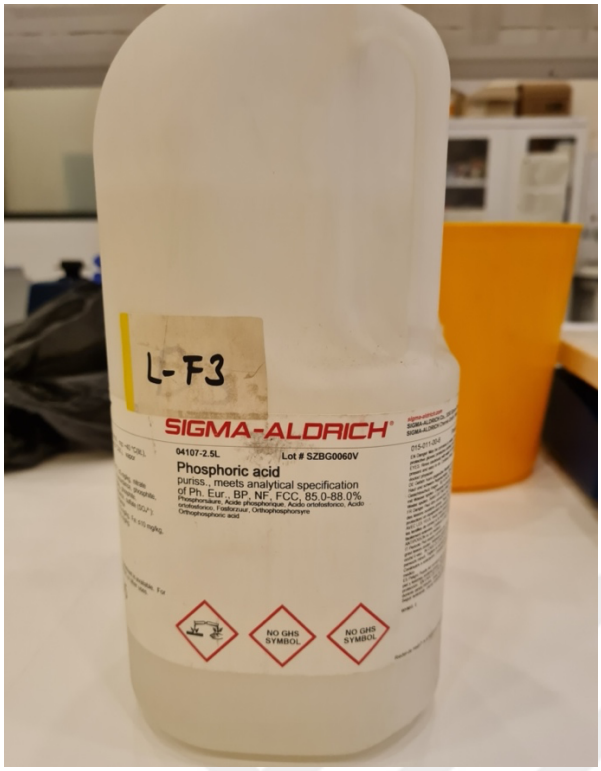
Resim 3.1: Çalışmada kullanılan mikro kesme cihazı Mecatome T180



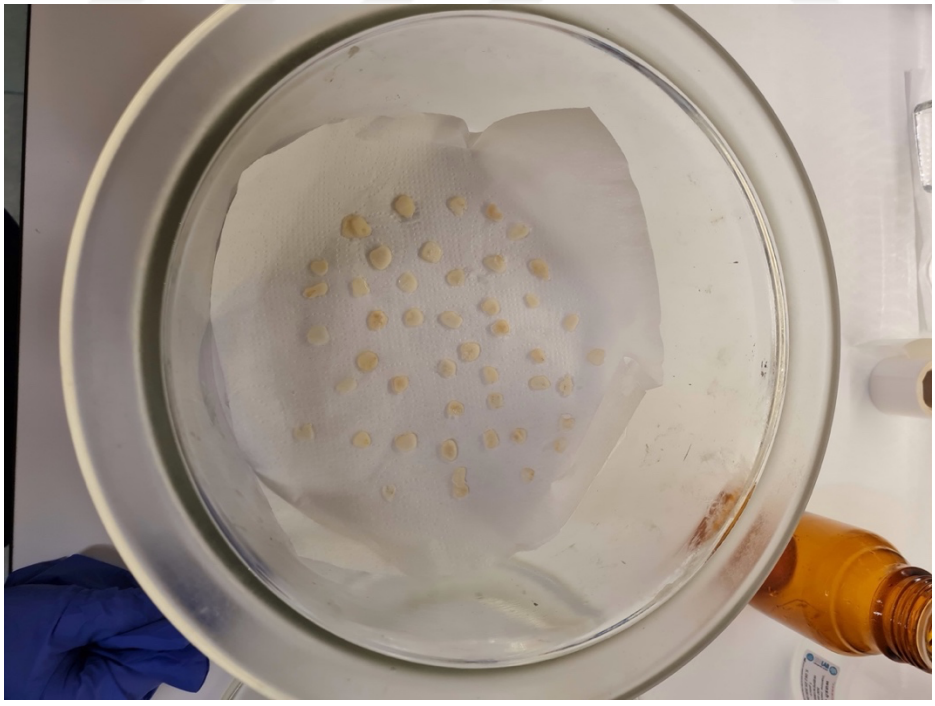
Resim 3.2: Çalışmada kullanılan polisaj cihazı Minitech Z33

3.1.3. Dentin Dokusunun İn-vitro Demineralizasyonu

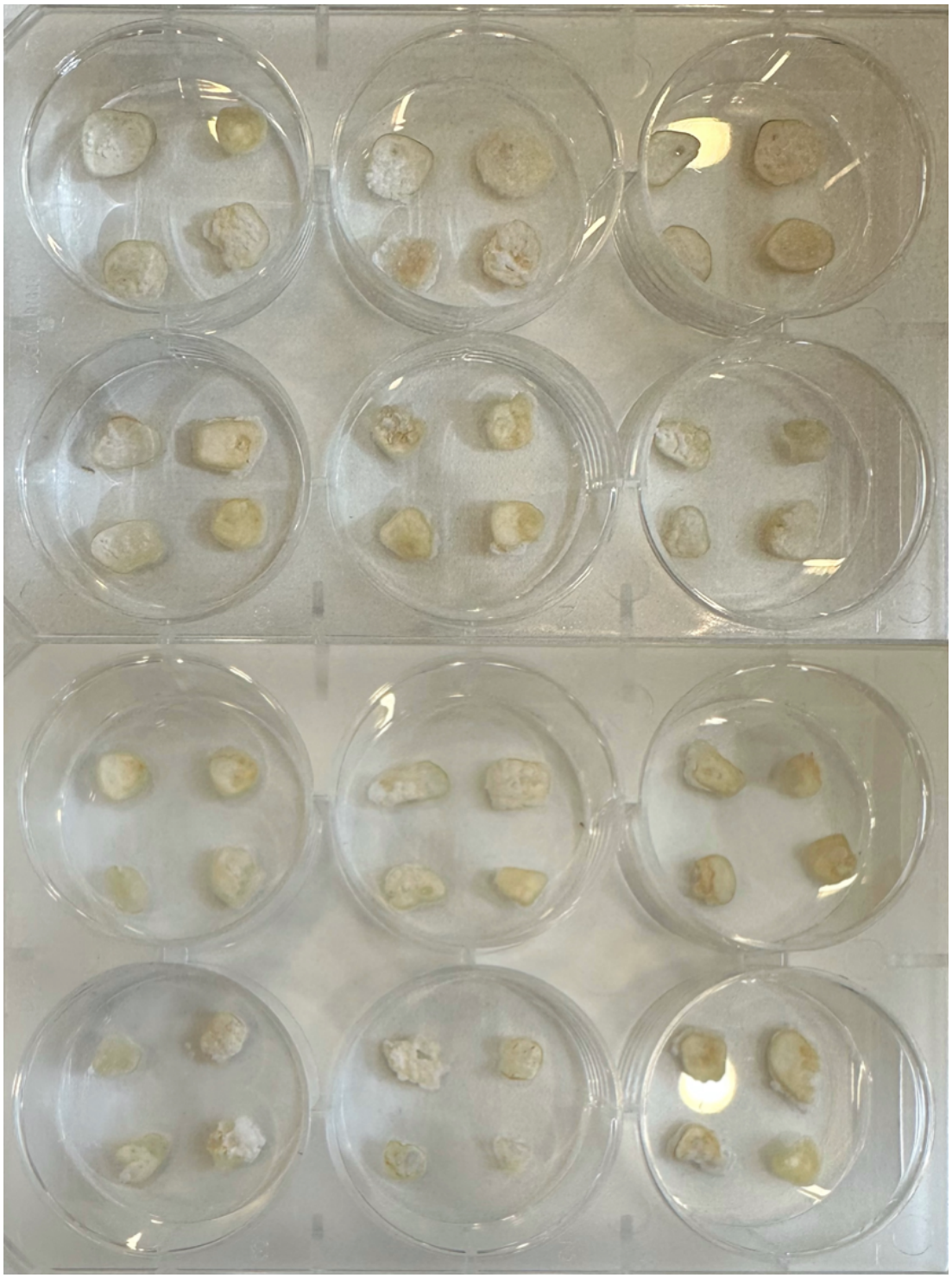
Çalışmamızda dentin dokusunu in-vitro olarak demineralize edebilmek için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda % 85 PA (Sigma Aldrich, Finlandiya) distile su içinde seyreltilerek %10'luk PA hazırlanmıştır (Resim 3.3). Tüm dentin diskleri 24 saat boyunca oda sıcaklığında %10'luk PA içerisinde bekletilmiştir. Ardından, 4 °C'de mekanik bir karıştırıcıyla birlikte 8 saat distile suda bekletilmiştir. Bu prosedürlerin ardından, demineralize edilen dentin diskleri randomize gruplara ayrılmak üzere cam kabın içerisinde toplanmıştır (Resim 3.4). Dentin diskleri, her bir kuyuda 4 adet dentin diski olacak şekilde 6'lı mikroplakalara yerleştirilmiştir (Resim 3.5).



Resim 3.3: Demineralizasyon solüsyonu



Resim 3.4: Demineralize edilen dentin diskleri



Resim 3.5: Mikroplaklara yerleştirilen dentin diskleri

3.1.5. Ultraviyole Dezenfeksiyon

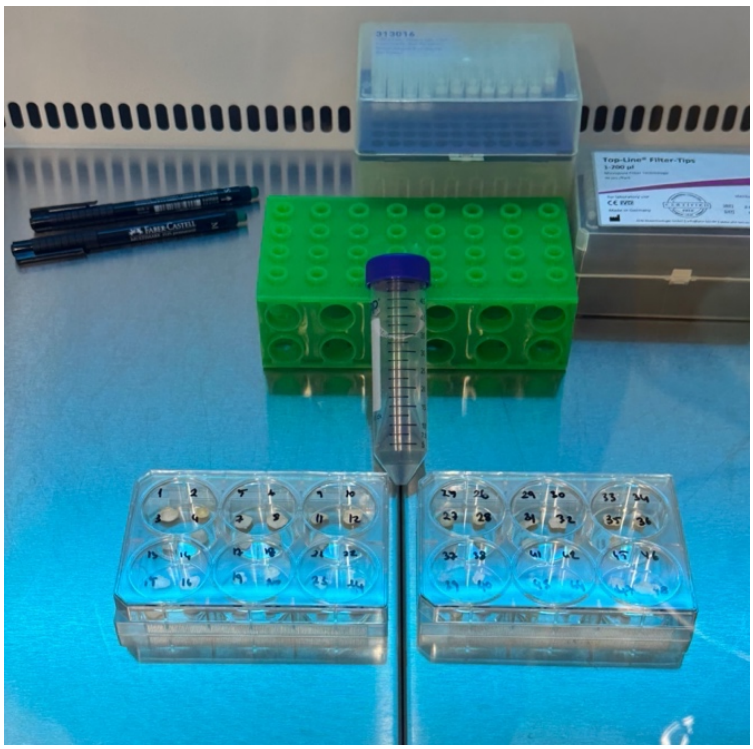
Kullanılan distile su, uygun bir filtreleme işlemine tabi tutulmuştur (Resim 3.6). Ultraviyole (UV) işlemi öncesinde, mikroplakalar alkol ile silinmiştir. Deneyde kullanılacak disklerinin yerleştirildiği mikroplaklar ve filtreleme işlemi yapılan distile su, laminar akış kabininde 20 dakika boyunca UV ışınlarına maruz bırakılmıştır (Resim 3.7). Tüm tedavi prosedürleri laminar akış kabininde gerçekleştirilmiştir (Resim 3.8).



Resim 3.6: Distile suyun filtrelenmesi



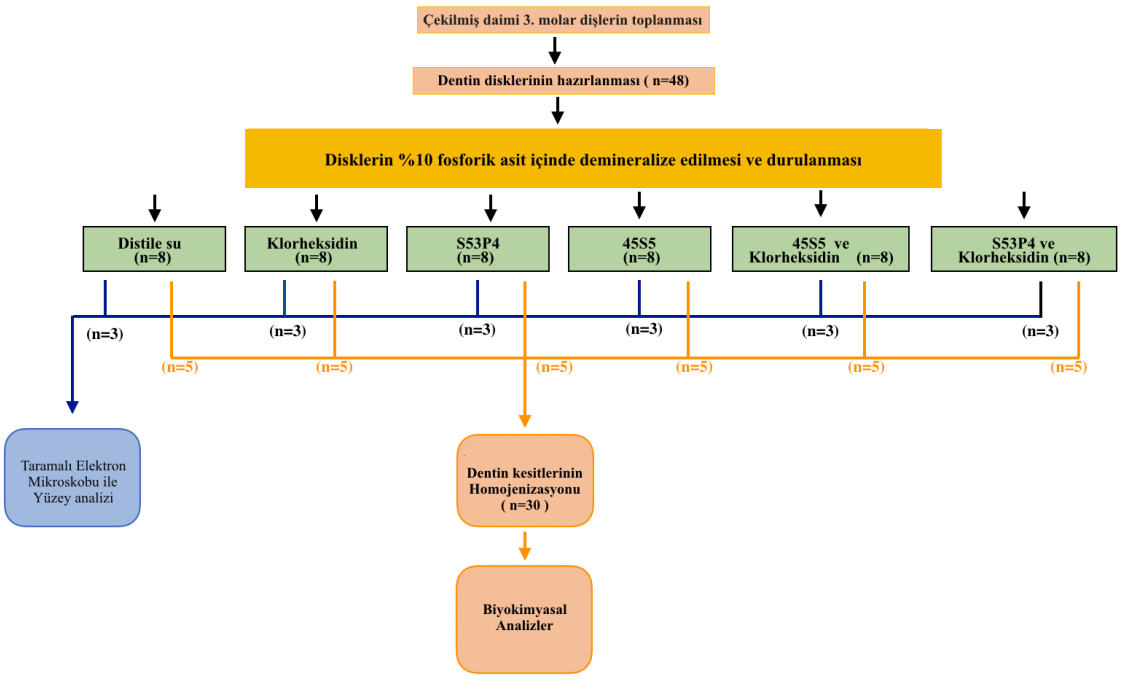
Resim 3.7: Laminar akış kabini



Resim 3.8: Ultraviyole ile dezenfekte edilen deney malzemeleri

3.2. DENEY SÜRECİ

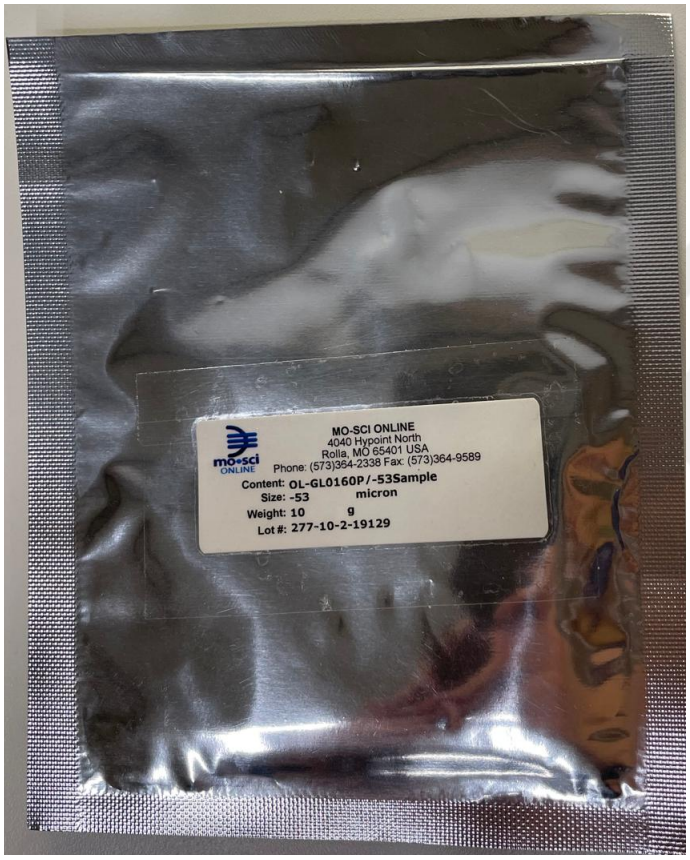
Çalışmamızda sürme problemleri nedeniyle çekilmiş çürüksüz daimi 3. molar dişler toplanarak dentin kesitleri elde edilmiş ve kesitler demineralize edilmiştir. Dentin diskleri, UV işleminden sonra her kuyucukta bir adet dentin diski olacak şekilde 24'lü mikroplakalara randomize olarak yerleştirilmiştir. Toplam 48 numune, deney grupları 45S5, S53P4, CHX ve 45S5, CHX ve S53P4, CHX ve distile su olacak şekilde altı gruba ayrılmış ve tedaviler uygulanmıştır. Daha sonra biyokimyasal analizler ve SEM analizi yapılmıştır. Çalışmaya ait deney akış şeması Şekil 3.1' de açıklanmıştır.



Şekil 3.1: Deney akış şeması

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda, 53 mikron 45S5 (MO-SCI, ABD) (Resim 3.9) ve 53 mikron S53P4 (MO-SCI, ABD) (Resim 3.10) materyallerinin etkilerini incelemek amacıyla, CHX ile kombine kullanımlarının yanı sıra pozitif ve negatif kontrol grubu da dahil olmak üzere 6 grup oluşturulmuştur (Tablo 3.1)



Resim 3.9: S53P4 biyoaktif cam



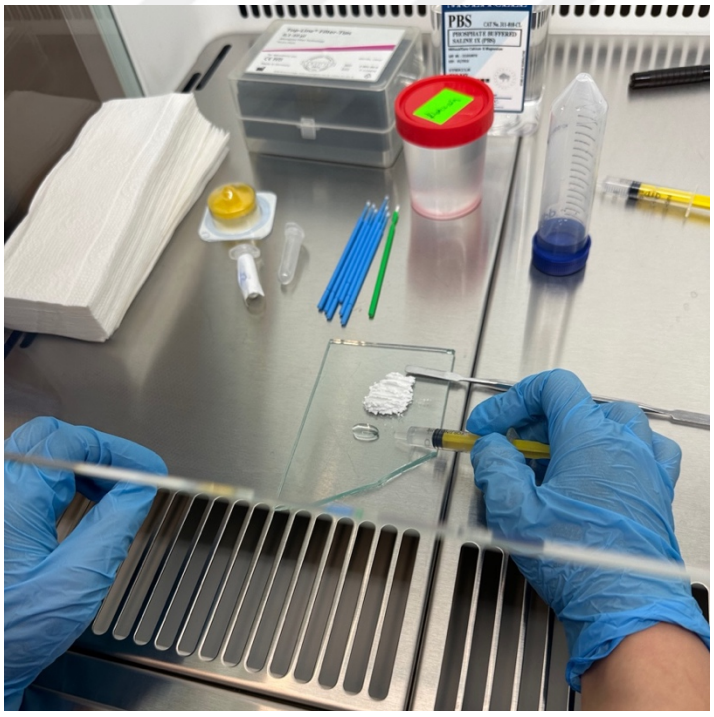
Resim 3.10: 45S5 biyoaktif cam

Tablo 3.1: Çalışma grupları ve kullanılan materyaller

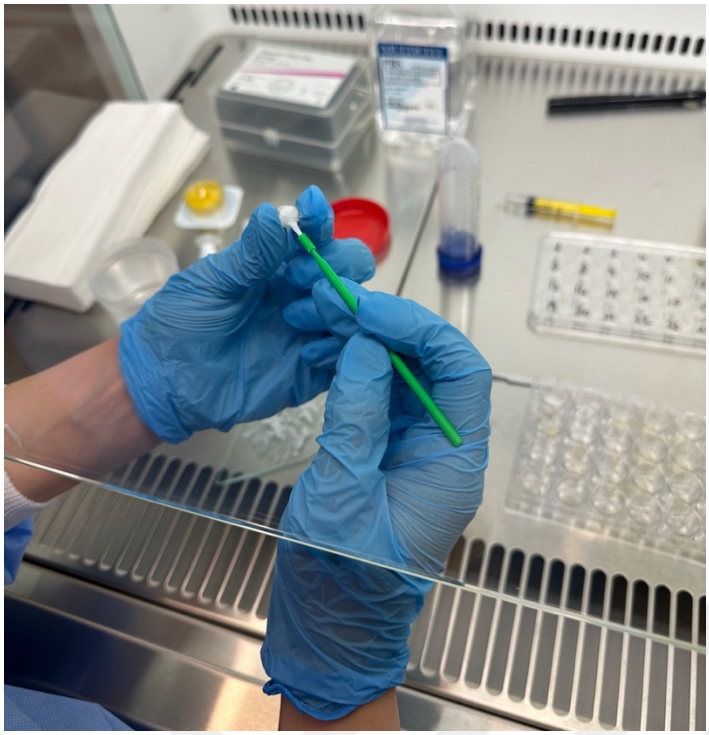
Grup Numarası	Uygulanan Materyaller
1.Grup	S53P4
2.Grup	45S5
3.Grup	Klorheksidin ve 45S5
4.Grup	Klorheksidin ve S53P4
5.Grup	Klorheksidin
6.Grup	Distile su

3.2.2. S53P4 ve 45S5 Biyoaktif Camlar

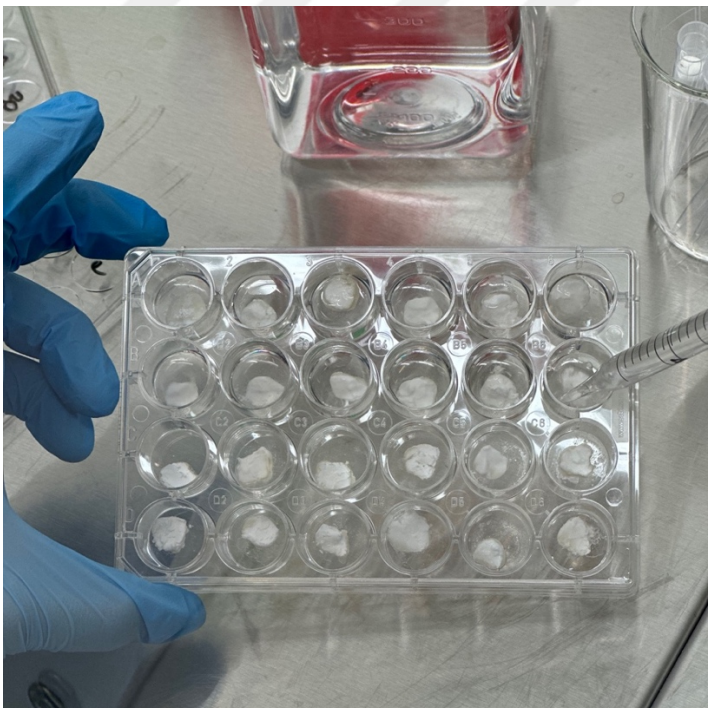
Dentin disklerine uygulanmak üzere, 1. grup için 0,6 gr S53P4 biyoaktif cam tozu 0,5 ml distile suyla süspansiyon haline getirilmiştir (Resim 3.11). 2. grup için 0,6 gram 45S5 biyoaktif cam tozu 0,5 ml distile suyla süspansiyon haline getirilmiştir. Oluşturulan süspansiyonlar, numune başına ortalama 0,06-0,07 mg gelecek şekilde tüm dentin yüzeyine uygulanmıştır (Resim 3.12). Mikroplakadaki her bir kuyuya kalsiyum ve magnezyum içermeyen Fosfat Tamponlu Salin (PBS, Wisent Inc., Kanada) ilave edilerek tedavi grupları 1 hafta boyunca +37°C'de inkübe edilmiştir (Resim 3.13). İlk haftanın sonunda, PBS Eppendorf tüpe alınarak dentin disklerinin üzeri distile su ile nazikçe yıkanmış ve kurulanmıştır. Tedavi tekrar uygulanarak diskler tekrar inkübe edilmiştir. Bu işlem 2. ve 3. haftalarda tekrarlanmıştır. 1.,2. ve 3. haftalarda Eppendorf tüplere alınan 'refresh' numuneleri biyokimyasal analizler için -80°C'de saklanmıştır. 4. haftanın sonunda diskler nazikçe yıkanarak distile su içerisine koyulmuştur.



Resim 3.11: 45S5 ve S53P4 biyoaktif camların hazırlanması



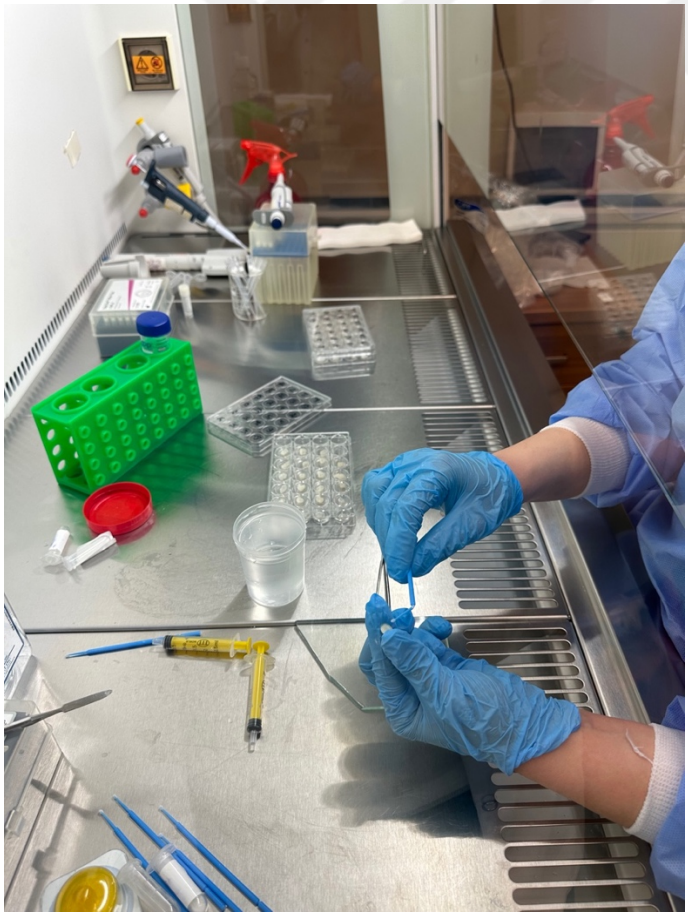
Resim 3.12: Dentin diskine biyoaktif cam uygulaması



Resim 3.13: Kuyulara fosfat salinli tampon ilave edilmesi

3.2.3. S53P4 ve 45S5 Biyoaktif Camların Klorheksidin ile Kombine Kullanımı

Dentin disklerine uygulanmak üzere, 0,6 gr cam tozları 0,5 ml distile suyla süspansiyon haline getirilmiştir. Oluşturulan süspansiyon uygulanmadan önce dentin disklerine %2'lik CHX ile muamele edilmiştir (Resim 3.14). 3. gruptaki dentin disklerine 45S5 biyoaktif cam, 4. gruptaki dentin disklerine S53P4 biyoaktif cam uygulanmıştır. Tedavi grupları PBS içerisinde 1 hafta boyunca +37°C'de inkübe edilmiştir.1. haftanın sonunda, PBS Eppendorf tüpe alınarak dentin disklerinin üzeri distile su ile nazikçe yıkanmış ve kurulanmıştır. Tedavi tekrar uygulanarak diskler tekrar inkübe edilmiştir. Bu işlem 2. ve 3. haftalarda tekrarlanmıştır. 1.,2. ve 3. haftalarda Eppendorf tüplere alınan 'refresh' numuneleri biyokimyasal analizler için -80°C'de saklanmıştır. 4. haftanın sonunda disk nazikçe yıkanarak distile su içerisine koyulmuştur.



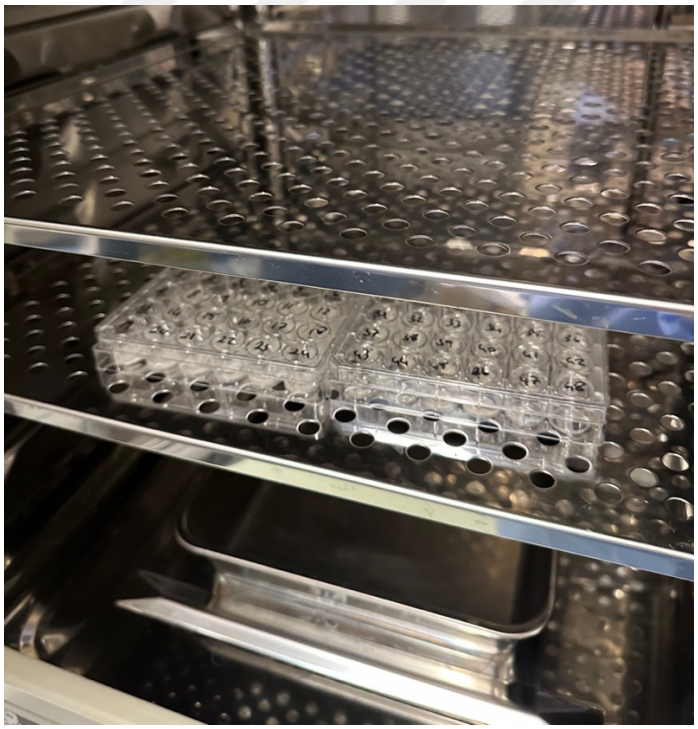
Resim 3.14: Biyoaktif cam uygulaması öncesi klorheksidinin uygulanması

3.2.4. Klorheksidin

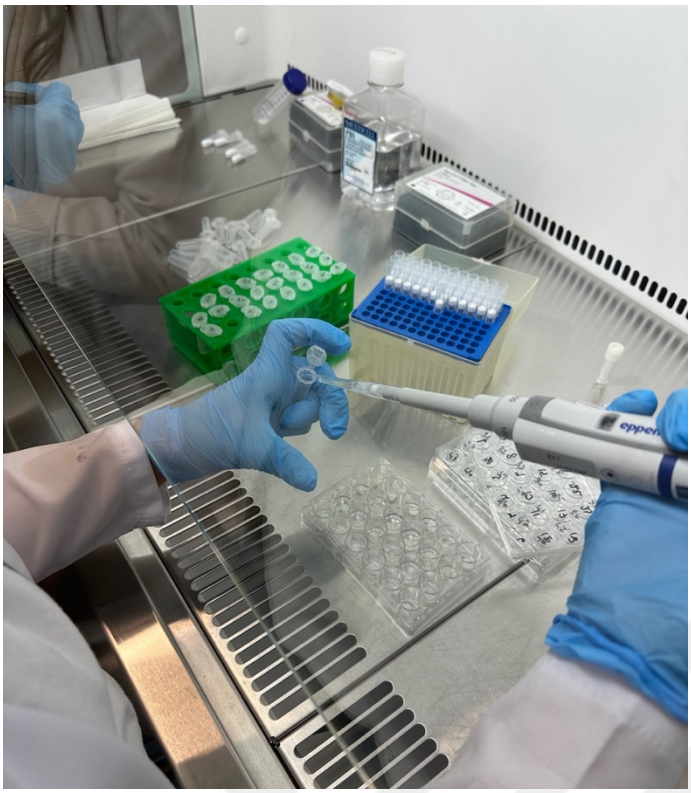
Dentin disklerine %2'lik CHX (Microvem, Türkiye) ile muamele edilmiştir. Diskler, PBS içerisinde 1 hafta boyunca +37°C'de inkübe edilmiştir.1. haftanın sonunda, PBS Eppendorf tüpe alınarak dentin disklerinin üzeri distile su ile nazikçe yıkanmış ve kurulanmıştır. CHX tekrar uygulanarak diskler tekrar inkübe edilmiştir. Bu işlem 2. ve 3. haftalarda tekrarlanmıştır. 1.,2. ve 3. haftalarda Eppendorf tüplere alınan 'refresh' numuneleri biyokimyasal analizler için -80°C'de saklanmıştır. 4. haftanın sonunda disk nazikçe yıkanarak distile su içerisine koyulmuştur.

3.2.5. Distile Su

Dentin disklerine her hangi bir ajan uygulanmadan disk yüzeyi distile su ile temizlenmiştir. Diğer deney gruplarıyla birlikte PBS içinde +37°C'de inkübe edilmiştir (Şekil 3.15). Bu işlem 1.,2. ve 3. haftalarda tekrarlanmıştır. 1.,2. ve 3. Haftalarda Eppendorf tüplere alınan 'refresh' numuneleri biyokimyasal analizler için -80°C'de saklanmıştır (Şekil 3.16). Diskler, 4. haftanın sonunda distile su içerisine koyulmuştur.



Resim 3.15: İnkübatöre alınan dentin diskleri



Resim 3.16: Eppendorf tüplere ‘refresh’ aktarılması

3.2.6. Dentin Disklerinin Homojenizasyonu ve Protein Ölçümü

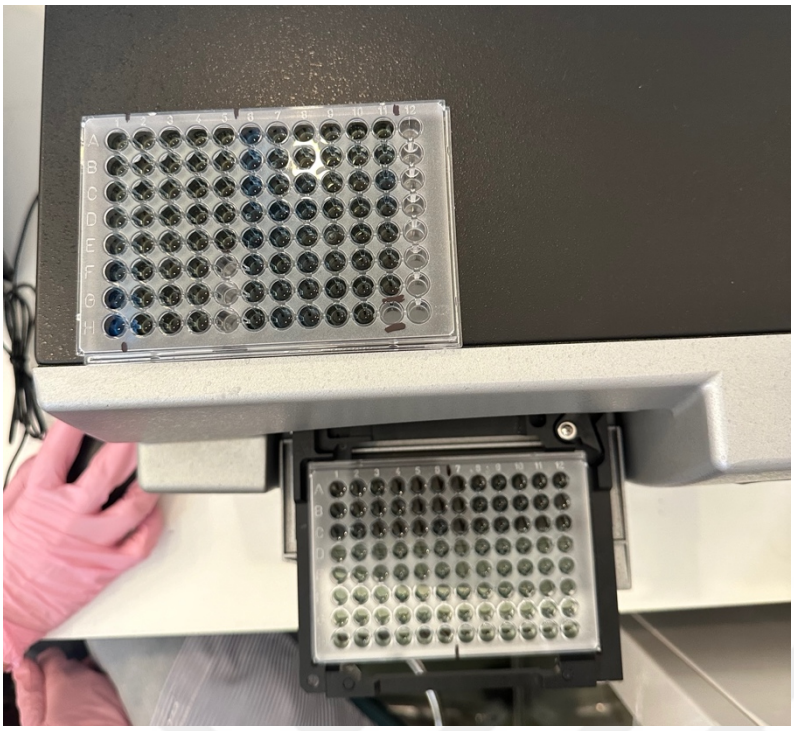
8 dentin diskinden randomize olarak seçilen 5 adet disk biyokimyasal parametrelerin değerlendirilebilmesi amacıla homojenize edilmiştir. Örnekler 1:10 oranında mg/pbs olacak şekilde bıçaklı homojenizatör cihazıyla parçalanmıştır (Resim 3.17). Ardından +4C’de 10.000G’de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir (Resim 3.18). Santrifüj işleminin ardından üste kalan homojenatlarda biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) analizlerinden önce ‘refresh’ numuneler dahil tüm örneklerin protein analizleri Bradford yöntemine dayalı olarak analiz edilmiştir (Resim 3.19). Ölçümler 595 nm dalga boyunda spektrofotometri (Synergy HTX, Biotek) ile ölçülmüştür (Resim 3.20).



Resim 3.17: Dentin disklerinin homojenizasyonu



Resim 3.18: Homojenize dentin disklerinin santrifüjlenme işlemi



Resim 3.19: Protein analizi

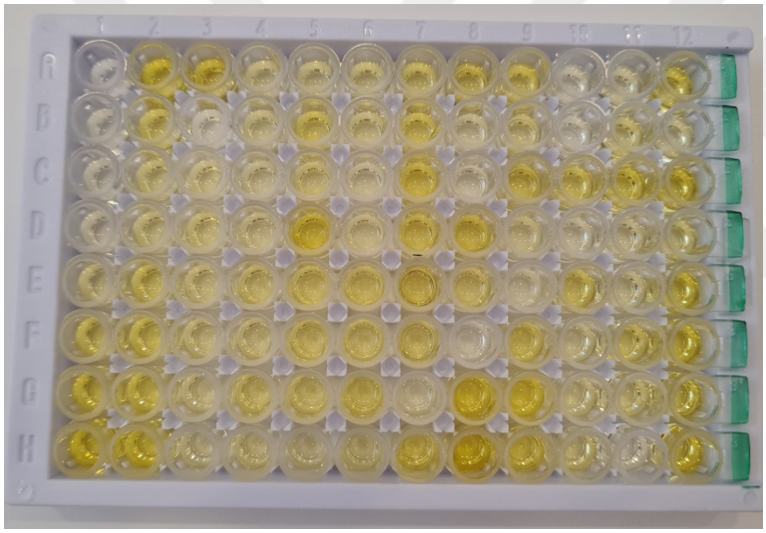


Resim 3.20: Spektrofotometri cihazı

3.2.8. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi

Tüm dentin disklerinin ve ‘refresh’ numunelerin MMP-2 (Elabscience - E-EL-H1445, Çin), MMP-9 (Elabsciece - E-EL-H6075, Çin), TIMP-1 (Elabscience - E-EL-H0184, Çin), TIMP-2 (Elabscience - E-EL-H1453, Çin) ve ICTP (Mybiosource -

MBS280531, ABD) düzeyleri enzime bağlı immünosorbent assay kiti ile üreticinin talimatlarına göre uygulanmıştır (Resim 3.21). Mikroplaka kuyulara 40 µL serum ve doku örneklerinden ve 10 µL parametreye özgü antikor eklendi. Ardından her kuyuya 50 µL streptavidin-HRP eklenmiştir. Bu karışım 37°C etüvde 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, kuyular 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Boş kuyulara 50 µL substrat A ve 50 µL substrat B eklenip karanlık bir ortamda 37°C etüvde 10 dakika tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından her kuyuya 50 µL stop solüsyonu eklenmiştir. Örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometri (Synergy HTX, Biotek) ile ölçülmüştür. Örneklerde ölçülen MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, ICTP ve CTX, düzeyleri önceden belirlenmiş standart eğriler ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.



Resim 3.21: Enzime bağlı immünosorbent testi

3.2.9. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

Tüm deney gruplarından 3'er adet dentin diski SEM (Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS) ile incelenmiştir. Yüzey kaplama işlemi öncesinde dentin kesitlerinin etanol serisi protokolü ile kurutulmuştur. Her bir dentin kesitine 5'er dakika sırasıyla %80 etanol + %90 etanol + %100 etanol + %100 etanol + %100 aseton + %100 aseton ile muamele edilmiştir. Kesitler 37 C° ısıda 24 saat boyunca inkübatörde bekletilerek tamamen kurutulması sağlanmıştır. Kesitler karbon bantlar ile stublara yapıştırıldıktan sonra yüzeydeki partikullerin giderilmesi icin argon gazı püskürtülerek temizlenmiştir.

İletkenlik sağlaması için kaplama cihazıyla (Leica, EM ACE600) 27nm C kaplanmıştır. Kaplama işleminden sonra, dentin kesitleri SEM cihazına yerleştirilerek vakumlanmıştır. Disklerin, X1000 ve X5000 büyütme altında görüntüleri alınmıştır.

3.1. İSTATİKSEL YÖNTEM

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS, sürüm 22 (IBM SPSS for Windows, Armonk, NY; BM Corp.) paket programı ile yapılmıştır. Öncelikle değişkenlere ilişkin verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için ShapiroWİLK testi kullanılmış ve verilerin normal dağıldığı görülmüştür. Bu nedenle parametrik testler kullanılmıştır. Sürekli değişkenleri gruplar arasında karşılaştırmak için ONE WAY ANOVA testi, değişkenlerin her grup içindeki 3 zaman arasındaki değişimine Repated Anova testi kullanılmıştır. Aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri tanımlayıcı istatistik olarak verilmiştir. Zamanlar arasındaki değişim için çizgi grafiği kullanılmıştır. İstatistiksel analizde anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

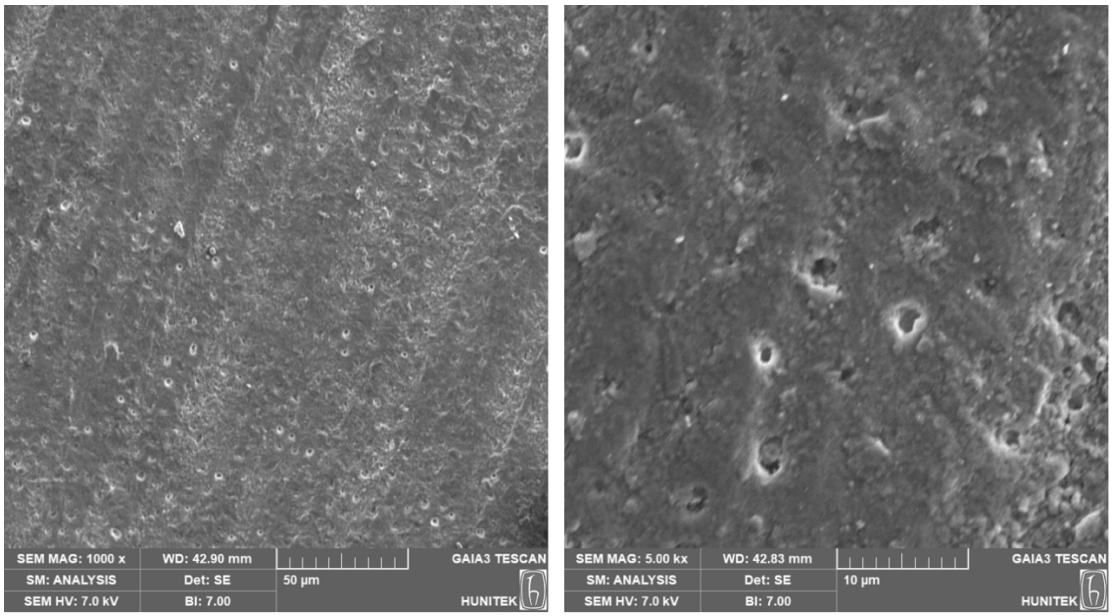
4. BULGULAR

Çalışmamızda, demineralize dentin disklerine uygulanan 45S5, S53P4 biyoaktif camların ve CHX ile kombine kullanımlarının; MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, CTX ve ICTP ekspresyonuna ve yüzey morfolojisine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar negatif kontrol grubu olan distile su ve pozitif kontrol grubu olan CHX ile karşılaştırılmıştır. Biyokimyasal analizler Elisa kitleri kullanılarak yapılmıştır. Yüzey morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda sunulmaktadır.

4.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU

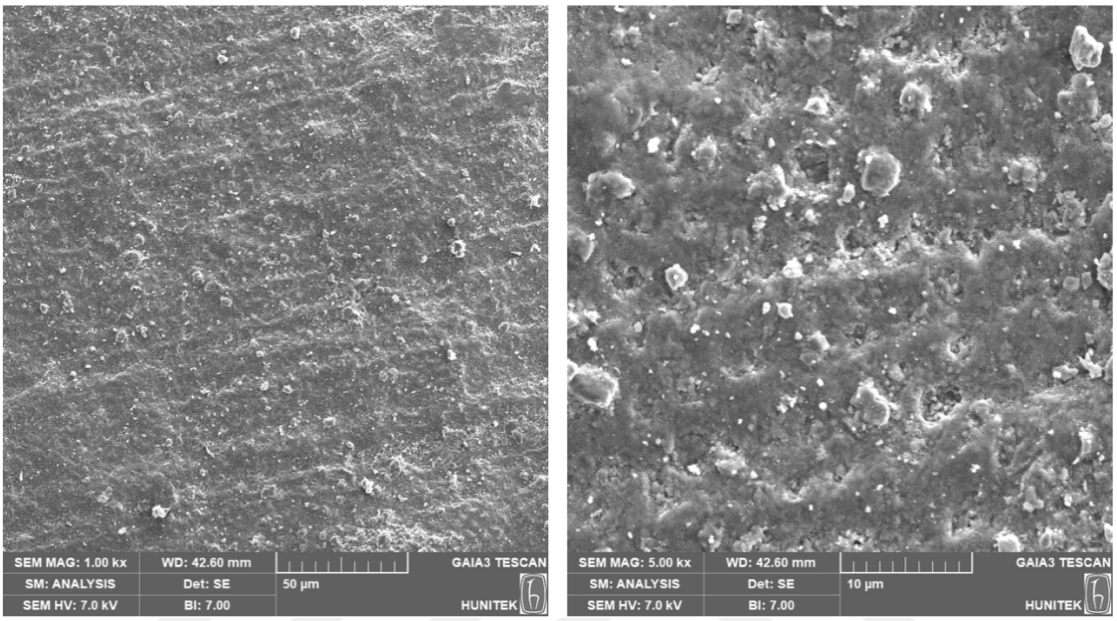
Taramalı elektron mikroskobu analizinde, 28 günlük tedavi ve inkübasyon süresinin ardından her gruptan randomize olarak seçilen 3'er adet dentin diskinin yüzey topografyası ve morfolojisi incelenmiştir. Görüntüler X1000 ve X5000 büyütme seviyelerinde elde edilmiştir.

S53P4'ün uygulandığı grupta dentin yüzeyi tamamen materyal ile kaplanmış haldedir.X1000 büyütmede tübüler yapı neredeyse izlenmemektedir. Tübül ağızları belirgin olan dentin tübüllerinin neredeyse tamamının tıkalı olduğu ve çapının azaldığı görülmektedir (Resim 4.1).



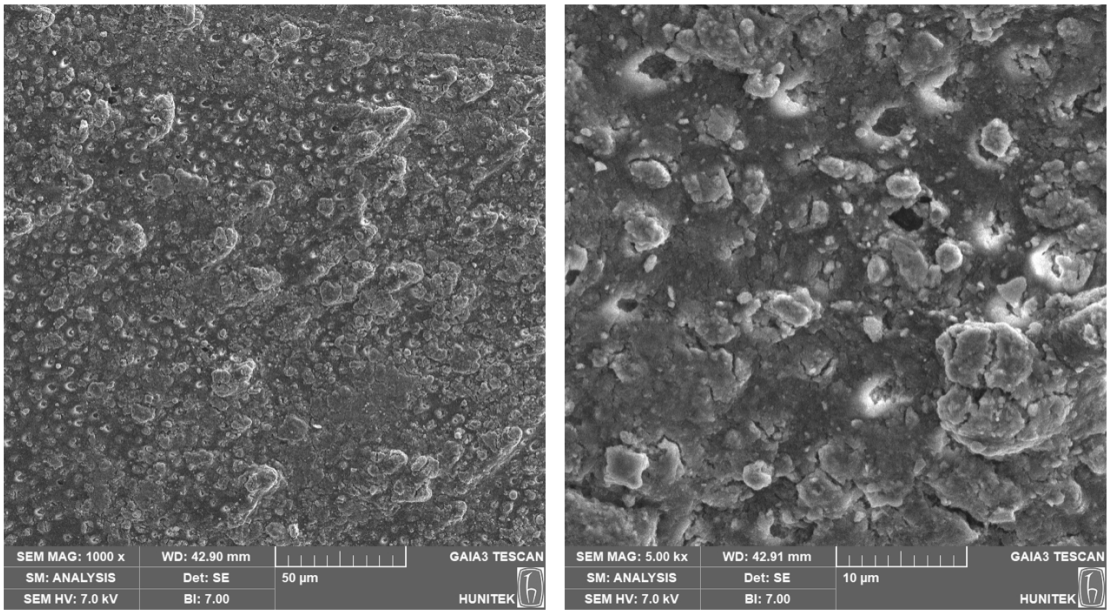
Resim 4.1: S53P4 uygulanmasından sonra demineralize dentin disklerinin; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikrosokobu görüntüleri

45S5'in uygulandığı grupta dentin yüzeyi tamamen materyal ile kaplanmış haldedir. X1000 büyütmede tübüler yapı izlenememektedir. Tüm dentin tübülleri tıkanmış durumdadır ve tübül ağızları belirgin şekilde ayırt edilememektedir (Resim 4.2).



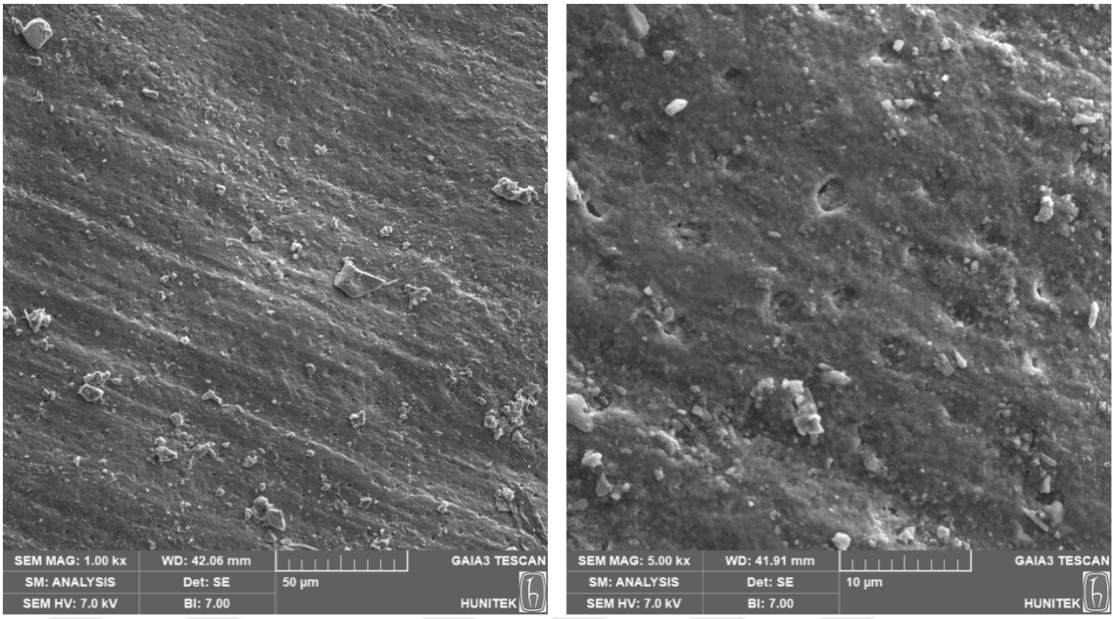
Resim 4.2: 45S5 uygulanmasından sonra demineralize dentin disklerinin; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikrosokobu görüntüleri

45S5'in CHX ile kombine olarak uygulandığı üçüncü grupta yalnızca 45S5 uygulanan gruba kıyasla X1000 büyütmede tübüler yapı daha belirgindir. Neredeyse tüm dentin tübülleri tıkalı haldedir. Dentin tübüllerinin çaplarının azaldığı görülmektedir (Resim 4.3).



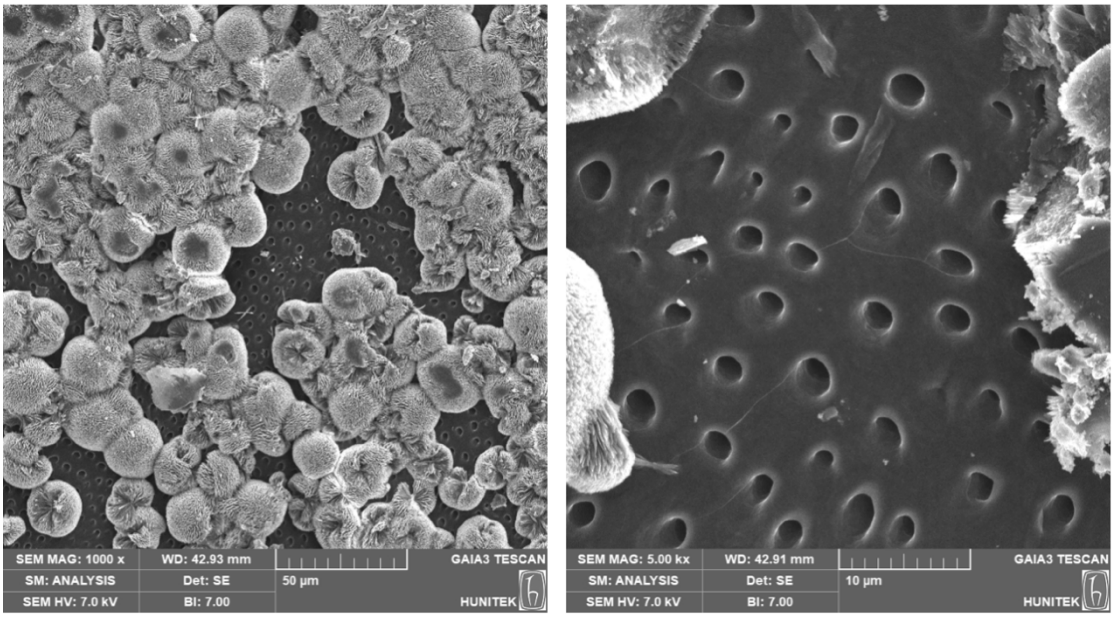
Resim 4.3: Demineralize edilen dentin disklerine klorheksidin ön işlemi ve 45S5 uygulanmasından sonra; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

S53P4'ün CHX ile kombine olarak uygulandığı dördüncü grup, yalnızca S53P4 uygulanan grupla benzer tübüler görüntü göstermektedir. X1000 büyütmede tübüler yapı neredeyse izlenememektedir. Materyal tüm dentin yüzeyini kaplamış haldedir. Neredeyse tüm dentin tübülleri tıkalı haldedir. Dentin tübüllerinin çaplarının azaldığı görülmektedir (Resim 4.4).



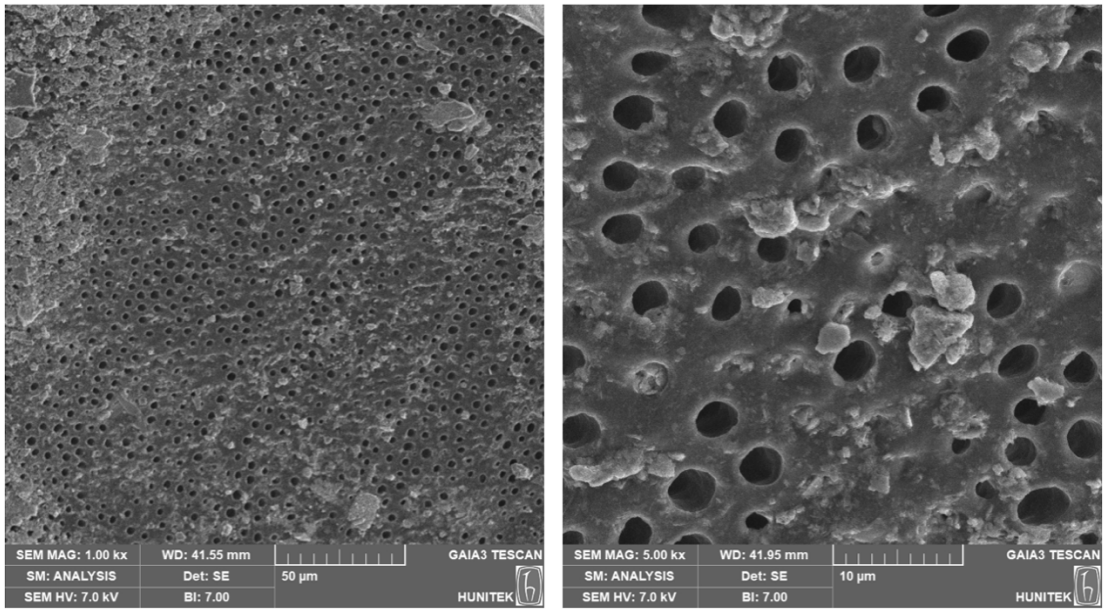
Resim 4.4: Demineralize dentin disklerine klorheksidin ön işlemi ve S53P4 uygulanmasından sonra; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

Yalnızca CHX uygulanan beşinci grupta, dentin tübülleri belirgin şekilde izlenmektedir (Resim 4.5). Dentin tübüllerinin ağızları yuvarlak haldedir. Bu durum peritübüler dentinin yüzeysel demineralizasyonunu göstermektedir. Dentin yüzeyi homojen tübüler bir yapı göstermemektedir.



Resim 4.5: Demineralize dentin disklerine klorheksidin uygulaması sonrası; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

Negatif kontrol grubunda (distile su), dentin tübüllerinde mineral kayıplarına bağlı olarak lümenlerin deforme olduğu gözlenmektedir (Resim 4. 6).



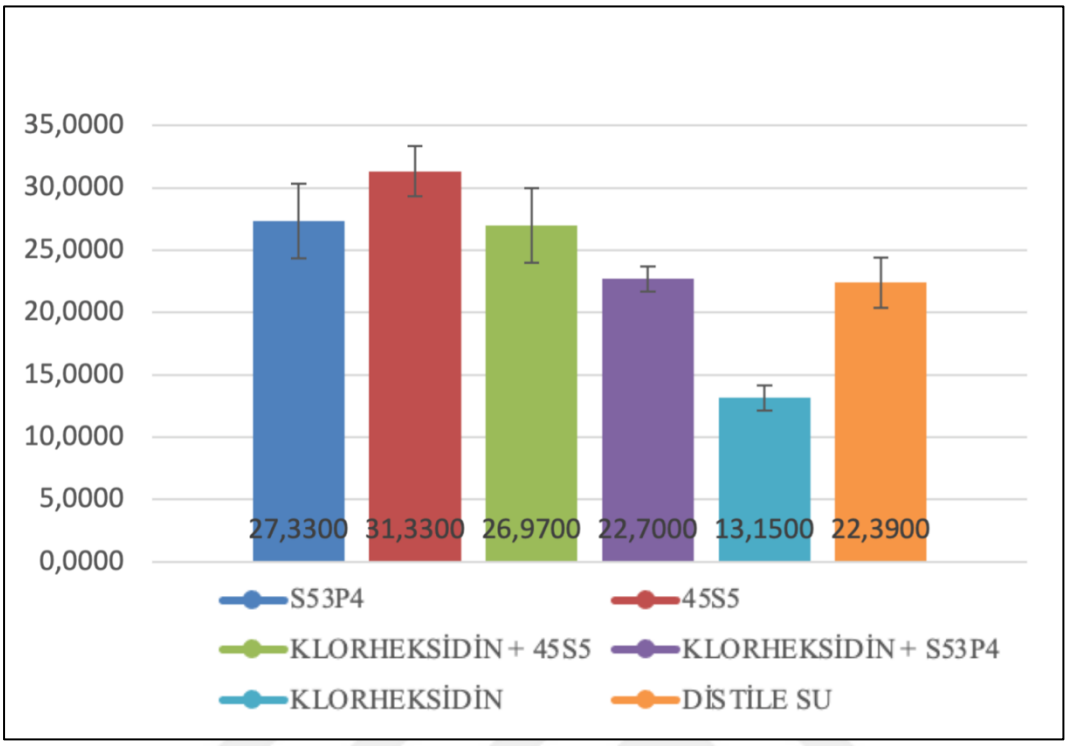
Resim 4.6: Negatif kontrol grubunun; sırasıyla X1000 ve X5000 büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Tüm gruplardan elde edilen homojenatların ve 1., 2., 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerin enzimatik aktivitesi değerlendirilmiştir. Ölçümler MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve ICTP ELISA kitleri kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda sunulmaktadır.

4.2.1. Matriks Metelloproteinaz 2

Gruplardan elde edilen homojenatlarda, MMP-2 ekspresyonunun en yüksek değerden en düşük değere doğru; 45S5 (31,33±2,09), S53P4 (27,33±3,63), CHX+ 45S5 (26,97±3,48), CHX+ S53P4 (22,7±1,86), distile su (22,39±2,93) ve CHX (13,15±1,73) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.). Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.1: Homojenatların matriks metalloproteinaz 2 değerleri

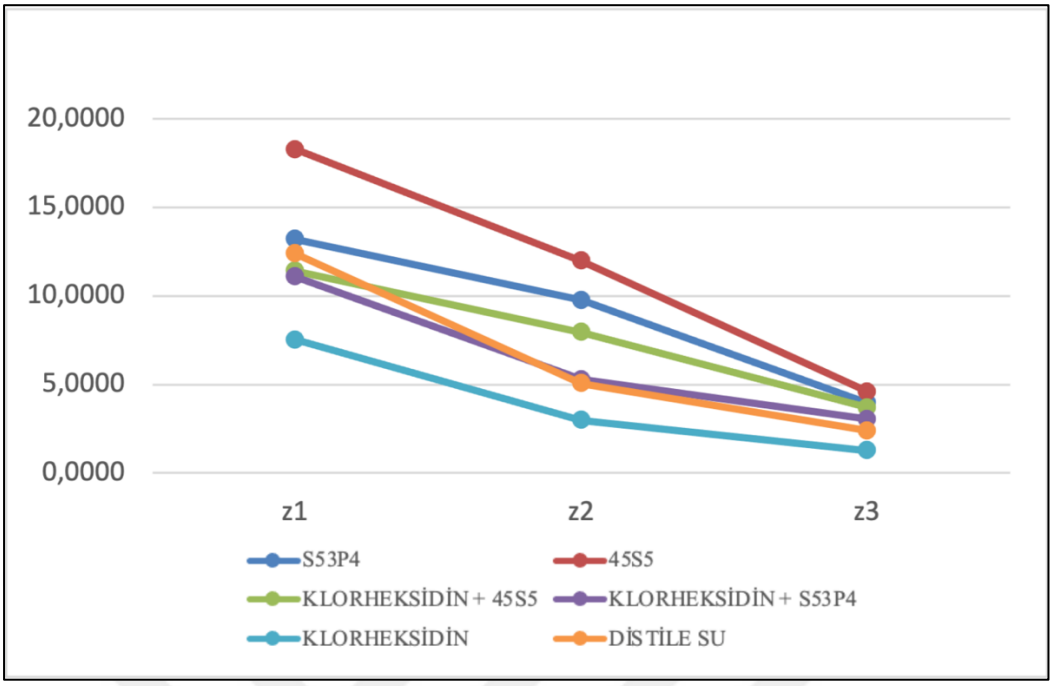
Gruplardan elde edilen 1.,2. ve 3. 'refresh' numunelerde, MMP-2 değerlerinin homojenatlarla uyumlu olarak, en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla 45S5, S53P4, CHX+ 45S5, CHX+ S53P4, distile su ve CHX olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). (Tablo 4.1).

Anova sonrası ikili kıyaslamalar için Post hoc testlerinden TUKEY testi yapıldı. İkili kıyaslamalarda; S53P4 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve CHX+S53P4 ($p=0,001$), 45S5 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve distile su ($p=0,001$), CHX+45S5 ve CHX ($p<0,001$), CHX+S53P4 ve 45S5 ($p=0,001$), CHX+S53P4 ve CHX ($p< 0,001$), CHX ve distile su ($p=0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.1: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinaz-2 değerleri

	Gruplar	Sonuçlar	p
1.Hafta	S53P4	13,01±1,3	<0,001
	45S5	18,24±2,46	
	CHX+45S5	11,61±1,23	
	CHX+S53P4	11,06±2	
	CHX	7,51±0,89	
	Distile Su	12,37±1,63	
2. Hafta	S53P4	9,75±0,5	<0,001
	45S5	11,96±1,28	
	CHX+45S5	7,95±1,48	
	CHX+S53P4	5,28±1,22	
	CHX	2,97±0,7	
	Distile Su	5,05±1,39	
3. Hafta	S53P4	3,97±0,31	<0,001
	45S5	4,58±0,92	
	CHX+45S5	3,74±0,43	
	CHX+S53P4	3,04±0,23	
	CHX	1,27±0,37	
	Distile Su	2,38±0,65	

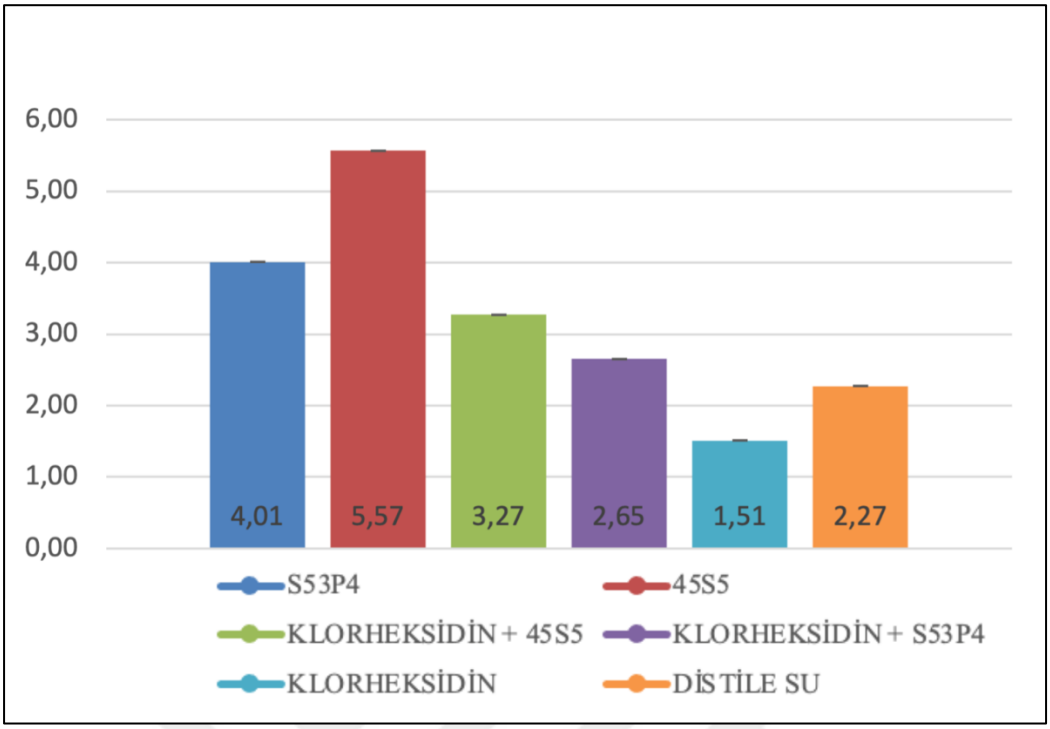
Her tedavi grubundan 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerin MMP-2 değerlerinin zaman içindeki değişimini incelendi. Tüm tedavi gruplarında MMP-2 salınımının 1. hafta en yüksek 3. hafta en düşük olduğu gözlemlendi. Zamanlar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü($p<0,001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Matriks metalloproteinaz salınımının zamana bağlı değişimi

4.2.2. Matriks Metalloproteinaz 9

Gruplardan elde edilen homojenatlarda, MMP-9 ekspresyonunun en yüksek değerden en düşük değere doğru sırasıyla; 45S5 (5,57±0,89), S53P4 (4,01±0,37), CHX+ 45S5 (3,27±0,53), CHX+ S53P4 (2,65±0,44), distile su (2,27±0,38) ve CHX (1,51±0,44) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.3: Homojenatların matriks metalloproteinaz-9 salınım değerleri

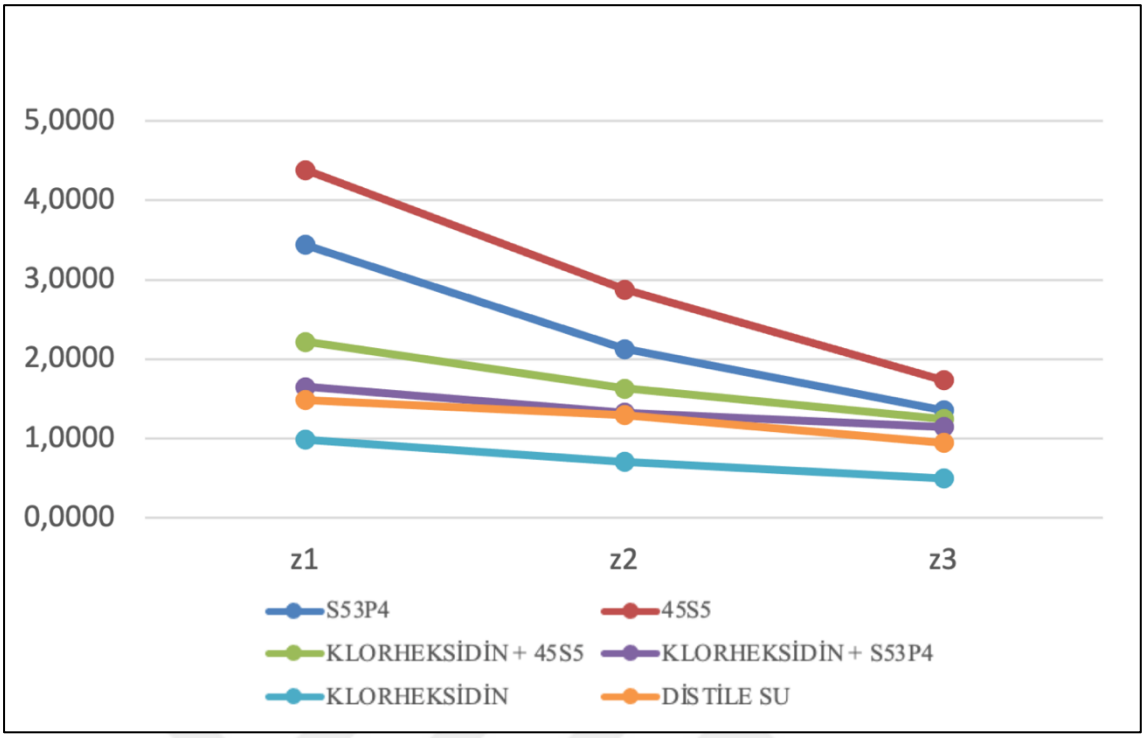
Gruplardan elde edilen 1.,2. ve 3. haftalardaki 'refresh' numunelerindeki MMP-9 değerlerinin homojenatlarla uyumlu olarak, en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla 45S5, S53P4, CHX+ 45S5, CHX+ S53P4, distile su ve CHX olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.2).

Anova sonrası ikili kıyaslamalar için Post hoc testlerinden TUKEY testi yapıldı. İkili kıyaslamalarda; S53P4 ve 45S5 ($p=0,002$), S53P4 ve CHX+S53P4 ($p=0,010$), S53P4 ve CHX ($p<0,001$), S53P4 ve distile su ($p=0,001$), 45S5 ve CHX+45S5 ($p<0,001$), 45S5 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve distile su ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ve CHX ($p=0,001$), CHX+ S53P4 ve CHX ($p=0,047$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.2: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinaz-9 değerleri

	Gruplar	Sonuçlar	p
1. Hafta	S53P4	3,49±0,53	<0,001
	45S5	4,38±0,39	
	CHX+45S5	2,2±0,31	
	CHX+S53P4	1,65±0,31	
	CHX	0,99±0,25	
	Distile Su	1,49±0,11	
2.Hafta	S53P4	2,13±0,66	<0,001
	45S5	2,88±0,41	
	CHX+45S5	1,63±0,28	
	CHX+S53P4	1,33±0,18	
	CHX	0,71±0,21	
	Distile Su	1,3±0,31	
3.Hafta	S53P4	1,37±0,2	<0,001
	45S5	1,74±0,19	
	CHX+45S5	1,26±0,11	
	CHX+S53P4	1,15±0,19	
	CHX	0,49±0,15	
	Distile Su	0,95±0,2	

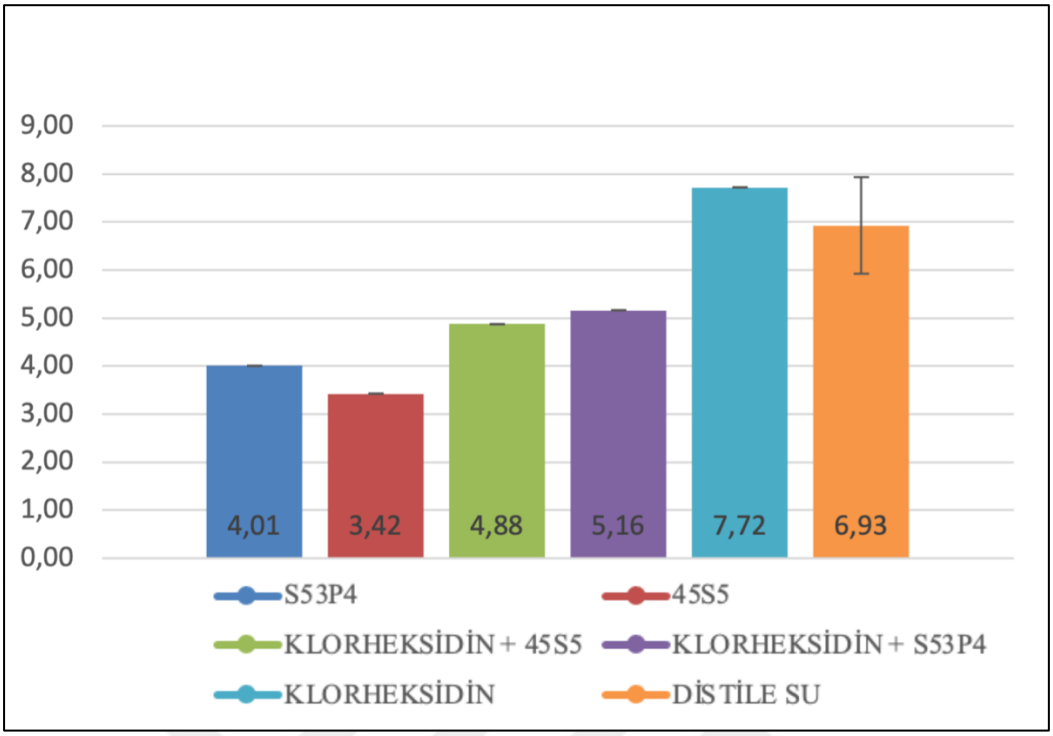
Her tedavi grubundan 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerin MMP-9 değerlerinin zaman içindeki değişimini incelendi. Tüm tedavi gruplarında MMP-9 salınımının 1. hafta en yüksek 3. hafta en düşük olduğu gözlemlendi. Zamanlar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Matriks metalloproteinaz 9 salınımının zaman içerisindeki değişimi

4.2.3. Matriks Metalloproteinazlara Spesifik Doku İnhibitörü-1

Gruplardan elde edilen homojenatlarda, TIMP-1 ekspresyonunun en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla CHX, distile su, CHX+ S53P4, CHX+ 45S5, S53P4 ve 45S5 olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5). Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.5: Homojenatların matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 salınım değerleri

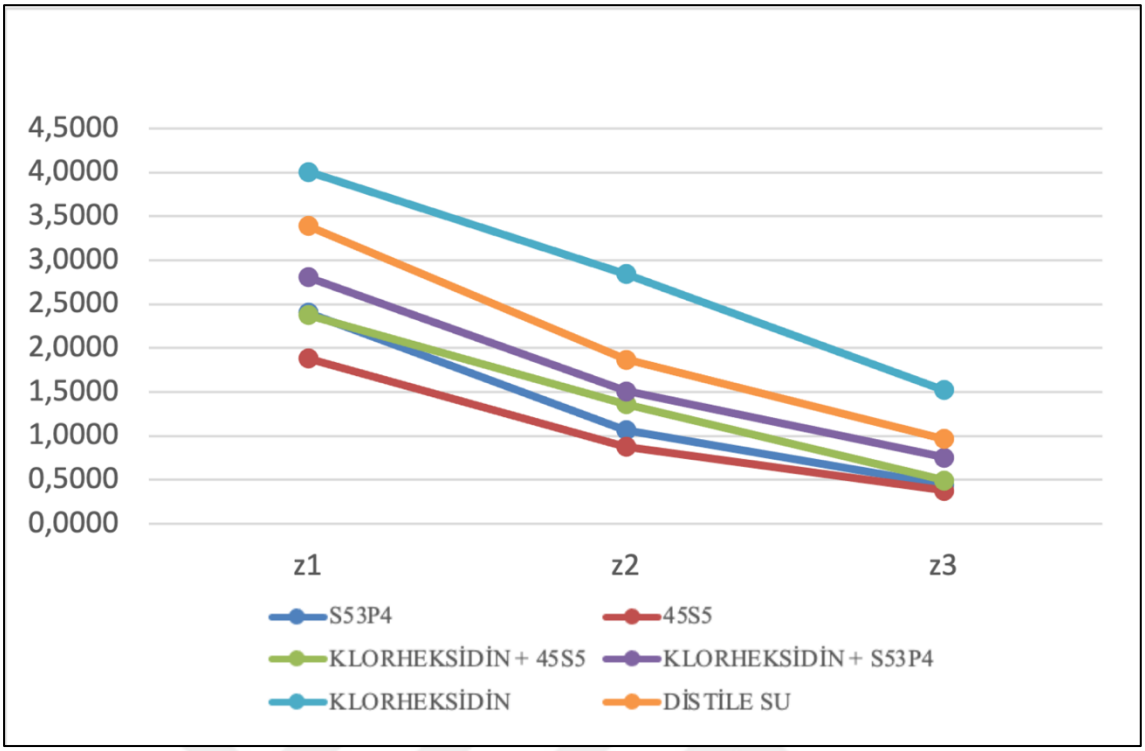
Gruplardan elde edilen 1.,2. ve 3. 'refresh' numunelerinin, TIMP-1 değerlerinin homojenatlarla uyumlu olarak, en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla CHX, distile su, CHX+ S53P4, CHX+ 45S5, S53P4 ve 45S5 olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.3).

Anova sonrası ikili kıyaslamalar için Posthoc testlerinden TUKEY testi yapıldı. İkili kıyaslamalarda; S53P4 ve CHX ($p<0,001$), S53P4 ve distile su ($p<0,001$), 45S5 ve CHX+ 45S5 ($p=0,026$), 45S5 ve CHX+ S53P4 ($p=0,005$), 45S5 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve distile su ($p<0,001$), CHX+45S5 ve CHX ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ve distile su ($p=0,001$), CHX+ S53P4 ve CHX ($p< 0,001$), CHX+ S53P4 ve distile su ($p=0,007$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.3:'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 değerleri

	Gruplar	Sonuçlar	p
1. Hafta	S53P4	2,41±0,25	<0,001
	45S5	1,89±0,5	
	CHX+45S5	2,44±0,36	
	CHX+S53P4	2,81±0,42	
	CHX	4,01±0,62	
	Distile Su	3,39±0,35	
2. Hafta	S53P4	1,07±0,1	<0,001
	45S5	0,88±0,07	
	CHX+45S5	1,36±0,34	
	CHX+S53P4	1,51±0,28	
	CHX	2,85±0,62	
	Distile Su	1,87±0,33	
3. Hafta	S53P4	0,44±0,07	<0,001
	45S5	0,38±0,05	
	CHX+45S5	0,51±0,08	
	CHX+S53P4	0,76±0,08	
	CHX	1,52±0,32	
	Distile Su	0,97±0,19	

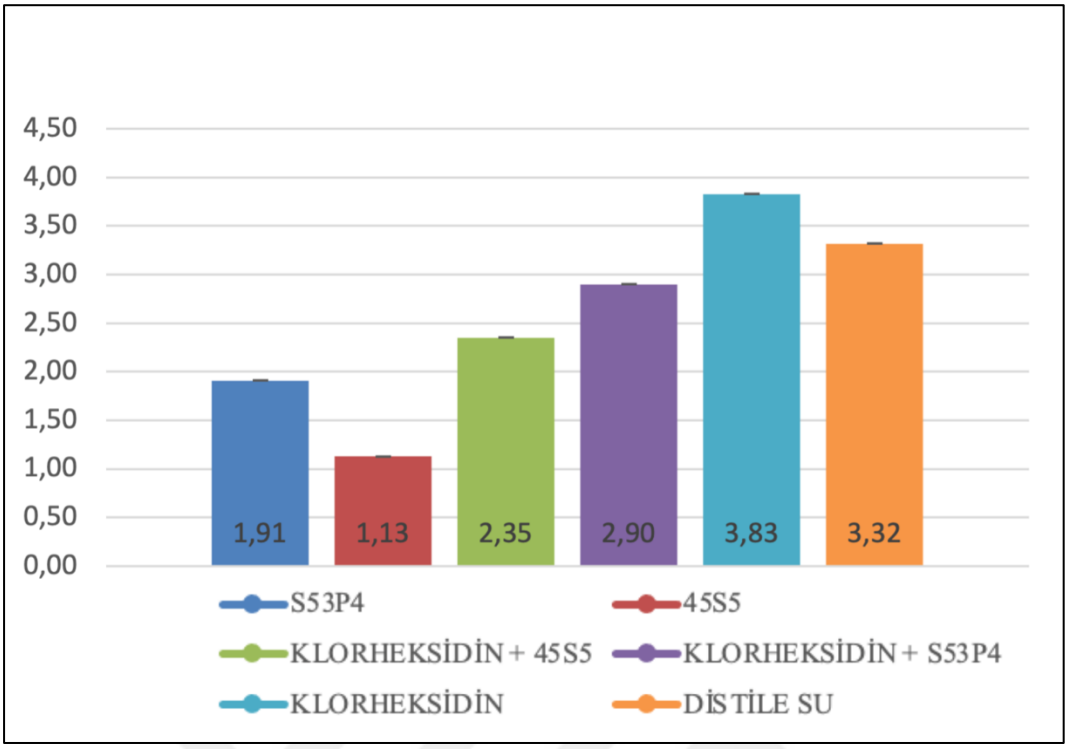
Her tedavi grubundan 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerinin TIMP-1 salınımlarının zaman içindeki değişimini incelendi. Tüm tedavi gruplarında TIMP-1 salınımının 1. hafta en yüksek 3. hafta en düşük olduğu gözlemlendi. Zamanlar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-1 salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi

4.2.4. Matriks Metalloproteinazlara Spesifik Doku İnhibitörü-2

Gruplardan elde edilen homojenatlarda, TIMP-2 değerlerinin en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla CHX, distile su, CHX+ S53P4, CHX+ 45S5, S53P4 ve 45S5 olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7). Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.7: Homojenatların matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 değerleri

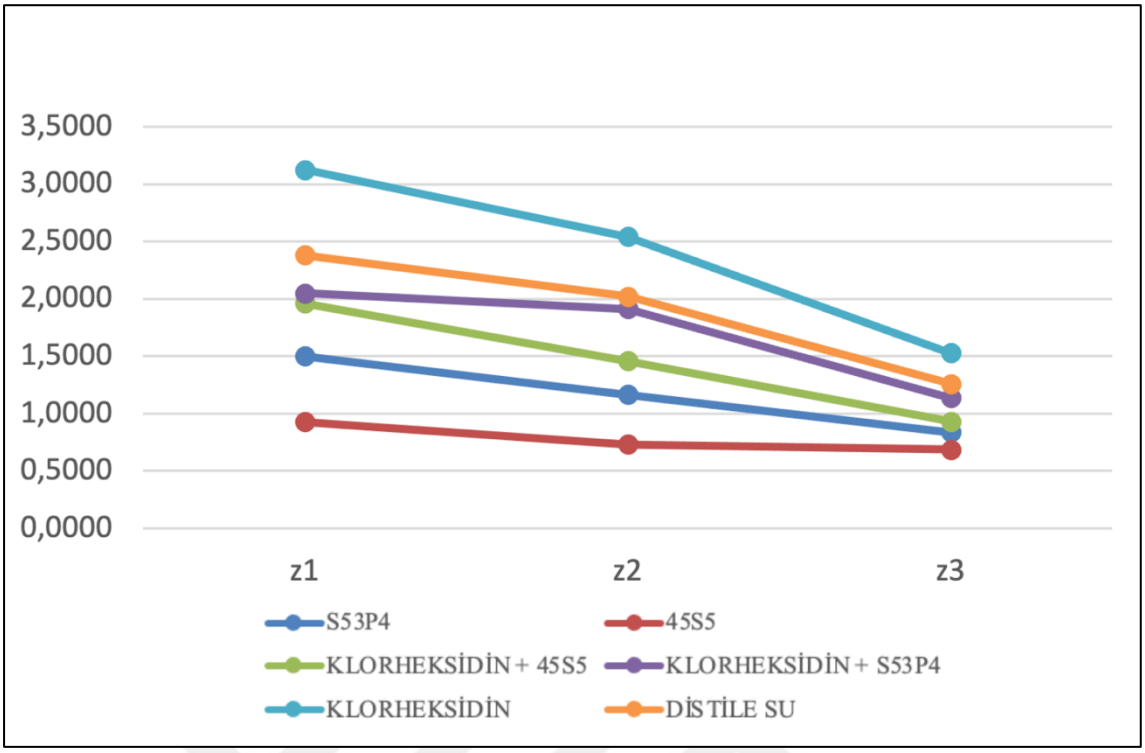
Gruplardan elde edilen 1.,2. ve 3 'refresh' numunelerde, TIMP-1 değerlerinin homojenatlarla uyumlu olarak, en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla CHX, distile su, CHX+ S53P4, CHX+ 45S5, S53P4 ve 45S5 olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.4).

Anova sonrası ikili kıyaslamalar için Post hoc testlerinden TUKEY testi yapıldı. İkili kıyaslamalarda; S53P4 ve 45S5 ($p=0,033$), S53P4 ve CHX+S53P4 ($p=0,005$), S53P4 ve CHX ($p<0,001$), S53P4 ve distile su ($p<0,001$), 45S5 ve CHX+ 45S5 ($p<0,001$), 45S5 ve CHX+ S53P4 ($p<0,001$), 45S5 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve distile su ($p<0,001$), CHX+45S5 ve CHX+S53P4 ($p=0,404$), CHX+45S5 ve CHX ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ve distile su ($p=0,009$), CHX+ S53P4 ve CHX ($p=0,008$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.4: 'Refresh' numunelerin matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 salınım değerleri

	Gruplar	Sonuçlar	p
1. Hafta	S53P4	1,5±0,24	<0,001
	45S5	0,93±0,21	
	CHX+45S5	1,9±0,27	
	CHX+S53P4	2,05±0,26	
	CHX	3,13±0,47	
	Distile Su	2,38±0,42	
2. Hafta	S53P4	1,16±0,31	<0,001
	45S5	0,73±0,11	
	CHX+45S5	1,46±0,37	
	CHX+S53P4	1,91±0,31	
	CHX	2,54±0,4	
	Distile Su	2,02±0,29	
3. Hafta	S53P4	0,83±0,17	<0,001
	45S5	0,69±0,11	
	CHX+45S5	0,99±0,37	
	CHX+S53P4	1,14±0,14	
	CHX	1,53±0,28	
	Distile Su	1,26±0,16	

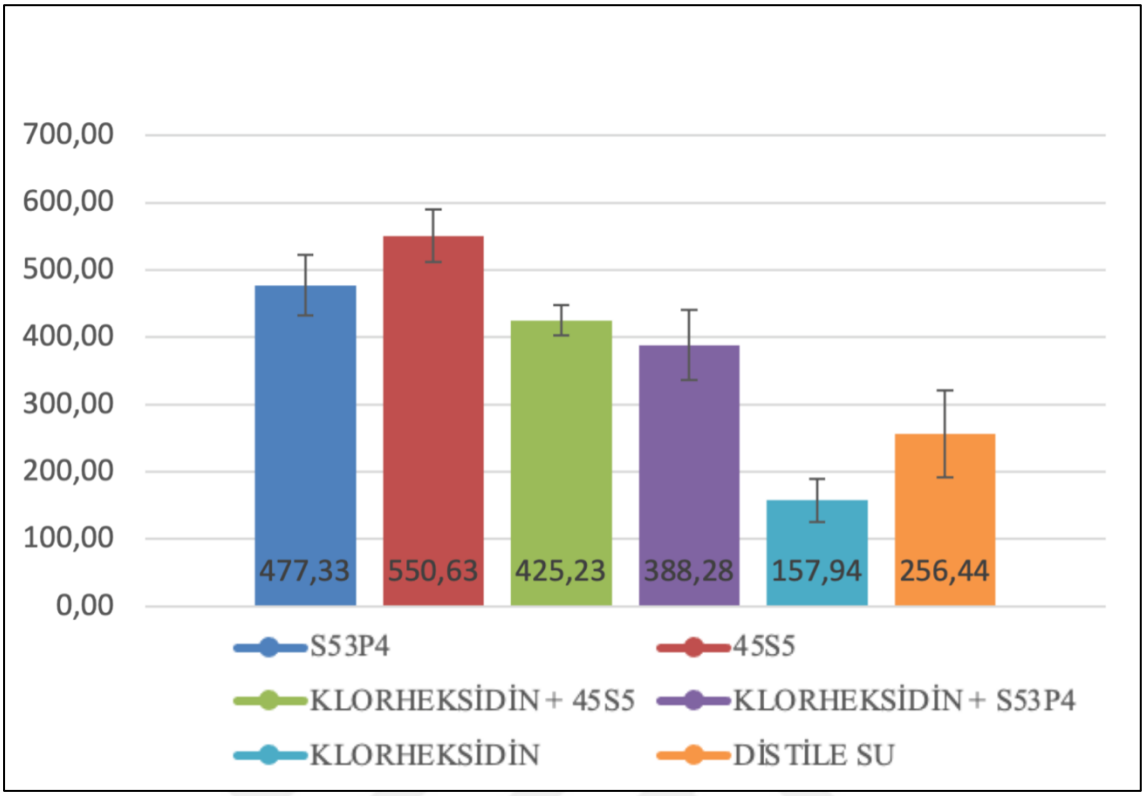
Her tedavi grubundan 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerdeki TIMP-2 değerleri imcelendi, zaman içindeki değişim kıyaslandı. Tüm tedavi gruplarında TIMP-2 salınımının 1. hafta en yüksek 3. hafta en düşük olduğu gözlemlendi. Zamanlar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Matriks metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörü-2 salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi

4.2.5. Tip I Kolajenin C-terminal Telopeptitleri

Gruplardan elde edilen homojenatlarda, ICTP değerlerinin en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla 45S5, S53P4, CHX+ 45S5, CHX+ S53P4, distile su ve CHX olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9). Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Şekil 4.9: Homojenatların tip I kolajen C-terminal telopeptitleri değerleri

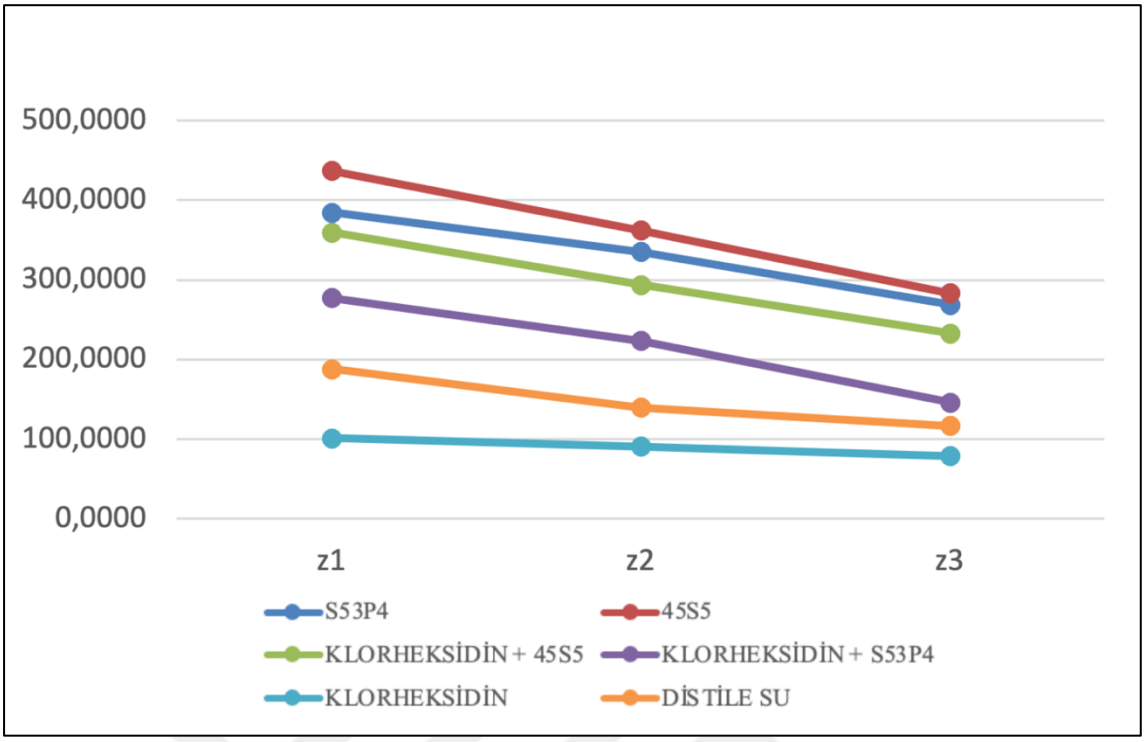
Gruplardan elde edilen 1.,2. ve 3. 'refresh' numunelerde, ICTP değerlerinin homojenatlarla uyumlu olarak, en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla 45S5, S53P4, CHX+ 45S5, CHX+ S53P4, distile su ve CHX olduğu gözlemlendi. Gruplar arasındaki ortalama farklara bakıldı. Gruplar arası ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.5).

Anova sonrası ikili kıyaslamalar için Post hoc testlerinden TUKEY testi yapıldı. İkili kıyaslamalarda; S53P4 ve CHX ($p<0,001$), S53P4 ve distile su ($p<0,001$), 45S5 ve CHX+45S5 ($p=0,002$) 45S5 ve CHX+ S53P4 ($p<0,001$), 45S5 ve CHX ($p<0,001$), 45S5 ve distile su ($p<0,001$), CHX+45S5 ve CHX ($p<0,001$), CHX+45S5 ve distile su ($p<0,001$), CHX+S53P4 ve CHX ($p<0,001$), CHX+S53P4 ve distile su ($p=0,003$), CHX ve distile su ($p=0,044$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 4.5: 'Refresh' numunelerin tip I kolajen C-terminal telopeptit salınım değerleri

	Gruplar	Sonuçlar	p
1. Hafta	S53P4	386,5±19,68	<0,001
	45S5	437,2±20,1	
	CHX+45S5	355,43±33,75	
	CHX+S53P4	277,54±12,15	
	CHX	101,38±18,65	
	Distile Su	187,75±17,21	
2. Hafta	S53P4	335,17±21,33	<0,001
	45S5	361,94±50,19	
	CHX+45S5	293,75±24,93	
	CHX+S53P4	223,36±20,71	
	CHX	90,48±11,76	
	Distile Su	139,69±14,76	
3. Hafta	S53P4	275,05±36,03	<0,001
	45S5	283,3±33,08	
	CHX+45S5	240,07±33,82	
	CHX+S53P4	145,98±20,31	
	CHX	78,73±9,21	
	Distile Su	116,4±13,33	

Her tedavi grubundan 1., 2. ve 3. haftalarda elde edilen 'refresh' numunelerdeki ICTP miktarlarının zaman içindeki değişimini incelendi. Tüm tedavi gruplarında ICTP salınımının 1. hafta en yüksek 3. hafta en düşük olduğu gözlemlendi. Zamanlar arasında istatiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Tip I kolajenin C-terminal telopeptitlerinin salınım düzeylerinin zaman içerisindeki değişimi

5. TARTIŞMA

Dişler, oral kavitede sürekli olarak demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsüne maruz kalmaktadır. Patolojik durumlarda, diş sert dokularının demineralizasyonu, remineralizasyondan daha hızlı gerçekleşmektedir (252). Mineralize dokuların geri dönüşümsüz kaybı, dişlerin fonksiyonu ve morfolojisi üzerinde ciddi etkiler yaratmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya çapında, yaklaşık 2 milyar yetişkinin ve 514 milyon çocuğun diş çürüğünden etkilendiği bildirmektedir (253). Diş çürüğünün geleneksel invaziv yöntemlerle restore edilmesi dokularda geri dönüşümsüz ve yıkıcı bir hasar meydana getirmektedir (1). Bu nedenle, doğal dokunun korunmasını teşvik eden, minimal doku kaybıyla çürük ilerlemesini durduracak prosedürlerin geliştirilmesi gerekmektedir (254).

Dentinin remineralizasyonu, demineralize dentin dokusundaki mineral kristallerinin eksikliği ve açığa çıkan organiks matriks sebebiyle mineye kıyasla daha az etkili ve kompleks bir yapıdadır. Klasik iyon bazlı kristalleşme kavramı dentinin remineralizasyon süreci için yeterli görülmemektedir (98). Fan ve ark. yaptıkları çalışmada, aynı remineralizasyon koşulları altında asitle demineralize edilmiş mine dokusunda remineralizasyon görülürken, dentinde remineralizasyon görülmediğini rapor etmektedir (255). Geleneksel flor uygulamalarının ve mine dokusunu remineralize etmek için kullanılan ajanların dentin dokusu üzerindeki etkileri sınırlıdır (256).

Biyomineralizasyon süreci, matriks parçacıklarının aracılık ettiği klasik olmayan bir kristalleşme yoludur (257). Dentin biyomineralizasyonunda, ESM proteinleri, apatit çekirdeklenmesini ve büyümesini kontrol etmektedir. Birçok biyomineralizasyon yolunda, geçici ACP nano-prekursorlerin varlığı tespit edilmiştir (258). Bu nedenle, sıvı ACP nano-prekursor parçacıkları kullanılarak doğal mineralizasyon süreci taklit edilmektedir (259). Dentin biyomineralizasyonunda, ekstrafibriler kolajen matriksindeki apatit içeriğinin artmasıyla birlikte intrafibriler mineralizasyonun sağlanması hedeflenmektedir (122). Bertassoni ve ark., dentinin mekanik özelliklerinin intrafibriler mineralizasyon yoluyla iyileştiğini ve bu iyileşmenin dokunun işlevselliğini korumak için kritik öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır (260).

Yapılan çalışmalarda, biyomimetik remineralizasyon stratejisiyle etch and rinse sistemler ile oluşturulan hibrit tabakanın remineralize olduğu gösterilmiştir (261–263). Self etch adezivler ile yapılan çalışmalarda da, oluşan hibrit tabakanın biyomimetik

ajanlar ile iyileştirildiği bildirilmiştir (264–266). Bununla birlikte, tamamen demineralize olmuş 250–300 μm kalınlığındaki dentin lezyonlarının biyomimetik ajanlar ile remineralize edildiği gösterilmiştir (267,268). Kim ve ark., biyomimetik remineralizasyon stratejilerinin kullanımıyla hibrit tabakada açıkta kalmış kolajenin mekanik özelliklerinin mineralize dentine yaklaşarak rezin-dentin bağlantısının dayanıklılığının artacağını savunmaktadır (269).

Biyoaktif camlar, Larry. L. Hench ve ark. tarafından 1969 yılında geliştirilmiştir (6). Kemik rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılan BAG, apatit oluşumunda oldukça etkili biyoaktif bir malzemedir (122). BAG'ların yüksek biyoaktif özellik göstermesi nedeniyle, diş hekimliğinin çeşitli alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (270,271). BAG'lar üzerinde yapılan çalışmalar mine ve dentin remineralizasyonunda etkili olduğunu göstermektedir (272,273).

Günümüzde, BAG aracılı apatit oluşumuyla dentinin remineralize edilmesi yaklaşımı üzerinde durulmaktadır. 45S5 üzerinde yapılan çalışmalar, BAG'ın dentinde apatit oluşumunu artırdığını göstermektedir (274–276). Wang ve ark.'larının 45S5 BAG ve ağırlıkça %40 soda-kireç camı içeren modifiye edilmiş 45S5 BAG ile yaptıkları çalışmada, tamamen demineralize olmuş dentinde her iki BAG türünün de apatit oluşumunu desteklediği gösterilmiştir (274). Tamamen demineralize dentinde apatit oluşumunun gösterilmesi, sürecin kristalit tohumlarından bağımsız gerçekleştiğine dair önemli bir kanıt olarak görülmektedir (122). Vollenweider ve ark.'larının nano 45S5 BAG (30-50 nm) ve mikro 45S5 BAG'ları üzerinde yaptıkları çalışmada, dentin 1.,10. ve 30. günlerde BAG içeren deiyonize suya daldırılmıştır. İki tedavi grubununda da 10. günde apatit oluşumunun gözlemlendiği, 30. günde apatit oluşumunun iyice arttığı bildirilmektedir (276).

Direkt kullanımlarının yanı sıra, BAG 45S5'in indirekt teması da incelenmiştir. Wang ve ark., %33 oranda rezin içeren polikarboksilatlı BAG, polikarboksilatlı kalsiyum silikat ve polikarboksilat kalsiyum silikat katkılı bruşit mikro dolgu maddelerinin remineralizasyona etkisini araştırmıştır. Polimerize edilmiş biyoaktif rezin diskleri, asitlenmiş dentin yüzeyiyle sıkı temasta tutularak 14 gün yapay tükürük içerisinde bekletilmiştir. Çalışma sonucunda, polikarboksilat içeren BAG'ın yüksek apatit oluşumu gösterdiği görülmüştür. Polikarboksilat içeren BAG ile tedavi edilen grubun 14. günden sonra en yüksek mineral matriks oranına sahip olduğu sonuçlarına varılmıştır (275).

Günümüzde, S53P4 BAG çeşitli klinik uygulamalarda kemik grefti yerine kullanılmaktadır (277). Forsback ve ark., BAG S53P4'ün dentin remineralizasyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, BAG ile tedavi edilen dentin diskleri 14 gün boyunca SBF ve remineralizasyon solüsyonu içerisinde tutulmuştur. Çalışma sonucunda, S53P4 BAG'ın fizyolojik ortamda dentin mineralizasyonunda terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (278). Xie ve ark., S53P4 içeren simanlarla yaptıkları çalışmada BAG içeriğinin, dentin diskinin yüzeyinde önemli ölçüde kalsiyum fosfat birikimi sağladığını göstermiştir (279).

Biyoaktif cam, diş dokularının remineralizasyonuna katkı sağlamak amacıyla diş macunlarına katılmaktadır. Sensodyne® Repair and Protect, diş hassasiyetini tedavi etmek için Novamin® (45S5 BAG) içeriğinin kullanıldığı bir diş macunu örneğidir (122). Wu ve ark., BAG içeren macunun dentin dokusunun mikrosertliğini artırabileceğini ve demineralize olmuş dentinin yüzeyinde mineral birikimini teşvik edebileceğini belirtmişlerdir (280). BAG dışında, macunlarda bulunan sodyum florür ve kalsiyum florür gibi diğer bileşenler de remineralizasyon sürecinde rol oynamaktadır. Bu durumda, yalnızca BAG'ın aracılık ettiği remineralizasyon sürecinin değerlendirilebilmesi mümkün olmamaktadır (122). Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda, 45S5 ve S53P4 BAG partiküllerinin tamamen saf formlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Matriks metalloproteinazlar 20'den fazla konak kaynaklı proteolitik enzimden oluşan, çinko ve kalsiyum bağımlı, endopeptidaz sınıfı bir enzim ailesidir (281). Odontoblastlar tarafından sentezlenen MMP'ler diş gelişiminde ve dentin çürük sürecinde rol oynamaktadır (188). Bununla birlikte, MMP'ler, adeziv işlemler sırasında oluşan asidik çevrede açığa çıkmakta ve aktive olmaktadır. Dentinde bulunan MMP'ler, self-etch veya total-etch adezivler aracılığıyla açığa çıkıp aktive olduğunda tip I kolajeni parçalamaktadır (282). Kolajen fibrillerin parçalanması hem dentin remineralizasyonunu hem de rezin-dentin bağlanmasını olumsuz etkilemektedir (283).

Demineralize dentin matriksinin remineralizasyonunu teşvik etmenin (269) ve MMP aktivitesini inhibe etmenin (211,284), kolajen lifleri koruyarak rezin dentin bağlanmasını iyileştirmek amacıyla araştırılan iki temel strateji olduğu görülmektedir. Araştırmacılar, dentin bağlantısının uzun dönem stabilitesini sağlamak ve sekonder çürüklerin oluşumunu azaltmak için, iki veya daha fazla stratejiye dayanan gelişmiş biyomalzemelerin geliştirilmesini gerekli görmektedir (285,286). Çünkü biyomimetik

strateji zaman alan bir süreçtir. Demineralize olmuş kolajen fibrilleri biyomimetik remineralizasyon süreci gerçekleşmeden önce MMP'ler tarafından bozulmaya uğrayabilmektedir (287). Bu nedenle, çalışmamızda iki farklı BAG'ın remineralizasyon sürecinde rol alırkan aynı anda MMP ekspresyonuna etkisinin ne olacağını araştırmayı hedefledik.

Mineralize insan dentininde, kolejenaz olarak da adlandırılan MMP-8 (288), jelatinazlar olarak adlandırılan MMP-2 ve MMP-9 (289,290) ve enamalisin olarak adlandırılan MMP-20 (291) olmak üzere inaktif halde bulunan birkaç MMP türü tanımlanmıştır. MMP-2 ve MMP-9 jelatinazlar olarak adlandırılmasına rağmen, araştırmalar bu iki MMP türünü kolajenolitik aktivite ile ilişkilendirmiştir (292,293). Yapılan çalışmalarda, hibrit tabakanın bazal kısmında yoğun MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu tespit edilmiştir (236,288). Mevcut literatür bilgisi doğrultusunda, çalışmamızda BAG'ların MMP ailesinden MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonuna etkisinin incelenmesine karar verilmiştir.

Klorhekdisin, oral bakterilere karşı geniş etki spektrumuna sahip, yaygın olarak kullanılan bir antimikrobiyal ajandır (289). Bununla birlikte, etkin olarak MMP-2 ve MMP-9'u inhibe ettiği bildirilmektedir (202). Bu nedenle, çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak CHX grubu kullanılmış ve BAG'lar CHX ile kombine edilerek kullanılmıştır. Yapılan in vitro çalışmalarda, CHX'in yalnızca %0,02 konsantrasyonda bile dentin içinde bulunan tüm MMP'leri inaktive edebilme kapasitesine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (19,210). Çalışmalarda, CHX'in kullanım önerilerinin %2'lik konsantrasyonunun 60 saniye boyunca uygulanmasından (19,210,294–296), %0,002'lik konsantrasyonunun 15 saniye boyunca uygulanmasına kadar değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir (210,297). Araştırmacılar, CHX'in yüksek substantiviteye sahip olması nedeniyle, konsantrasyonunun ve uygulama süresinin minör öneme sahip olduğunu bildirmiştir (19,210,297). İncelenen çalışmalarda, CHX'in saf sulu çözelti formunun kullanılması gerektiği konusunda fikir birliği olduğu görülmüştür (19,210,294–296). Bu çalışmalar doğrultusunda, çalışmamızda %2'lik saf sulu CHX çözeltisi 1 dakika dentin disklerinde bekletilerek uygulanmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu analizi, yüzey morfolojisinin kalitatif ölçümü için ideal bir yöntem olarak görülmektedir (298). Geniş alan derinliği ve yüksek büyütme kapasitesiyle iki ve üç boyutlu görüntüler elde edilebildiği için diş hekimliğinde sıklıkla

tercih edilmektedir (251). Çalışmamızda dentin numunelerinin yüzey özelliklerinin ve tübül tıkanıklığının görsel değerlendirilmesi için SEM kullanımı üzerine odaklanılmıştır. SEM analizi yüksek çözünürlüklü, iki-üç boyutlu görüntüler ve topografik bilgiler sağlayan bir yöntem olduğu için seçilmiştir. Yapılan literatür taramasında, BAG kullanılarak remineralizasyonun incelendiği bir çok çalışmada yüzey özelliklerinin değerlendirilebilmesi için SEM analizinin yapıldığı görülmüştür (279,299–301). Çalışmamızda SEM analiziyle, X1000 büyütmede dentin yüzey özelliklerindeki değişimler, X5000 büyütmede dentin tübüllerinin yapısı ve kapanması, yapının homojenliği ve iskeletsel yapının oluşumu değerlendirilmiştir.

In vitro çalışmalar, sonrasında hayvanlar ve insanlar (in vivo) üzerinde test edilecek olan potansiyel yeni malzemelerin ve tekniklerin değerlendirilmesi için önemlidir (302). İn vitro çalışmalarda, ağız ortamını en iyi şekilde simüle eden ortamın oluşturulması ve çalışmayı etkileyebilecek olumsuz faktörlerin asgariye indirilmesi amaçlanmaktadır (191). Enzim aktivitesi, genellikle in vitro koşullar altında ölçülmektedir. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde amaç, belirlenmiş koşullarda mevcut olan enzim miktarlarlarını belirlemektir. Böylelikle örnekler arasında enzim aktivitesine dair farklılıklar karşılaştırılabilmektedir (303). Yapılan literatür taramasında, MMP aktivitesinin incelendiği bir çok çalışmanın in vitro koşullar altında gerçekleştirildiği görülmüştür (220,285,304–306). Bu sebeplerden ötürü, BAG'ların enzimatik aktiviteye olan etkisini değerlendirmek amacıyla çalışmamızın in vitro koşullar altında gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Deney materyali olarak diş kesitlerinin kullanıldığı çalışmalarda insan ve hayvanlardan elde edilen dişler kullanılmaktadır. Sığırlardan elde edilen dişler, insan dişlerine ulaşmanın giderek zorlaşması nedeniyle, in vitro ve in situ çalışmalarda insan dişlerinin davranışını simüle etmek amacıyla kullanılmaktadır (307–309). Sığır dişleri büyük boyutlu olmaları nedeniyle de tercih edilebilmektedir (310,311). Sığır dentiniyle insan dentininin MMP aktivasyonunun kıyaslandığı çalışmada, hem sığır hem de insan dentininden elde edilen substratların, MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin araştırılması amacıyla kullanılabileceğini gösterilmiştir. Ancak, elde edilen bulgular sığır dentinindeki toplam MMP-2 aktivitesinin hem kök hem krondan elde edilen numuneler için insan dentinine kıyasla %30 oranda daha düşük olduğunu göstermiştir (312). Bu bilgilerden yola çıkılarak, çalışmamızda çekilmiş insan dişlerinin kullanılması tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılmak üzere toplanan dişlerin uygun koşullarda saklanması büyük önem taşımaktadır. Dişlerin, dehidratasyonun önlenmesi amacıyla çekimden hemen sonra saklama solüsyonuna konulması gerekmektedir. Bu solüsyon, süreç içerisinde bakteriyel ve fungal büyümeyi önleyecek özellikte olmalıdır (313). Literatür incelendiğinde distile su, fizyolojik salin, yapay tükürük, Hanks' ın Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS), etanol, metanol, glutaraldehit, formalin, sodyum hipoklorit, sodyum azit, sıvı kloramin, timol solüsyonları, Homofix (70 mL su, 30 mL gliserol ve 4 g fenol), setilpiridinyum klorür, hidrojen peroksit ve mineral yağların saklama solüsyonu olarak kullanıldığı görülmüştür (313–323). Goodis ve ark. yaptığı çalışmada, timol içeren solüsyonların dentinin organik veya inorganik içerikleri üzerinde etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (321). Antibakteriyel özellikleri nedeniyle çalışmalarda timol içerikli solüsyonların kullanımının tercih edildiği görülmüştür (324,325). Farklı çalışmalarda, timol %0.02'den %0.1'e kadar değişen çeşitli konsantrasyonlarda ve 24 saatten 6 aya uzanan depolama sürelerinde kullanılmıştır (324–326). İncelenen in vitro çalışmalarda, %0,1 konsantrasyonda timol solüsyonunun tercih edildiği görülmüştür (327,328). Timol hafif asidik bir yapıya sahip olduğu için uzun süreli depolamada diş yapısının mineral içeriğini etkileyebileceği düşünülmektedir (325). Aydın ve ark., çeşitli saklama solüsyonları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, iki aylık saklama süresi sonunda mikrosertlik değerlerinin normal aralıklarda olduğunu, ancak bu sürenin on iki aya uzatılmasıyla değerlerde anlamlı bir azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir (329). İncelenen çalışmalar doğrultusunda, çalışmamızda kullanılmak üzere çekilen dişler %0,1'lik timol solüsyonunda en fazla 2 ay bekleyecek şekilde saklanmıştır.

Bakteriyel asitler (laktik asit), diyet asitleri (sitrik asit, PA ve asetik asit) ve mide asidi (hidroklorik asit) çürük ve asit erozyonu süreçleri aracılığıyla dentin dokusunu demineralize etmektedir. İn-vitro remineralizasyon çalışmalarında, sağlam diş yüzeyleri üzerinde erozyon ve çürükle ilişkili asitlerle benzer etkileri yaratacak demineralizasyon modellerine ihtiyaç duyulmaktadır (330). Bu amaçla, pH değeri düşük çeşitli asitlerin kullanımını içeren kimyasal model yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmanın basit olması, düşük maliyet, zaman tasarrufu, tekrarlanabilirlik ve deneyin kararlılığı bu modelin avantajlarındandır. Ancak, in vitro demineralizasyonun biyolojik bir süreç değildir ve karmaşık ağız ortamını tam olarak taklit edemez. Hiçbir model tüm deneysel tasarımlar için %100 uygunluk göstermez. Bu nedenle, deneysel hedeflerin gereksinimlerini karşılayacak seçim yapılması gerekmektedir (331).

Restoratif prosedürlerde, kolajen fibril ağını ortaya çıkarmak ve adeziv rezinlerin mikromekanik tutunmasını sağlamak amacıyla %32 ila %37 PA kullanılmaktadır (332). Demineralizasyon solüsyonu olarak kullanıldığında demineralize edilen dentinin yapısı çürükten etkilenmiş dentinden farklılık göstermekte ve çürük saldırısı altındaki durumu tam olarak taklit etmemektedir (333). Fakat, çalışmamızda çürük lezyonlarını simüle etmek yerine rezin-dentin bağlantılarıyla ilgili sorunları ve enzim aktivasyonunu incelemeyi amaçladığımız için demineralizasyon solüsyonu olarak adeziv sistemlerde kullanılan PA tercih edilmiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, remineralizasyon ve MMP aktiviteleri üzerine gerçekleştirilen diğer araştırmalarda da dentinin demineralizasyonu için PA tercih edildiği gözlemlenmiştir (15,334,335). DeVito-Moraes ve ark. farklı PA konsantrasyonlarının MMP-2 üzerine etkisini araştırmıştır. %1, %10 ve %37 PA konsantrasyonları kullanarak yaptıkları çalışmada, tüm numunelerde enzim aktivasyonu gözlemlenmiştir. Fakat, MMP-2 ekspresyonu, %10'luk PA ile tedavi edilen örneklerde anlamlı derecede ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur. Ayrıca, kolajen parçalanmasını gösteren hidroksiprolin salınımı, %10'luk PA ile tedavi edilen dentin numunelerinde en yüksek düzeyde bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları, %10'luk PA'nın enzimatik aktiviteleri ve kolajen parçalanmasını artırmada daha etkili olabileceğini göstermiştir (336). Bu nedenle, çalışmamızda %10'luk konsantrasyonda PA kullanılmıştır.

Matriks metalloproteinazların, fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünü anlamak ve spesifik inhibitörlerini geliştirebilmek için, MMP aktivitesininin güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir (337). Yapılan literatür taramasında, enzimatik aktivitenin zimografi ve/veya ELISA analiziyle değerlendirildiği görülmüştür (304,335,338,339). Farklı MMP tespit yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları mevcuttur (337). Zimografi yönteminde, substrat dönüşümü yoluyla enzimatik aktivite görüntülenmektedir (340). MMP aktivasyonunun değerlendirilmesinde sıklıkla substrat zimografi tercih edilmektedir. Düşük maliyetli, yüksek hassasiyete sahip ve aynı proteazın aktif ve latent formlarının değerlendirilebilmesi tekniğin avantajlarındandır. Fakat substrat zimografide serbest MMP'ler ile TIMP'ler veya diğer proteinlerle kompleksleşmiş MMP'ler arasında ayrım yapılamamaktadır. Bu durum veri analizinde karmaşıklığa sebep olabilmektedir. Bununla birlikte, teknik uzun çalışma protokolüne sahiptir (341). ELISA, antijen ve antikor arasındaki etkileşimden hareketle, antikora bağlı enzimin aktivitesini incelemeye yönelik basit, hassas, hızlı ve güvenilir ölçüm

yöntemidir. ELISA kitleri, özellikle insan MMP'leri için yaygın olarak kullanılmaktadır. ELISA ile MMP miktarı nicel olarak ölçülebilmektedir (337). Çalışmamızda, kolay uygulama ve zamansal planlama göz önünde bulundurularak enzim aktivitesinin ELISA yöntemiyle değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Diş hekimliği alanında, saf 45S5 ve S53P4 BAG'ların ve bu materyallerin CHX ile kombine kullanımının dentin MMP'leri üzerine etkisinin değerlendirilmediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda, 45S5 ve S53P4 BAG tedavi gruplarındaki MMP-2 ve MMP-9 salınımının anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). Yapılan ikili kıyaslamalarda, MMP-2 değerleri için 45S5 ve S53P4 arasında anlamlı derecede fark bulunmazken ($p>0,05$), MMP-9 değerleri için 45S5 ve S53P4 grupları arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,002$). Bununla birlikte, kolajenin MMP'ye bağlı enzimatik aktivite sonucu yıkımından oluşan ICTP değerlerinin 45S5 ve S53P4 gruplarında anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). Yapılan ikili kıyaslamalarda, ICTP değerleri için 45S5 ve S53P4 arasında anlamlı derecede fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Fernando ve ark. (2017), BAG'ların dentin remineralizasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla 303 makale taramıştır. Yüksek dışlama kriterlerinin belirlendiği bu sistematik incelemede, BAG'ın remineralizasyon üzerindeki izole etkisinin incelenebilmesi için diş macunları kullanılarak yapılan çalışmalar incelemenin dışında tutulmuştur. Benzer şekilde, X-Işınları Difraksiyonu, spektrometre cihazı veya Raman spektroskopisi gibi güvenilir karakterizasyon teknikleriyle dentinde apatit varlığını doğrulamayan çalışmalar da incelemeye dahil edilmemiştir (122). İncelenen makaleler arasında yalnızca Wang ve ark. (2011,2014) ve Vollenweider ve ark.'larının (2007) yaptıkları çalışmalarda BAG tedavisinin dentinde artırılmış apatit oluşumuna yol açtığını doğrulamıştır (274–276). Bununla birlikte, bu araştırmacılardan yalnızca Vollenweider ve ark.'larının dentinin mekanik özelliklerini rapor ettiği görülmüştür (276).

Vollenweider ve ark.'larının (2007) nano BAG üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada, dentin diskleri 20-50 nm boyutlarında BAG veya µm boyutunda PerioGlas ile 30 gün boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi edilen dentin numunelerinin mineral yoğunluğunda artış gözlemlenmiş, ancak mekanik özelliklerin doğal dentine kıyasla belirgin oranda düşük kaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, demineralize dentin yapısındaki mineraller ile kolajen fibrillerinin arasındaki etkileşimin tam olarak optimize edilememiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (276). Bununla birlikte,

Atmeh ve ark. (2012) ile Leiendecker ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarda, kalsiyum silikat simanlar gibi kuvvetli alkali materyallerle temas eden bölgelerde kolajen degradasyonunun meydana geldiğini bildirmiştir (342,343). Bu çalışmaların bulguları, çalışmamızın verilerini destekler niteliktedir. Proteaz inhibitörleri ile BAG'ın kombine kullanımıyla remineralize dentinin mekanik özelliklerinin iyileştirilebileceğini düşünüyoruz. Bu konu hakkında çalışmalar yapılmasının gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Gerçekleştirilen literatür taramasında, 45S5 BAG'ın farklı oranlarda rezinle birleştirilerek elde edilen deneysel kompozitlerin proteaz aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği görülmüştür (20,344). Osorio ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, rezin, 45S5 BAG içeren rezin ve β-trikalsiyum fosfat modifiye kalsiyum silikat partikülleri içeren rezinlerin MMP'ler üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada, %10 PA veya 0.5 mol/ L EDTA ile demineralize edilen dentin diskleri yapay tükürük içinde saklanmış ve ICTP miktarı, 24 saat, 1 hafta ve 4 hafta sonra ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada, hem PA hem EDTA ile demineralize edilen dentinde belirgin şekilde kolajen yıkımı olduğu gözlenmiştir. Çalışmada, rezin infiltrasyonunun demineralize dentindeki MMP aktivitesini büyük ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, rezin içeriğine 45S5 BAG partiküllerinin eklenmesinin, dentin remineralizasyonu sırasında MMP aktivasyonunu düşürerek kolajen üzerinde ek bir koruma sağladığı bildirilmiştir (20).

Tezvergil-Mutluay ve ark'larının (2017), BAG içeren kompozit rezinler ile yaptıkları çalışmanın sonuçları Osorio ve ark.'larının yaptıkları çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Tezvergil-Mutluay ve ark., %10 PA ile demineralize edilen dentin diskleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, rezin, 45S5 BAG içeren rezin ve florürlü BAG parçacıkları içeren rezinin kolajen degradasyonuna etkisini incelemiştir. Tedavi grupları 3 gün ve 30 gün boyunca yapay tükürükte bekletilmiştir. Çalışmada MMP'ye bağlı kolajen bozunması, ICTP değerlerinin ELISA kitleriyle ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. 3 günlük inkübasyon sonrasında en yüksek ICTP salınımı, tedavi edilmeyen dentin grubunda gözlendiği, BAG, BAG-F ve rezin grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Bunun aksine, 30 günlük inkübasyon sonrasında en düşük ICTP salınımının florürlü BAG grubunda gözlendiği ve bunu BAG grubunun takip ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada test edilen deneysel biyouyumlu kompozitler (BAG ve BAG-F), inkübasyon ortamını alkalize edebilmiştir. Tezvergil-Mutluay ve ark'larının

yaptıkları çalışmada, Osorio ve ark. yaptıkları çalışmanın aksine rezin ve dentin grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (344). Bulgularımız, incelenen araştırmaların sonuçlarıyla çelişmektedir.

İncelenen iki çalışmada, spesifik olarak MMP-2 ve MMP-9'un değerlendirilmediği, yalnızca ICTP'lerin ölçüldüğü görülmüştür. Çalışmamızda direkt olarak MMP-2 ve MMP-9'a spesifik ELISA kitleri kullanılmıştır. Fakat incelenen çalışmaların sonuçları, çalışmamızdaki ICTP değerleri ile de uyum göstermemektedir. Çalışmamızda, MMP ve ICTP değerleri proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına uygun olarak birbiriyle paralel sonuç vermiştir. En yüksek ICTP değeri MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu en yüksek bulunan 45S5 grubunda bulunmuştur ($p<0,001$).

İncelenen çalışmalarda sırasıyla %60 rezin- %40 BAG ve %50 rezin-%50 BAG partikülü olacak şekilde deney gruplarının tasarlandığı görülmüştür. Çalışmamızda ise, 53 µm 45S5 ve S53P4 BAG'ların saf hali distile su ile seyreltilerek %55 konsantrasyonda kullanılmıştır. Zhang ve ark., in vitro koşullar altında, 45–1000 µm arasında değişen partikül boyutlarına sahip ve farklı ürün formlarında olan BAG'ların farklı reaksiyonlar gösterdiğini gözlemlemiştir.BAG'ların in vitro davranışı, partikül boyutuna, cam bileşimine ve partiküller etrafındaki yerel çevreye güçlü bir şekilde bağlı bulunmuştur. Aynı konsantrasyonda, ince partiküllü ürünün, kalın partiküllü ürüne göre kıyasla daha yüksek pH değeri sağladığı görülmüştür (345). Amaral ve ark., MMP aktivasyonunun pH değerlerindeki değişikliklerden etkilendiğini ortaya koymuştur (346). Bu nedenle, çalışmamız ve incelenen çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıklar, kullanılan metodolojik yaklaşımlar ve deneysel koşullar arasındaki farklılıklardan kaynaklı olabilir. MMP aktivasyonunun, farklı konsantrasyon ve partikül boyutlarında BAG'ler kullanılarak incelenmesinin, elde edilebilecek sonuçlarda değişikliklere yol açabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, CHX uygulanan grupta MMP-2 ve MMP-9 salınımının diğer gruplara kıyasla anlamlı seviyede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). MMP-2 değerleri için yapılan ikili kıyaslamalarda CHX ile distile su grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p=0,001$), MMP-9 değerleri için yapılan ikili kıyaslamalarda CHX ile distile su grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı ($p>0,05$) sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bu bulgular, CHX'in, MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini inhibe ettiğini, ancak MMP-2'nin MMP-9'a oranla daha duyarlı

olduğu sonucu çıkartılabilir. Gendron ve ark.'larının (1999), CHX'in MMP-2, MMP-8 ve MMP-9 ekspresyonuna etkisi üzerine yaptıkları çalışmada da, CHX'in, her iki jelatinazın aktivitesini inhibe ettiğini, ancak MMP-2'nin, MMP-9'a kıyasla bu etkiye daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (347).

Çalışmamızda, CHX ile kombine edilen 45S5 ve S53P4 gruplarının MMP-2 ve MMP-9 değelerinin, yalnızca 45S5 ve S53P4 kullanılan gruplara oranla daha düşük olduğu bulunmuştur. Literatürde yer alan in vivo ve in vitro çalışmaları incelendiğinde çalışmamızın verilerini destekler nitelikte olduğu görülmüştür. İncelenen çalışmalarda, CHX uygulamasının, hibrit tabakanın bozulmasını önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmalar, rezin dentin bağının daha uzun süre korunduğu ve nanosızıntının kanıtlanabilir şekilde azaldığı ortaya koymaktadır (198,201,210,297). Ancak, incelenen diğer klinik çalışmalarda, CHX'in adeziv sistemlere eklenmesinin veya ön işlem ajanı olarak kullanılmasının, özellikle iki yıl gibi daha uzun takip sürelerinde, klinik olarak avantaj sağlamadığı ve adeziv restorasyonların dayanıklılığını artırmadığı rapor edilmiştir (348–351). Bu nedenle, çalışmamızın kısa vadeli sonuçlara odaklanmış olması, araştırmamızın önemli bir sınırlaması olarak değerlendirilebilir. Uzun vadeli etkileri değerlendirecek ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Matriks metelloproteinaz işlevinin düzenlenmesi çok yönlüdür. TIMP'ler, MMP'lerin regülasyonunda rol oynamaktadır (352). MMP ve substrat etkileşimi, MMP'leri TIMP inhibisyonundan koruyabilmektedir. Fakat, diğer matriksler veya membranlarla olan etkileşimler de MMP aktivitesini değiştirebilmektedir (353,354). Çalışmamızdaki homojenatlarda, TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonunun en yüksek CHX grubunda olduğu görülmüştür ($p<0,001$). CHX grubunun ardından TIMP-1 ve TIMP-2 ekspresyonu sırasıyla distile su ($p<0,001$), CHX+S53P4 ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ($p<0,001$), S53P4 ($p<0,001$) ve 45S5 ($p<0,001$) gruplarında görülmüştür. TIMP-1 sonuçlarının değerlendirilmesinde yapılan ikili kıyaslamalarda, CHX grubu ile S53P4 ($p<0,001$), 45S5 ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ($p<0,001$), CHX+ S53P4 ($p<0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. TIMP-2 sonuçlarının değerlendirilmesinde yapılan ikili kıyaslamalarda da, CHX grubu ile S53P4 ($p<0,001$), 45S5 ($p<0,001$), CHX+ 45S5 ($p<0,001$), CHX+ S53P4 ($p=0,008$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. MMP ve TIMP değerlerinin birbirine zıt sonuçlar vermesi, bu proteinlerin biyolojik fonksiyonları dikkate alındığında beklenen bir

bulgudur. Çalışmamızın sonuçları, ELISA kitleriyle ölçümü yapılan MMP, TIMP ve ICTP düzeylerinin birbirleriyle tutarlı bir uyum içinde olduğunu ve ilişkilerinin benzer bir eğilim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, kullanılan analiz yöntemlerinin güvenilirliğini gösterir niteliktedir.

Çalışmamızda, 45S5 ve S53P4 deney gruplarında dentin tübüllerinin tamamen tıkanmış olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki SEM görüntüleri, Forsback ve ark.'larının (2004), S53P4 BAG'ların dentin biyomineralizasyonuna ve yüzey özelliklerine etkisini inceledikleri çalışma ile uyum göstermektedir. İncelenen çalışmada, BAG uygulanan tedavi grubunun, dentin tübüllerinin tıkandığı görülmüştür. Çalışmanın bulguları, S53P4 BAG'ın fizyolojik ortamda dentinin ve dentin tübüllerinin mineralizasyonunda terapötik amaçla kullanılabilecek bir materyal olduğunu düşündürmektedir (299). Fallahzade ve ark.'larının (2019) yaptıkları çalışmada, demineralize dentine BAG uygulanmış ve 21 gün sonra numuneler SEM ile analiz edilmiştir. SEM analizi, dentin disklerinin tüm yüzeyinin BAG parçacıklarıyla kaplı olduğunu ortaya koymuştur (355).

Çalışmamızda, BAG gruplarının CHX ile kombine kullanımda dentin yüzey özelliklerini değiştirip değiştirmeyeceği incelenmiştir. 45S5'in CHX ile kombine olarak uygulandığı tedavi grubunun yalnızca 45S5 uygulanan gruba kıyasla X1000 büyütmede daha belirgin tübüler yapı göstermiştir. Bu sonuç, farkın minimal olması ve neredeyse tüm dentin tübüllerinin tıkalı olması nedeniyle göz ardı edilebilir. S53P4'ün CHX ile kombine olarak uygulandığı dördüncü grupta da, yalnızca S53P4 uygulanan grupla benzer tübüler görüntü görülmüştür. CHX'in tek başına uygulandığı grupta dentin tübüllerinin belirgin şekilde izlendiği görülmüştür. CHX grubunda tübüller üzerinde yuvarlak kristal yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu yapıların, PBS solüsyonu içerisindeki fosfat ve dentin kesitindeki kalsiyumun reaksiyona girmesiyle veya klorheksidinin fosfat iyonlarlarıyla reaksiyona girmesiyle oluşan kalıntılar olabileceğini düşünüyoruz.

Chen ve ark. (2021), CHX yükledikleri PAMAM dendrimerleri üzerinde yaptıkları çalışmanın SEM görüntülerinde de, PAMAM-COOH ve CHX-PAMAM-COOH gruplarının SEM görüntüleri arasında belirgin farklılıklar olmadığı gözlemlenmiştir. İncelenen çalışmada, 14 gün içinde hem dentin yüzeyinde hem de dentin tübülünde çok sayıda çubuk benzeri kristal oluştuğunu ve bunların Ca/P oranı (Ca/P = 1,67) açısından doğal dentindeki HA'ya benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmanın verileri, remineralizasyon ajanına CHX yüklemenin remineralizasyon etkinliğini değiştirmediğini göstermiştir (356). Chen ve ark.'larının çalışmasından elde edilen bulgular çalışmamız sonuçlarını destekler niteliktedir. Fakat, mevcut araştırmamızda yüzey kimyasal kompozisyonunun daha ayrıntılı analiz edilmesine olanak sağlayan Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi (EDS) yapılmamış olması, çalışmamızın limitasyonlarından biri olarak değerlendirilebilir. SEM ile görsel değerlendirme, yüzey özellikleri hakkında genel bilgiler sunarken, EDS analizi ile mineralizasyon sürecinde meydana gelen kimyasal değişimleri daha kesin şekilde belirlenebilir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmaların EDX analiziyle desteklenmesi, elde edilen verilerin kapsamının genişletilmesi için faydalı olabilir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, biyomimetik remineralizasyonun hedeflendiği tedavilerde proteaz inhibitörlerinin kullanılmasının potansiyel rolünü ortaya koymuş ve bu alandaki literatüre değerli bir katkı sağlamıştır. Bu bulgular, BAG'ların dentin biyomineralizasyonunda etkinliğinin arttırılması için alternatif yaklaşımların belirlenmesine ışık tutabilir. Bununla birlikte, farklı konsantrasyon ve partikül boyutlarındaki BAG'ların MMP aktivasyonuna etkisinin değişiklik gösterebileceği unutulmamalıdır. Gelecekteki çalışmalarda, remineralizasyon ajanlarının farklı proteaz inhibitörleri ile kombinasyonunun, remineralizasyon tedavileri üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması önerilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İn-vitro koşullarda demineralize edilen dentin disklerinin S53P4, 45S5, CHX+ S53P4, CHX+45S5, CHX ve distile su gruplarıyla tedavi edilmesiyle MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ICTP ekspresyonunun değerlendirildiği ve SEM ike dentin disklerinin yüzey özelliklerinin analiz edildiği çalışmamızdan elde edilen veriler neticesinde ortaya çıkan sonuç ve öneriler aşağıda belirtilmektedir:

1. Demineralize dentin disklerine uygulanan 45S5 BAG'ın MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu arttığı gözlemlenmiştir.
2. Demineralize dentin disklerine uygulanan S53P4 BAG'ın MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu arttığı gözlemlenmiştir.
3. 45S5 BAG uygulaması öncesi dentin diskine %2'lik CHX ile 1 dakika muamele edilmesinin MMP-2 ve MMP-9 salınımında belirgin şekilde azalma gözlemlenmiştir.
4. S53P4 BAG uygulaması öncesi dentin diskine %2'lik CHX ile 1 dakika muamele edilmesinin MMP-2 ve MMP-9 salınımında belirgin şekilde azalma gözlemlenmiştir.
5. CHX uygulamasının MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir.
6. SEM analizinde negatif kontrol grubununda, dentin tübüllerinde mineral kayıpları ve buna bağlı olarak lümen deformasyonu gözlenmiştir.
7. 45S5 uygulanan gruptan yüzeyin tamamen materyal ile kaplandığı, dentin tübüllerinin tıkalı olduğu ve daraldığı gözlemlenmiştir.
8. S53P4 uygulanan gruptan yüzeyin tamamen materyal ile kaplandığı, dentin tübüllerinin tıkalı olduğu ve daraldığı gözlemlenmiştir.
9. 45S5 uygulaması öncesinde, dentin kesitine CHX uygulamasının materyalin yüzeye tutunmasını etkilemediği gözlemlenmiştir. CHX ile 45S5'in kombine uygulandığı grubun yüzey özellikleri 45S5 grubu ile benzerlik göstermektedir.
10. S53P4 uygulaması öncesinde, dentin kesitine CHX uygulamasının materyalin yüzeye tutunmasını etkilemediği gözlemlenmiştir. CHX ile S53P4'ün

kombine uygulandığı grubun yüzey özellikleri S53P4 grubu ile benzerlik göstermektedir.

11. Dentinin biyomimetik remineralizasyonunu sağlayacak ve MMP aktivitesini inhibe edecek ikili stratejilere yönelik tedavi protokollerinin veya malzemelerin geliştirilmesi gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tsang, P., Qi, F., & Shi, W. (n.d.). *Medical Approach to Dental Caries: Fight the Disease, Not the Lesion*.
2. Basheer, N., Madhubala, M. M., & Mahalaxmi, S. (2020). Future Perspectives of Biomimetics in Restorative Dentistry. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 19–28. https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i2530820
3. Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of Dental Research*, *90*(8), 953–968. https://doi.org/10.1177/0022034510391799
4. Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & Dorigo, E. D. S. (2008). Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, *24*(1), 90–101.
5. Mattos, J., Soares, G. M., & Ribeiro, A. de A. (2014). Current status of conservative treatment of deep carious lesions. *Dental Update*, *41*(5), 452–456.
6. Hench, L. L., & Jones, J. R. (2015). Bioactive glasses: frontiers and challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*, 194.
7. KULAN, M., & ULUKAPI, I. (2011). Bioactive glasses in Dentistry. *European Oral Research*, *45*(1), 65.
8. Jones, J. R. (2013). Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, *9*(1), 4457–4486.
9. Chatzistavrou, X., Velamakanni, S., DiRenzo, K., Lefkelidou, A., Fenno, J. C., Kasuga, T., Boccaccini, A. R., & Papagerakis, P. (2015). Designing dental composites with bioactive and bactericidal properties. *Materials Science and Engineering: C*, *52*, 267–272.
10. Tauböck, T. T., Zehnder, M., Schweizer, T., Stark, W. J., Attin, T., & Mohn, D. (2014). Functionalizing a dentin bonding resin to become bioactive. *Dental Materials*, *30*(8), 868–875.
11. Sauro, S., Watson, T. F., Thompson, I., & Banerjee, A. (2012). One-bottle self-etching adhesives applied to dentine air-abraded using bioactive glasses containing polyacrylic acid: an in vitro microtensile bond strength and confocal microscopy study. *Journal of Dentistry*, *40*(11), 896–905.
12. Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2018). Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental Materials*, *34*(1), 78–96.
13. Drummond, J. L. (2008). Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. *Journal of Dental Research*, *87*(8), 710–719.
14. Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of Dental Research*, *90*(8), 953–968.
15. Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Breschi, L. (2015). Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *Journal of Dental Research*, *94*(2), 241–251.
16. Tjäderhane, L., Buzalaf, M. A. R., Carrilho, M., & Chaussain, C. (2015). Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of 'dentin degradomics''.' *Caries Research*, *49*(3), 193–208.
17. Sulkala, M., Larmas, M., Sorsa, T., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2002). The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal of Dental Research*, *81*(9), 603–607.
18. Breschi, L., Lopes, M., Gobbi, P., Mazzotti, G., Falconi, M., & Perdigão, J. (2002). Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FEISEM study. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *61*(1), 40–46.
19. Carrilho, M. R. O., Geraldeli, S., Tay, F., De Goes, M. F., Carvalho, R. M., Tjäderhane, L., Reis, A. F., Hebling, J., Mazzoni, A., & Breschi, L. (2007). In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal of Dental Research*, *86*(6), 529–533.
20. Osorio, R., Yamauti, M., Sauro, S., Watson, T. F., & Toledano, M. (2012). Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase–mediated dentin collagen degradation. *Journal of Endodontics*, *38*(9), 1227–1232.
21. Tezvergil-Mutluay, A., Seseogullari-Dirihan, R., Feitosa, V. P., Cama, G., Brauer, D. S., & Sauro, S. (2017). Effects of composites containing bioactive glasses on demineralized dentin. *Journal of Dental Research*, *96*(9), 999–1005.

22. Jones, F. H. (2001). Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surface Science Reports*, *42*(3–5), 75–205.
23. Antoinette Metivier, C. D. A., & Kimberly Bland, C. D. A. (n.d.). *Dental Anatomy: A Review*.
24. Mendis, B., & Darling, A. I. (1979). Distribution with age and attrition of peritubular dentine in the crowns of human teeth. *Archives of Oral Biology*, *24*(2), 131–139.
25. Dorow, C., Krstin, N. x 00161 a, & Sander, F.-G. (2003). Determination of the mechanical properties of the periodontal ligament in a uniaxial tensional experiment. *Journal of Orofacial Orthopedics= Fortschritte Der Kieferorthopadie: Organ/Official Journal Deutsche Gesellschaft Fur Kieferorthopadie*, *64*(2), 100–107.
26. WT, B. (1984). Dentin collagen: chemical structure and role in mineralization. *Dentin and Dentinogenesis*, 37–53.
27. Gage, J. P. (1984). Electrophoretic characterization of peptides from normal mature human dentine. *Archives of Oral Biology*, *29*(8), 575–580.
28. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, *3*, 711.
29. Abou Neel, E. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 4743–4763.
30. Pashley, D. H., & Liewehr, F. R. (2006). Structure and functions of the dentin-pulp complex. *Pathways of the Pulp*, *9*, 460–513.
31. Mjör, I. A. (2002). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. *(No Title)*.
32. Hahn, C.-L., & Liewehr, F. R. (2007). Innate immune responses of the dental pulp to caries. *Journal of Endodontics*, *33*(6), 643–651.
33. Tjäderhane, L., Carrilho, M. R., Breschi, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic Topics*, *20*(1), 3–29.
34. Kontakiotis, E. G., Tsatsoulis, I. N., Filippatos, C. G., & Agrafioti, A. (2015). A quantitative and diametral analysis of human dentinal tubules at pulp chamber ceiling and floor under scanning electron microscopy. *Australian Endodontic Journal*, *41*(1), 29–34.
35. Kagayama, M., Sasano, Y., Sato, H., Kamakura, S., Motegi, K., & Mizoguchi, I. (1999). Confocal microscopy of dentinal tubules in human tooth stained with alizarin red. *Anatomy and Embryology*, *199*, 233–238.
36. Mjör, I. A., & Nordahl, I. (1996). The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Archives of Oral Biology*, *41*(5), 401–412.
37. Gallagher, R. R., Demos, S. G., Balooch, M., Marshall Jr, G. W., & Marshall, S. J. (2003). Optical spectroscopy and imaging of the dentin–enamel junction in human third molars. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *64*(2), 372–377.
38. Goldberg, M., Septier, D., Bourd, K., Hall, R., Jeanny, J.-C., Jonet, L., Colin, S., Tager, F., Chaussain-Miller, C., & Garabédian, M. (2002). The dentino-enamel junction revisited. *Connective Tissue Research*, *43*(2–3), 482–489.
39. Oliveira, C. A., Bergqvist, L. P., & Line, S. R. P. (2001). A comparative analysis of the structure of the dentinoenamel junction in mammals. *Journal of Oral Science*, *43*(4), 277–281.
40. Jones, S. (1984). Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. *Dentin and Dentinogenesis*.
41. Stratmann, U., Schaarschmidt, K., Wiesmann, H. P., Plate, U., Höhling, H. J., & Szuwart, T. (1997). The mineralization of mantle dentine and of circumpulpal dentine in the rat: an ultrastructural and element-analytical study. *Anatomy and Embryology*, *195*, 289–297.
42. Osorio, R., Aguilera, F. S., Otero, P. R., Romero, M., Osorio, E., García-Godoy, F., & Toledano, M. (2010). Primary dentin etching time, bond strength and ultra-structure characterization of dentin surfaces. *Journal of Dentistry*, *38*(3), 222–231.
43. Romagnoli, P., Mancini, G., Galeotti, F., Francini, E., & Pierleoni, P. (1990). The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption. *Journal of Dental Research*, *69*(12), 1857–1862.
44. Nanci A. (2008). Ten Cate's Oral Histology. In *Ten Cate's Oral Histology* (7th ed., pp. 191–238). Mosby Elsevier.
45. Magloire, H., Bouvier, M., & Joffre, A. (1992). Odontoblast response under carious lesions. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia*, *88*, 257–274.

46. Yamamura, T. (1985). Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *Journal of Dental Research*, *64*(4), 530–540.
47. Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, *53*(3), 286–291.
48. Tanzer, J. M., Livingston, J., & Thompson, A. M. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, *65*(10), 1028–1037.
49. Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., & Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(4), 1407–1417.
50. Simón-Soro, A., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Alcaraz, L. D., & Mira, A. (2013). A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Research*, *47*(6), 591–600.
51. Peters, M. C. (2010). Strategies for noninvasive demineralized tissue repair. *Dental Clinics*, *54*(3), 507–525.
52. Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, *369*(9555), 51–59.
53. Dawes, C. (2003). What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal-Canadian Dental Association*, *69*(11), 722–725.
54. Nascimento, M. M., Behar-Horenstein, L. S., Feng, X., Guzmán-Armstrong, S., & Fontana, M. (2017). Exploring how US dental schools teach removal of carious tissues during cavity preparations. *Journal of Dental Education*, *81*(1), 5–13.
55. Roberson, T. M., Heyman, H. O., & Swift, E. J. (2011). Introduction to art and science of operative dentistry. *St. Louis, Mosby Co*, *1001*, 7–134.
56. Kozemi, R., Meiers, J., & Peppers, K. (2002). Effect of Caries Disclosing Agents on Bond Strengths of Total Etch and Self Etching Primer Dentin Bonding Systems to Resin Composite. *Oper Dent*, *27*, 238–242.
57. Yoshiyama, M., Urayama, A., Kimochi, T., Matsuo, T., & Pashley, D. H. (2000). Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. *Operative Dentistry*, *25*(3), 163–169.
58. Fusayama, T. (1997). The process and results of revolution in dental caries treatment. *International Dental Journal*, *47*(3), 157–166.
59. Pugach, M. K., Strother, J., Darling, C. L., Fried, D., Gansky, S. A., Marshall, S. J., & Marshall, G. W. (2009). Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *Journal of Dental Research*, *88*(1), 71–76.
60. Kidd, E. A. M., & Fejerskov, O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *Journal of Dental Research*, *83*(1_suppl), 35–38.
61. Rôças, I. N., Lima, K. C., Assunção, I. V, Gomes, P. N., Bracks, I. V, & Siqueira Jr, J. F. (2015). Advanced caries microbiota in teeth with irreversible pulpitis. *Journal of Endodontics*, *41*(9), 1450–1455.
62. Schwendicke, F., Paris, S., & Tu, Y.-K. (2015). Effects of using different criteria for caries removal: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of Dentistry*, *43*(1), 1–15.
63. Stanley, H. R., Pereira, J. C., Spiegel, E., Broom, C., & Schultz, M. (1983). The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *12*(4), 257–289.
64. Swift, E. J., Perdigão, J., & Heymann, H. O. (1995). Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995. *QUINTESSENCE INTERNATIONAL-ENGLISH EDITION-*, *26*, 95.
65. Rivera-Muñoz, E. M. (2011). Hydroxyapatite-based materials: synthesis and characterization. *Biomedical Engineering-Frontiers and Challenges*, 75–98.
66. Monchois, V., Arguello-Morales, M., & Russell, R. R. B. (1999). Isolation of an active catalytic core of Streptococcus downei MFe28 GTF-I glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, *181*(7), 2290–2292.
67. Fernández-Ferrer, L., Vicente-Ruíz, M., García-Sanz, V., Montiel-Company, J. M., Paredes-Gallardo, V., Almerich-Silla, J. M., & Bellot-Arcis, C. (2018). Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions: A systematic review. *The Journal of the American Dental Association*, *149*(9), 778–786.
68. Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., & Kirkham, J. (2000). The chemistry of enamel caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, *11*(4), 481–495.
69. Marsh, P. D. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental Clinics*, *54*(3), 441–454.
70. Caufield, P. W., & Griffen, A. L. (2000). Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Pediatric Clinics of North America*, *47*(5), 1001–1019.
71. Hardie, J. M. (1982). The microbiology of dental caries. *Dental Update*, *9*(4), 199–200.
72. Nurelhuda, N. M., Al-Haroni, M., Trovik, T. A., & Bakken, V. (2010). Caries experience and quantification of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in saliva of Sudanese schoolchildren. *Caries Research*, *44*(4), 402–407.

73. Kargul, B., Tanboga, I., Ergeneli, S., Karakoc, F., & Dagli, E. (1998). Inhaler medicament effects on saliva and plaque pH in asthmatic children. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *22*(2), 137–140.
74. Meurman, J. H., & Ten Gate, J. M. (1996). Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *European Journal of Oral Sciences*, *104*(2), 199–206.
75. Uhlen, M.-M., Tveit, A. B., Refsholt Stenhagen, K., & Mulic, A. (2014). Self-induced vomiting and dental erosion–a clinical study. *BMC Oral Health*, *14*, 1–7.
76. Dundar, A., & Sengun, A. (2014). Dental approach to erosive tooth wear in gastroesophageal reflux disease. *African Health Sciences*, *14*(2), 481–486.
77. Brown, W. E. (1974). Physicochemical mechanisms of dental caries. *Journal of Dental Research*, *53*(2), 204–216.
78. De Medeiros, R. C. G., Soares, J. D., & De Sousa, F. B. (2012). Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *Journal of Microscopy*, *246*(2), 177–189.
79. Grawish, M. E., Grawish, L. M., Grawish, H. M., Grawish, M. M., Holiel, A. A., Sultan, N., & El-Negoly, S. A. (2022). Demineralized dentin matrix for dental and alveolar bone tissues regeneration: an innovative scope review. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *19*(4), 687–701.
80. Gandolfi, M. G., Taddei, P., Pondrelli, A., Zamparini, F., Prati, C., & Spagnuolo, G. (2018). Demineralization, collagen modification and remineralization degree of human dentin after EDTA and citric acid treatments. *Materials*, *12*(1), 25.
81. Lussi, A. (2006). Erosive tooth wear–a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. In *Dental erosion* (Vol. 20, pp. 1–8). Karger Publishers.
82. Markowitz, K. (1993). Tooth sensitivity: mechanisms and management. *Compendium (Newtown, Pa.)*, *14*(8), 1032–1034.
83. Twetman, S., Axelsson, S., Dahlgren, H., Holm, A., Källestål, C., Lagerlöf, F., Lingström, P., Mejàre, I., Nordenram, G., & Norlund, A. (2003). Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica*, *61*(6), 347–355.
84. Sthephen, K. W. (1994). Fluoride toothpastes, rinses, and tablets. *Advances in Dental Research*, *8*(2), 185–189.
85. Stamm, J. W. (2007). Multi-function toothpastes for better oral health: a behavioural perspective. *International Dental Journal*, *57*(S5), 351–363.
86. Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M., & Ten Cate, J. M. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Fluoride and the Oral Environment*, *22*, 97–114.
87. Cate, J. M. ten. (1999). Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontologica Scandinavica*, *57*(6), 325–329.
88. Arifa, M. K., Ephraim, R., & Rajamani, T. (2019). Recent advances in dental hard tissue remineralization: a review of literature. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *12*(2), 139.
89. Attiguppe, P., Malik, N., Ballal, S., & Naik, S. V. (2019). CPP–ACP and fluoride: a synergism to combat caries. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *12*(2), 120.
90. Kumar, V. L. N., Itthagarun, A., & King, N. M. (2008). The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Australian Dental Journal*, *53*(1), 34–40.
91. Iijima, Y., Cai, F., Shen, P., Walker, G., Reynolds, C., & Reynolds, E. C. (2004). Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Research*, *38*(6), 551–556.
92. Whitford, G. M., Buzalaf, M. A. R., Bijella, M. F. B., & Waller, J. L. (2005). Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Research*, *39*(2), 100–107.
93. Pessan, J. P., Sicca, C. M., De Souza, T. S., Da Silva, S. M. B., Whitford, G. M., & Buzalaf, M. A. R. (2006). Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *European Journal of Oral Sciences*, *114*(6), 489–493.
94. Pessan, J. P., Silva, S. M. B., Lauris, J. R. P., Sampaio, F. C., Whitford, G. M., & Buzalaf, M. A. R. (2008). Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *Journal of Dental Research*, *87*(5), 461–465.
95. Han, M., Li, Q.-L., Cao, Y., Fang, H., Xia, R., & Zhang, Z.-H. (2017). In vivo remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system. *Scientific Reports*, *7*(1), 41955.
96. El Gezawi, M., Wölfle, U. C., Haridy, R., Fliefel, R., & Kaisarly, D. (2019). Remineralization, regeneration, and repair of natural tooth structure: influences on the future of restorative dentistry practice. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *5*(10), 4899–4919.

97. Zhong, B., Peng, C., Wang, G., Tian, L., Cai, Q., & Cui, F. (2015). Contemporary research findings on dentine remineralization. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *9*(9), 1004–1016.
98. Niu, L., Zhang, W., Pashley, D. H., Breschi, L., Mao, J., Chen, J., & Tay, F. R. (2014). Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*, *30*(1), 77–96.
99. Silverman, L., & Boskey, A. L. (2004). Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calcified Tissue International*, *75*, 494–501.
100. Kokubo, T. (2005). Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Materials Science and Engineering: C*, *25*(2), 97–104.
101. Abe, Y., Kokubo, T., & Yamamuro, T. (1990). Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *1*, 233–238.
102. Tan, Q., Zhang, K., Gu, S., & Ren, J. (2009). Mineralization of surfactant functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) to prepare hydroxyapatite/MWNTs nanohybrid. *Applied Surface Science*, *255*(15), 7036–7039.
103. Gower, L. B. (2016). Biomimetic mineralization of collagen. In *Biomineralization and Biomaterials* (pp. 187–232). Elsevier.
104. Kim, J., Arola, D. D., Gu, L., Kim, Y. K., Mai, S., Liu, Y., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom–up approach. *Acta Biomaterialia*, *6*(7), 2740–2750.
105. Gupta, H. S., Seto, J., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Boesecke, P., & Fratzl, P. (2006). Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 17741–17746.
106. Prasad, M., Butler, W. T., & Qin, C. (2010). Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connective Tissue Research*, *51*(5), 404–417.
107. Li, J., Yang, J., Li, J., Chen, L., Liang, K., Wu, W., Chen, X., & Li, J. (2013). Bioinspired intrafibrillar mineralization of human dentine by PAMAM dendrimer. *Biomaterials*, *34*(28), 6738–6747.
108. Shao, C., Zhao, R., Jiang, S., Yao, S., Wu, Z., Jin, B., Yang, Y., Pan, H., & Tang, R. (2018). Citrate improves collagen mineralization via interface wetting: a physicochemical understanding of biomineralization control. *Advanced Materials*, *30*(8), 1704876.
109. Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2008). Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials*, *29*(8), 1127–1137.
110. Li, C., Lu, D., Deng, J., Zhang, X., & Yang, P. (2019). Amyloid-like rapid surface modification for antifouling and in-depth remineralization of dentine tubules to treat dental hypersensitivity. *Advanced Materials*, *31*(46), 1903973.
111. Baino, F., Hamzehlou, S., & Kargozar, S. (2018). Bioactive glasses: where are we and where are we going? *Journal of Functional Biomaterials*, *9*(1), 25.
112. Montazerian, M., & Zanotto, E. D. (2017). A guided walk through Larry Hench's monumental discoveries. *Journal of Materials Science*, *52*(15), 8695–8732.
113. Singer, L., Fouda, A., & Bourauel, C. (2023). Biomimetic approaches and materials in restorative and regenerative dentistry. *BMC Oral Health*, *23*(1), 105.
114. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C., & Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, *5*(6), 117–141.
115. Sepulveda, P., Jones, J. R., & Hench, L. L. (2001). Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel–derived 58S bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *58*(6), 734–740.
116. Chen, X., Lei, B., Wang, Y., & Zhao, N. (2009). Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *355*(13), 791–796.
117. Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D. K., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2000). Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *276*(2), 461–465.
118. Rust, K. R., Singleton, G. T., Wilson, J., & Antonelli, P. J. (1996). Bioglass middle ear prosthesis: long-term results. *Otology & Neurotology*, *17*(3), 371–374.
119. Lovelace, T. B., Mellonig, J. T., Meffert, R. M., Jones, A. A., Nummikoski, P. V, & Cochran, D. L. (1998). Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. *Journal of Periodontology*, *69*(9), 1027–1035.
120. Behbehani, M., & Zaatar, E. (1999). Bioactive glass in dentistry. *Dent Update*, *6*, 11–15.
121. Schepers, E., Clercq, M. De, Ducheyne, P., & Kempeneers, R. (1991). Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *Journal of Oral Rehabilitation*, *18*(5), 439–452.

122. Fernando, D., Attik, N., Pradelle-Plasse, N., Jackson, P., Grosgogeat, B., & Colon, P. (2017). Bioactive glass for dentin remineralization: A systematic review. *Materials Science and Engineering: C*, *76*, 1369–1377.
123. Dionysopoulos, D. (2024). The Role of Bioactive Glasses in Dental Erosion—A Narrative Review. *Compounds*, *4*(3), 442–452.
124. Shi, D. (2013). *Biomaterials and tissue engineering*. Springer Science & Business Media.
125. Tilocca, A. (2010). Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. *Journal of Materials Chemistry*, *20*(33), 6848–6858.
126. Srivatsan, T. S. (2009). *Processing and fabrication of advanced materials, XVII: part 8: polymer-based composites and nano composites: volume two* (Vol. 2). IK International Pvt Ltd.
127. Merwin, G. E. (1986). Bioglass middle ear prosthesis: preliminary report. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, *95*(1), 78–82.
128. Fiume, E., Barberi, J., Verné, E., & Baino, F. (2018). Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, *9*(1), 24.
129. Shearer, A., Montazerian, M., Sly, J. J., Hill, R. G., & Mauro, J. C. (2023). Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses. *Acta Biomaterialia*, *160*, 14–31.
130. Deng, M., Wen, H.-L., Dong, X.-L., Li, F., Xu, X., Li, H., Li, J.-Y., & Zhou, X.-D. (2013). Effects of 45S5 bioglass on surface properties of dental enamel subjected to 35% hydrogen peroxide. *International Journal of Oral Science*, *5*(2), 103–110.
131. Golpayegani, M. V., Sohrabi, A., Biria, M., & Ansari, G. (2012). Remineralization effect of topical NovaMin versus sodium fluoride (1.1%) on caries-like lesions in permanent teeth. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, *9*(1), 68.
132. Hupa, L., & Lindfors, N. C. (2022). Bioactive Glass S 53 P 4–From a Statistically Suggested Composition to Clinical Success. *Bioactive Glasses and Glass-Ceramics: Fundamentals and Applications*, 33–59.
133. Forsback, A., Areva, S., & Salonen, J. (2004). Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, *62*(1), 14–20.
134. Drago, L., Vecchi, E. De, Bortolin, M., Toscano, M., Mattina, R., & Romanò, C. L. (2015). Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains. *Future Microbiology*, *10*(8), 1293–1299.
135. Munukka, E., Leppäranta, O., Korkeamäki, M., Vaahtio, M., Peltola, T., Zhang, D., Hupa, L., Ylänen, H., Salonen, J. I., & Viljanen, M. K. (2008). Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *19*, 27–32.
136. Leppäranta, O., Vaahtio, M., Peltola, T., Zhang, D., Hupa, L., Hupa, M., Ylänen, H., Salonen, J. I., Viljanen, M. K., & Eerola, E. (2008). Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *19*, 547–551.
137. Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *17*(11), 967–978.
138. Clark Jr, A. E., Pantano Jr, C. G., & Hench, L. L. (1976). Auger spectroscopic analysis of bioglass corrosion films. *Journal of the American Ceramic Society*, *59*(1-2), 37–39.
139. Chen, Q. Z., Xu, J. L., Yu, L. G., Fang, X.-Y., & Khor, K. A. (2012). Spark plasma sintering of sol–gel derived 45S5 Bioglass®-ceramics: Mechanical properties and biocompatibility evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, *32*(3), 494–502.
140. Filho, O. P., La Torre, G. P., & Hench, L. L. (1996). Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, *30*(4), 509–514.
141. Wu, C., Fan, W., Gelinsky, M., Xiao, Y., Simon, P., Schulze, R., Doert, T., Luo, Y., & Cuniberti, G. (2011). Bioactive SrO–SiO2 glass with well-ordered mesopores: Characterization, physiochemistry and biological properties. *Acta Biomaterialia*, *7*(4), 1797–1806.
142. Reema, S. D., Lahiri, P. K., & Roy, S. Sen. (2014). Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate. *Chin J Dent Res*, *17*(1), 7–14.
143. Yassin, O., & Milly, H. (2019). Effect of CPP-ACP on efficacy and postoperative sensitivity associated with at-home vital tooth bleaching using 20% carbamide peroxide. *Clinical Oral Investigations*, *23*, 1555–1559.
144. Mazzaoui, S. A., Burrow, M. F., Tyas, M. J., Dashper, S. G., Eakins, D., & Reynolds, E. C. (2003). Incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass-ionomer cement. *Journal of Dental Research*, *82*(11), 914–918.
145. Marović, D., Šariri, K., Demoli, N., Ristić, M., Hiller, K.-A., Škrtić, D., & Rosentritt, M. (2016). Remineralizing amorphous calcium phosphate based composite resins: The influence of inert fillers on

monomer conversion, polymerization shrinkage, and microhardness. *Croatian Medical Journal*, *57*(5), 465–473.
146. Bayram, M., Kusgoz, A., Yesilyurt, C., & Nur, M. (2017). Effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate application after interproximal stripping on enamel surface: An in-vivo study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *151*(1), 167–173.
147. Wang, C. P., Huang, S. B., Liu, Y., Li, J. Y., & Yu, H. Y. (2014). The CPP-ACP relieved enamel erosion from a carbonated soft beverage: an in vitro AFM and XRD study. *Archives of Oral Biology*, *59*(3), 277–282.
148. Vilhena, F. V., de Oliveira, S. M. L., Matochek, M. H. M., Tomaz, P. L. S., de Sá Oliveira, T., & D'Alpino, P. H. P. (2021). Biomimetic mechanism of action of fluoridated toothpaste containing proprietary REFIX technology on the remineralization and repair of demineralized dental tissues: an in vitro study. *European Journal of Dentistry*, *15*(02), 236–241.
149. Vilhena, F. V, Polassi, M. R., Paloco, E. A. C., Alonso, R. C. B., Guiraldo, R. D., & Paulo, H. P. D. (2020). Effectiveness of toothpaste containing REFIX technology against dentin hypersensitivity: a randomized clinical study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *21*(6), 609–614.
150. Peumans, M., Politano, G., & Van Meerbeek, B. (2020). Treatment of noncarious cervical lesions: when, why, and how. *Int J Esthet Dent*, *15*(1), 16–42.
151. Toledano, M., Vallecillo-Rivas, M., Aguilera, F. S., Osorio, M. T., Osorio, E., & Osorio, R. (2021). Polymeric zinc-doped nanoparticles for high performance in restorative dentistry. *Journal of Dentistry*, *107*, 103616.
152. Osorio, R., Osorio, E., Cabello, I., & Toledano, M. (2014). Zinc induces apatite and scholzite formation during dentin remineralization. *Caries Research*, *48*(4), 276–290.
153. Wu, H., Zhao, C., Lin, K., & Wang, X. (2022). Mussel-inspired polydopamine-based multilayered coatings for enhanced bone formation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 952500.
154. Liu, C., Liu, J., Ning, X., Chen, S., Liu, Z., Jiang, S., & Miao, D. (2019). The effect of polydopamine on an Ag-coated polypropylene nonwoven fabric. *Polymers*, *11*(4), 627.
155. Zhou, Y.-Z., Cao, Y., Liu, W., Chu, C. H., & Li, Q.-L. (2012). Polydopamine-induced tooth remineralization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *4*(12), 6901–6910.
156. Zhang, J., He, X., Yu, S., Zhu, J., Wang, H., Tian, Z., Zhu, S., & Cui, Z. (2021). A novel dental adhesive containing Ag/polydopamine-modified HA fillers with both antibacterial and mineralization properties. *Journal of Dentistry*, *111*, 103710.
157. Lu, Z.-Q., Zhang, L.-L., Yan, Y., & Wang, W. (2021). Polyelectrolytes of inorganic polyoxometalates: acids, salts, and complexes. *Macromolecules*, *54*(14), 6891–6900.
158. Xie, Y., He, E., Cao, Z., Ou, Q., & Wang, Y. (2019). Effect of polyvinylphosphonic acid on resin-dentin bonds and the cytotoxicity of mouse dental papilla cell-23. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *122*(5), 492-e1.
159. Suzuki, S., Haruyama, N., Nishimura, F., & Kulkarni, A. B. (2012). Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Archives of Oral Biology*, *57*(9), 1165–1175.
160. Gu, L., Kim, Y. K., Liu, Y., Ryou, H., Wimmer, C. E., Dai, L., Arola, D. D., Looney, S. W., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Biomimetic analogs for collagen biomineralization. *Journal of Dental Research*, *90*(1), 82–87.
161. Cao, C. Y., Mei, M. L., Li, Q.-L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2015). Methods for biomimetic remineralization of human dentine: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 4615–4627.
162. Liu, Y., Kim, Y.-K., Dai, L., Li, N., Khan, S. O., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials*, *32*(5), 1291–1300.
163. Tang, S., Dong, Z., Ke, X., Luo, J., & Li, J. (2021). Advances in biomineralization-inspired materials for hard tissue repair. *International Journal of Oral Science*, *13*(1), 42.
164. Duncan, R., & Izzo, L. (2005). Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(15), 2215–2237.
165. Yang, S., He, H., Wang, L., Jia, X., & Feng, H. (2011). Oriented crystallization of hydroxyapatite by the biomimetic amelogenin nanospheres from self-assemblies of amphiphilic dendrons. *Chemical Communications*, *47*(36), 10100–10102.
166. Liang, K., Wang, S., Tao, S., Xiao, S., Zhou, H., Wang, P., Cheng, L., Zhou, X., Weir, M. D., & Oates, T. W. (2019). Dental remineralization via poly (amido amine) and restorative materials containing calcium phosphate nanoparticles. *International Journal of Oral Science*, *11*(2), 15.
167. Esfand, R., & Tomalia, D. A. (2001). Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, *6*(8), 427–436.

168. Bae, J., Son, W.-S., Yoo, K.-H., Yoon, S.-Y., Bae, M.-K., Lee, D. J., Ko, C.-C., Choi, Y.-K., & Kim, Y.-I. (2019). Effects of poly (amidoamine) dendrimer-coated mesoporous bioactive glass nanoparticles on dentin remineralization. *Nanomaterials*, *9*(4), 591.
169. Gunasekaran, S. (2003). *Purifying type I collagen using two papain treatments and reducing and delipidation agents*. Google Patents.
170. Li, X., & Chang, J. (2008). Preparation of bone-like apatite–collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *85*(2), 293–300.
171. Stöcker, W., Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Rüth, F., & Mckay, D. B. (1995). The metzincins—Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein Science*, *4*(5), 823–840.
172. Hashimoto, M., De Munck, J., Ito, S., Sano, H., Kaga, M., Oguchi, H., Van Meerbeek, B., & Pashley, D. H. (2004). In vitro effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials*, *25*(25), 5565–5574.
173. Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C. K. Y., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R. M. de, & Ito, S. (2004). Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research*, *83*(3), 216–221.
174. Bode, W., & Maskos, K. (2003). *Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases*.
175. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, *92*(8), 827–839.
176. Betancourt, D. E., Baldion, P. A., & Castellanos, J. E. (2019). Resin-dentin bonding interface: mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. *International Journal of Biomaterials*, *2019*(1), 5268342.
177. Nissinen, L., & Kähäri, V.-M. (2014). Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1840*(8), 2571–2580.
178. Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., & Mobashery, S. (1998). Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *The FASEB Journal*, *12*(12), 1075–1095.
179. Snoek-van Beurden, P. A. M., & Von den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, *38*(1), 73–83.
180. Garnero, P., Ferreras, M., Karsdal, M. A., Nicamhlaoibh, R., Risteli, J., Borel, O., Qvist, P., Delmas, P. D., Foged, N. T., & Delaisse, J. M. (2003). The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(5), 859–867.
181. De, G. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, *74*, 111–122.
182. Brew, K., Dinakarpandian, D., & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1477*(1–2), 267–283.
183. Woessner, J. F., & Nagase, H. (2000). *Matrix Metalloproteinases and TlMPs*. Oxford University Press.
184. Sabatini, C., & Pashley, D. H. (2014). Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review. *American Journal of Dentistry*, *27*(4), 203.
185. Van Strijp, A. J. P., Jansen, D. C., DeGroot, J., Ten Cate, J. M., & Everts, V. (2003). Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Research*, *37*(1), 58–65.
186. Martin-De Las Heras, S., Valenzuela, A., & Overall, C. M. (2000). The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology*, *45*(9), 757–765.
187. Tjaderhane, L. (2002). The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in human odontoblasts. *Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001*, 45–51.
188. Tjäderhane, L., Larjava, H., Sorsa, T., Uitto, V.-J., Larmas, M., & Salo, T. (1998). The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of Dental Research*, *77*(8), 1622–1629.
189. Perdigão, J., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2013). Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *25*(4), 219–241.
190. Wang, Y., & Spencer, P. (2002). Analysis of acid-treated dentin smear debris and smear layers using confocal Raman microspectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *60*(2), 300–308.

191. Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *OPERATIVE DENTISTRY-UNIVERSITY OF WASHINGTON-*, *28*(3), 215–235.
192. Van Meerbeek, B., Vanherle, G., Lambrechts, P., & Braem, M. (1992). Dentin-and enamel-bonding agents. *Current Opinion in Dentistry*, *2*, 117–127.
193. Shokati, B., Tam, L. E., Santerre, J. P., & Finer, Y. (2010). Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *94*(1), 230–237.
194. Wang, Y., & Spencer, P. (2003). Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *Journal of Dental Research*, *82*(2), 141–145.
195. Zhang, S., & Kern, M. (2009). The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *International Journal of Oral Science*, *1*(4), 163–176.
196. Tay, F. R., Pashley, D. H., Loushine, R. J., Weller, R. N., Monticelli, F., & Osorio, R. (2006). Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *Journal of Endodontics*, *32*(9), 862–868.
197. Perdigao, J., Denehy, G. E., & Swift Jr, E. J. (1994). Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *American Journal of Dentistry*, *7*(2), 81–84.
198. Hebling, J., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., & Tay, F. R. (2005). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal of Dental Research*, *84*(8), 741–746.
199. Breschi, L., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., Visintini, E., Tjäderhane, L., Ruggeri Jr, A., Tay, F. R., Dorigo, E. D. S., & Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dental Materials*, *26*(4), 320–325.
200. MG, B. (2009). In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent*, *34*, 381–385.
201. Brackett, W. W., Tay, F. R., Brackett, M. G., Dib, A., Sword, R. J., & Pashley, D. H. (2007). The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Operative Dentistry*, *32*(2), 107–111.
202. Scaffa, P. M. C., Vidal, C. de M. P., Barros, N., Gesteira, T. F., Carmona, A. K., Breschi, L., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., Tersariol, Il., & Nascimento, F. D. (2012). Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *Journal of Dental Research*, *91*(4), 420–425.
203. Kim, J., Uchiyama, T., Carrilho, M., Agee, K. A., Mazzoni, A., Breschi, L., Carvalho, R. M., Tjäderhane, L., Looney, S., Wimmer, C., Tezvergil-Mutluay, A., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dental Materials*, *26*(8), 771–778. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.04.001
204. Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K., Hoshika, T., Materials, M. C.-D., & 2010, undefined. (n.d.). The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *ElsevierA Tezvergil-Mutluay, KA Agee, T Hoshika, M Carrilho, L Breschi, L Tjäderhane, Y NishitaniDental Materials, 2010•Elsevier*. Retrieved October 2, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564110001752
205. Hannas, A. R., Lica, A., Hannas, R., Pereira, J. C., Granjeiro, J. M., Tja¨derhane, L., & Tja¨derhane, T. (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Taylor & FrancisAR Hannas, JC Pereira, JM Granjeiro, L TjäderhaneActa Odontologica Scandinavica, 2007•Taylor & Francis*, *65*(1), 1–13. https://doi.org/10.1080/00016350600963640
206. Sabatini, C. (2013). Effect of a chlorhexidine-containing adhesive on dentin bond strength stability. *Operative Dentistry*, *38*(6), 609–617. https://doi.org/10.2341/12-239-L
207. Breschi, L., Martin, P., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., Tjäderhane, L., Visintini, E., Cadenaro, M., Tay, F. R., Dorigo, E. D. S., & Pashley, D. H. (2010). Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, *26*(6), 571–578. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.02.007
208. Breschi, L., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., Visintini, E., Tjäderhane, L., Ruggeri, A., Tay, F. R., Dorigo, E. D. S., & Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, *26*(4), 320–325. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2009.11.153
209. Pashley, D., Tay, F., Breschi, L., materials, L. T.-D., & 2011, undefined. (n.d.). State of the art etch-and-rinse adhesives. *ElsevierDH Pashley, FR Tay, L Breschi, L Tjäderhane, RM Carvalho, M CarrilhoDental Materials, 2011•Elsevier*. Retrieved October 2, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564110004598
210. Loguercio, A., Stanislawczuk, R., … L. P.-E. journal of, & 2009, undefined. (2009). Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin–dentin bond strength durability. *Wiley Online LibraryAD Loguercio, R Stanislawczuk, LG Polli, JA Costa, MD Michel, A ReisEuropean*

Journal of Oral Sciences, 2009•Wiley Online Library, *117*(5), 587–596. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00663.x
211. Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K. A., Uchiyama, T., Imazato, S., Mutluay, M. M., Cadenaro, M., Breschi, L., Nishitani, Y., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2011). The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *Journal of Dental Research*, *90*(4), 535–540. https://doi.org/10.1177/0022034510389472
212. Dentistry, J. K. 3rd-A. J. of, & 1997, undefined. (n.d.). One step bond strength to enamel and dentin. *Europepmc.OrgJ Kanca 3rdAmerican Journal of Dentistry, 1997•europepmc.Org*. Retrieved October 2, 2024, from https://europepmc.org/article/med/9545912
213. Turkun, M., Cal, E., … M. T.-O., & 2005, undefined. (n.d.). Effects of dentin disinfectants on the shear bond strength of all-ceramics to dentin. *Meridian.Allenpress.ComM Turkun, E Cal, M Toman, S ToksavulOPERATIVE DENTISTRY-UNIVERSITY OF WASHINGTON-, 2005•meridian.Allenpress.Com*. Retrieved October 2, 2024, from https://meridian.allenpress.com/operative-dentistry/article-pdf/30/4/1/1819389/1559-2863-30-4-1.pdf#page=47
214. Imazato, S., Kinomoto, Y., Tarumi, H., Torii, M., Russell, R. R. B., & McCabe, J. F. (1997). Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *Journal of Dental Research*, *76*(3), 768–772. https://doi.org/10.1177/00220345970760030901
215. journal, S. I.-D. materials, & 2009, undefined. (2009). Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Jstage.Jst.Go.JpS ImazatoDental Materials Journal, 2009•jstage.Jst.Go.Jp*, *28*(1), 11–19. https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/28/1/28_1_11/_article/-char/ja/
216. Nakajima, M., Okuda, M., … M. O.-O., & 2003, undefined. (2003). The durability of a fluoride-releasing resin adhesive system to dentin. *Meridian.Allenpress.ComM Nakajima, M Okuda, M Ogata, PN Pereira, J Tagami, DH PashleyOperative Dentistry, 2003•meridian.Allenpress.Com*. https://meridian.allenpress.com/operative-dentistry/article-pdf/28/2/1/1819315/1559-2863-28-2-1.pdf#page=84
217. Donmez, N., Belli, S., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2005). Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *Journal of Dental Research*, *84*(4), 355–359. https://doi.org/10.1177/154405910508400412
218. Heikkilä, P., Teronen, O., … M. M.-A., & 2002, undefined. (n.d.). Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type. *Journals.Lww.Com*. Retrieved October 3, 2024, from https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/fulltext/2002/03000/bisphosphonates_inhibit_stromelysin_1__mmp_3_,.6.aspx
219. Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K., Hoshika, T., biomaterialia, F. T.-A., & 2010, undefined. (n.d.). The inhibitory effect of polyvinylphosphonic acid on functional matrix metalloproteinase activities in human demineralized dentin. *ElsevierA Tezvergil-Mutluay, KA Agee, T Hoshika, FR Tay, DH PashleyActa Biomaterialia, 2010•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270611000245X
220. Gu, L., Kim, Y., Liu, Y., Takahashi, K., Arun, S., biomaterialia, C. W.-A., & 2011, undefined. (n.d.). Immobilization of a phosphonated analog of matrix phosphoproteins within cross-linked collagen as a templating mechanism for biomimetic mineralization. *Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706110003569
221. Nagase, H., Visse, R., research, G. M.-C., & 2006, undefined. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Academic.Oup.ComH Nagase, R Visse, G MurphyCardiovascular Research, 2006•academic.Oup.Com*. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002
222. Souza, A., Gerlach, R., Biomaterials, S. L.-, & 2001, undefined. (n.d.). Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *ElsevierAP Souza, RF Gerlach, SRP LineBiomaterials, 2001•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200003884
223. Souza, A. De, Gerlach, R., Materials, S. L.-D., & 2000, undefined. (n.d.). Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *ElsevierAP De Souza, RF Gerlach, SRP LineDental Materials, 2000•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564199000846
224. Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., dentistry, M. R.-R.-J. of, & 2011, undefined. (n.d.). Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *ElsevierR Osorio, M Yamauti, E Osorio, ME Ruiz-Requena, DH Pashley, FR Tay, M ToledanoJournal of Dentistry, 2011•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571210002794

225. Toledano, M., Yamauti, M., Osorio, E., research, R. O.-C., & 2012, undefined. (n.d.). Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. *Karger.ComM Toledano, M Yamauti, E Osorio, R OsorioCaries Research, 2012•karger.Com*. Retrieved October 3, 2024, from https://karger.com/cre/article-abstract/46/3/201/85475
226. Toledano, M., Yamauti, M., Ruiz-Requena, M., Dentistry, R. O.-J. of, & 2012, undefined. (n.d.). A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *ElsevierM Toledano, M Yamauti, ME Ruiz-Requena, R OsorioJournal of Dentistry, 2012•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571212001297
227. Santos, M. C. L. G., De Souza, A. P., Gerlach, R. F., Trevilatto, P. C., Scarel-Caminaga, R. M., & Line, S. R. P. (2004). Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *Journal of Oral Rehabilitation*, *31*(7), 660–664. https://doi.org/10.1111/J.1365-2842.2004.01297.X
228. Toledano, M., Yamauti, M., Ruiz-Requena, M., Dentistry, R. O.-J. of, & 2012, undefined. (n.d.). A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *ElsevierM Toledano, M Yamauti, ME Ruiz-Requena, R OsorioJournal of Dentistry, 2012•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571212001297
229. Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., Román, J. S., & Toledano, M. (2011). Zinc-doped dentin adhesive for collagen protection at the hybrid layer. *European Journal of Oral Sciences*, *119*(5), 401–410. https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.2011.00853.X
230. Rosenberg, K., Olsson, H., … M. M.-J. of B., & 1998, undefined. (1998). Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *ASBMB*. https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20397
231. Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K., Hoshika, T., Materials, T. U.-D., & 2011, undefined. (n.d.). Inhibition of MMPs by alcohols. *ElsevierA Tezvergil-Mutluay, KA Agee, T Hoshika, T Uchiyama, L Tjäderhane, L Breschi, A MazzoniDental Materials, 2011•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564111001370
232. Fisher, J., Reviews, S. M.-C. and M., & 2006, undefined. (2006). Recent advances in MMP inhibitor design. *SpringerJF Fisher, S MobasheryCancer and Metastasis Reviews, 2006•Springer*, *25*(1), 115–136. https://doi.org/10.1007/s10555-006-7894-9
233. Breschi, L., Martin, P., Mazzoni, A., Nato, F., Materials, M. C.-D., & 2010, undefined. (n.d.). Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *ElsevierL Breschi, P Martin, A Mazzoni, F Nato, M Carrilho, L Tjäderhane, E Visintini, M CadenaroDental Materials, 2010•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564110000497
234. Almahdy, A., Koller, G., Sauro, S., Barts, J. W., Sherriff, M., Watson, T. F., & Banerjee, A. (2012). Effects of MMP inhibitors incorporated within dental adhesives. *Journal of Dental Research*, *91*(6), 605–611. https://doi.org/10.1177/0022034512446339
235. Breschi, L., Martin, P., Mazzoni, A., Nato, F., Materials, M. C.-D., & 2010, undefined. (n.d.). Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *ElsevierL Breschi, P Martin, A Mazzoni, F Nato, M Carrilho, L Tjäderhane, E Visintini, M CadenaroDental Materials, 2010•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564110000497
236. Lührs, A. K., De Munck, J., Geurtsen, W., & Van Meerbeek, B. (2013). Does inhibition of proteolytic activity improve adhesive luting? *European Journal of Oral Sciences*, *121*(2), 121–131. https://doi.org/10.1111/EOS.12018
237. Sulkala, M., Wahlgren, J., Larmas, M., Sorsa, T., Teronen, O., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2001). The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *Journal of Dental Research*, *80*(6), 1545–1549. https://doi.org/10.1177/00220345010800061301
238. Golub, L. M., Ramamurthy, N. S., McNamara, T. F., Greenwald, R. A., & Rifkin, B. R. (1991). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: New therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *2*(3), 297–321. https://doi.org/10.1177/10454411910020030201
239. Griffin, M., Ceballos, G., research, F. V.-P., & 2011, undefined. (n.d.). Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *ElsevierMO Griffin, G Ceballos, FJ VillarrealPharmacological Research, 2011•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661810001969
240. Tezvergil-Mutluay, A., Mutluay, M. M., Agee, K. A., Seseogullari-Dirihan, R., Hoshika, T., Cadenaro, M., Breschi, L., Vallittu, P., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *Journal of Dental Research*, *91*(2), 192–196. https://doi.org/10.1177/0022034511427705
241. Seseogullari-Dirihan, R. (2016). *Effect of Collagen Crosslinkers on Dentin Protease Activity*. *1253*. https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/125587/AnnalesD1253.pdf?sequence=2

242. Avila, M., Surgery, J. N.-J. of C. & R., & 2010, undefined. (n.d.). Effect of genipin collagen crosslinking on porcine corneas. *Journals.Lww.ComMY Avila, JL NaviaJournal of Cataract & Refractive Surgery, 2010•journals.Lww.Com*. Retrieved October 3, 2024, from https://journals.lww.com/jcrs/fulltext/2010/04000/Effect_of_genipin_collagen_crosslinking_on_porcine.21.aspx
243. Ma, D., Lai, J., Cheng, H., Tsai, C., Biomaterials, L. Y.-, & 2010, undefined. (n.d.). Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *ElsevierDHK Ma, JY Lai, HY Cheng, CC Tsai, LK YehBiomaterials, 2010•Elsevier*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210006526
244. Tezvergil-Mutluay, A., Seseogullari-Dirihan, R., Feitosa, V. P., Tay, F. R., Watson, T. F., Pashley, D. H., & Sauro, S. (2014). Zoledronate and ion-releasing resins impair dentin collagen degradation. *Journal of Dental Research*, *93*(10), 999–1004. https://doi.org/10.1177/0022034514546043
245. Bedran-Russo, A. K. B., Vidal, C. M. P., Dos Santos, P. H., & Castellan, C. S. (2010). Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *94*(1), 250–255. https://doi.org/10.1002/JBM.B.31649
246. Mazzoni, A., Apolonio, F. M., Saboia, V. P. A., Santi, S., Angeloni, V., Checchi, V., Curci, R., Di Lenarda, R., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Breschi, L. (2014). Carbodiimide inactivation of MMPs and effect on dentin bonding. *Journal of Dental Research*, *93*(3), 263–268. https://doi.org/10.1177/0022034513516465
247. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., Joy, D. C., Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., & Ritchie, N. W. M. (2018). Quantitative Analysis: The SEM/EDS Elemental Microanalysis k-ratio Procedure for Bulk Specimens, Step-by-Step. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, 309–339.
248. Brodusch, N., Demers, H., & Gauvin, R. (2017). *Field emission scanning electron microscopy: New perspectives for materials characterization*. Springer.
249. Zhou, W., & Wang, Z. L. (2007). *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. Springer science & business media.
250. Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, 1–40.
251. Lei, C., Jiyao, L., Xu, H. H. K., & Xuedong, Z. (2016). Demineralization and remineralization. *Dental Caries: Principles and Management*, 71–83. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47450-1_4
252. Organization, W. H. (2022). *Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030*. https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=XnwOEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Global+oral+health+status+report:+towards+universal+health+coverage+for+oral+health+by+2030&ots=DSCrhIm7NU&sig=SGLQeJw6hryyrW1rmvtMeNggAmc
253. Deb, S., & Chana, S. (2015). Biomaterials in Relation to Dentistry. *Frontiers of Oral Biology*, *17*, 1–12. https://doi.org/10.1159/000381686
254. Fan, Y., Sun, Z., Biomaterials, J. M.-O.-, & 2009, undefined. (n.d.). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *ElsevierY Fan, Z Sun, J Moradian-OldakBiomaterials, 2009•Elsevier*. Retrieved October 27, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208008107
255. ten Cate, J. M., & Buzalaf, M. A. R. (2019). Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist... *Journal of Dental Research*, *98*(7), 725–730. https://doi.org/10.1177/0022034519831604
256. Cao, Y., Mei, M. L., Li, Q. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2014). Agarose hydrogel biomimetic mineralization model for the regeneration of enamel prismlike tissue. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *6*(1), 410–420. https://doi.org/10.1021/AM4044823
257. Jee, S. S., Thula, T. T., & Gower, L. B. (2010). Development of bone-like composites via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. Part 1: influence of polymer molecular weight. *Acta Biomaterialia*, *6*(9), 3676–3686. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.03.036
258. Cao, C. Y., Mei, M. L., Li, Q.-L., Chin, E., Lo, M., & Chu, C. H. (2015). Methods for Biomimetic Remineralization of Human Dentine: A Systematic Review. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, *16*, 16. https://doi.org/10.3390/ijms16034615
259. Bertassoni, L., Habelitz, S., Kinney, J., … S. M.-C., & 2009, undefined. (2009). Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Karger.ComLE Bertassoni, S Habelitz, JH Kinney, SJ Marshall, GW Marshall JrCaries Research, 2009•karger.Com*, *43*(1), 70–77. https://doi.org/10.1159/000201593
260. Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *Journal of Dental Research*, *88*(8), 719–724. https://doi.org/10.1177/0022034509341826

261. Mai, S., Kim, Y. K., Kim, J., Yiu, C. K. Y., Ling, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). In vitro remineralization of severely compromised bonded dentin. *Journal of Dental Research*, *89*(4), 405–410. https://doi.org/10.1177/0022034510363662
262. Mai, S., Kim, Y. K., Toledano, M., Breschi, L., Ling, J. Q., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2009). Phosphoric acid esters cannot replace polyvinylphosphonic acid as phosphoprotein analogs in biomimetic remineralization of resin-bonded dentin. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, *25*(10), 1230. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2009.05.001
263. Kim, J., Vaughn, R. M., Gu, L., Rockman, R. A., Arola, D. D., Schafer, T. E., Choi, K. K., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). Imperfect hybrid layers created by an aggressive one-step self-etch adhesive in primary dentin are amendable to biomimetic remineralization in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *93*(4), 1225–1234. https://doi.org/10.1002/JBM.A.32612
264. Liu, Y., Mai, S., Li, N., Yiu, C. K. Y., Mao, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomaterialia*, *7*(4), 1742–1751. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.11.028
265. Kim, J., Mai, S., Carrilho, M. R., Yiu, C. K. Y., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). An All-in-One Adhesive Does Not Etch beyond Hybrid Layers. *Journal of Dental Research*, *89*(5), 482. https://doi.org/10.1177/0022034510363665
266. Qi, Y. P., Li, N., Niu, L. N., Primus, C. M., Ling, J. Q., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2012). Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomaterialia*, *8*(2), 836–842. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2011.10.033
267. Liu, Y., Li, N., Qi, Y., Niu, L. N., Elshafiy, S., Mao, J., Breschi, L., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dental Materials*, *27*(5), 465–477. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2011.01.008
268. Kim, Y. K., Mai, S., Mazzoni, A., Liu, Y., Tezvergil-Mutluay, A., Takahashi, K., Zhang, K., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices – implications in the aging of resin-dentin bonds. *Acta Biomaterialia*, *6*(9), 3729. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.03.021
269. Ma, Q., Chen, J., Xu, X., & Wang, T. (2020). Impact of transparent tray-based application of bioactive glasses desensitizer on the permeability of enamel and dentin to hydrogen peroxide: an in vitro study. *BMC Oral Health*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/S12903-020-01096-5
270. Khijmatgar, S., Reddy, U., John, S., Badavannavar, A. N., & D Souza, T. (2020). Is there evidence for Novamin application in remineralization?: A Systematic review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *10*(2), 87–92. https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2020.01.001
271. Manz, A. S., Attin, T., Sener, B., & Sahrmann, P. (2019). Dentin tubule obturation of a bioglass-based dentin desensitizer under repeated exposure to lactid acid and brushing. *BMC Oral Health*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/S12903-019-0962-7/PEER-REVIEW
272. Milly, H., Festy, F., Watson, T. F., Thompson, I., & Banerjee, A. (2014). Enamel white spot lesions can remineralise using bio-active glass and polyacrylic acid-modified bio-active glass powders. *Journal of Dentistry*, *42*(2), 158–166. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2013.11.012
273. Wang, Z., Jiang, T., Sauro, S., Wang, Y., Thompson, I., Watson, T. F., Sa, Y., Xing, W., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2011). Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *Journal of Dentistry*, *39*(11), 746–756. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2011.08.006
274. Wang, Z., Shen, Y., Haapasalo, M., Wang, J., Jiang, T., Wang, Y., Watson, T. F., & Sauro, S. (2014). Polycarboxylated microfillers incorporated into light-curable resin-based dental adhesives evoke remineralization at the mineral-depleted dentin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *25*(7), 679–697. https://doi.org/10.1080/09205063.2014.891926
275. Vollenweider, M., Brunner, T. J., Knecht, S., Grass, R. N., Zehnder, M., Imfeld, T., & Stark, W. J. (2007). Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomaterialia*, *3*(6), 936–943. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.003
276. Van Gestel, N. A. P., Geurts, J., Hulsen, D. J. W., Van Rietbergen, B., Hofmann, S., & Arts, J. J. (2015). Clinical Applications of S53P4 Bioactive Glass in Bone Healing and Osteomyelitic Treatment: A Literature Review. *BioMed Research International*, *2015*(1), 684826. https://doi.org/10.1155/2015/684826
277. Forsback, A. P., Areva, S., & Salonen, J. I. (2004). Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, *62*(1), 14–20. https://doi.org/10.1080/00016350310008012
278. Xie, D., Zhao, J., Weng, Y., Park, J. G., Jiang, H., & Platt, J. A. (2008). Bioactive glass-ionomer cement with potential therapeutic function to dentin capping mineralization. *European Journal of Oral Sciences*, *116*(5), 479–487. https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.2008.00562.X

279. Wu, Q., Mei, M. L., Wu, X., Shi, S., Xu, Y., Chu, C. H., & Chen, Y. (2020). Remineralising effect of 45S5 bioactive glass on artificial caries in dentine. *BMC Oral Health*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/S12903-020-1038-4/TABLES/2
280. Nagaset, H., & Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 21491–21494. https://doi.org/10.1074/JBC.274.31.21491
281. Carrilho, M. R., Tay, F. R., Donnelly, A. M., Agee, K. A., Tjäderhane, L., Mazzoni, A., Breschi, L., Foulger, S., & Pashley, D. H. (2009). Host-derived Loss of Dentin Matrix Stiffness Associated with Solubilization of Collagen. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, *90*(1), 373. https://doi.org/10.1002/JBM.B.31295
282. Ganss, C., Lussi, A., Sommer, N., Klimek, J., & Schlueter, N. (2010). Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Research*, *44*(3), 248–252.
283. Soares, I. P. M., Anselmi, C., Guiné, I., de Oliveira Fernandes, L., Pires, M. L. B. A., de Souza Costa, C. A., Scheffel, D. L. S., & Hebling, J. (2022). Inhibitory activity of S-PRG filler on collagen-bound MMPs and dentin matrix degradation. *Journal of Dentistry*, *124*, 104237.
284. Gonçalves, R. S., Scaffa, P. M. C., Giacomini, M. C., Vidal, C. de M. P., Honório, H. M., & Wang, L. (2018). Sodium trimetaphosphate as a novel strategy for matrix metalloproteinase inhibition and dentin remineralization. *Caries Research*, *52*(3), 189–198.
285. Zhou, W., Liu, S., Zhou, X., Hannig, M., Rupf, S., Feng, J., Peng, X., & Cheng, L. (2019). Modifying adhesive materials to improve the longevity of resinous restorations. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 723.
286. Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of Dental Research*, *90*(8), 953–968. https://doi.org/10.1177/0022034510391799
287. Sulkala, M., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Larmas, M., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2007). Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archives of Oral Biology*, *52*(2), 121–127. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2006.08.009
288. Stanley, A., Wilson, M., & Newman, H. N. (1989). The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, *16*(4), 259–264.
289. Mazzoni, A., Pashley, D. H., Tay, F. R., Gobbi, P., Orsini, G., Ruggeri, A., Carrilho, M., Tjäderhane, L., Di Lenarda, R., & Breschi, L. (2009). Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *88*(3), 697–703. https://doi.org/10.1002/JBM.A.31920
290. Sulkala, M., Larmas, M., Sorsa, T., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2002). The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *Journal of Dental Research*, *81*(9), 603–607. https://doi.org/10.1177/154405910208100905
291. MA, K. (2001). Type I collagen fragments ICTP and CTx reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res*, *16*, 195.
292. Aimes, R. T., & Quigley, J. P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type i collagen generating the specific ¾-and ¼-length fragments (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(11), 5872–5876.
293. Moon, P. C., Weaver, J., & Brooks, C. N. (2010). Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *The Open Dentistry Journal*, *4*, 147.
294. Boushell, L. W., & SWIFT EDWARD J, J. R. (2011). Dentin bonding: matrix metalloproteinases and chlorhexidine. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, *23*(5), 347–352.
295. Osorio, R., Yamauti, M., Osorio, E., Ruiz-Requena, M. E., Pashley, D., Tay, F., & Toledano, M. (2011). Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *European Journal of Oral Sciences*, *119*(1), 79–85.
296. Breschi, L., Mazzoni, A., Nato, F., Carrilho, M., materials, E. V.-D., & 2010, undefined. (n.d.). Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *ElsevierL Breschi, A Mazzoni, F Nato, M Carrilho, E Visintini, L Tjäderhane, A Ruggeri Jr, FR TayDental Materials, 2010•Elsevier*. Retrieved October 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564109004990
297. Huang, S., Gao, S., Cheng, L., dentistry, H. Y.-J. of, & 2010, undefined. (n.d.). Combined effects of nano-hydroxyapatite and Galla chinensis on remineralisation of initial enamel lesion in vitro. *ElsevierS Huang, S Gao, L Cheng, H YuJournal of Dentistry, 2010•Elsevier*. Retrieved November 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571210001648
298. Forsback, A. P., Areva, S., & Salonen, J. I. (2004). Mineralization of dentin induced by treatment with bioactive glass S53P4 in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*, *62*(1), 14–20. https://doi.org/10.1080/00016350310008012

299. Osorio, E., Fagundes, T., Navarro, M. F., Zanotto, E. D., Peitl, O., Osorio, R., Toledano-Osorio, M., & Toledano, M. (2015). A novel bioactive agent improves adhesion of resin-modified glass-ionomer to dentin. *Journal of Adhesion Science and Technology*, *29*(15), 1543–1552. https://doi.org/10.1080/01694243.2015.1030897
300. Khoroushi, M., Mousavinasab, S. M., Keshani, F., & Hashemi, S. (2013). Effect of resin-modified glass ionomer containing bioactive glass on the flexural strength and morphology of demineralized dentin. *Operative Dentistry*, *38*(2). https://doi.org/10.2341/11-325-L
301. White, D. J. (1995). The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Advances in Dental Research*, *9*(3). https://doi.org/10.1177/08959374950090030101
302. LS, R. S., & 2001, undefined. (n.d.). Enzyme activity and assays. *Researchgate.Net*. Retrieved November 3, 2024, from https://www.researchgate.net/profile/Abdelkader-Bouaziz/post/What-is-the-most-accepted-formula-for-enzyme-activity-calculation/attachment/6016381c1fe03f00010f65eb/AS%3A985902545379331%401612068892822/download/enzyme+activity.pdf
303. Mazzoni, A., Scaffa, P., Carrilho, M., Tjäderhane, L., Di Lenarda, R., Polimeni, A., Tezvergil-Mutluay, A., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Breschi, L. (2013). Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *Journal of Dental Research*, *92*(1), 82–86. https://doi.org/10.1177/0022034512467034
304. Kara, O., Seseogullari Dirihan, R., Sayin Ozel, G., Tezvergil Mutluay, A., & Usumez, A. (2021). Inhibition of cathepsin-K and matrix metalloproteinase by photodynamic therapy. *Dental Materials*, *37*(10), e485–e492. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2021.08.015
305. Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K. A., Hoshika, T., Carrilho, M., Breschi, L., Tjäderhane, L., Nishitani, Y., Carvalho, R. M., Looney, S., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2010). The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dental Materials*, *26*(11), 1059–1067. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.07.006
306. Francisconi, L. F., Hm, •, Rios, H. • D., Fávaro Francisconi, L., Marques Honório, H., Rios, D., Magalhães, A. C., Aparecida De Andrade, M., & Machado, M. (2008). Effect of erosive pH cycling on different restorative materials and on enamel restored with these materials. *Meridian.Allenpress.ComLF Francisconi, HM Honório, D Rios, AC Magalhães, MAAM Machado, MAR BuzalafOperative Dentistry, 2008•meridian.Allenpress.Com*, 203–208. https://doi.org/10.2341/07-77
307. Vieira, A., Lugtenborg, M., Ruben, J., research, M. H.-C., & 2006, undefined. (n.d.). Brushing abrasion of eroded bovine enamel pretreated with topical fluorides. *Karger.ComA Vieira, M Lugtenborg, JL Ruben, M HuysmansCaries Research, 2006•karger.Com*. Retrieved November 3, 2024, from https://karger.com/cre/article-abstract/40/3/224/84973
308. Rios, D., Honório, H., Magalhães, A., … A. D.-C., & 2006, undefined. (n.d.). Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Karger.ComD Rios, HM Honório, AC Magalhães, ACB Delbem, MAAM Machado, SMB SilvaCaries Research, 2006•karger.Com*. Retrieved November 3, 2024, from https://karger.com/cre/article-abstract/40/3/218/84987
309. Tschoppe, P., Zandim, D. L., Martus, P., & Kielbassa, A. M. (2011). Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, *39*(6), 430–437. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2011.03.008
310. Schmidlin, P., Zobrist, K., Attin, T., & Wegehaupt, F. (2016). *In vitro* re-hardening of artificial enamel caries lesions using enamel matrix proteins or self-assembling peptides. *Journal of Applied Oral Science*, *24*(1), 31–36. https://doi.org/10.1590/1678-775720150352
311. Kato, M., Hannas, A., Leite, A., Bolanho, A., … B. Z.-C., & 2011, undefined. (n.d.). Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Karger.ComMT Kato, AR Hannas, AL Leite, A Bolanho, BL Zarella, J Santos, M Carrilho, L TjäderhaneCaries Research, 2011•karger.Com*. Retrieved November 3, 2024, from https://karger.com/cre/article/45/5/429/85651
312. DeWald, J. P. (1997). The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: A review of infection control considerations. *Dental Materials*, *13*(2), 74–81. https://doi.org/10.1016/S0109-5641(97)80015-2
313. Francescut, P., Zimmerli, B., research, A. L.-C., & 2006, undefined. (n.d.). Influence of different storage methods on laser fluorescence values: a two-year study. *Karger.ComP Francescut, B Zimmerli, A LussiCaries Research, 2006•karger.Com*. Retrieved November 4, 2024, from https://karger.com/cre/article-abstract/40/3/181/84986
314. Armstrong, S., Keller, J., Materials, D. B.-D., & 2001, undefined. (n.d.). The influence of water storage and C-factor on the dentin–resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *ElsevierSR Armstrong, JC Keller, DB BoyerDental Materials,*

2001•Elsevier. Retrieved November 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564100000816
315. Toledano, M., Osorio, R., Osorio, E., Materials, F. A.-D., & 2007, undefined. (n.d.). Durability of resin–dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *ElsevierM Toledano, R Osorio, E Osorio, FS Aguilera, M Yamauti, DH Pashley, F TayDental Materials, 2007•Elsevier*. Retrieved November 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564106001989
316. Haller, B., Hofmann, N., Klaiber, B., Materials, U. B.-D., & 1993, undefined. (n.d.). Effect of storage media on microleakage of five dentin bonding agents. *ElsevierB Haller, N Hofmann, B Klaiber, U BlochingDental Materials, 1993•Elsevier*. Retrieved November 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/010956419390119B
317. Ziskind, D., Gleitman, J., Rotstein, I., & Friedman, M. (2003). Evaluation of cetylpyridinium chloride for infection control in storage solution. *Journal of Oral Rehabilitation*, *30*(5), 477–481. https://doi.org/10.1046/J.1365-2842.2003.01091.X
318. Komabayashi, T., Ahn, C., Zhang, S., Surgery, Q. Z.-O., Oral, undefined, & 2009, undefined. (n.d.). Chronologic comparison of root dentin moisture in extracted human teeth stored in formalin, sodium azide, and distilled water. *Elsevier*. Retrieved November 4, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210409001711
319. DeWald, J. P. (1997). The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: A review of infection control considerations. *Dental Materials*, *13*(2), 74–81. https://doi.org/10.1016/S0109-5641(97)80015-2
320. Goodis, H. E., Marshall, G. W., White, J. M., Gee, L., Hornberger, B., & Marshall, S. J. (1993). Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths. *Dental Materials*, *9*(2), 79–84. https://doi.org/10.1016/0109-5641(93)90079-6
321. Materials, J. D.-D., & 1997, undefined. (n.d.). The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations. *ElsevierJP DeWaldDental Materials, 1997•Elsevier*. Retrieved November 3, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0109564197800152
322. Ziskind, D., Gleitman, J., Rotstein, I., & Friedman, M. (2003). Evaluation of cetylpyridinium chloride for infection control in storage solution. *Journal of Oral Rehabilitation*, *30*(5), 477–481. https://doi.org/10.1046/J.1365-2842.2003.01091.X
323. Zheng, T., Huang, C., Zhang, Z., … S. W.-S. kou qiang yi, & 2005, undefined. (n.d.). Influence of storage methods on microtensile bond strength of dentin adhesive system. *Europepmc.OrgTL Zheng, C Huang, ZX Zhang, S Wang, G ZhangShanghai Kou Qiang Yi Xue= Shanghai Journal of Stomatology, 2005•europepmc.Org*. Retrieved November 4, 2024, from https://europepmc.org/article/med/15886839
324. Tosun, G., Sener, Y., journal, A. S.-D. materials, & 2007, undefined. (n.d.). Effect of storage duration/solution on microshear bond strength of composite to enamel. *Jstage.Jst.Go.JpG Tosun, Y Sener, A SengunDental Materials Journal, 2007•jstage.Jst.Go.Jp*. Retrieved November 4, 2024, from https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/26/1/26_1_116/_article/-char/ja/
325. Hope, C. K., Griffiths, D. A., & Prior, D. M. (2013). Finding an Alternative to Formalin for Sterilization of Extracted Teeth for Teaching Purposes. *Journal of Dental Education*, *77*(1), 68–71. https://doi.org/10.1002/J.0022-0337.2013.77.1.TB05445.X
326. Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, *42*(12), 1592–1602. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2014.09.004
327. Nozari, A., Ajami, S., Rafiei, A., & Niazi, E. (2017). Impact of nano hydroxyapatite, nano silver fluoride and sodium fluoride varnish on primary enamel remineralization: An in vitro study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *11*(9), ZC97–ZC100. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/30108.10694
328. Aydin, B., Pamir, T., Baltaci, A., Orman, M. N., & Turk, T. (2015). Effect of storage solutions on microhardness of crown enamel and dentin. *European Journal of Dentistry*, *9*(2), 262–266. https://doi.org/10.4103/1305-7456.156848
329. Miller, C. A., Ashworth, E., Deery, C., El Sharkasi, L., Moorehead, R. D., & Martin, N. (2021). Effect of Demineralizing Agents on Organic and Inorganic Components of Dentine. *Caries Research*, *55*(5), 521–533. https://doi.org/10.1159/000518463
330. Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dentistry Journal 2017, Vol. 5, Page 20*, *5*(2), 20. https://doi.org/10.3390/DJ5020020
331. DH, N. N. P. (1998). Hybridization of dental hard tissues. *Tokyo: Quintessence*, 54–56.
332. Chen, L., Chen, W., Yu, Y., Yang, J., Jiang, Q., Wu, W., & Yang, D. (2021). Effect of chlorhexidine-loaded poly(amido amine) dendrimer on matrix metalloproteinase activities and remineralization in etched human dentin in vitro. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *121*. https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2021.104625

333. Mazzoni, A., Angeloni, V., Sartori, N., Duarte, S., Maravic, T., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Breschi, L. (2017). Substantivity of Carbodiimide Inhibition on Dentinal Enzyme Activity over Time. *Journal of Dental Research*, *96*(8), 902–908. https://doi.org/10.1177/0022034517708312
334. Seseogullari-Dirihan, R., Apollonio, F., Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Pashley, D., Breschi, L., & Tezvergil-Mutluay, A. (2016). Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dental Materials*, *32*(3), 423–432. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2015.12.012
335. DeVito-Moraes, A. G., Francci, C., Vidal, C. M. P., Scaffa, P. M. C., Nesadal, D., Yamasaki, L. C., Nicolau, J., Nascimento, F. D., Pashley, D. H., & Carrilho, M. R. (2016). Phosphoric acid concentration affects dentinal MMPs activity. *Journal of Dentistry*, *53*, 30–37. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2016.06.002
336. Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., & Ferdinandy, P. (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *61*(2), 205–209. https://doi.org/10.1016/J.VASCN.2010.02.011
337. Niu, L. N., Zhang, L., Jiao, K., Li, F., Ding, Y. X., Wang, D. Y., Wang, M. Q., Tay, F. R., & Chen, J. H. (2011). Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *Journal of Dentistry*, *39*(8), 536–542. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2011.05.004
338. Mazzoni, A., Mannello, F., Tay, F. R., Tonti, G. A. M., Papa, S., Mazzotti, G., Di Lenarda, R., Pashley, D. H., & Breschi, L. (2007). Zymographic Analysis and Characterization of MMP-2 and -9 Forms in Human Sound Dentin. *Https://Doi.Org/10.1177/154405910708600509*, *86*(5), 436–440. https://doi.org/10.1177/154405910708600509
339. GROSS, J., & LAPIERE, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *48*(6), 1014–1022. https://doi.org/10.1073/PNAS.48.6.1014
340. Ricci, S., D'Esposito, V., Oriente, F., Formisano, P., & Di Carlo, A. (2016). Substrate-zymography: A still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *54*(8), 1281–1290. https://doi.org/10.1515/CCLM-2015-0668/MACHINEREADABLECITATION/RIS
341. Atmeh, A. R., Chong, E. Z., Richard, G., Festy, F., & Watson, T. F. (2012). Dentin-cement interfacial interaction: Calcium silicates and polyalkenoates. *Journal of Dental Research*, *91*(5), 454–459. https://doi.org/10.1177/0022034512443068
342. Leiendecker, A., Qi, Y., Sawyer, A., … L. N.-J. of, & 2012, undefined. (n.d.). Effects of calcium silicate–based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *ElsevierAP Leiendecker, YP Qi, AN Sawyer, LN Niu, KA Agee, RJ Loushine, RN Weller, DH PashleyJournal of Endodontics, 2012•Elsevier*. Retrieved November 24, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099239912000581
343. Tezvergil-Mutluay, A., Seseogullari-Dirihan, R., Feitosa, V. P., Cama, G., Brauer, D. S., & Sauro, S. (2017). Effects of Composites Containing Bioactive Glasses on Demineralized Dentin. *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/0022034517709464*, *96*(9), 999–1005. https://doi.org/10.1177/0022034517709464
344. Zhang, D., Hupa, M., & Hupa, L. (2008). In situ pH within particle beds of bioactive glasses. *Acta Biomaterialia*, *4*(5), 1498–1505. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2008.04.007
345. Do Amaral, S. F., Scaffa, P. M. C., Rodrigues, R. D. S., Nesadal, D., Marques, M. M., Nogueira, F. N., & Sobral, M. A. P. (2018). Dynamic Influence of pH on Metalloproteinase Activity in Human Coronal and Radicular Dentin. *Caries Research*, *52*(1–2), 113–118. https://doi.org/10.1159/000479825
346. Gendron, R., Grenier, D., Sorsa, T., & Mayrand, D. (1999). Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *6*(3), 437–439. https://doi.org/10.1128/CDLI.6.3.437-439.1999/FORMAT/EPUB
347. Valério, R. A., Galo, R., Galafassi, D., Corona, S. A. M., & Borsatto, M. C. (2020). Four-year clinical prospective follow-up of resin composite restoration after selective caries removal using Er:YAG laser. *Clinical Oral Investigations*, *24*(7), 2271–2283. https://doi.org/10.1007/S00784-019-03082-W
348. Galafassi, D., Scatena, C., Galo, R., Curylofo-Zotti, F. A., Corona, S. A. M., & Borsatto, M. C. (2017). Clinical evaluation of composite restorations in Er:YAG laser-prepared cavities re-wetting with chlorhexidine. *Clinical Oral Investigations*, *21*(4), 1231–1241. https://doi.org/10.1007/S00784-016-1897-X
349. Araújo, M. S. R. G., Souza, L. C., Apolonio, F. M., Barros, L. O., Reis, A., Loguercio, A. D., & Saboia, V. P. A. (2015). Two-year clinical evaluation of chlorhexidine incorporation in two-step self-etch adhesive. *Journal of Dentistry*, *43*(1), 140–148. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2014.07.010

350. Sartori, N., Stolf, S. C., Silva, S. B., Lopes, G. C., & Carrilho, M. (2013). Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: A 3-year follow-up. *Journal of Dentistry*, *41*(12), 1188–1195. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2013.09.004
351. Willenbrock, F., Crabbe, T., Slocombe, P. M., Sutton, C. W., Docherty, A. J. P., Cockett, M. I., Brocklehurst, K., & Phillips, I. R. (1993). The Activity of the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Is Regulated by C-Terminal Domain Interactions: A Kinetic Analysis of the Inhibition of Gelatinase A. *Biochemistry*, *32*(16), 4330–4337. https://doi.org/10.1021/BI00067A023
352. Makowski, G. S., & Ramsby, M. L. (1998). Binding of latent matrix metalloproteinase 9 to fibrin: Activation via a plasmin-dependent pathway. *Inflammation*, *22*(3), 287–305. https://doi.org/10.1023/A:1022300216202
353. Brooks, P., Strömblad, S., Cell, L. S.-, & 1996, undefined. (n.d.). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin αvβ3. *Cell.ComPC Brooks, S Strömblad, LC Sanders, TL von Schalscha, RT Aimes, WG Stetler-StevensonCell, 1996•cell.Com*. Retrieved November 21, 2024, from https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81235-0
354. Fallahzadeh, F., Atai, M., & Ghasemi, S. (2019). Evaluation of dentin remineralization after application of bioactive glass 45S5, nano-tricalcium phosphate, and Biodentine. *Eurasian Journal of Biosciences*.
355. Chen, L., Chen, W., Yu, Y., Yang, J., Jiang, Q., Wu, W., & Yang, D. (2021). Effect of chlorhexidine-loaded poly(amido amine) dendrimer on matrix metalloproteinase activities and remineralization in etched human dentin in vitro. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *121*, 104625. https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2021.104625

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 05.06.2023-18370

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 26.05.2023
Toplantı Sayısı : 2023/11
Karar Sayısı : 11/15

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan Prof. Dr. Günseli Güven Polat'ın sorumlu, Doç. Dr. Eray Metin Güler ve Dt. Aslıhan Yelkenci'nin yardımcı araştırmacı olduğu 23/344 kayıt numaralı ***"45S5 ve S53P4 Biyoaktif Camların Tek Başına ve Klorheksidinle Kombine Kullanımında Matriks Matelloproteinaz, Sistein Katepsin Ekspresyonuna ve Dentin Remineralizasyonuna Etkisinin İn Vitro Değerlendirilmesi"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 26.05.2023 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Derya BÜYÜKKAYHAN
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Erhan ALABAY
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ÖZYAZICI
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Şükran ÖZDATLI KURTULUŞ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Gamze TEMİZ
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇİKLER
Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan DEMİRCİ
Öğretim Üyesi

29.05.2023 Memur

Feyzanur SEZGİN

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSLK36MTT5&eS=18370

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ HAMİDİYE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Sayın hasta,

Çekim endikasyonu konularak çekilmiş dişinizin **"45S5 ve S53P4 Biyoaktif Camların Tek Başına ve Klorheksidinle Kombine Kullanımının Matriks Matelloproteinaz Ekspresyonuna ve Dentin Yüzey Özelliklerine Etkisinin İn Vitro Değerlendirilmesi''** isimli bilimsel araştırma çalışmasında kullanılabilmesi için izin istenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Çekilmiş dişlerin, **"45S5 ve S53P4 Biyoaktif Camların Tek Başına ve Klorheksidinle Kombine Kullanımında Matriks Matelloproteinaz, Sistein Katepsin Ekspresyonuna ve Dentin Remineralizasyonuna Etkisinin İn Vitro Değerlendirilmesi''** isimli çalışmada değerlendirilmesi ile diş çürüğünün durdurulması için kullanılabilecek materyallerin etkinliği, klinikte kullanımı sonucunda avantaj sağlanıp sağlanamayacağı bu deneysel çalışma sayesinde araştırılmış olacaktır. Bu çalışma sonucunda amacımız diş çürüklerinin durdurulması için kullanılabilecek materyaller hakkında daha detaylı bilgiler elde etmektir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI RİSKLERİ NELERDİR?

Çalışmaya katılmanın herhangi bir olası riski bulunmamaktadır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak araştırmaya katılım için onay vermiş olacaksınız. Bununla birlikte kimlik bilgileriniz çalışmanın herhangi bir aşamasında kullanılmayacak, yalnızca çekilmiş diş çalışma içinde değerlendirilecektir.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİ:

Adı Soyadı: Aslıhan YELKENCİ, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği AD

Telefon:

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.

Gönüllü Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	

Araştırmacı Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	