T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN-VİTRO DEMİNERALİZE MİNE MODELİNDE P11-4 VE KARBOKSİMETİL KİTOSANIN MİNE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM İLE TESPİTİ VE LİZOZİM İLE ETKİLEŞİMİNİN VE BİYOAKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

NUR IRMAK ERAKMAN YEL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜNSELİ GÜVEN POLAT
2. TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ EMİR ALPER TÜRKOĞLU

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2024

İTHAF

“Sevgili annem ve babam Ümit ve Metin Erakman’a, canım abim Fırat Erakman’a ve değerli eşim, hayat arkadaşım Hasan Burak Yel’e ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren üzerimde çok büyük emeği olan, bilgeliği ve üstün akademik başarısıyla bana hep yol gösteren, tezimin her aşamasıyla ilgilenen, aynı zamanda bir anne şevkatiyle yaklaşımını, sevgisini ve yüce gönüllüğünü benden eksik etmeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum ve kendime her zaman örnek alacağım, değerli hocam Prof. Dr. Günseli Güven Polat'a,

Tez sürecim boyunca deneylerimin tüm aşamasıyla titizlikle ilgilenen ve üstün tecrübesi, bilgileriyle deneylerime yardımcı olan, akademisyenliğin ve bilimin tanımını öğreten, interdisipliner çalışmanın önemini bana aşılayan, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum saygıdeğer ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emir Alper Türkoğlu'na,

Tez çalışmam sırasındaki değerli katkılarından dolayı, tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Şeniz Karaçay ve Doç. Dr. Emine Kaya hocalarıma,

Bana lisans eğitimimin ilk yıllarından başlayarak tüm tecrübelerini aktaran, sevgi ve şevkatini benden esirgemeyen canım Pınar Karataban Hocam'a,

Doktora hayatımı güzelleştiren, arkadaştan ziyade ablam gibi gördüğüm, beni her zaman destekleyen sevgili Dr. Öğr. Üyesi Gizem Yoğurucu Değerli'ye,

Doktoranın ilk gününden itibaren tüm zorlukları birlikte göğüslediğimiz, bana hep yardımcı olan, beni hep motive eden canım arkadaşlarım Dt. Zeynep Özsoy, Dt. Berna Öztürk Ateş ve içinde bulunmaktan mutluluk duyduğum Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı ailesine,

Bana hep inanan, güvenen, başarılarımın yegane kaynağı; annem Ümit, babam Metin ve abim Fırat Erakman'a,

İhtiyaç duyduğum her an yanımda olan, her konuda beni motive eden ve sevgisini bir an bile eksik etmeyen, en zor zamanlarımda bile beni güldürebilen, hayat arkadaşım, sevgili eşim Hasan Burak Yel'e teşekkür ederim…

Bu doktora tez çalışmasını bilimsel araştırmalar projesi kapsamında 2023/085 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 xii
SİMGELER VE KISALTMALAR xiv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. TÜKÜRÜK NEDİR? 4
2.1.1. Tükürüğün Fonksiyonları 6
2.1.1.1. Sindirim 6
2.1.1.2. Tamponlama etkisi ve nötralizasyon 7
2.1.1.3. Tat alma 8
2.1.1.4. Koruma ve lubrikasyon 8
2.1.1.5. Diş bütünlüğünün korunması 9
2.1.1.6. Antimikrobiyal etkinlik 9
2.2. TÜKÜRÜK VE DİŞ SAĞLIĞI 10
2.3. TÜKÜRÜĞÜN SAVUNMA MEKANİZMASI VE ANTİMİKROBİYAL PROTEİNLER 11
2.3.1. İmmünoglobulin A 12
2.3.2. Laktoferrin 12
2.3.3. Peroksidaz 12
2.3.4. Histatin 13
2.3.5. Defensin 13
2.3.6. Sistatin 13
2.3.7. Kathelisidin 14
2.3.8. Staterin 14
2.3.9. Müsin 14
2.3.10. Agglütinin 15
2.3.11. Prolince Zengin Proteinler 15
2.3.12. Lizozim 15

2.3.12.1. Lizozimin yapısı 16
2.3.12.2. Lizozimin diş çürüğünü engelleme mekanizması 17
2.3.12.3. Lizozim içeren ağız ve diş sağlığı ürünleri 18
2.4. REMİNERALİZASYON- DEMİNERALİZASYON VE TÜKÜRÜK 19
2.4.1. Demineralizasyon 20
2.4.2. Remineralizasyon 21
2.4.3. Demineralizasyon ve Remineralizyonda Tükürüğün Rolü 21
2.5. REMİNERALİZASYON VE ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN AJANLAR 22
2.5.1. Diş Hekimliğinde Güncel Biyomimetik Ajanlar 23
2.5.1.1. Kendiliğinden birleşen peptit P11-4 24
2.5.1.2. Karboksimetil kitosan 25
2.5.1.3. Deney aşamasındaki diğer biyomimetik ajanlar 26
2.6. DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN YÜZEY KARAKTERİZASYON TEKNİKLERİ 27
2.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu 28
2.7. PROTEİN-LİGAND BİYOETKİLEŞİMLERİ 28
2.7.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi 29
2.7.2. Moleküler Kenetlenme 31
2.7.3. Yüzey Plazmon Rezonans 32
2.8. BİYOLOJİK DOKULARDA ENZİM AKTİVİTESİ 33
2.8.1. Lizozim Aktivitesinin Belirlenmesi 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. GEREÇ 35
3.1.1. Deneyde Kullanılan Materyaller, Kimyasallar ve Çözeltiler 35
3.1.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar 37
3.1.3. Örnek Sayısının Tespiti 38
3.2. YÖNTEM 38
3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu için Örneklerin Hazırlanması 38
3.2.2. Mine Dokusunda *in-vitro* Demineralizasyon Oluşturulması 41
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 42
3.2.3.1. Yapay tükürük (1. grup-negatif kontrol 1) 42
3.2.3.2. Saf P11-4 ve yapay tükürük (2. grup) 43
3.2.3.3. Saf karboksimetil kitosan ve yapay tükürük (3. grup) 45
3.2.3.4. Yapay tükürük+lizozim (4. grup-negatif kontrol 2) 45
3.2.3.5. Saf P11-4 ve yapay tükürük+lizozim (5. grup) 46
3.2.3.6. Saf karboksimetil kitosan ve yapay tükürük+lizozim (6. grup) 46
3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Mine Yüzey Karakterizasyonu Çalışmaları 47

3.2.5. Saf P11-4 ve Karboksimetil Kitosan ile Biyoetkileşim Çalışmaları 48
3.2.5.1. Ultraviyole-görünür bölge spektroskopi çalışmaları 48
3.2.5.2. Moleküler kenetlenme yöntemi ile etkileşimlerin incelenmesi 49
3.2.5.3. Yüzey plazmon rezonans ile kinetik çalışmalar 50
3.2.6. Saf P11-4 ve Karboksimetil Kitosan ile Biyoaktivite Çalışmaları 54
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM 55
4. BULGULAR 57
4.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU GÖRÜNTÜLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI 57
4.2. BİYOETKİLEŞİM ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI 64
4.2.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi Çalışmalarının Sonuçları 64
4.2.2. Moleküler Kenetlenme Yöntemi ile Etkileşim Sonuçları 66
4.2.3. Yüzey Plazmon Rezonans ile Kinetik Çalışmaların Sonuçları 69
4.3. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI 71
5. TARTIŞMA 73
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 96
KAYNAKLAR 99
EKLER 119

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Çalışma grupları, uygulanan materyaller ve bekletilen ortam.....42

Tablo 3.2: Deney için hazırlanan yapay tükürük içeriği.....43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Tükürüğün özellikleri ve fonksiyonları 6

Şekil 2.2: Tükürüğün konak faktörlerinin bazı bakterilere karşı sinerjik etkisi 11

Şekil 2.3: Lizozimin üç boyutlu yapısı 16

Şekil 2.4: CMC'nin moleküler yapısı 26

Şekil 2.5: SEM cihazının çalışma mekanizması 28

Şekil 2.6: UV cihazının çalışma mekanizması 30

Şekil 2.7: Protein-ligand kompleks oluşumu 31

Şekil 2.8: SPR sensorgramın şematik gösterimi 33

Şekil 3.1: Deney akış şeması 35

Şekil 3.2: Moleküler kenetlenme işleminin gerçekleştirilmesi için hazırlanan moleküler doku kutusu 50

Şekil 3.3: Altın çip yüzeyinde MUA tasarımı (A), NHS-EDC solüsyonuyla aktivasyon (B), lizozim immobilizasyonu (C), kalan aktive edici grupların bloke edilmesi (D) 53

Şekil 4.1: Lizozim, CMC ve oluşturdukları kompleksin UV absorbsiyon spektrumu 65

Şekil 4.2: Lizozim, P11-4 ve oluşturdukları kompleksin UV absorbsiyon spektrumu 66

Şekil 4.3: CMC ve P11-4 için lizozim ile moleküler kenetlenme sonuçları: CMC-lizozim için elde edilen moleküler kenetlenme pozisyonu (A), P11-4-lizozim için elde edilen moleküler kenetlenme pozisyonu (B) 67

Şekil 4.4: En düşük enerjili moleküler kenetlenme sonuçlarını veren kompleks yapıların iki boyutlu etkileşim haritaları: CMC ve lizozimin moleküler kenetlenme işlemi sonucunda elde edilen bir kompleksi (A), CMC-lizozim iki boyutlu etkileşim haritası (B), P11-4 ve lizozimin moleküler kenetlenme işlemi sonucunda elde edilen bir kompleksi (C), P11-4-lizozim iki boyutlu etkileşim haritası (D) 68

Şekil 4.5: Artan derişimlerde (75-200 ppm) CMC ile immobilize lizozim etkileşiminin referans alınmış deneysel SPR etkileşim sensorgramı 70

Şekil 4.6: 12.000 ppm P11-4 ile immobilize lizozim etkileşiminin referans alınmış deneysel SPR etkileşim sensorgramı 70

Şekil 4.7: CMC'nin lizozim aktivitesi üzerine etkisi üç tekrarlı deney grafiği..... 71

Şekil 4.8: P11-4'ün lizozim aktivitesi üzerine üç tekrarlı deney grafiği..... 72

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1: Antibakteriyal tükürük proteini içerikli çeşitli ağız ve diş sağlığı ürünleri 19

Resim 2.2: Curodont Repair P11-4 25

Resim 3.1: Deney parametrelerinde ortak kullanılan lizozim, CMC ve P11-4 ürünleri 36

Resim 3.2: Deneyde kullanılan 3. büyük azı dişleri 39

Resim 3.3: Örneklerin temizlenmiş hali (A) ve kullanılan zımpara cihazı (B) 40

Resim 3.4: 4x4 etiketlerin bukkal yüzeye yapıştırılması (A), 2 kat cila uygulaması (B), bukkal yüzeyde 4x4'lük oluşan pencere (C, D) 40

Resim 3.5: Demineralizasyon solüsyonunun hazırlanması (A), dişlerin solüsyonda bekletilmesi (B), dişlerin kron ve köklerinin ayrılması (C), demineralize diş (D) 41

Resim 3.6: Dişlerin gruplara ayrılması 42

Resim 3.7: Toz formunda saf P11-4 43

Resim 3.8: NaClO uygulaması (A), fosforik asit uygulaması (B), P11-4'ün hazırlanması (C), P11-4 uygulaması (D) 44

Resim 3.9: Saf CMC (A), 1000 rpm'de CMC çözeltisi hazırlanması (B), jel formunda CMC (C), CMC uygulaması (D) 45

Resim 3.10: Yapay tükürüğe lizozim eklenmesi (A), manyetik karıştırıcıda çözünürlüğünün sağlanması (B) 46

Resim 3.11: Deneyde kullanılan SEM cihazı 47

Resim 3.12: Örneklere etanol serisi uygulanması 48

Resim 3.13: UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı (A), kuvarz küvetler (B), deney düzeneği (C) 49

Resim 3.14: SPR sistem düzeneği 51

Resim 3.15: Altın çipe pirana uygulaması (A), MUA uygulaması (B) 51

Resim 3.16: SPR analizi öncesinde hazırlık aşaması 52

Resim 3.17: Farklı derişimlerin ilgili SPR örnek tepsilerine yerleştirilmesi 54

Resim 3.18: Liyofilize *M. lysodeikticus* bakterileri (A) ve deney düzeneği (B) 55

Resim 4.1: Sağlam mine yüzeyinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri 57

Resim 4.2: Demineralize mine yüzeyinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri 58

Resim 4.3: Yapay tükürükte bekletilen mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri 59

Resim 4.4: P11-4 uygulanan mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri 60

Resim 4.5: CMC uygulanan mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri 61

Resim 4.6: Yapay tükürükte bekletilen mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri 62

Resim 4.7: Yapay tükürük+lizozim solüsyonunda bekletilen P11-4 uygulanmış dişlerin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri 63

Resim 4.8: Yapay tükürük+lizozim solüsyonunda bekletilen CMC uygulanmış dişlerin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP : Amorf Kalsiyum Fosfat

CPP-ACFP : Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Florid Fosfat

CPP-ACP : Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Fosfat

CFU : Koloni Oluşturan Birim

CMC : Karboksimetil Kitosan

EA-HCI : Etanolamin Hidroklorür

EÇÇ : Erken Çocukluk Çağı Çürüğü

EDC : N-Etil-N'-(3-(Dimetilamino) Propil) Karbodiimid

FTIR : Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi

GlcNAc : N-Asetilglukozamin

Glu : Glutamin

IC_{50} : Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyonu

Ig A : İmmünoglobülin A

Ig G : İmmünoglobülin G

K_2HPO_4 : Dipotasyum Fosfat

K_D : Denge Sabiti

KH_2PO_4 : Potasyum Dihidrojen Fosfat

MUA : 11-Merkaptoundekanoik Asit

MurNAc : N-asetil Muramik Asit

Na_2HPO_4 : Disodyum Fosfat

NHS : N-Hidroksisüksinimit

PAMAM : Poliamidoamin

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PDB : Protein Veri Bankası

PEG : Polietilenglikol

PES : Polieter Sülfon

SAXS : Küçük Açı X-Işını Saçılımı

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SEM-EDX : Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılım X Işını Spektrometresi

SPR : Yüzey Plazmon Rezonans

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

UFF : Universal Force Field

UV : Ultraviyole

XRT : X Işını Kırınım Topografisi

İN-VİTRO DEMİNERALİZE MİNE MODELİNDE P11-4 VE KARBOKSİMETİL KİTOSANIN MİNE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM İLE TESPİTİ VE LİZOZİM İLE ETKİLEŞİMİNİN VE BİYOAKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı biyomimetik amaçlı kullanılan P11-4 ve CMC materyallerinin mine üzerinde etkilerinin SEM ile tespit edilmesi ve bu materyallerin lizozim ile olan etkileşimlerinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: P11-4, CMC uygulanan ve uygulanmayan demineralize 3. azı dişleri, yapay tükürük ve lizozim içeren yapay tükürükte bekletilmek üzere altı gruba bölünmüştür. 28 gün sonunda SEM analizi ile mine yüzeyindeki değişimler incelenmiştir. Madde-lizozim komplekslerinin absorbsiyon spektrumları UV-görünür bölge spektrofotometresinde ölçülmüştür. Moleküler kenetlenme ile lizozim ve ilgili maddelerin etkileşimleri üç boyutlu olarak gerçekleştirilmiştir. SPR için artan derişimlerde P11-4 ve CMC'nin lizozim kaplı altın çip yüzeyine seri enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Madde-lizozim kombinasyonlarının *M. lysodeikticus*'a karşı litik aktivitesi UV-görünür bölge spektrofotometrede tespit edilmiştir.

Bulgular: SEM'de en iyi biyomimetik etkiyi P11-4 sağlamış, lizozim CMC ile biraraya gelerek yüzeyde dağılım yapmıştır. UV'de CMC, P11-4'e göre lizozimle daha iyi etkileşim göstermiştir. Moleküler kenetlenme çalışmalarında CMC-lizozim arasında yoğun etkileşim ağı oluşmuş, P11-4-lizozim etkileşiminde birbirini iten etkileşimler gözlemlenmiştir. SPR'de artan CMC derişimlerinde sinyallerin arttığı görülürken, P11-4'de anlamlı bir SPR sinyali görülmemiştir. Biyoaktivite çalışmalarında CMC lizozimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyon oluştururken, P11-4 lizozimi inhibe etmemiştir.

Sonuç: P11-4 biyomimetik açıdan CMC'ye göre ideal bir maddedir. Diş yüzeyine uygulandığında tükürük içerisindeki lizozimi inhibe etmemektedir. P11-4 lizozim ile etkileşime anlamlı derecede girmediği ve lizozimi inhibe etmediği için lizozimle kombine edilerek biyomimetik-antibakteriyal ürün üretilmesi açısından uygun bir materyaldir. CMC'nin biyomimetik etkisi vardır fakat diş yüzeyine

uygulandığında tükürükteki lizozimi inhibe etme potansiyaline sahiptir. CMC modifiye edilerek lizozimi inhibe etmeyecek şekilde bir biyomimetik-antibakteriyal ürün üretilebilmesi için çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktivite, CMC, Lizozim, P11-4, SEM, SPR

DETERMINATION OF EFFECTS OF P11-4 AND CARBOXYMETHYL CHITOSAN ON ENAMEL IN THE IN-VITRO DEMINERALIZED ENAMEL MODEL USING SEM AND EVALUATION OF ITS INTERACTION AND BIOACTIVITY WITH LYSOZYME

ABSTRACT

Aim: This study aims to determine the effects of P11-4 and CMC materials used for biomimetic purposes on enamel by SEM and to evaluate the interactions of these materials with lysozyme.

Materials and Methods: P11-4, CMC-applied and unapplied demineralized 3rd molars were divided into six groups to be stored in artificial saliva and artificial saliva containing lysozyme. At the end of 28 days, changes on the enamel surface were examined by SEM. Absorption spectra of the substance-lysozyme complexes were measured in the UV-visible spectrophotometer. Interactions of lysozyme and related substances were performed in three dimensions by molecular docking. Serial injections of P11-4 and CMC were performed on the lysozyme-coated gold chip surface for SPR at increasing concentrations. The lytic activity of the substance-lysozyme combinations against *M. lysodeikticus* was determined in the UV-visible spectrophotometer.

Results: P11-4 provided the best biomimetic effect in SEM, lysozyme combined with CMC and distributed on the surface. CMC showed better interaction with lysozyme than P11-4 in UV. In molecular docking, a dense interaction network was formed between CMC-lysozyme, and repulsive interactions were observed in P11-4-lysozyme interaction. While it was observed that the signals increased with increasing CMC concentrations in SPR, no significant SPR signal was observed in P11-4. In bioactivity, CMC binds to the active site of lysozyme and creates inhibition, while P11-4 did not inhibit lysozyme.

Conclusion: P11-4 is an ideal substance compared to CMC regarding biomimetics. When applied on teeth, it does not inhibit lysozyme in saliva. Since P11-4 does not interact significantly with lysozyme and does not inhibit lysozyme, it is a suitable material to produce biomimetic-antibacterial products by combining it with

lysozyme. CMC has a biomimetic effect, but when applied to the tooth surface, it has the potential to inhibit lysozyme in saliva. Studies are needed to produce a biomimetic-antibacterial product by modifying CMC so that it does not inhibit lysozyme.

Key Words: Bioactivity, CMC, Lysozyme, P11-4, SEM, SPR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Demineralizasyon, tüketilen yiyecek içecek veya bakteriyel kaynaklı asit atakları sonucu dişin mine, dentin gibi sert dokularında mevcut hidroksiapatitten Kalsiyum (Ca^{+2}) ve Fosfat (PO_4^{3-}) iyonlarının çözünmesi sonucu dişte mineral kaybına neden olan bir süreçtir (1). Demineralizasyon, çürük lezyonları veya eroziv lezyonlar olarak ortaya çıkabilmekte ve tedavi edilmezse diş ağrısına, diş pulpasının iltihaplanmasına ve sonunda diş kaybına yol açabilmektedir (2). Diş yapısının demineralizasyonu, yaştan bağımsız olarak nüfusun büyük bir bölümünü etkileyen bir ağız sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 verilerine göre diş çürüğü sonucunda meydana gelen demineralizasyon dünya genelinde tüm hastalıklar arasında en yaygın görüleni olup, daimi dişlerdeki çürükler 2 milyardan fazla insanı etkilenmekte iken, süt dişlerinde ise tedavi edilmeyen diş çürüğüne sahip çocuk sayısı 514 milyona ulaşmıştır (3).

Günümüz diş hekimliğinde, çürük diş dokularının tedavi edilmesinden çok koruyucu tedavilere ve demineralizasyonun başlangıç aşamasında teşhis edilerek bu sürecin geri döndürülmesine odaklanmıştır (4). Bugüne kadar bu amaçla flor en çok kullanılan ajanlardan biri olmasına rağmen, son zamanlarda florun minede yüzeyel bir remineralizasyon yarattığı, Flor (F^-), ile Ca^{+2} ve PO_4^{3-} iyonlarının lezyon derinliğine ulaşamadığı gözlemlenmiştir (4,5). Biyomimetik materyaller florun aksine, mine-dentin gibi diş sert dokularının doğal oluşum sürecini taklit edebilen materyaller olarak diş hekimliğinde yeni üretilmiş materyallerdir (6).

Kendiliğinden birleşen peptid P11-4, yapısında 11 adet aminoasit barındıran oligopeptit zinciridir. İyonik kuvvet ve pH gibi belirli koşullarda peptidler arasında kendiliğinden yapısal olarak birleşme meydana gelmektedir (7). Meydana gelen yapı yüzey altı çürük lezyonunda hidroksiapatit çekirdeklenmesini sağlamakta yani hidroksiapatitin taklit edilebileceği üç boyutlu iskele oluşturabilmektedir (8). Bu da yüzeyel olmayan içeride meydana gelen bir sert doku yenilenmesini teşvik etmektedir (9).

Kitosan genelde kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinde bulunan kitinin deasetilasyonundan elde edilen bir polimerdir. Karboksimetil Kitosan (CMC) ise kitosanın karboksimetilasyonu sonucu elde edilen polimerdir. Karboksil grupları

CMC'nin suda çözünürlüğünü, Ca^{2+} ile şelasyon kapasitesini, poliamfoterik özelliğini arttırmıştır. Bu özellikler karboksimetil kitosanı mine ve dentin rejenerasyonunda kullanımı için ideal özelliklere sahip güncel biyomineralizasyon materyali haline getirmiştir (10). Diş hekimliğinde biyomimetik bir ürün olarak henüz üretilmiş bir formu yoktur, fakat konu üzerine çalışmalar devam etmektedir (11,12).

Diş çürüğünün oluşumunda ve önlenmesinde tükürük miktarı ve bileşimi, beslenme, ağız hijyeni, diş fırçalama alışkanlığı, ailenin eğitim seviyesi, sosyoekonomik durum gibi etkenler rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında özellikle tükürük miktarının ve bileşiminin diş çürüğü oluşumunda doğrudan çürük önleyici etkisi vardır (13). Tükürük içerisinde çürük yapan bakterilere karşı antimikrobiyal ajanlar bulunmaktadır. Lizozim proteini de bunlar arasında yer almaktadır. Lizozim bakteri hücre duvarındaki spesifik bağları hidroliz ederek bakteri lizizi ve ölümüne sebep olmaktadır (14).

Eksojen madde-lizozim etkileşimlerinin belirlenmesi, moleküler bağlanma çalışmalarında büyük ilgi uyandırmıştır. Ultraviyole (UV) spektroskopik çalışmalar, moleküler kenetlenme, Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) gibi çeşitli teknikler madde-lizozim etkileşim analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikler sayesinde hem *in-vitro* hem de *in-siliko* şartlarda lizozim ile maddelerin etkileşimleri hakkında bilgi sağlanmaktadır (15–17).

P11-4 ve CMC gibi yeni üretilmiş biyomimetik özelliğe sahip dental materyaller ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcut olup, bu materyallerin biyomimetik özellik açısından karşılaştırıldıkları bir çalışma yoktur. Özellikle modifiye edilmiş CMC'nin genellikle dentin üzerinde incelendiği çalışmalar mevcutken saf CMC'nin mine biyomimetiği ile ilişkili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca çürük ve demineralizasyonun önlenmesinde dental materyaller haricinde kişinin tükürüğündeki mevcut savunma faktörleri önemli bir etkiye sahip olup, biyomimetik materyallerin lizozim gibi tükürük savunma proteinleri ile olan etkileşimi ve lizozimin aktivitesi üzerine olan etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle biyomimetik materyallerin tükürük içerikleri üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu araştırmalar ışığında gelecekte ağız diş sağlığı ürünlerine doğal tükürük savunma kompenentlerinin de eklenmesi ile

hem diş çürüğünü engelleyen veya olan çürüğün biyoremineralizasyonunu sağlayan hem de antibakteriyal etkinliği arttırılmış ürünler üretilebilir. Bu amaçla tezimizde P11-4 ve CMC maddelerinin lizozim ile olan etkileşimi, lizozim biyoaktivitesine etkisi ve maddelerin diş minesi üzerindeki biyomimetik kapasiteleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TÜKÜRÜK NEDİR?

Tükürük, oral kavitede yumuşak dokular ve diş yüzeylerini kaplayan kompleks, ekzokrin olarak salgılanan biyolojik bir vücut sıvısıdır (18,19). Ağız sağlığının korunmasının yanısıra genel vücut sağlığının da korunmasını sağlayan, vücudun fizyolojik ve patalojik durumunun tespit edilmesine katkıda bulunan bir sıvıdır (18). Hafif asidik, hipotonik, serömükoz vücut sıvısı olarak işlev göstermektedir (20). Normal tükürük renksiz, tatsız, transparan ve visközdür (21). pH değeri 6,5-7,5 arasında değişmektedir (22).

Oral kavitedeki tükürük salgısının çoğunluğu majör tükürük bezleri olan parotis, sublingual ve submandibular tükürük bezlerinden salgılanmaktadır. Çok sayıda minör tükürük bezleri tükürük salımına katkıda bulunmaktadır (23). Toplam tükürük miktarının yaklaşık %90'ı majör tükürük bezlerinden salgılanmaktadır (19,24). Uyarılmamış tükürüğün yaklaşık %20'si en büyük tükürük bezi olan parotis tükürük bezinden salgılanmaktadır. Uyarıldığında ise bu oran yaklaşık %53'e kadar yükselmektedir (25,26). Parotis tükürük bezinden müsin salgısı genellikle üretilmemekte, tükürük seröz içerikte salgılanmaktadır (25). İkinci en büyük tükürük bezi olan submandibular tükürük bezinden uyarılmamış tükürüğün yaklaşık %65'i salgılanmaktadır (27). Submandibular tükürük bezi karışık salgı yapan bir tükürük bezidir. Asinüs hücrelerden hem seröz hem de mükoz salım yapılmaktadır (25). Üçüncü en büyük tükürük bezi olan sublingual tükürük bezinden ise uyarılmamış tükürüğün yaklaşık %5-7'si salgılanmakta olup, sublingual tükürük bezlerinden salgılanan tükürük müsin içeriğe sahiptir (28). Labial, lingual, bukkal, palatinal ve retromolar bölgede lokalize olan sayıları 600-1.000 arasında değişen minör tükürük bezlerinden ise toplam tükürüğün yaklaşık %10'u oral kaviteye salgılanmaktadır (19,24).

Sağlıklı bir insanda günde ortalama 1.000-1.500 mL arasında tükürük üretimi olmaktadır (26). Ağızda fizyolojik olarak, istirahat halinde dış veya farmakolojik bir uyaran olmadan, günün %90'ınından daha fazla süresinde ağız dokularının nemlendirilmesi ve kayganlaştırılması için sürekli bir uyarılmamış bazal tükürük üretimi mevcuttur (24,29). Uyarılmış tükürük ise, mekanik, tatsal, kokusal veya

farmakolojik bir uyarana yanıt olarak üretilmektedir (30). Sağlıklı yetişkinlerde rapor edilen ortalama uyarılmamış tükürük akışı yaklaşık 0,25-0,35 mL/dk iken, uyarılmış tükürük akışı ise yaklaşık 1-3 mL/dk'dır (25,28). Sağlıklı bir çocukta bu değerler uyarılmamış tükürükte yaklaşık 0,32-0,96 mL/dk, uyarılmış tükürükte ise yaklaşık 1,05-2,5 mL/dk'dır (25,31).

Tükürüğün yapısal olarak çoğunluğu sudan oluşmaktadır. Ancak aynı zamanda proteinler, enzimler, hormonlar, iyonlar ve diğer bileşiklerin karmaşık bir karışımından da meydana gelmektedir (23). Tükürüğün %99'unu su, %1'ini ise inorganik iyonlar, elektrolitler, salgısal glikoproteinler, antibakteriyal bileşenler, immünoglobulinler, mukus, serum elemanları ile enzimler oluşturmaktadır (32,33). Total tükürüğün içeriğinde tükürük bezlerinden üretilen sıvı haricinde, bakteriler, yiyecek artıkları, epitelyal hücre kalıntıları, burun boşluğu ve farenks mukozası, diş eti oluğu sıvısı, oral mukoza transüdasından gelen sıvılar ve kandan türetilen bileşikler (plazma proteinleri, eritrositler ve lökositler) gibi glandüler olmayan yapıda bileşenler de bulunmaktadır. Diş eti oluğu sıvısı ve kandan türetilen bileşiklerin tükürükteki seviyeleri periodontal ve oral mukozadaki enflamasyonun derecesine bağlı olarak değişmektedir (24,34–36).

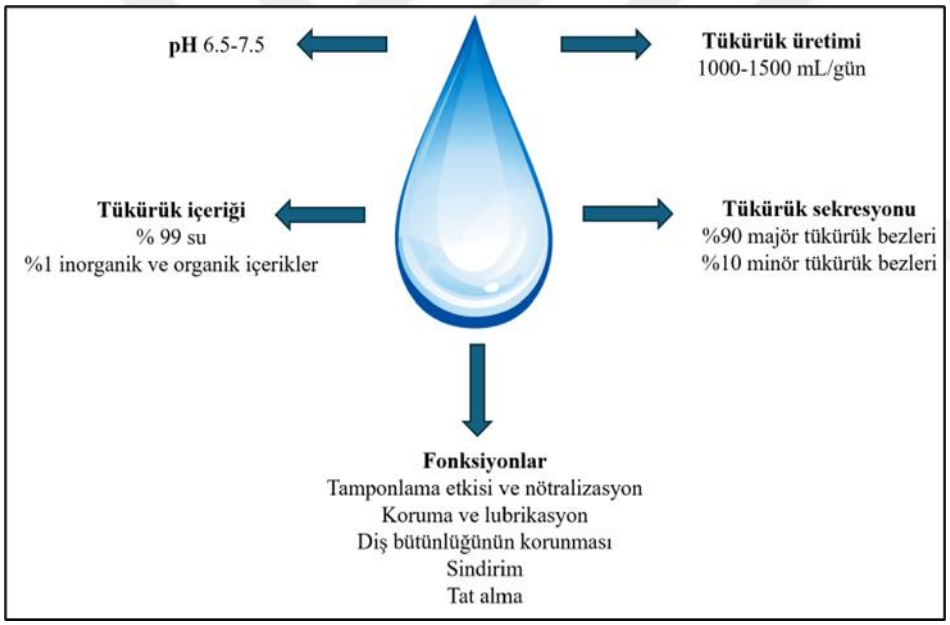
Tükürüğün inorganik bileşenlerini; ağız içinde tamponlama kapasitesi oluşturabilen güçlü ve zayıf iyonlar yani Sodyum (Na^+), Potasyum (K^+), Magnezyum, (Mg^{2+}), Ca^{2+}, Klor (Cl^-), Bikarbonat (HCO^-_3) gibi iyonlar oluşturmaktadır. Fakat çeşitli faktörler tükürük iyon konsantrasyonunu değiştirebilmektedir. Uyarılmamış tükürüğün bileşimi, uyarılmış tükürüğün bileşiminden farklı olup, uyarılmamış tükürük içerik olarak daha çok plazma sıvısına benzemektedir (36,37). Uyarılmamış tükürüğe kıyasla uyarılmış tükürükte Na^+, Cl^-, HCO_3^-, toplam protein ve toplam Ca^{2+} konsantrasyonları daha yüksek, K^+ ve toplam PO_4^{3-} konsantrasyonları ise daha düşüktür (20,38). İnorganik tükürük bileşenleri, fiziko-kimyasal özellikleri ile ağız ve diş yüzeyi biyofilmlerinin oluşumu ve yerleşik ağız mikrobiyotasının oluşumunda da katkıda bulunmaktadır (39).

Organik olarak ise küçük miktarlarda protein yapılı olmayan bileşikler ve lipit gibi bileşenler tespit edilebilmektedir. Bunlar; ürik asit, bilirubin, kreatinin, glikoz, aminoasitler, kolestrol gibi lipitler ve mono/digliseritlerdir (40,41). Protein/polipeptit bileşikleri olarak ise İmmünoglobülin A (Ig A) ve İmmünoglobülin G (Ig G) amilaz, lizozim, laktoferrin, maltaz, alkalen fosfataz, peroksidaz, laktoperoksidaz, laktik dehidrogenaz gibi enzimler ve diğer antimikrobiyal faktörlerle ilişkili proteinler, mukozal glikoproteinler gibi yapılar mevcuttur (32,42,43). Protein bileşeninin

ağırlığının %90'ından fazlası, parotis, submandibular ve sublingual tükürük bezlerinden gelen tükürükte mevcuttur. Ağırlığın geri kalan %10'u minör tükürük bezleri ve diş eti oluğu sıvısından gelen tükürüktedir (44). Tükürüğün kıvamı ise, bileşimindeki protein miktarına bağlı olarak sulu, yoğun, yapışkan veya köpüklü olabilmektedir (45).

2.1.1. Tükürüğün Fonksiyonları

Tükürük ağız ortamındaki biyolojik dengenin sürdürülebilmesi açısından fonksiyonel bir oluşumdur (46). Tükürüğün hem inorganik hem de organik bileşenlerinin aracılık ettiği çok sayıda fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar sindirim, tamponlama, tat alma, lubrikasyon, diş bütünlüğünün korunması ve antibakteriyal etkinlik olmak üzere 6 ana başlıkta özetlenebilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Tükürüğün özellikleri ve fonksiyonları

2.1.1.1. Sindirim: Gastrointestinal fonksiyonların kontrolü ağız ortamında besin gibi bir uyarana yanıt olarak gelişmekte ve bu kontrol bir dizi sinirsel refleks tarafından düzenlenmektedir. Ağızda besin bulunması nöral refleksler yoluyla hem mekanik hem de kimyasal uyarıları başlatmaktadır. Böylelikle ağız boşluğunda tükürüğün salgısında bir artış meydana gelmektedir. Sindirimin oral fazında dişler aracılığı ile besinlerin mekanik olarak daha küçük parçalara bölünmesi ve tükürükle

bolus oluşumu, besinlerin kimyasal sindirimi başlamaktadır (47,48). Tükürük ağızda sindirime yardımcı olmakta, gıdaların ufalanmasını ve besinlerin özofagusa taşınmasını sağlamaktadır (32). Tükürükte bulunan müsin besinleri birbirine yapıştırarak yumuşak kıvamlı, bir kitle oluşturarak besinlerin yutulmasını kolaylaştırmaktadır (32,49). Tükürüğün su ve müsin içeriği sayesinde çiğneme sırasında gıdanın sertliği ve partikül boyutu hızla azalırken, yutma anına kadar yapışkanlık iyice artmaktadır. Karbonhidratların ve trigliseritlerin enzimatik sindirimi besin bolusunda başlatılır. Bolus oluşturulduktan sonra yutmaya hazırlık amacıyla dilin arka kısmına iletilir (50,51). Pityalin yani α-amilazın biyolojik işlevi nişastadaki glikozidik bağları ayırarak maltoz, maltorioz ve dekstrinlere parçalamaktır (24). Bu enzim tükürük bezlerinin ürettiği toplam tükürük proteinlerinin %40-50'sini oluşturmaktadır. Bu enzimin aktivitesi gastrointestinal sistemin asidik kısımlarıyla inaktive olmakta ve sonuç olarak işlevi ağız ortamı ile sınırlı kalmaktadır (52). Tükürük enzimleri aynı zamanda yağ sindirimini de başlatmakta, oluşan bolusun yağlanmasını sağlamaktadır. Lingual lipaz enzimi dilin arka bölgesinde, sirkumvallat papillanın altında yer alan seröz minör tükürük bezlerinin asiner hücrelerinden salgılanan bir sindirim enzimidir (53,54). Lingual lipaz, ağız boşluğu ve midede diyetle alınan trigliseritlerin küçük bir kısmını parçalamaktadır (55).

2.1.1.2. Tamponlama etkisi ve nötralizasyon: Tükürük ağız ortamında tamponlama etksini ve nötralizasyonu; karbonik asit-bikarbonat tamponlama sistemi, protein tamponlama sistemi, üre, çeşitli enzimler ve fosfat tamponlama sistemi gibi çeşitli yollarla göstermektedir (24,56). Karbonik asit-bikarbonat sistemi en önemli tamponlama sistemidir. Tükürük bezleri karbondioksitten bikarbonat üretebilmektedir. Tükürükteki bikarbonat seviyesi genellikle plazma seviyesinden biraz daha düşük olmasına rağmen, tükürük glandüler hücrelerinin artan metabolizması sonucu çıkan karbondioksitin karbonik anhidraz enzimleri katalizörlüğünde bikarbonata dönüştürülmesi sonucu bikarbonat miktarında artış görülmektedir (57). Tükürükteki bikarbonat konsantrasyonu, büyük oranda tükürük akış hızına bağlıdır ve tükürük akış hızı arttığında bikarbonat oranı da artmaktadır (58,59). Karbonik asit-bikarbonat ve fosfat tamponu için optimal tamponlama aralığı sırasıyla pH 6,3 ve pH 7,2'de meydana gelmektedir (60). Fosfat tampon sistemi uyarılmamış tükürükte önemli bir rol oynamaktadır. Monohidrojenfosfat iyonuna bir hidrojen iyonunu bağlanarak dihidrojenfosfat iyonu oluşmasıyla tamponlama sistemi gerçekleşmektedir. Gıda alımı

sırasında, uyarılmış tükürükteki fosfat konsantrasyonunun yetersiz olması nedeniyle fosfat tamponlama sisteminin etkinliği sınırlıdır (61). Düşük tükürük akış hızlarında ve tükürük pH'ının 5 ve 5'ten düşük olduğu durumlarda, proteinler ana tamponlama kapasitesini oluşturmaktadır (58,61). Tükürüğün bikarbonat olmayan tamponlama yeteneğinin %90'ından fazlası düşük moleküler ağırlıklı, histidin açısından zengin peptitlere atfedilmektedir (62). Tükürükte bulunan diğer bir tampon olan üre, dental plakta bakteriyel üreazlar tarafından metabolize edildikten sonra hidrolizasyon gerçekleşerek amonyak ve karbondioksit açığa çıkarmakta ve böylece plak pH'ında hızlı bir artışa sebep olmaktadır (24,63). Tükürük pH'ı bu sistemlerle karbonhidratların bakteriyel fermantasyonu sonucu üretilen asitleri tamponlanması ve böylece diş demineralizasyon hızının azaltılmasıyla, nispeten sabit bir fizyolojik seviyede, yani 6,5-7,4'te tutulmaktadır (58).

2.1.1.3. Tat alma: Lingual papilla (mantarsı, foliat ve oval papilla) içindeki tat tomurcuklarında tat alıcı hücrelerin uyarılması için besinlerin çözünmüş formda olması gerekmektedir. Tükürük hem besinlerin çözünmesinde hem de çözünen besinlerin tat cisimciklerine taşınmasında görev almaktadır (32). Tükürük proteini olan gustin tat tomurcuklarının büyümesi ve olgunlaşması için gereklidir (64). Tükürük proteinlerinden olan müsinler de yağların ve yağlar içinde çözünen tat verici maddelerin emülsifiye edilmesine yardımcı olmakta ve bunların tat alma tomurcuklarına iletilmesine olanak tanımaktadır (65). Son olarak ise tükürük tat tomurcuklarını kurumaya ve tomurcukları mekanik etkilere karşı korumaktadır (38).

2.1.1.4. Koruma ve lubrikasyon: Ağız boşluğunda tükürüğün önemli işlevlerinden biri sert (mine) ve yumuşak (mukozal) dokular ve bunların kombinasyonları arasında kayganlaştırma ve koruma görevi görmesidir (66). Serömüköz içeriği ile tükürük, ağız dokularını ona zarar verebilecek etkenlere karşı bariyer görevi görmektedir. Bu etkenler arasında, plakta üretilen proteolitik ve hidrolitik enzimler, sigaradan kaynaklanan potansiyel kanserojenler ve ekzojen kimyasallar ve ağız solunumundan kaynaklanan kuruluk yer almaktadır (67). Tükürüğün en iyi lubrikasyon sağlayan bileşenleri minör tükürük bezlerinden salgılanan müsinlerdir (68). Müsinler ayrıca mikroorganizmaların oral doku yüzeylerine yapışmasını seçici olarak modüle ederek bakteri ve mantar kolonizasyonunun kontrol altında tutulmasını sağlayan antibakteriyel bir işlev de gerçekleştirmektedir (24,69). Mukoza üzerinde oluşan pelikıl,

tükürük müsinlerinin ve proteinlerinin oral mukozal epitel hücrelerine yapışmasıyla oluşmaktadır. Mukozal pelikıl, müsin, karbonik anhidraz, Ig A ve sistatinlerden oluşan kompleks bir yapı olup, hidrojel gibidir. Bu yapı ağız mukozasının birincil enfeksiyonunu önlemektedir (70,71).

2.1.1.5. Diş bütünlüğünün korunması: Diş bütünlüğünü korumak tükürüğün diş üzerinde demineralizasyon ve remineralizasyon sürecini kolaylaştıran bir işlevidir. Tükürük proteinleri tarafından sağlanan yüksek Ca^{2+} ve PO_4^{3-} konsantrasyonları, minenin olgunlaşması ve remineralizasyonundan sorumludur (64). Tükürük peptitlerinden olan staterin, sistatin, histatin, prolince zengin proteinler, Ca^{2+} ve PO_4^{3-} stabilizasyonuna katkıda bulunmakta, dişi aşınmadan korumak için bir lubrikant görevi görmekte ve hidroksiapatite bağlanarak diş üzerinde koruyucu pelikıl oluşumunu başlatmaktadır (72). Ayrıca diş yüzeyine mineral çökelmesi ve mineral çıkışının kontrolünü sağlayarak, minenin dış yüzeyinde hidroksiapatitin stabilitesini arttırmaktadırlar (73).

2.1.1.6. Antimikrobiyal etkinlik: İnsan tükürüğünde çok sayıda antimikrobiyal ajan tanımlanmıştır. Bunlar genellikle immünolojik ve immünolojik olmayan faktörler şeklinde ayrılmaktadır (74). Antimikrobiyal faktörler tek başına veya kombinasyon halinde karyojenik mikroorganizmalar, bakteriler, mantarlar, virüsler üzerinde etkili olmaktadır (30,35). Tükürükteki antimikrobiyal bileşenler, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) gibi spesifik, ağız ve diş sağlığı için zararlı türlerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olurken aynı zamanda mikroorganizmaların aşırı çoğalmasını önlemekte ve zararsız türlerin sayısının potansiyel olarak tehlikeli türlerden fazla olduğu istikrarlı bir ekosistemin kurulmasını ve sürdürülmesini yönetmekte ve böylece kendi başına ağız ortamında bir koruma oluşturmaktadır (75). Tükürüğün immünolojik salgısal içeriğini Ig A, Ig G ve Ig M oluşturmaktadır. Tükürüğün en büyük immünolojik bileşeni olan Ig A, virüsleri nötralize etmekte, bakteriyel antijenlere karşı bir antikor görevi görmekte ve bakterilerin konakçı dokulara bağlanmasını engellemektedir (60,76). Tükürükte bulunan diğer immünoglobulinler düşük miktarlardadır ve çoğunlukla diş eti oluğu sıvısından gelmektedir (26). Asiner bez hücrelerinin ürünleri olan immünolojik olmayan antimikrobiyal tükürük faktörlerini ise enzimler (lizozim, laktoferrin, peroksidaz), müsin, glikoproteinler, agglutinin, histatin, prolince zengin proteinler, staterin ve sistatinler gibi faktörler oluşturmaktadır (49). Bu faktörler dişlerin

ve çevre dokuların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal hasarlara karşı korunmasına yardımcı olmaktadırlar (74).

2.2. TÜKÜRÜK VE DİŞ SAĞLIĞI

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ağız sağlığı bireylerin yemek yeme, nefes alma ve konuşma gibi temel işlevleri yerine getirmesini sağlayan ağız, dişler ve orofasiyal yapıların durumu olup, rahatsızlık ve utanç duymadan kendine güvenme, kendini iyi hissetme, sosyalleşebilme ve ağrısız çalışabilme gibi psikososyal boyutlarını kapsayan bir durumdur (77). Çürük ise, diş sert dokularında demineralizasyon sonucu Ca^{2+} ve PO_4^{3-} gibi iyonların çözünmesi ile mineral kaybının meydana geldiği, ağız sağlığını olumsuz etkileyen dinamik bir süreçtir (78). Diş yüzeyindeki demineralizasyon ve remineralizasyon arasındaki dengenin demineralizasyona yönelmesi, diş çürüğüne sebep olmaktadır. Demineralizasyon bakteri, diyet ve tükürük bileşenleri gibi etkenler arasındaki karmaşık kimyadan kaynaklanmaktadır (79).

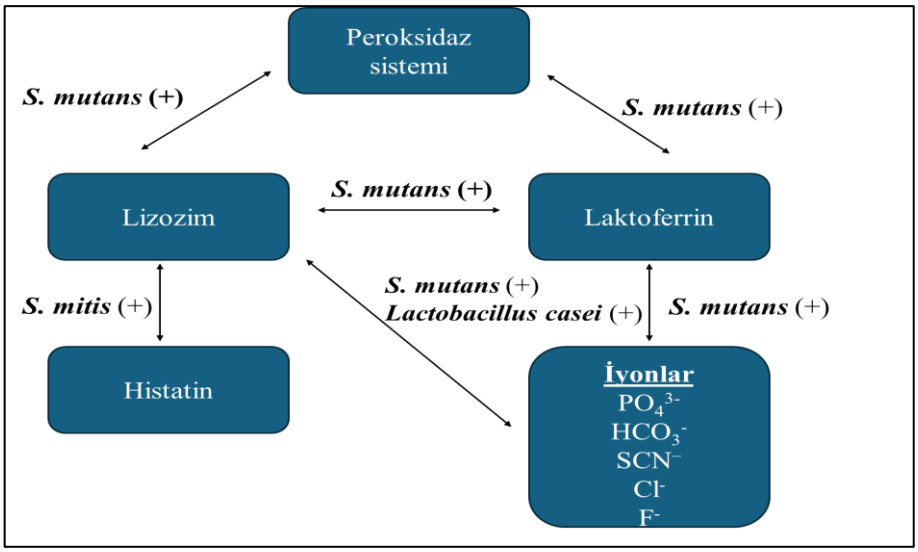
Demineralizasyona neden olan bakteriler, plak bakterileri tarafından üretilmektedir. Plak bakterileri tükürüğe salınabildiğinden, tükürükteki belirli bakteri türlerinin düzeyi, diş plağındaki düzeylerini de yansıtabilmekte ve böylelikle tükürük mikroflorası ağız boşluğunun sağlık ve hastalık durumunun etkili bir biyobelirteci haline gelmektedir. *S. mutans* ve laktobasiller diş çürüğüne katkıda bulunan önemli türler olduğu için, tükürükteki *S. mutans* düzeyinin $>10^5$ Koloni Oluşturan Birim (CFU)/mL ve laktobasil miktarının ise, $>10^6$ CFU/mL olması, bireyin çürük riskinin yüksek olduğunun göstergesidir (61).

Tükürüğün tamponlama kapasitesi, akış hızı, yapısındaki antimikrobiyal ajanların etkinliği demineralizasyona doğrudan etki eden parametreler arasındadır (46). Tükürük bileşiminde içerdiği çeşitli elektrolitler, küçük organik maddeler, proteinler ve peptitler ile ağız dokularını kayganlaştırma, yutma, konuşma gibi işlevlerin yanında aynı zamanda dişleri de çürüğe karşı korumaktadır (80). Tükürük, antimikrobiyal bileşenlere sahip olup, ağız dokularını korumak için harekete geçen tamponlayıcı özellikteki bir vücut sıvısıdır. Tükürükteki laktoferrin, lizozim, peroksidaz, defensin ve histatin gibi proteinler, ağız boşluğundaki mikroorganizmaların çoğalmasını engellemekte veya bu mikroorganizmaları yok edebilmektedir. Böylelikle ağız ve diş sağlığının korunmasına katkıda bulunmaktadır (81).

2.3. TÜKÜRÜĞÜN SAVUNMA MEKANİZMASI VE ANTİMİKROBİYAL PROTEİNLER

Ağız boşluğu, normal ağız mikroflorasında değişikliklere yol açabilecek patojenler için önemli bir giriş kapısıdır (82). Ağız boşluğundaki sıcaklık, besin açısından zengin ve nemli ortam, yerleşik ve geçici bakteriler, mantarlar, virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikrorganizmaların büyümesini teşvik etmektedir (83). Karbonhidrat alımının artması veya kötü ağız hijyeni gibi biyolojik veya çevresel değişim koşullarında, ağız mikroflorasının etiyolojik dengesi asidürik bakteriler ve asidojenik bakteriler lehine kayarak diş çürüğü riskini arttırmaktadır (61).

Tükürük, ağızdaki mikrobiyal tutunmayı ve kolonizasyonu modüle etmede ikili bir rol oynamaktadır. İlki diş minesinde bakterilerin yüzeye yapışmasını sağlayan reseptörlerin benzerinin tükürükte bulunmasıyla, bakterilerin diş yüzeyi yerine tükürüğe bağlanarak yüzey adezinlerinin bloke edilmesidir (84). İkincisi ise tükürükteki immünolojik ve immünolojik olmayan antimikrobiyal faktörlerin, patojen bakterilerin metabolizmalarını inhibe etmesi, bakteri duvarlarını parçalaması ve kommensal florayı desteklemesidir (46). İmmünolojik ve immünolojik olmayan antimikrobiyal faktörler farklı uyaranlara göre farklı içerik ve miktarlarda plazma veya asiner hücrelerden salınmaktadırlar (74). Tükürüğün yapısındaki konak antimikrobiyal faktörler patojen bakterilere karşı birleşerek sinerjik etki gösterebilmektedirler (60) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Tükürüğün konak faktörlerinin bazı bakterilere karşı sinerjik etkisi

2.3.1. İmmünoglobulin A

Gözyaşı, tükürük, burun salgıları, bronşiyal mukus ve bağırsak mukusu dahil olmak üzere ekzokrin salgılarda yaygın olarak bulunan bir immünoglobulin olan Ig A, mukozal yüzeylerin bağışıklığından sorumludur. Tükürükteki çeşitli immünoglobulin tipleri arasında Ig A en bol bulunanıdır (76). Tükürük bezlerinde üretilen miktarı bireyler arasında değişmekle birlikte, parotis bezinden günde 10-80 mg Ig A üretilmektedir. Toplam miktarı uyarılmış tükürükte uyarılmamış tükürüğe göre daha yüksektir (85,86). Ig A, bakteriyel bağlanmada yer alan reseptörleri bloke ederek, bakterilerin diş yüzeyine bağlanmasını engellemekte ve bu tip inhibisyonda müsin ile birlikte görev yapmaktadır. Ig A, glukoziltransferaz inhibisyonu yoluyla bakterilerin glukan sentezini inhibe ederek diş çürüklerini önlemektedir (87,88).

2.3.2. Laktoferrin

Tükürük major ve minor tükürük bezlerinin seröz hücreleri ve nötrofiller tarafından sentezlenen molekül ağırlığı yaklaşık 80 Kilodalton (kDa) olan demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Laktoferrin, tükürükte 1 mg/dL'nin altındaki konsantrasyonlarda bulunmaktadır (86,89). Laktoferrin demire bağlı olmayan bir apoprotein olarak salgılanmakta ve daha sonra ağız boşluğunda demire bağlanarak bakterilerin metabolizması için gerekli temel iyon olan demir iyonlarını tüketerek bakteri üremesini baskılamaktadır (90). Demir yoksunluğu etkisi ile *S. mutans* da dahil olmak üzere metabolizma için demir gerektiren bakteriler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etkilere yol açabilmektedir (55,90,91). Laktoferrinin bakteriyostatik, bakterisidik, fungisidal, antiviral, antienflamatuar ve immünomodülatör özelliklere sahip çok işlevli bir protein olduğu rapor edilmiştir (55,91,92). Laktoferrin demir bağlama kapasitesini pH 4'ün altında bile korumaktadır (86).

2.3.3. Peroksidaz

Tükürükteki peroksidaz sistemi laktoperoksidaz, miyeloperoksidaz, tiyosiyanat ve hidrojen peroksit olmak üzere 4 ana yapısal bileşenden oluşmaktadır (93). Laktoperoksidaz ve tiyosiyanat tükürüğün doğal bileşeni olup, submandibular ve parotis tükürük bezlerinin asiner hücreleri tarafından salgılanmaktadır (94). Miyeloperoksidaz, diş eti oluğundan ağız boşluğuna göç eden polimorfonükleer lökositlerde bulunmakta ve tükürükteki konsantrasyonu diş eti ve mukozal enflamasyonu yansıtmaktadır (55,95).

Miyeloperoksidazların toplam tükürük peroksidazına katkısı %30 ila %75 arasında değişmektedir (96). Hidrojen peroksit ise ağız boşluğundaki bakteriyel metabolizmadan kaynaklanmaktadır (97,98). Tükürük peroksidaz sistemleri antimikrobiyal aktivite göstermekte, konakçı hücreleri ve proteinleri hidrojen peroksitin potansiyel olarak zararlı olan toksik ve oksidan etkilerinden korumaktadır. Peroksidazlar bu koruma ve antimikrobiyal etkinliğini hidrojen peroksit ile tiyosiyanatın, hipotiyosiyanite oksidasyonunu katalize ederek gerçekleştirmektedirler (99–102). Hipotiyosiyanit, önemli bakteriyel metabolik süreçleri inhibe etmekte ve *S. mutans*, laktobasil, mayalar ve periodontal patojenler de dahil olmak üzere çeşitli gram negatif türler ve bazı virüsler üzerinde etkili olmaktadır (100–102).

2.3.4. Histatin

Histatin parotis, submandibular ve subligual tükürük bezleri tarafından üretilen katyonik peptid ailesinde yer alan bir peptittir (103). Şimdiye kadar, insan tükürüğünde 12 adet histatin izoformu bulunmuştur. Bunlar arasında histatin 1, 3 ve 5 tükürükte en yaygın olarak bulunan izoformlardır (20,103). 1, 3 ve 5 hidroksiapatit için yüksek bir afiniteye sahiptir. Histatin-1, mine üzerinde kalsiyum-fosfat tuzlarının kristal büyümesini inhibe eder, ancak kalsiyum-fosfat tuzlarının mineye spontan çökelmesini inhibe etmemektdir (86). Histatin ayrıca *Candida albicans*'a (*C. albicans*) karşı antifungal etkiye dahil etkinliği olup *S. mutans* gibi bakterilere karşı da antimikrobiyal etkileri vardır (104,105).

2.3.5. Defensin

Defensinler kısa, katyonik, düşük molekül ağırlıklı peptidlerdir (106). Defensinler α-defensin ve β-defensin olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (107). Gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde geniş spektrumlu etkisi bulunan defensinlerden, β-defensin-2 ve 4, α-defensin 1,2,3 ve 4 proteinlerinin çürük oluşumunu engellediğini ve lipopolisakkarit üretimini engelleyerek *S. mutans*'ı yok ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (108,109).

2.3.6. Sistatin

Tükürük sistatinleri parotis, submandibular ve sublingual tükürük bezleri tarafından salgılanan, sistatin süper protein ailesinin bir parçasıdır (110,111).

Tükürükteki sistatinler enflamatuar süreçte lökositler veya mikroorganizmalar gibi konakçıların proteolitik aktivitesini kontrol etmekte ve ağız dokularını bu süreçte korumaktadırlar (112). İnsan tükürüğündeki sistatin aktivitesi esas olarak sistatin S, SA ve SN izoformları ile ilişkilidir. Sistatinler pelikıl oluşumunda rol almakta ayrıca, hidroksiapatite afinitesi olduğu için kalsiyum-fosfat çökelmesini de etkileyebilmektedirler (113).

2.3.7. Kathelisidin

Kathelisidinler, 12-97 amino asitten oluşan küçük katyonik, amfifilik peptitlerdir (114). Tükürükte kathelisidinin alt grubu olan LL-37 ve türevleri bulunmakta olup, başlıca kaynakları lökositler ve diş eti oluğu sıvısıdır (115). LL-37 ve türevleri katyonik peptidler olduğundan, antibakteriyel etkisini, bakterilerin iyon kanallarının, transmembran porlarının ve membranların yok ederek göstermektedir. LL-37 ayrıca bakteriyel lipopolisakkaritleri nötralize etmektedir (116). LL-37 ve türevlerinin ağız boşluğundaki yaraların ve ülserlerin yeniden epitelizasyonunda rol oynaması muhtemeldir (117).

2.3.8. Staterin

Staterin parotis bezinden salgılanan tirozin, Glutamin (Glu) ve prolince zengin fosforillenmiş bir proteindir (118). Staterinin Ca^{2+}'ye bağlama özelliği olup, aşırı doymuş tükürükten kalsiyum-fosfat tuzlarının çökelmesini engellemektedir (119). Ayrıca staterin, yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlerin diş yüzeylerine emilimini rekabetçi bir şekilde inhibe etmekte ve dolayısıyla *S. mutans* dahil yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein bağlayıcı karyojenik bakterilerin diş yüzeyine yapışmasını engellemektedir (120). Staterin, antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra *C. albicans*'a karşı ağız savunmasına katkıda bulunmaktadır (121).

2.3.9. Müsin

Müsin submandibular ve minör tükürük bezlerinden salgılanan bir tür glikoproteindir. MUC5b ve MUC7 olmak üzere iki formda sınıflandırılmaktadır (122). MUC5b diş yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanarak mine pelikılı oluşumunda rol almaktayken, MUC7 bakteriyal agregasyonu etkilemekte ve *S. mutans* dahil olmak üzere oral bakterilerin yüzey reseptörlerine doğrudan bağlanabilmektedir (123). MUC7,

mantarları ve viral partikülleri de yakalayıp aglütine etmektedir (115). MUC5b'nin ayrıca antiviral özellikler gösterdiği de gösterilmiştir (124). Müsinler ayrıca, Ig A'ya bağlanarak ve bakterilere bağlanma afinitesini artırarak antibakteriyel aktivite göstermektedir. Müsine bağlanan bakteriler ağız boşluğunun yüzeyine tutunamamakta ve ağız ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir (86).

2.3.10. Agglütinin

Tükürük aglütininleri, parotis ve submandibular tükürükte bulunabilen, süspansiyon halindeki yüksek moleküler ağırlıklı, müsin benzeri glikoprotein agregatlarıdır. Tükürük agglütininleri hidroksiapatite bağlanabilmekte ve aynı zamanda mine pelikılının bir bileşenidir. Agglütininler Streptokok yüzey reseptörü olan antijen I/II'ye kalsiyuma bağımlı bir şekilde bağlanmaktadır. Ayrıca Ig A'ya bağlanarak bakteriyel agregasyonun sinerjistik etkisine neden olur ve bu da mikroorganizmaların ağız boşluğundan temizlenmesini desteklemektedir (125,126).

2.3.11. Prolince Zengin Proteinler

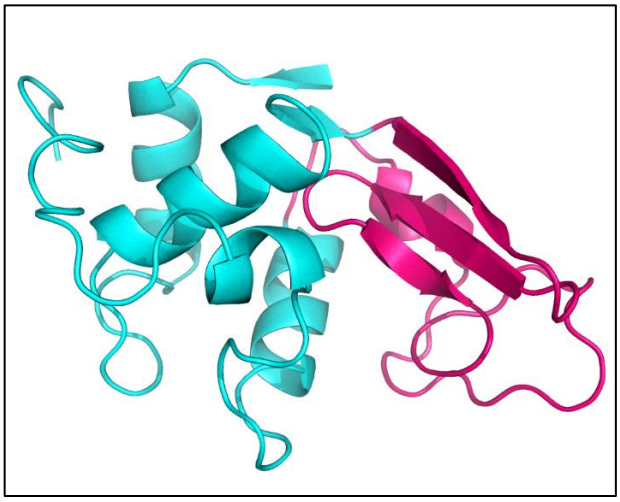
Prolince zengin proteinler tükürük proteinlerinin yaklaşık %20 ila %30'u kadarını oluşturmaktadırlar (127). Prolince zengin proteinler yüksek oranda fosforile edilmiş proteinlerdir. Asidik olanları kalsiyum hidroksiti bağlama özelliği göstermekte ve bu nedenle diş yüzeyinde pelikıl oluşumuna katılmaktadır (119). Asidik prolince zengin proteinler bakterileri bağlarken, bazik olanlar mantarları ve virüsleri bağlamakta, glikolize edilmiş ise bakteri ve virüsleri bağlamaktadır. Böylelikle mikroorganizmaların mideye doğru temizlenmesinde ve diş ve oral yüzeylerden uzaklaştırılmasında görev almaktadır (128).

2.3.12. Lizozim

Lizozim bronşiyal mukus, gözyaşı, tükürük, mide sıvısı, anne sütü gibi vücut sıvılarında bulunan antibakteriyel özellikte bir proteindir (49,86). Doğumdan itibaren tükürüğün doğal savunma faktörleri arasında lizozim de yer almaktadır (39). Tükürükte bulunan lizozim, majör ve minör tükürük bezlerinden, diş eti oluğu sıvısından ve tükürük lökositlerinden sağlanmaktadır (89). Lizozim konsantrasyonu sublingual ve submandibular tükürükte parotisten salgılanan tükürüğe göre daha yüksektir ve tükürükte ortalama lizozim miktarı 0,11 g/L'dir (61). Lizozimin antimikrobiyal etkinliği

ilk olarak 1922 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. Deney sırasında *Micrococcus lysodeikticus* (*M. lysodeikticus*) kültürünün bulunduğu petri kabına burun akıntısının kazara damlaması sonucunda, *M. lysodeikticus*'ların ölmesi ile keşfedilmiştir (129). Bunun üzerine gözyaşı ile tekrarlayan deneyler sonucunda gözyaşındaki lizozomin yüksek bakteriyolitik ve bakterisidal etkisinin olduğunu, damlayan gözyaşının etrafında yaklaşık 1 dk içinde bakterilerin olmadığı bir zon oluştuğunu gözlemlemişlerdir (130). Lizozim hem tükürük ile oluşan pelikılda hem de dental plakta yer alarak aktivite göstermektedir (131). Ağız ve diş sağlığı için özellikle diş çürüklerinin önlemesi açısından önemli antibakteriyal özelliklere sahiptir (132).

2.3.12.1. Lizozimin yapısı: 1966'da David Chilton Phillips, X-ışını kristalografisini kullanarak, lizozimin yapısını belirlemiştir (133). Lizozim, 130 amino asit uzunluğunda ve 14,3 kDa moleküler kütleye sahip bir enzimdir. Proteinlerin +ß sınıfına aittir ve 11 anyonik amino asit kalıntısı ve 19 katyonik amino asit kalıntısı içermektedir. Ayrıca bu protein sulu çözeltilerde pozitif yüklüdür. Lizozim, dört disülfit bağı (C6-C128, C30-C116, C65-C81, C77 C95) nedeniyle stabil bir proteindir ve yüzeyi çoğunlukla polar, iç kısmı ise neredeyse her zaman hidrofobiktir (134,135). Fizyolojik koşullarda lizozim, üzerinde uzun bir yarık bölgesi bulunan kompakt, globüler bir yapıdadır (Şekil 2.3). Yarık olan bölge bakterilerin karbonhidrat zincirlerine bağlanma ve bakterileri parçalamada rol oynayan aktif bölgedir (136). Aspartat-52 ve Glutamat-35 uçları enzimatik aktivite için kritik amino asitlerdir (137).



Şekil 2.3: Lizozimin üç boyutlu yapısı

2.3.12.2. Lizozimin diş çürüğünü engelleme mekanizması: Lizozim antimikrobiyal etkinliğini dört farklı mekanizmayla gerçekleştirmektedir. İlk mekanizmada peptidoglikan tabakasının lizozim tarafından parçalanması bazı bakterilerin canlılığını yitirmesi için yeterlidir (129). Peptidoglikan veya murein, bakteri türüne bağlı olarak farklı bileşimlere sahip kısa peptitlerle çapraz bağlanan doğrusal glukan zincirlerinden oluşan bir biyopolimerdir. Bu yapı; ß-1,4 bağlarıyla bağlanmış N-Asetilglukozamin (GlcNAc) ve N-Asetil Muramik Asit'ten (MurNAc) oluşmaktadır (136,138,139). Peptidoglikan, sitoplazmik membranın dışındaki prokaryotik hücre duvarının önemli bir bileşenidir (138,139). Bu polimerik yapı bakteri morfolojisinin korunmasını gerçekleştirmekte, proteinler gibi hücre zarı üzerindeki diğer bileşenleri sabitlemek için bir iskele görevi görmekte, mekanik stresi engellemekte ve besinlerin difüzyonuna izin vermektedir (139). Lizozim genellikle gram pozitif bakterilerde bu tabakadaki GlcNAc ve MurNAc arasındaki β-1,4 glikozidik bağı yok ederek antibakteriyel aktivite elde etmektedir (140). Düşük lizozim konsantrasyonlarına duyarlı organizmalar arasında bazı patojenik olmayan gram pozitif bakteriler (*M. lysodeikticus* ve Bacillus türleri) bulunmaktadır (129).

Dirençli gram pozitif bakteriler peptidoglikan molekülünü lizozimin enzimatik etkisine dirençli hale getiren kovalent modifikasyonlar ile kendilerini lizozimin etkilerine karşı değişken şekilde savunmakta, direkt canlılıklarını kaybetmeseler bile lizozimin katyonik ve amfipatik bir protein olması ile bakteriler antimikrobiyal maddelere ve ozmotik strese karşı daha duyarlı hale gelmekte, hücre zarları zarar görmektedir (129).

Genel olarak gram negatif bakteriler, lizozimin peptidoglikana erişimini engelleyen dış lipopolisakkarit yapıları nedeniyle daha dirençlidir (61). Yüksek ama yine de gerçekçi lizozim konsantrasyonlarında, bu molekülün yüksek katyonik yapısına bağlı olarak enzimatik olmayan antimikrobiyal aktivite de gözlemlenmektedir. Bu en iyi şekilde lizozimin katalitik bölgesinde bakteriye yönelik mutajenez sonrasında bakteriyal otolizinlerin aktivasyonu ile gösterilmektedir (39). Bu enzimatik olmayan rolde lizozim, bakterinin membran bütünlüğünü bozmakta, bakteri büyümesi ve bölünmesi sırasında normalde bakterinin hücre duvarını yeniden yapılandırması için kullandığı otolitik enzimlerin bakterilerden serbest bırakılmasıyla etki göstermektedir (141,142).

Lizozim ayrıca bazı bakterilerin agregasyonunu indükleyerek bakterilerin seçici olarak ortadan kaldırmakta, bakterilerin yüzeye yapışmalarını engellemektedir (61,86). Lizozimin en yaygın olarak tanınan özelliği bakteriyolitik aktivitesi iken, özellikle ağız ortamında mikroflorayı etkileme konusunda agregasyon sağlamasıyla önemli bir potansiyel barındırmaktadır (143). Lizozim ağızdaki bakterileri agrege ederek ağızda bakterilerin diş ve mukoza yüzeylerine yapışma etkinliğini azaltabilmekte ve bakterilerin ağız boşluğundan elimine edilmesini teşvik etmektedir (144). Mine pelikılında ve plak içerisinde mevcut lizozim oral streptokokların hidroksiapatite yapışmasını, belirgin şekilde azaltmaktadır (39,143). Ayrıca bakteriyel glukoz alımını, asit üretiminin inhibisyonunu ve streptokok birlikteliğinin çözülmesini sağlamaktadır (145). Gram pozitif olan oral streptokoklar lizozimin doğrudan parçalamasına karşı dirençli olsalar da çoğu streptokok türü için lizozim bakterisidal etki göstermektedir (146,147). Lizozim ile direkt lizise uğramayan streptekokların hücre duvarları hasar görmektedir. Ancak ortamda tuz veya deterjan etkili maddelerin varlığında direkt bakteri lizisi olmaktadır (146–148). Ayrıca ağız ortamında düşük tükürük pH'ı ve yüksek lizozim aktivitesinin birlikte görülmesinin, oral mikroflorada *S. mutans* sayısının artışına yani ağız ortamında disbiyozise doğru geçişe yanıt olarak meydana geldiği düşünülmektedir (149).

Lizozim ağız ortamında antibakteriyal etkinliğinin yanında antiviral ve antifungal aktivite göstermektedir (39). *C. albicans* ve *C. krusei* lizozime karşı duyarlı türlerdendir (150). Ayrıca lizozim *Herpes simplex* ve *Herpes zoster* gibi türler üzerinde antiviral etkinlik göstermektedir (151).

2.3.12.3. Lizozim içeren ağız ve diş sağlığı ürünleri: Lizozim, laktoferrin, peroksidaz gibi tükürük proteinlerinin ağız ortamında antibakteriyal etkisinden faydalanmak için üretilen pek çok oral hijyen ürünü mevcuttur (145,152–154). Lizozim temelli oral hijyen ürünlerinin üretimi için geliştirilmeye devam edilen ilaç sistemleri de mevcuttur (132,155,156). Bu ürünler ve ilaç sistemleri ağız ortamında disbiyoza sebep olan *S. mutans* gibi çürük yapan bakteriler ve periodontal patojenlerin eliminasyonunu sağlayarak sağlıklı oral mikrobiyatanın oluşturulmasını ve tükürüğün kendi antimikrobiyal kapasitesini yeniden sağlamasını hedeflemektedir (145). Bu amaca hizmet eden markalar olan Biotene (Haleon, İngiltere), Bioxtra (İngiltere), Zendium (Unilever, Hollanda)'un; jel, gargara, macun gibi farklı formlarda ürünleri mevcut olup,

bu ürünler insan tükürüğünde doğal olarak bulunan antibakteriyel enzimler olan laktoperoksidaz, glikoz oksidaz, lizozim gibi içeriklere sahiptir (Resim 2.1). Bu bileşenlerin antibakteriyel ve iyileştirici özellikleri ile doğal bir ağız korumasının oluşturulması hedeflenmektedir (157).



Resim 2.1: Antibakteriyal tükürük proteini içerikli çeşitli ağız ve diş sağlığı ürünleri (158)

Oral mukozaya biyofarmasötiklerin verilmesi için çeşitli potansiyel uygulamalar belirlenmiştir. Bunlar arasında, geleneksel antimikrobiyallere dirençli, periodontal hastalık, oral kandidiyazis gibi bakteriyel ve fungal enfeksiyonların tedavisi için antimikrobiyal peptitler yer almaktadır. Lizozimin de etkili bir antimikrobiyal etkinlik göstermesi amaçlanarak elektroçekim yöntemi ile tek yönlü ilaç dağıtımını destekleyen oral mukozaya yapışan sistemler üretilmiştir (155). Lizozimin direkt olarak aktif farmakolojik bileşen şeklinde kullanılabildiği sistemler mevcuttur (156).

2.4. REMİNERALİZASYON- DEMİNERALİZASYON VE TÜKÜRÜK

Genel olarak demineralizasyon, mine, dentin gibi diş sert dokulardaki hidroksiapatit kristallerinden mineral iyonlarının uzaklaşması iken, bu mineral iyonlarının tekrar diş yüzeyine kazandırılma süreci ise remineralizasyondur (1). Demineralizasyon–remineralizasyon süreci bir döngü şeklinde olup bu süreç karyojenik bakteriler, fermente edilebilir karbonhidratlar ve tükürük gibi faktörler mevcut olduğu

sürece ağızda devam etmektedir. Patolojik faktörler ile koruyucu faktörler arasındaki denge, herhangi bir anda demineralizasyonun veya remineralizasyonun devam edip etmediğini belirlemektedir (159). Tükürük dengeyi iki yönde de etkilemektedir. Tükürük tamponlama kapasitesi, tükürük pH'ı, tükürük proteinleri, enzimler, yapısındaki iyonlar ve tükürük akış hızı demineralizasyon-remineralizasyon döngüsünde etkili olan faktörler arasındadır (160).

2.4.1. Demineralizasyon

Dişlerde demineralizasyon, yiyecek veya içecek yoluyla tüketilen diyet asidinin etkisi ve ağızda bulunan bakterilerin karbonhidratları fermente etmeleri sonucunda ürettikleri asit sonucuda olmak üzere iki ana yolla gerçekleşmektedir (1). Diş yüzeyinde etkenin pH'ına bağlı olarak üç asit saldırısı tanımlanmıştır. ph değeri 1 olan asitler, çok kısa süre mine yüzeyine maruz bırakıldığında yüzeyde makro ölçekte aşınmaya neden olmaktadır. Nano ölçekte yüzey yumuşaması ise minenin pH 2-4'e kısa süre maruz kaldığında meydana gelmekte, ancak bu makro ölçeğe kadar uzanmamaktadır. Asit saldırısının üçüncü ve en yaygın şekli, zayıf asitin (pH 4,5-6,9) minede oluşturduğu yüzey altı çözünmesidir. Bu, genelde bakterilerle birlikte çürük lezyonların oluşumuna yol açan asidik atak tipidir (161,162). İlk iki asit atağı yaygın bir biyolojik olay değildir. Kusma, mide asitlerinin dişlerle temasının olduğu sistemik hastalıklarda diş şiddetli asit ataklarına maruz kalmaktadır (1).

Meyvelerde bulunan sitrik asit, karboksilik asit ve gazlı içeceklerde bulunan fosforik asit pH 3,8-4 aralığında etki etmektedir (162,163). Karboksilik asitlerin oluşturduğu hidronyum iyonu fosfata kolayca bağlanarak fosfat katyonları oluşturur, bu katyonlar kalsiyum-asit şelasyon kompleksi oluşturabilir ve çevredeki minerallerin bağlarını çözerek yaygın demineralizasyona neden olabilmektedir (164).

Diş yüzeyinin devamlı temas halinde olduğu ağız sıvıları (tükürük, biyofilm sıvısı), minenin mineral bileşimine göre aşırı doygun konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve PO_4^{3-} içermektedir. Fizyolojik koşullarda (nötr pH 7), düşük iyon konsantrasyonları diş sert dokularını dengede tutmak için yeterlidir. Diş plağının ürettiği asit nedeniyle pH düşerse, minenin çözünmesini önlemek için daha yüksek iyon konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (165). Bakterilerin sebep olduğu demineralizasyonda fermente olabilen karbonhidratlar, diş plağında bulunan bakteriler tarafından organik asitler üretilmek üzere metabolize edilmektedir. Plak pH'ı kritik seviye olan 5,5'e düştüğünde

yetersiz doygunluk başlamakta yani plak sıvısındaki Ca^{2+} ve PO_4^{3-} konsantrasyonları mineyi stabil dengede tutmak için yeterli olmamaktadır (166). Asitler, kristaller arasındaki su yoluyla dişin sert dokusuna yayılmakta ve kristal yüzeyinde duyarlı bir bölgeye ulaşmaktadır. Ca^{2+} ve PO_4^{3-}, kristaller arasındaki bölgede sulu fazda çözülmektedir. Bu, sonunda kavitasyona yol açabilecek diş çürüğü sürecinin devamındaki ilk adım olarak kabul edilmektedir (159).

2.4.2. Remineralizasyon

Remineralizasyon süreci, demineralizasyon sonucu çözünmüş olan mineralleri iyonik formlarda hidroksiapatit kristallerine yeniden kazandıran doğal bir onarım mekanizmasıdır. Nötre yakın fizyolojik pH koşulları altında yani plak pH'ı tekrar 5,5'in üstüne çıktığında meydana gelmektedir (167). Remineralizasyon için gerekli olan Ca^{2+}, PO_4^{3-} ve diğer iyonların kaynağını tükürük ve remineralizasyonu desteklemek için kullanılan eksternal topikal kaynaklar oluşturmaktadır (168). Burada Ca^{2+}, PO_4^{3-} ve F^- gibi iyonlar, tükürük ve plak sıvısından çürük lezyonu içinde yeniden birikmektedir. Florun hidroksiapatit yapısındaki hidroksil grubu ile yer değiştirmesi sonucu kalsiyum-flor kovalent bağları ve/veya hidroksi-flor bağları oluşur ve apatitin birim hücre hacmi azaltılarak florapatit kristalleri meydana gelmektedir. Böylelikle mine sertliği ve kimyasal dayanıklık artmakta, dolayısıyla aside dirençli yapılar oluşmaktadır (169–171).

2.4.3. Demineralizasyon ve Remineralizyonda Tükürüğün Rolü

Tükürük, demineralizasyon ve remineralizasyonun belirlenmesinde kritik bir faktördür (166). Tükürük asitleri nötralize edebilmekte, diş yüzeylerinde koruyucu bir yapı oluşturabilmekte ve mine, dentine Ca^{2+}, PO_4^{3-} ve F^- sağlayarak remineralizasyonu destekleyebilmektedir (172). Fizyolojik koşullarda, ağızda tükürük ve biyofilm sıvıları, minenin mineral bileşimine göre aşırı doygun konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve PO_4^{3-} içerdiği için bu iyonlar sürekli olarak mine yüzeyinde birikirler veya kayboldukları mine alanlarında yeniden birikmektedirler. Bu, minenin mineral yapısını korumak ve remineralizasyonu sağlamak için tükürüğün teşvik ettiği doğal bir savunmadır (173). Ağızda pH düştüğünde tükürüğün uyarılmasıyla nötral pH'ında üzerinde hızlı bir artış meydana gelmekte ve tükürükte Ca^{2+}, PO_4^{3-} ve glikoprotein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks kolaylıkla diş plağının içine dahil olmaktadır. Kalsiyum-fosfatın tükürük

proteinlerindeki yüksek çözünürlüğü nedeniyle (dişteki Ca^{2+} ve PO_4^{3-}'den 8-10 kat yüksek), minenin çözünmesini engelleyen bir depo oluşmaktadır (1).

Tükürüğün diş demineralizasyon hızını ve derecesini farklı şekillerde belirleyen farklı etkileri vardır; (i) pelikıl, (ii) şeker klirensi, (iii) diş yüzeylerinin yıkanma seviyesi ve seyreltme etkisi (iv) tamponlama kapasitesi, (v) akış hızı (vi) antibakteriyal etkinlik ve tükürük proteinleri, (vii) pH (174). Bu faktörler birbirleriyle ilişkili olup bir veya birden fazlasının eksikliği demineralizasyon oluşumuna sebep olmaktadır. Örneğin tükürük akışı azalmış bireylerde daha fazla asidik tükürük ve biyofilm bulunmaktadır, bu da demineralizasyon riskini artırmaktadır. Azalan tükürük akışı aynı zamanda asitleri etkili bir şekilde nötralize edemeyen bir ağız ortamı yaratmakta bu nedenle remineralizasyon süreci sıklıkla sekteye uğramaktadır (166).

2.5. REMİNERALİZASYON VE ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN AJANLAR

Son yıllarda diş hekimliği, kayıp diş yapısının rejenerasyonunun en çok tercih edilen ve en uygun yolunun remineralizasyon prosedürleri olduğu konservatif bir yaklaşıma yönelmiştir. Bu nedenle yeni başlayan çürüklerin tanımlanması, korunması ve girişimsel olmayan tedavisine yönelik önleyici yaklaşımların da uygulanabilmesi için çok sayıda remineralizasyon ajanının kullanımı gündemdedir (167).

Çürük yönetiminde ve remineralizasyonda faydalanılan iyonlar asında yer alan flor geçmişten günümüze değin remineralizasyon ajanı olarak en çok kullanılan materyaller arasında yer almaktadır. Florür hidroksiapatit kristalleri ile reaksiyona girerek daha dirençli florapatit kristalleri oluşturmakta, bakterilerdeki glikolitik yolun önemli bir ara maddesi olan fosfoenol piruvat üretimine müdahale ederek asit üreten bakterilerin aktivitesini inhibe etmekte ve demineralizasyonu azaltmak, remineralizasyonu arttırmak için diş sert dokusunda, ağız mukozasında ve diş plağında kalarak etki göstermektedir (175). Gümüş iyonu farklı bileşikler ile kullanıldığında dişte çözünürlüğü azaltıp, remineralizasyona yardımcı olmaktadır. Bu amaçla üretilen gümüş diamin florür de, gümüş iyonunun bakteriler için toksik olan uzun süreli aktivitesi ile, florun remineralizasyon özelliğinin kombine edildiği bir ajandır (176).

Sorbitol, mannitol, ksilitol, isomalt gibi şeker alkolleri doğal olarak üretilmekte ya da monosakkaritler veya disakkaritlerden sentezlenmektedirler (177). Şeker

alkollerini karyojenik bakteriler tam parçalayamadığı için biyofilm matris sentezi için bir substrat olarak kullanılamamaktadır. Ayrıca ilişkili gen ekspresyonunu inhibe ederek, düşük polisakkarit seviyelerine sahip, karyojenik olmayan bir biyofilme yol açmakta, karyojenik bakterilerin diş yüzeyine tutunmalarına engel olmakta, tükürük akış hızını arttırarak pH değerini yükseltmektedirler (178,179).

Remineralizasyonda kitosan, galla chinensis, üzüm çekirdeği ekstresi, teobromin gibi bitkisel kaynaklı ürünler de kullanılmaktadır. Bu ürünlerin çürük yönetiminde *S. mutans*'a karşı bakteriyostatik, bakterisid özellikleri, ağız ortamındaki organik asitleri tamponlama etkisi, sert mine yüzey sertliğini artırması gibi özelliklerinden faydalanılmaktadır (180).

Biyoaktif camlar tükürükle çözünerek, içerdiği nano boyuttaki partiküllerden Na^{+}, PO_4^{3-} ve Ca^{2+} salımını gerçekleştirerek hidroksiapatit benzeri mineralize doku oluşumunu sağlayan biyoaktif nanoteknolojik ajanlar arasında yer almaktadır (181). Nanohidroksiapatitler yüksek çözünürlüklü, minenin geliştirilmesi amacıyla yapay olarak üretilen diş sert dokusunun Ca^{2+} ve PO_4^{3-} oranını yükseltmek amacıyla geliştirilen ajanlardır (182). Kazein, süt ve süt ürünlerinde bulunan partiküler bir protein olup, süt proteini içerikli Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP) remineralizasyon ajanı üretilmiştir (183). CPP-ACP plaktaki Ca^{2+} ve PO_4^{3-} seviyesini arttırmakta ayrıca *S. mutans*'ların adezyonunu ve diş demineralizasyonunu engellemektedir (184). Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Florid Fosfat (CPP-ACFP) da CPP-ACP'nin flor ile kombine edilmiş formu olup, sinerjik etki yaratmaktadır (185).

2.5.1. Diş Hekimliğinde Güncel Biyomimetik Ajanlar

Yunancada "bio" hayat, "mimesis" ise taklit anlamına gelmektedir. Biyomimetik, biyolojik yapıları taklit eden ürünlerin sentezlenmesi amacıyla biyolojik olarak materyallerin yapısının, oluşumunun ve işlevinin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır (6). Doğal sürece dayalı biyomimetik teknikle bu şekilde oluşturulan bir malzemeye biyomimetik malzeme adı verilmektedir (186). Biyomimetik diş hekimliğinin temel ilkesi, estetiğin yanı sıra, kaybedilen diş dokularının yapısını ve tam fonksiyonunu geri kazanmaktır (6).

Diş minesi ömür boyu, ağızdaki çiğneme kuvvetleri, bakteriler, sıcaklık ve pH değişimi gibi etkenlere karşı mekanik bir direnç gösteren dokudur. Olgun mine

hücresizdir ve sıklıkla diş çürüğü veya erozyonun yanı sıra konjenital malformasyon, travma veya çiğneme nedeniyle ortaya çıkan önemli mineral kaybından sonra birebir yenilenmemektedir (187,188). Mine onarımı için biyomimetik stratejide, normal diş remineralizasyonundan ziyade mine yüzeyine sağlam bir şekilde tutunan organize mine apatit kristalleri oluşumu amaçlanmaktadır. Bu nedenle mine rejenerasyonu için çeşitli biyomimetik stratejiler geliştirilmektedir (187).

2.5.1.1. Kendiliğinden birleşen peptit P11-4: Son yıllarda kendiliğinden birleşen peptitler doku mühendisliği amacıyla tasarlanmış, biyokimyasal ortama bağlı olarak farklı şekillerde kendi kendine birleşerek çeşitli biyolojik yapıları taklit edebilen sistemlerdir (189). Peptitler arasında kendi kendine birleşme, düzensiz peptitlerin kendi aralarındaki spesifik, kovalent olmayan etkileşimler nedeniyle hiyerarşik olarak yapılar halinde organize olduğu bir süreçtir (190).

Mine oluşumu, bir dizi yüksek düzeyde düzenlenmiş hücresel aktiviteyi ve protein kontrollü mineralizasyon süreçlerini içermektedir. Mine matriks proteinleri, mine gelişimi sırasında mineralizasyonun ve kristal organizasyonunun düzenlenmesinde hayati rol oynamaktadır. Amelogenin ise hücre dışı organik matrisin %90'ından fazlasını oluşturan, mine oluşumuna en çok katkıda bulunan proteindir (191). Bu protein, sayesinde sert doku matriksinin oluşumu, hidroksiapatitlerin organizasyonu ve kristal büyümesinin kontrolü, mine kalınlığı ve boyutunun düzenlenmesi sağlanmaktadır (192). Kendiliğinden birleşen peptit P11-4 ise, Glu, glutamik asit, fenilalanin, triptofan ve arjinin (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln–Gln-NH2) olmak üzere 11 adet aminoasit içeren, başlangıç mine çürüğü lezyonunda, mine peptid matrisine benzeyen biyomimetik bir yapı iskelesi oluşturabilmek amacıyla üretilen yapılardır (193). P11-4, amelogeninin C-terminalindeki telopeptidden ilham alınarak üretilmiş peptittir. P11-4, potansiyel Ca^{2+} bağlanma bölgeleri olan dört adet negatif yüklü Glu kalıntısına sahiptir. Bu bölgeler arasındaki mesafenin yaklaşık 9,4 Å olduğu bulunmuştur ki bu, hidroksiapatitteki Ca^{2+}' nin konumuna benzemektedir (9). Bu anyonik peptid, düşük viskoziteli, enjekte edilebilir bir monomer çözeltisi olarak uygulanabilmekte ve demineralize minede pH 8,0'ın altında hızla jelleşmeye uğramaktadır (194). Bu süreçte monomer şeklindeki peptitler, belli koşullar altında kendiliğinden birleşerek hiyerarşik olarak, ß tabaka yapısında tek boyutlu nanobantları, şeritleri, fibrilleri, fibril çiftlerini ve en son ise fiberleri oluşturmaktadır (9). Yeni

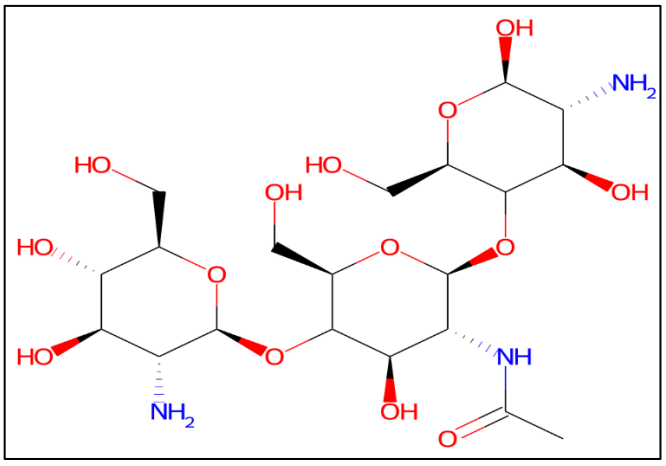
oluşturulan üç boyutlu iskele, diş yüzeyi ile güçlü bir kimyasal bağlanma göstermektedir. Mine matriks proteinlerinin fonksiyonunu taklit edebilmekte ve lezyon içinde hidroksiapatit çekirdeklenmesi ve birikimi için bir şablon görevi görmektedir (167).

Florid uygulaması minenin dış yüzeyinde remineralizasyon oluşturmakta ve tükürükteki Ca^{2+} ve PO_4^{3-} minenin daha derin katmanlarına ilerlemesini engelleyerek çürüğün alt katmanlarında yeterli mineralizasyon sağlamazken, P11-4 çürüğün lezyon gövdesi kısmında bile doku onarımını sağlamaktadır (5). P11-4 içerikli ürün, diş hekimliğinde ilk olarak Credentis firması tarafından üretilen Curodont Repair (Credentis AG, İsviçre)'dir. İçerik olarak sinerjik etki yaratması için hem flor hem P11-4 birarada kullanılmıştır (Resim 2.2).



Resim 2.2: Curodont Repair P11-4 (195)

2.5.1.2. Karboksimetil kitosan: Kitosan kabukluların ve böcek dış iskeletlerinin yanı sıra bazı bakteri ve mantar hücre duvarlarında yaygın olarak bulunan bir polisakkarit olan kitinin temel deasetilasyonundan elde edilen, diş hekimliğinde de remineralizasyon ajanı olarak kullanımı olan bir polimerdir (196). CMC ise kitosanın karboksimetilasyonundan elde edilen, yapısında Amin ($–NH_2$), Hidroksil (–OH), Karboksil (–COOH) ve Asetamido ($–NHCOCH_3$) grupları içeren, suda çözünen kitosan türevlerinden biridir (197) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: CMC'nin moleküler yapısı

Son on yılda CMC, biyouyumluluğu, toksik olmaması, antibakteriyel aktivitesi ve diş üzerinde internal biyomimetik mineralizasyon potansiyelinin olması nedeniyle dikkat çeken bir materyal olmuştur (198). CMC'nin avantajı kitosanın alkalin ve toprak alkali metaller için çok sınırlı afinitesine karşın, kitosana göre karboksimetil gruplarını barındırması nedeniyle daha fazla Ca^{2+} ile şelasyon sağlayabilecek kapasiteye ulaşmış ve daha yüksek biyomineralizasyon yapma derecesine ulaşmış olmasıdır. Kitosanın pH 6,0'ın üzerinde sulu çözeltilerde çözünmemesi nedeniyle uygulaması sınırlıyken CMC'nin, ayrıca sulu çözeltide gelişmiş çözünürlük ve poliamfoterik elektrolit özelliği artmıştır (199). CMC'nin, biyomimetik özelliğini dentinde, dentin ekstraselüler matriksindeki glikozaminoglikanları taklit etme özelliği ile kollajenin hidrofilikliğini, Ca^{2+} emme kapasitesini ve termal bozunma direncini arttırarak, kollajenin intrafibriller mineralizasyonunu ve Ca^{2+} salımı için çekirdeklenme alanları oluşumu sağlayarak gösterdiği düşünülmektedir (12). Mine üzerinde ise Amorf Kalsiyum Fosfat (ACP) ile birlikte kullanımında çevresel koşullara göre CMC'nin, nötr ortamda negatif yük gibi davranarak veya asidik ortamda ise pozitif yük gibi davranarak ACP'yi stabilize ederek hidroksiapatitin kristal fazlarına dönüştürebileceği düşünülmektedir (200,201). CMC hala deney aşamasında olan bir materyal olduğu için diş hekimliğinde kullanıma hazır, üretilmiş bir formu piyasada bulunmamaktadır. Fakat mine ve dentin biyomimetiğini sağlaması açısından ümit vaadeden bir materyaldir.

2.5.1.3. Deney aşamasındaki diğer biyomimetik ajanlar: Son yıllarda çürük lezyonlarının kalsiyum-fosfat materyalleri ile biyomimetik tedavisi büyük ilgi görmüştür. Minenin biyomimetik oluşumu için ACP veya hidroksiapatit

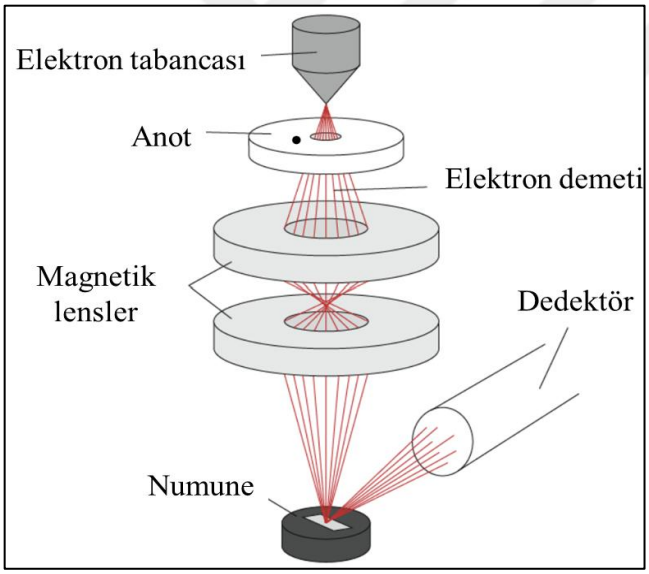
nanopartiküllerini içeren çeşitli biyomimetik sistemler geliştirilmektedir (187). Hidroksiapatit çekirdeklenmesini başlatmak için amelogeninin hidrofilik fonksiyonel alanını içeren bir anyonik oligopeptit OPA, C18H35O-Thr-Lys-Arg-Glu-Glu-Val-Asp peptidi ve dentin siyalofosfoprotein peptit bazlı geliştirilen biyomimetik ajanlar arasındadır (8). Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri ise nanoküreler halinde kendiliğinden birleşerek doğrusal zincirlere dönüşüp çekirdeklenme alanı oluşturabilen, amelogeninden esinlenerek üretilen biyomimetik bir ajandır (202). Elektrolitik biriktirme tekniği kullanarak, fizyolojik pH'a yakın ve iyonik güçte çözünür rekombinant amelogenin proteinleri içeren bir mineralizasyon çözeltisinden elde edilen hidrojeller asitlenmiş mine yüzeyinde, mine yapısını tekrar oluşturmak için deney aşamasında olan biyomimetik bir uygulamadır (203). Aynı şekilde farklı organik katkı maddeleri içeren likitler ve hidrojeller dahil olmak üzere başka biyomimetik sistemler geliştirilmeye devam edilmektedir (187).

2.6. DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN YÜZEY KARAKTERİZASYON TEKNİKLERİ

Diş hekimliğinde karakterizasyon, hem kullanılan dental materyallerin yapısını ve özelliklerini anlamak hem de bu materyallerin diş yüzeyine olan etkilerinin anlaşılması için esastır. Karakterizasyon amacıyla kullanılan analizler makro seviyeden nanometre mertebesindeki seviyelere kadar değişmektedir. Bu analizlerle parçacık boyutu, morfoloji, pürüzlülük, yapısal-optik özellikler ve remineralizyon parametreleri değerlendirilmektedir (204). Genel olarak karakterizasyon yöntemleri makro ve mikro/nano karakterizasyon yöntemleri olarak sınıflandırılmaktadır. Makro yöntemlerde mukavemet, yapı, renk, bileşim ve şekil gözlemlenmektedir. Mikro/nano temelli karakterizasyonda ise mikroskoplar kullanılmaktadır. Mikroskoplar, elektronlar, iyonlar, fotonlar veya probların fiziksel penetrasyonu yoluyla malzemelerin veya dişlerin yüzeyini veya yüzeyinin altını incelemektedir (205). Malzeme ve diş yüzeyi karakterizasyonunda optik mikroskop, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), alan iyon mikroskobu, taramalı tünelleme mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu, X Işını Kırınım Topografisi (XRT), Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) gibi mikroskoplar yaygın olarak kullanılmaktadır (204).

2.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu

Taramalı elekron mikroskobu, esas olarak çok çeşitli büyütmelerde diş yüzeylerinde morfoloji ve yapı incelemesi için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Büyütme miktarı 50x-10.000x ve hatta daha da yüksek değerlere kadar ulaşmaktadır (206). SEM ile cihaz içinde yayılan odaklanmış elektron ışını, elektron ışınının enerjisi, incelenecek yüzeyin cinsi gibi faktörlere bağlı olarak çeşitli sinyaller üretmek üzere maddenin yüzeyi taranmaktadır. Taranılan madde yüzeyinden yansıyan ikincil elektronlar cihaz tarafından algılanmakta ve görüntü meydana gelmektedir (Şekil 2.5). İncelenen maddenin yüzey özelliklerine göre yansıyan ikincil elektronların da sayısı değişmektedir (207). Diş hekimliğinde, mine-dentin yüzeyinin incelenmesi, diş yüzeyinin iç yapısının incelenmesi ve diş yüzeylerinden alınan kesitsel yüzeylerin detaylı taraması gibi işlemler SEM ile gerçekleştirilebilmektedir (208).



Şekil 2.5: SEM cihazının çalışma mekanizması (209)

2.7. PROTEİN-LİGAND BİYOETKİLEŞİMLERİ

Biyolojik makromoleküllerin birbirleriyle veya çeşitli küçük moleküllerle yüksek özgüllük ve afiniteyle etkileşerek belirli bir kompleks oluşturma süreci olan biyoetkileşim, canlı organizmalardaki tüm süreçlerin temelini oluşturmaktadır (210). Vücutta biyolojik aktiviteler tek başına bir molekülün etkisi ile olabildiği gibi, çoğu

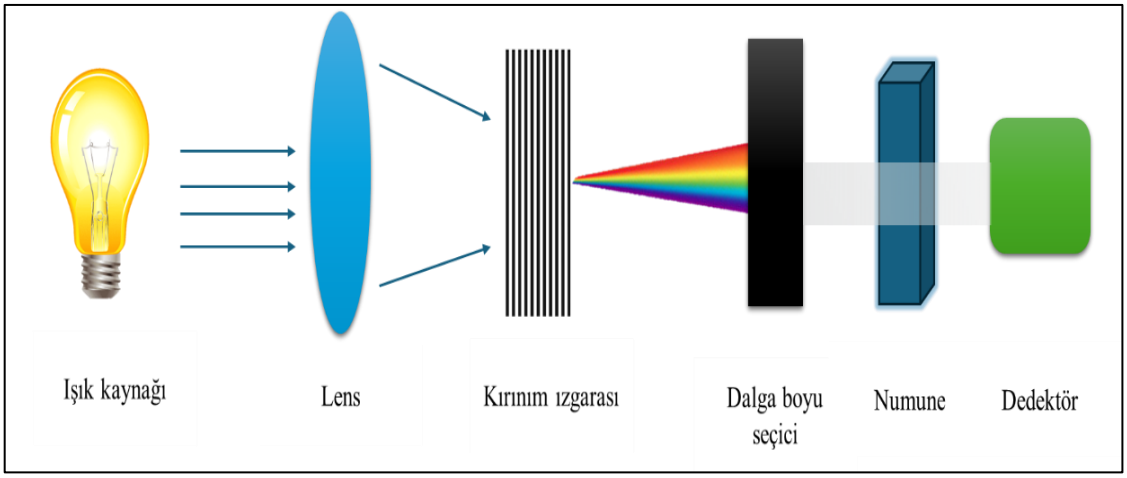
önemli aktiviteler çoklu moleküllerin birbirleriyle etkileşime girmesinin sonucunda ortaya çıkmaktadır (211). Biyolojik makromoleküllerin önemli bir sınıfı olan proteinler, işlevlerini kendilerine veya diğer moleküllere bağlanarak gerçekleştirmektedirler. Protein-ligand etkileşimlerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, biyolojiyi moleküler düzeyde anlamak için çok önemlidir. Bunun yanı sıra, protein-ligand tanıma ve bağlanmasından sorumlu mekanizmaların bilinmesi, çeşitli maddelerin etkileşimini, etkinliğini ve buna bağlı olarak da ilaçların keşfini, tasarımını ve geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır (210). Diş hekimliği alanında ise ağız bölgesinde protein-ligand etkileşimleri ile çeşitli maddelerin biyolojik dokularla hassas etkileşimi sağlanmaktadır. Protein-ligand etkileşimleri ve nanoteknolojinin enfeksiyon veya biyofilm oluşum sürecinde; ilaç taşıyıcı sistemlerin antimikrobiyal, analjezik etkileri, çürük önlemede ise; antimikrobiyal ajanlarla yüklü partiküllerin diş macunları, gargaralar gibi ürünlere dahil edilmesi ve bu sistemlerin dental biyofilme etki ederek demineralizasyon-remineralizasyon dengesini sağlaması gibi çeşitli etkileri mevcuttur (212,213). İlaç taşıyıcı sistemler sayesinde ağızda biyofilm oluşumunun engellendiğini, ilacın biyofilme penetre olmasının sağlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (212,214).

Protein işlevlerinin daha derin bir şekilde anlaşılması için ön koşul, protein-ligand etkileşimlerinden sorumlu mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılmasıdır. Bunun için bir kompleksin oluşumunu yöneten/yönlendiren enerjetiklerin tam açıklaması, karakterizasyonu ve nicelleştirilmesi çok önemlidir (215). Bu bağlamda protein-ligand etkileşimlerinin incelenmesi için *in-vivo, in-vitro* ve *in-siliko* yöntemler mevcuttur. *In-vitro* tekniklerde, protein-ligand etkileşimleri canlı bir organizmanın dışında kontrollü bir ortamda gerçekleştirilmektedir. Yüzey plazmon rezonans, UV-görünür ışık gibi yöntemler ile etkileşimlerin izlenmesi *in-vitro* teknikler arasındadır (216). *In-siliko* ortamda protein-ligand etkileşimleri bilgisayar ortamında simulasyonlar ile dizi tabanlı ve yapı tabanlı (moleküler kenetlenme gibi) olarak gerçekleştirilmektedir (217). *In-vivo* ortamda ise etkileşimlerin canlı organizma üzerinde gerçekleştirildiği çalışmalar mevcut olup, kimyasal çapraz baglama, sentetik letalite gibi yöntemleri barındırmaktadır (211).

2.7.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi

Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi, bir referans çözelti veya boş numuneye kıyasla bir çözelti tarafından emilen veya maddeden iletilen UV veya

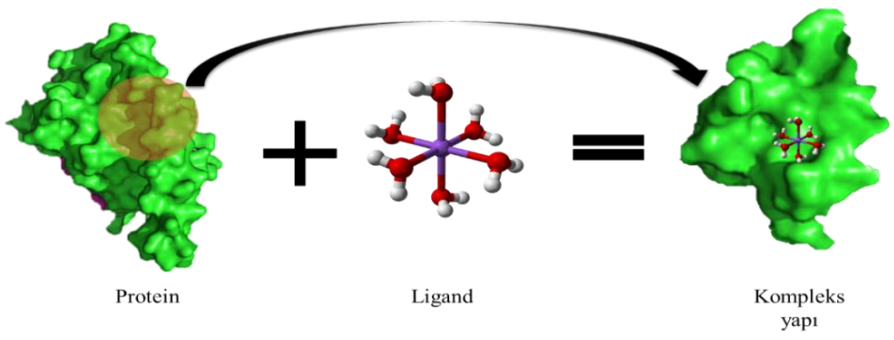
görünür ışığın ayrı dalga boylarının miktarını ölçen bir tekniktir (218). Elektromanyetik radyasyon/ışık maddeyle etkileşime girdiğinde, yansıma, saçılma, emilim (absorbsiyon), floresans/fosforesans (emilim ve yeniden emisyon) ve fotokimyasal reaksiyonlar (emilim ve bağ kopması) dahil olmak üzere çeşitli süreçler meydana gelebilmektedir (219). Tipik olarak UV-görünür bölge spektroskopi ile görünür veya UV ışığın numune/çözelti içinden geçmesi ya da numune/çözelti yüzeyinden yansıtılmasından sonraki azalması ölçülmektedir (Şekil 2.6). Cihazdaki ışığın dalgaboyu yaklaşık 900 nm bir spektral aralığa sahiptir. Işığın şiddetinin azalmış olması emilimin arttığını göstermektedir. UV-görünür bölge spektroskopi ile çözeltinin derişimi belirli bir dalga boyundaki absorpsiyon miktarının ölçülmesiyle bulunmaktadır. Farklı moleküller farklı dalga boylarını absorpladıkları için sonuçta molekülün yapısını gösteren absorpsiyon bantlarından oluşan absorpsiyon spekturumu ile tayin yapılmaktadır (219,220). Elde edilen spektrumdan, numunenin kimyasal veya fiziksel özelliklerini belirlemek, katı veya sıvı numunedeki molekülleri tanımlamak, çözeltideki belirli bir molekülün konsantrasyonunu belirlemek, bir dizi dalga boyu boyunca bir sıvı veya katıdan emilimi veya geçirgenliği karakterize etmek, bir yüzeyin yansıtma özelliklerini karakterize etmek veya bir malzemenin rengini ölçmek ve biyolojik süreçleri incelemek mümkündür (221,222).



Şekil 2.6: UV cihazının çalışma mekanizması (223)

2.7.2. Moleküler Kenetlenme

Proteinler başka proteinler, nükleik asitler veya küçük moleküllerle birçok şekilde etkileşime girebilmektedir. Moleküler kenetlenme, *in-siliko* ortamda bu etkileşimlerin incelendiği yapı tabanlı bir yöntemdir. Bu yöntemle protein ve analit ile etkileşim üç boyutlu olarak modellenmekte ve hangi analitin hedef proteine nasıl bağlanacağı bulunmaktadır (224). Bu teknik etkileşimleri incelenecek olan maddelerin moleküler üç boyutlu yapıları mevcut olduğunda tercih edilen yöntemdir (Şekil 2.7). Moleküllerin yapısal olarak olası bağlanma oryantasyonları bulunmakla birlikte oluşan bağlantının da enerjisel olarak afiniteleri tahmin edilebilmektedir (225). Etkileşim, maddeler arasındaki esneklik ve hareketlilik sonucu belirlenmektedir. Kavramsal olarak moleküler kenetlenmede proteinler ve ligandları uzayda rastgele çarpıştırılarak kaba bir yapı modeli oluşturulmakta ve bu modeldeki bağlanma bölgelerinde iyileştirme yapılarak bağlanma oryantasyonları, bu sayede de etkileşimin meydana geldiği kompleks yapı ortaya çıkmaktadır (226). Çeşitli yazılımlar aracılığıyla bu yazılımlardaki arama algoritmaları ve enerji puanlama işlevleri kullanılarak etkileşimler belirli adımlar izlenerek incelenmektedir (227). Moleküler kenetlenme algoritması dört adımdan oluşmaktadır. İlk adım protein ve ligand hazırlanma sürecinde maddelerin üç boyutlu koordinat dosyaları elde edilmekte ve optimize edilmektedir (228). İkinci adım arama stratejisi sistematik ya da rastgele arama yöntemlerini barındıran yazılımların belirlendiği bir aşamadır (229). Üçüncü aşama olan seçme fonksiyonunda yaratılan moleküler yapıların içlerinden biyolojik olarak uygun olanları seçilmekte ve oluşan kompleks yapıların bağlanma enerjileri tahmin edilmektedir (230). Bunun için de çeşitli puanlama fonksiyonları kullanılmaktadır. Son aşamada ise kenetlenme sonuçları kök ortalama kare sapması gibi yöntemlerle doğrulanmaktadır (231).



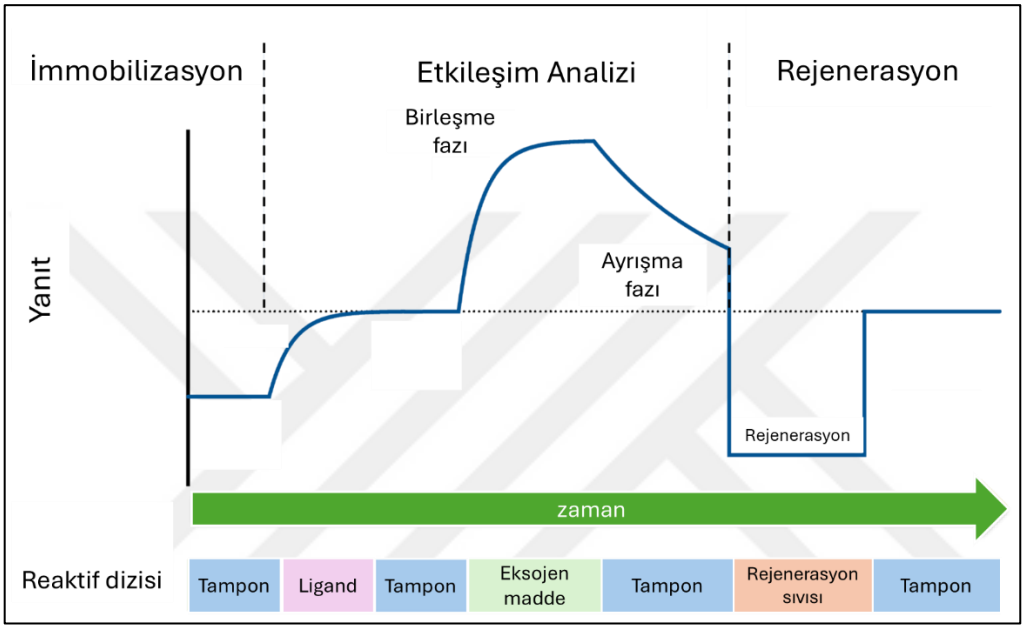
Şekil 2.7: Protein-ligand kompleks oluşumu (232)

2.7.3. Yüzey Plazmon Rezonans

Protein-ligand etkileşimlerinde SPR, herhangi bir işaretlemeye gerek kalmaksızın moleküler etkileşimlerin afinitesinin, spesifikliğinin ve kinetik davranışlarının eş zamanlı incelenmesini sağlayan optik temelli bir yöntemdir (233). SPR ilk olarak 1901 yılında Wood tarafından gözlemlenmiştir. SPR olgusu ise 1907 yılında Rayleigh tarafından açıklanmıştır. Otto ve Kretschmann, 1968 yılında zayıflatılmış toplam yansıma yöntemi ile yüzey plazmonlarının optik uyarılmasını göstermiştir (234). SPR ile peptit/protein–protein, DNA/RNA–protein, protein–hücre, reseptör–hücre, protein–virüs, karbonhidrat–protein, karbonhidrat–hücre, lipozom–protein, yapay malzemeler–biyolojik madde, ilaç–protein, ilaç–DNA çiftleri arasındaki bağlanma etkileşimleri tespit edilebilmektedir. Afinite tespiti, kinetik analizi, konsantrasyon analizi, aktif konsantrasyon tayini, bağlanma stokiometre ölçümleri, termodinamik analiz, epitop haritalama, uygun ligand tasarımı ve etkileşim mekanizmaları ise SPR ile incelenebilen analizler arasında yer almaktadır (235).

Yüzey plazmon rezonans sistemleri, algılama yapısına bağlı olarak prizma temelli (prizma/metal tabaka/analit), dalga kılavuzu temelli, fiber ve kafes temelli olarak dört farklı konfigürasyonla sınıflandırılır. Prizma temelli (Kretchmann yapılandırması olarak da bilinir) konfigürasyon bunlar arasında en yaygın kullanılan türdür (236). SPR'de genellikle dielektrik özelliğe sahip ince bir metal film yüzeyinin çok yakın çevresinde oluşan kırılma indisi değişimleri incelenerek ligand-analit arasındaki etkileşim tespit edilir. Bu teknikte, optik sensör yüzeyi işlevi görmesi için farklı kırılma indisine sahip iki şeffaf ortam yani, cam prizma ve numune çözeltisi arasında genellikle altın veya gümüş olmak üzere ince bir metal film kullanılmaktadır (237). Belirli bir açıda cam prizmadan gelen ışığın metal yüzeydeki elektronlarla birleşmesi ve uyarılma sonucu hareket etmeleriyle plazmonlar oluşmaktadır. Oluşan plazmonlar yansıyan ışık yoğunluğunda bir azalmaya neden olmaktadır. Bu olguya yüzey plazmon rezonans denir ve yalnızca rezonans açısı olarak bilinen belirli bir açıda meydana gelmektedir. Biyomolekül bağlanması gibi durumlarda algılama ortamının ışığı yansıtma indeksinde değişiklik meydana gelmekte, rezonans açısı kaymaktadır. Bu sayede madde etkileşimleri yansıyan ışıktaki değişikliklerin ölçülmesiyle gerçekleştirilmekte ve grafiksel sonuç sensorgramlar olarak elde edilmektedir (Şekil 2.8) (238). Analiti içeren çözelti metal sensor üzerine immobilize edilmiş reseptör (ligand) molekül ile etkileşime

girdiğinde yüzeyin kırılma indisinin değişimine ve rezonans açısının kaymasına neden olur. Yüzeye immobilize edilmiş reseptör veya liganda eksojen madde bağlanmasıyla rezonans açısı değişmektedir, rejenerasyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle eksojen madde yüzeyden ayrılmaya başlamakta ve bir süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine dönmektedir (239).



Şekil 2.8: SPR sensorgramın şematik gösterimi (240)

2.8. BİYOLOJİK DOKULARDA ENZİM AKTİVİTESİ

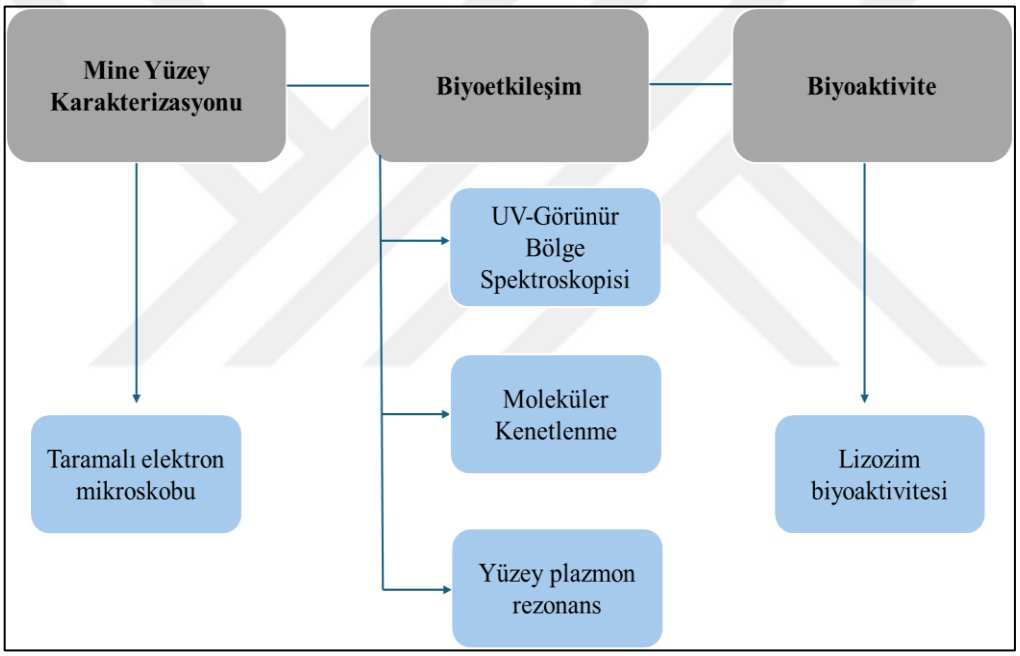
Biyolojik ortamda hücreler tarafından sentezlenerek, biyolojik dokulardaki çeşitli tepkimeleri katalizleyen protein yapısındaki maddelere enzim denilmektedir. Enzimler mikroorganizmaların neden olduğu tüm biyolojik değişikliklerden sorumlu yapılardır (241). Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir (242). Biyolojik dokularda enzimlerin miktarının ve aktivitesinin tespiti çeşitli hastalıkların tespitinde, enzimin liganda karşı afinitesi, spesifitesi gibi parametrelerin de belirlenmesinde önem taşımaktadır (243,244).

2.8.1. Lizozim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lizozim tıp, immünohistokimya, diş hekimliği, gen ve hücre mühendisliği gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan ve insanların çeşitli biyolojik sıvılarında bulunan bir enzimdir (244). İnsanlarda serum, göbek kordonu, beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı, idrar, tükürük, mide suyu, safra, gözyaşı, anne sütü gibi pek çok biyolojik sıvıda bulunan lizozimin içinde bulunduğu organa, biyolojik dokuya ilişkin özgüllüğünün ve buna bağlı olarak aktivitesinin belirlenmesi hem bu biyolojik dokularda meydana gelebilecek olası hastalıkların tespiti hem de lizozim içerikli ilaç veya ürün geliştirme çalışmalarının yapılabilmesi için önem taşımaktadır (245). Bu nedenle lizozim enziminin aktivitesinin belirlenmesi için birçok strateji geliştirilmiştir. Kantitatif lizozim tayinleri iki ilkeye göre gerçekleştirilmektedir. İlki elektroforetik, kromatografik, immünoenzimatik, spektrofotoflorometrik ve floresan polarizasyon teknikleri gibi proteinin kendisine dayanan lizozim aktivite yöntemidir (246,247). İkincisi ise bir substrat olarak *M. lysodeikticus*'un hücre duvarına karşı lizozimin litik aktivitesine dayanan tespit yöntemidir (244). İkinci yöntemde kullanılan UV-görünür bölge spektroskopi yönteminde aktivite ölçümü, bir spektrofotometrede ortalama nötr pH'ta ve 25°C'de, bir bakteri süspansiyonunun lizozim ile inkübasyonu sırasında, reaksiyonun 450 nm'de absorbansındaki azalmanın izlenmesiyle takip edilmektedir (248).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız için deney akış şeması oluşturulması (Şekil 3.1) ve planlamalar yapılması ile deney süreci için gerekli olan etik kurul, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.07.2023 tarih ve 2023/14 sayılı toplantısında görüşülerek onaylanmıştır (EK-1.a-b). Tez çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi ve Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Deney akış şeması

3.1. GEREÇ

3.1.1. Deneyde Kullanılan Materyaller, Kimyasallar ve Çözeltiler

Tez çalışmasında etkileşimlerde ve mine yüzey karakter karakterizasyonunda ortak kullanılan materyaller olan lizozim (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri), P11-4 (Curodont Repair, Credentis AG, İsviçre) ve CMC (Biosynth, MA, ABD) ürünleri 4ºC'de buzdolabında saklanılmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1: Deney parametrelerinde ortak kullanılan lizozim, CMC ve P11-4 ürünleri

Laboratuvar kapları %5'lik nitrik asit solüsyonunda bir gece bekletilmiş, ultra saf su ile durulandıktan sonra her deney öncesinde tozsuz koşullar altında kurutulmuştur. Deney adımlarında doğru örnekleme ve sıvı transferi tek kanallı pipetlerle (Eppendorf Research Plus, Eppendorf AG, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

Mine yüzey karakterizasyonu çalışmalarında; diş örneklerinin deney başlangıcına kadar olan süreçte bekletilmesi için %0,1 timol solüsyonu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri), örneklerin temizlenmesi için mikromotor ile kullanılan pomza ve fırça (Frank Dental, BY, Almanya), dişlerin kuron ve köklerini birbirinden ayırmak için elmas disk (Frank Dental, BY, Almanya), örneklerde demineralizasyon oluşturmak için demineralizasyon solüsyonu (pH 4,4), deney sürecinde örneklerin bekletilmesi için yapay tükürük solüsyonu (pH 6,8) ve SEM öncesinde örneklerin dehidratasyonunu sağlamak amacıyla etil alkol (Isolab, Türkiye) kullanılmıştır.

Yüzey plazmon rezonans ile kinetik çalışmalar için; 11-Merkaptoundekanoik Asit (MUA), N-Hidroksisüksinimit (NHS), N-Etil-N'-(3-(Dimetilamino) Propil) Karbodiimid (EDC), Etanolamin Hidroklorür (EA-HCl), Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Disodyum Fosfat (Na_2HPO_4), Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) ve Sodyum Hidroksit (NaOH) Sigma-Aldrich'ten (Saint Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. Sodyum Klorür (NaCl) ve Potasyum Klorür (KCl) ticari olarak Carlo Erba'dan (BW, Fransa) satın alınmıştır. Etanol ve Sülfürik Asit (H_2SO_4) Isolab'tan (Türkiye) satın alınmıştır.

SPR sensör çipleri ve eşleştirme sıvısı ise Biosensing Instrument Inc.'den (Tempe, AZ, ABD) ticari olarak temin edilmiştir. H_2O_2 ve stok çözeltileri 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. EDC doğrudan -20ºC'de tutulmuştur. Tamponların hazırlanması ve kinetik çalışmalar için Tip-1 su kullanılmıştır.

Ultraviyole-görünür bölge spektroskopi çalışmaları için; lizozim, P11-4, CMC ve P11-4-lizozim, CMC-lizozim kombinasyonlarının UV-görünür bölge absorbanslarının ölçümü için maddeler 4°C'de buzdolabında muhafaza edilen Fosfat Tamponlu Salin (PBS) pH 7,4'te çözdürülmüştür. Deneysel süreçte µL düzeyindeki sıvıların transferi otomatik pipetler ve ilgili pipet uçları ile sağlanmıştır. Çözeltilerin cihaza yerleştirilmesinde 0,8 mL hacimli kuvarz spektrofotometre küvetleri (Purshee Optical Elements Co., LTD, Çin) kullanılmıştır. Tüm deneysel süreçte ve seyreltmelerde Tip 1 su kullanılmıştır.

Biyoaktivite çalışmaları için; P11-4-lizozim, CMC-lizozim ve tek başına lizozim ile biyoaktiviteyi ölçmek için substrat olarak *M. lysodeikticus* bakteri süspansiyonu, reaksiyon tamponu için KH_2PO_4 ve Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, ABD)'nden temin edilmiştir. Deneysel süreçte µL düzeyindeki sıvıların transferi otomatik pipetler ve ilgili pipet uçları ile sağlanmıştır. Bakteriler doğrudan -20ºC'de bir dondurucuda, tampon çözeltisi ise 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çözeltilerin cihaza yerleştirilmesinde 2 mL hacimli kuvarz spektrofotometre küvetleri kullanılmıştır. Tüm deneysel süreçte ve seyreltmelerde Tip 1 su kullanılmıştır.

3.1.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deney tamponlarının hazırlanmasında kullanılan ultra saf su, su saflaştırma sistemi olan Direct Q®3 UV cihazından (Millipore Corp., Fransa) elde edilmiştir. Tüm kimyasallar ve reaktifler analitik terazide (Ohaus PA224C, Ohaus Corp., ABD) tartılmıştır. Solüsyonların pH değerleri masaüstü pH metre (Seven Compact, Mettler Toledo, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür. Çözeltileri karıştırmak ve homojenleştirmek için vorteks karıştırıcı (ZX3 Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica, İtalya) ve çözeltileri homojenize etmek ve gaz giderimi için ise ultrasonik banyo (Elmasonic S 60 H, Elma Schmidbauer GmbH, Almanya) kullanılmıştır.

P11-4-lizozim ve CMC-lizozim etkileşim kompleksinin tespiti ve lizozim biyoaktivite tayini için çift ışın yollu UV-görünür bölge spektrofotometre (Jasco V730, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır.

Bağlanma etkileşim kinetiklerini ve afinitesini belirlemek için tüm madde-lizozim bağlanma analizleri p-polarize lazer ışığı λ= 670 nm ile donatılmış BI-4500A SPR cihazı (Biosensing Instrument Inc., Tempe, AZ, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Mine yüzey karakterizasyonu öncesi örneklerin hazırlanması sürecinde dişlerin polisajını sağlamak amacıyla polisaj cihazı (Minitech Z33, ABD) kullanılmıştır. Dişlerin mine yüzey karakterizasyonu için yüzey kaplama cihazı (Quorum Q150R ES, İngiltere) ve görüntüleme için ise SEM cihazı (Tescan, GAIA3+OxfordXMax 150 EDS, Çekya) ile hazırlık süreci ve analizler gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Örnek Sayısının Tespiti

Mine yüzey karakterizasyonunun belirlenmesi için gerekli diş örneklerinin sayısının belirlenmesinde, G*Power Programı (Software sürüm 3.1.9.2) kullanılarak güç analizi yapılmıştır. SEM analizi için α=0,05 anlamlılık düzeyinde her grup için örnek sayısı 6 olduğunda, testin gücü %95 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle her grupta 6 adet örnek olacak şekilde toplam 36 adet 3. büyük azı dişinin çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu için Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada çekim işlemi öncesi gerekli bilgilendirmeler yapılarak onam formu (EK-2) imzalatılmış olan hastalardan elde edilen, çürük ve dolgu olmayan, çekim işlemi sırasında zarar görmemiş ve yapısal bozukluğu olmayan; sağlam alt veya üst 3. büyük azı dişleri kullanılmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2: Deneyde kullanılan 3. büyük azı dişleri

Dişlerin çekim zamanlarıyla deney amaçlı kullanım zamanları arasında 3 aydan daha fazla süre geçmemesine dikkat edilmiştir. Bu süre zarfında dişlerin kök yüzeyi üzerindeki yumuşak doku kalıntıları, debris oluşumu gibi birikintiler bir küret yardımıyla temizlenerek %0,1'lik timol içeren salin solüsyonunda +4°C'de bekletilmiştir. Deney başlangıcında dişlerin bukkal mine yüzeyleri, düşük devirli mikromotor ile kullanılan fırça ve pomza ile temizlenmiştir. Ardından mine yüzeyleri 30 sn distile su ile yıkanmıştır (Resim 3.3.a). Minede materyallerin uygulanabileceği ve SEM'de düzgün görüntüleme alınabilecek düz bir mine yüzeyi oluşturabilmek amacı ile örneklerin bukkal yüzeylerine su soğutması altında sırasıyla 600, 800, 1200 gridlik alüminyum oksit zımparaları olan polisaj cihazı ile 5'er sn dairesel hareketlerle polisaj yapılmış ve sonucunda düzgün, pürüzsüz ve parlak mine yüzeyleri elde edilmiştir (Resim 3.3.b).



Resim 3.3: Örneklerin temizlenmiş hali (A) ve kullanılan zımpara cihazı (B)

Polisaj işlemi sonrasında örnekler distile su ile yıkanarak yüzeyleri temizlenmiştir. Dişlerin bukkal mine yüzeylerinde deney materyallerinin uygulanacağı standart yüzeyler oluşturulabilmesi amacıyla 4x4 mm'lik etiket kağıtları kesilerek bukkal yüzeylere yapıştırılmış, dişlerin geri kalan kısımları demineralizasyon solüsyonundan etkilenmemesi için aside dirençli tırnak cilası ile 2 kat kaplanmıştır. Örnekler cilanın kuruması için 24 saat dışarıda bekletilmiştir (Resim 3.4).



Resim 3.4: 4x4 etiketlerin bukkal yüzeye yapıştırılması (A), 2 kat cila uygulaması (B), bukkal yüzeyde 4x4'lük oluşan pencere (C, D)

3.2.2. Mine Dokusunda *in-vitro* Demineralizasyon Oluşturulması

Örneklerde demineralizasyon oluşturulabilmesi için gerekli demineralizasyon solüsyonu Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık Fakültesi Biyoetkileşim Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır. Demineralizasyon solüsyonu 2,2 mM Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$), 2,2 mM KH_2PO_4 ve 0,05 M asetik asit içermekte olup, çözelti pH'sı 4,4 olarak ayarlanmıştır (249). Örnekler bir kap içerisine demineralizasyon solüsyonunda dişler birbirine değmeyecek şekilde yerleştirilerek, 37ºC'de 96 saat bekletilmiştir. Demineralizasyon solüsyonu 48 saatte bir yenilenmiştir. 96 saatlik süre sonrasında örnekler deiyonize su ile yıkandıktan sonra kurutularak bukkal yüzeylerindeki 4x4 mm'lik alanda demineralizasyon oluşumu kontrol edilmiştir. Demineralize alan oluşturulan tüm dişlerin kuron ve kökleri cerrahi elmas separe ile ayrılmıştır. Örnekler deney süresine kadar oda sıcaklığında, deiyonize su içerisinde özel kaplarda muhafaza edilmiştir (Resim 3.5).



Resim 3.5: Demineralizasyon solüsyonunun hazırlanması (A), dişlerin solüsyonda bekletilmesi (B), dişlerin kron ve köklerinin ayrılması (C), demineralize diş (D)

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyde seçilen materyaller ile demineralize mine yüzeyinde biyomimetik remineralizasyon sağlayabilecek materyallerin etkisini inceleyebilmek için negatif kontrol grupları dahil toplamda 6 grup oluşturulmuştur (Resim 3.6) (Tablo 3.1).



Resim 3.6: Dişlerin gruplara ayrılması

Tablo 3.1: Çalışma grupları, uygulanan materyaller ve bekletilen ortam

Grup Numarası	Uygulanan Materyaller	Bekletilen ortam
1. Grup (1. Negatif Kontrol)	-	Yapay tükürük
2. Grup	Saf P11-4	Yapay tükürük
3. Grup	Saf CMC	Yapay tükürük
4. Grup (2. Negatif Kontrol)	-	Yapay tükürük+ Lizozim
5. Grup	Saf P11-4	Yapay tükürük+ Lizozim
6. Grup	Saf CMC	Yapay tükürük+ Lizozim

3.2.3.1. Yapay tükürük (1. grup-negatif kontrol 1): Bu gruptaki dişlere hiçbir materyal uygulanmamıştır. Dişler direkt yapay tükürük solüsyonuna konulmuştur. Kullanılan yapay tükürük solüsyonu Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Eczacılık

Fakültesi Biyoetkileşim Laboratuvarında hazırlanmıştır. Yapay tükürük solüsyonu NaCl, KCl, Magnezyum Klorür ($MgCl_2$), $CaCl_2$, sorbitol, KH_2PO_4, karboksimetilselüloz sodyum ve su içermektedir. Solüsyon pH'ı 6,8 olacak şekilde hazırlanmıştır (250) (Tablo 3.2). Yapay tükürük solüsyonunda dişler 28 gün boyunca bekletilmiş, diğer gruplarla karşılaştırması yapılmıştır. Solüsyon 28 gün boyunca günde iki kez yenilenmiştir.

Tablo 3.2: Deney için hazırlanan yapay tükürük içeriği

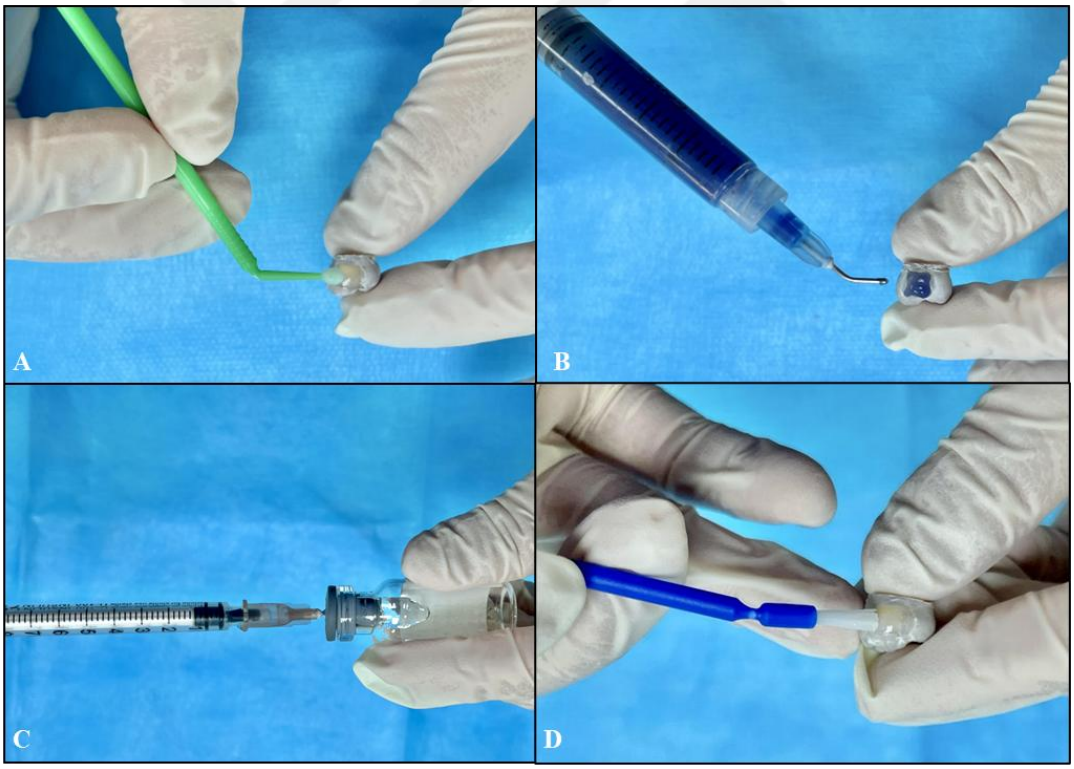
İçerik	Miktar (g/L)
NaCl	0,84
KCl	1,2
$MgCl_2$	0,05
$CaCl_2$	0,14
Sorbitol	3
KH_2PO_4	0,34
Karboksimetilselüloz sodyum	1
Su	993,41

3.2.3.2. Saf P11-4 ve yapay tükürük (2. grup): Deneyde Curodont Repair toz formunda saf P11-4 kullanılmıştır (Resim 3.7).



Resim 3.7: Toz formunda saf P11-4

Materyalin uygulanması üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir (251). Diş demineralizasyonundan sonra, bukkal penceredeki mine yüzeyleri bir fırça ile temizlenmiş ardından 20 sn boyunca %2'lik Sodyum Hipoklorit (NaClO) (Chloraxid, Cerkamed, SW, Polonya) uygulanmıştır. Örnekler 30 sn boyunca Tip-1 suyla durulanmıştır. 20 sn boyunca %37'lik fosforik asit (Ultra- Etch, Ultradent Products Inc, UT, ABD) uygulandıktan sonra örnekler Tip-1 su ile durulanıp, hava spreyi ile kurutulmuştur. Cam şişe içindeki toz formda P11-4'e 0,05 mL Tip-1 su enjekte edilerek çözdürülmüştür. Çözünmenin ardından hemen mine yüzeyine P11-4 uygulaması gerçekleştirilmiş, nüfuz etmesi için 5 dk boyunca beklenmiştir (Resim 3.8). Örnekler daha sonra yapay tükürük solüsyonuna konulmuş, 28 gün boyunca bekletilmiştir. Yapay tükürük günde iki kez yenilenmiştir. Tüm çalışmada dişlere P11-4 uygulaması bir kez gerçekleştirilmiştir.



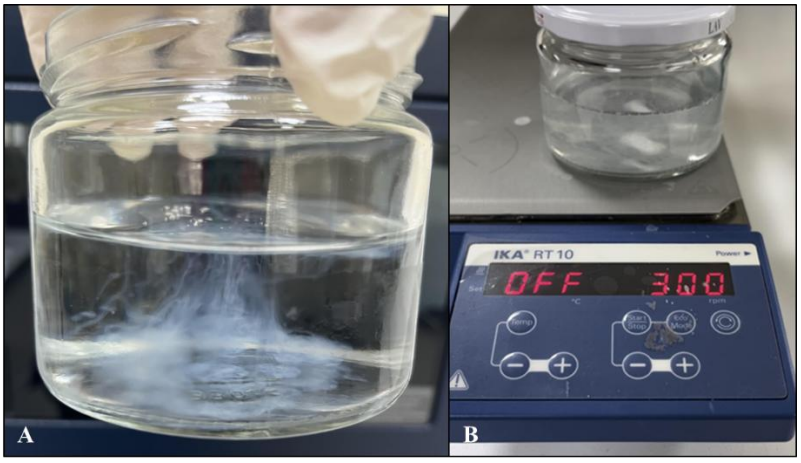
Resim 3.8: NaClO uygulaması (A), fosforik asit uygulaması (B), P11-4'ün hazırlanması (C), P11-4 uygulaması (D)

3.2.3.3. Saf karboksimetil kitosan ve yapay tükürük (3. grup): Deneyde, Biosynth markasının toz formunda saf CMC ürünü kullanılmıştır. 2,5 gr CMC, 40 mL Tip-1 su ile manyetik karıştırıcıda 1000 rpm döngüsel hızda çözünene kadar karıştırılmış ve CMC jeli elde edilmiştir. Demineralize mine yüzeyi fırça ile temizlendikten sonra CMC jel 5 dk boyunca fırça ile devamlı olarak uygulanmış, örnekler yapay tükürük solüsyonuna konulmuştur (Resim 3.9). Örnekler gün içinde 24 saatin 12 saati yapay tükürükte, kalan 12 saat boyunca da yüzeydeki CMC temizlendikten sonra yapay tükürükte bekletilmiştir (252). Bu işlem 28 gün boyunca tekrarlanmıştır. Yapay tükürük solüsyonu günde iki kez yenilenmiştir.



Resim 3.9: Saf CMC (A), 1000 rpm'de CMC çözeltisi hazırlanması (B), jel formunda CMC (C), CMC uygulaması (D)

3.2.3.4. Yapay tükürük+lizozim (4. grup-negatif kontrol 2): Bu gruptaki dişlere hiçbir materyal uygulanmamıştır. Yapay tükürüğe 0,11g/L olacak şekilde lizozim ilave edilmiş manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Resim 3.10). Dişler direkt lizozim içeren yapay tükürük solüsyonuna konulmuştur. Yapay tükürük-lizozim solüsyonunda dişler 28 gün boyunca bekletilmiş, diğer gruplarla karşılaştırması yapılmıştır. Solüsyon 28 gün boyunca günde iki kez yenilenmiştir.



Resim 3.10: Yapay tükürüğe lizozim eklenmesi (A), manyetik karıştırıcıda çözünürlüğünün sağlanması (B)

3.2.3.5. Saf P11-4 ve yapay tükürük+lizozim (5. grup): Diş demineralizasyonundan sonra, bukkal penceredeki mine yüzeyleri bir fırça ile temizlenmiş ardından 20 sn boyunca %2'lik NaClO uygulanmıştır. Örnekler 30 sn boyunca Tip-1 suyla durulanmıştır. 20 sn boyunca %37'lik fosforik asit uygulandıktan sonra örnekler Tip-1 su ile durulanıp, hava spreyi ile kurutulmuştur. Cam şişe içindeki toz formda P11-4'e 0,05 mL Tip-1 su enjekte edilerek çözdürülmüştür. Çözünmenin ardından hemen mine yüzeyine P11-4 uygulaması gerçekleştirilmiş, nüfuz etmesi için 5 dk boyunca beklenmiştir. Örnekler daha sonra yapay tükürük-lizozim solüsyonuna konulmuş, 28 gün boyunca bekletilmiştir. Yapay tükürük-lizozim solüsyonu günde iki kez yenilenmiştir. Tüm çalışmada dişlere P11-4 uygulaması bir kez gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.6. Saf karboksimetil kitosan ve yapay tükürük+lizozim (6. grup): 2,5 gr CMC, 40 mL Tip-1 su ile manyetik karıştırıcıda 1000 rpm döngüsel hızda çözünene kadar karıştırılmış ve CMC jeli elde edilmiştir. Demineralize mine yüzeyi fırça ile temizlendikten sonra CMC jel 5 dk boyunca fırça ile devamlı olarak uygulanmış, örnekler yapay tükürük-lizozim solüsyonuna konulmuştur. Örnekler gün içinde 24 saatin 12 saati yapay tükürükte, kalan 12 saat boyunca da yüzeydeki CMC temizlendikten sonra yapay tükürükte bekletilmiştir. Bu işlem 28 gün boyunca tekrarlanmıştır. Yapay tükürük-lizozim solüsyonu günde iki kez yenilenmiştir.

3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Mine Yüzey Karakterizasyonu Çalışmaları

Deneyde kullanılan diş örneklerinde demineralizsyon oluşturulmasını takiben, sınıflandırılan gruplara ait örnek yüzeylerine biyomimetik ajanların uygulanması sonrasında dişlerin bukkal yüzeylerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi ve gruplar arası karşılaştırılmasının yapılması için SEM cihazı ile analizler yapılmıştır (Resim 3.11).



Resim 3.11: Deneyde kullanılan SEM cihazı

Örneklerin görüntüleme öncesinde yüzey hazırlıkları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak örneklerin tamamen dehidrasyonunun sağlanması için örnekler etil alkole tabi tutulmuştur. Farklı etil alkol derişimleri elde etmek için etil alkol deiyonize su ile seyreltilmiştir. Etil alkol ile yıkama işleminde tüm diş örneklerine sırası ile 30 dk boyunca %25, %50, %75, %96 (iki tekrar), %100 (iki tekrar) etanol içeriği uygulanmıştır. Örnekler 37°C sıcaklıkta 24 saat kuruması için bekletilmiştir (Resim 3.12).



Resim 3.12: Örneklere etanol serisi uygulanması

Sonraki aşama olan yüzey kaplaması için örnekler metal plaka üzerine iki taraflı yapışkan bant ile yapıştırılarak sabitlenmiş, havasız bir ortamda 5 nm kalınlığında platin ile yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiştir. Kaplama işlemi tamamlanan örnekler, SEM cihazının içine yerleştirildikten sonra vakum altında örneklerin, 5.000x ve 10.000x büyütmede görüntüleri incelenmiştir.

3.2.5. Saf P11-4 ve Karboksimetil Kitosan ile Biyoetkileşim Çalışmaları

3.2.5.1. Ultraviyole-görünür bölge spektroskopi çalışmaları: P11-4, CMC, lizozim ve bunların etkileşim komplekslerinin absorbsiyon spektrumları, UV-görünür gölge spektrofotometresi kullanılarak üç tekrarlı çalışmalar ile gerçekleştirilmiştir (Resim 3.13.a). 360 ppm lizozim P11-4'ün varlığında ve yokluğunda, 280 ppm lizozim ise CMC'nin varlığında ve yokluğunda 1X PBS tamponunda (pH 7,4) inkübe edilmiştir. 1200 ppm P11-4 ve 80 ppm CMC'nin absorbsiyon spektrumu UV-görünür bölge spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Cihaz ile elde edilen spektrumlar, 240-400 nm aralığında, 10,00 mm optik yol uzunluğuna sahip 0,8 mL iç hacimli kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.13.b-c).

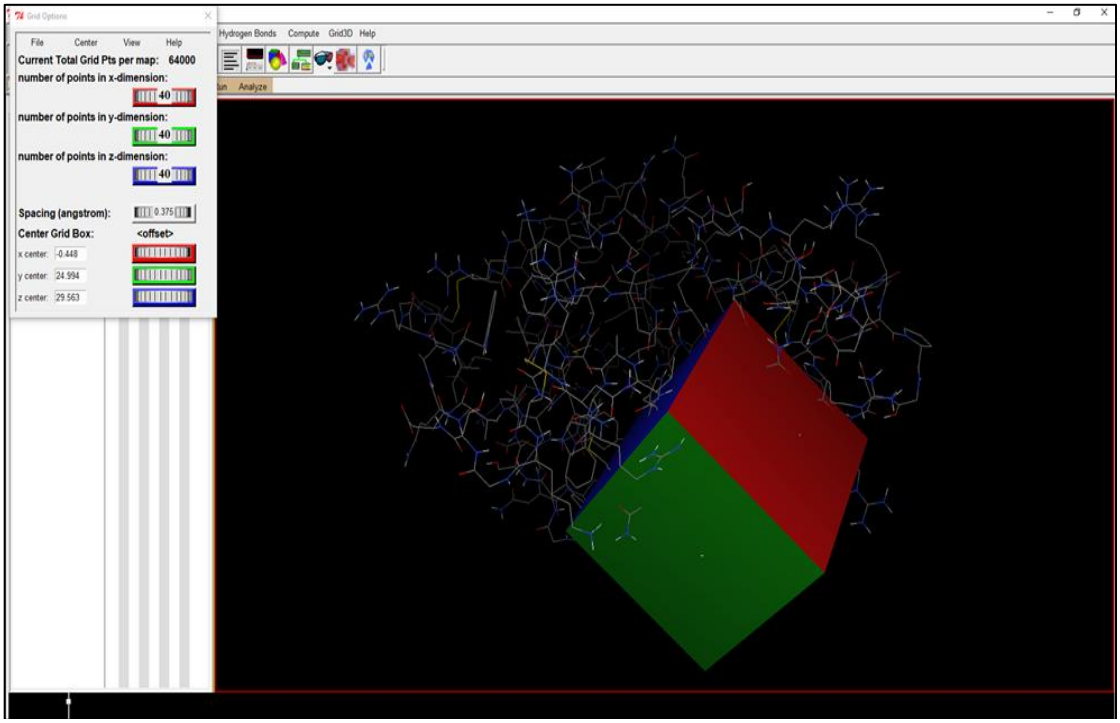


Resim 3.13: UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı (A), kuvarz küvetler (B), deney düzeneği (C)

3.2.5.2. Moleküler kenetlenme yöntemi ile etkileşimlerin incelenmesi: Moleküler kenetlenme işlemi, Türkoğlu ve ark. (253)'in çalışmasında izlenen yöntem temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Model lizozim proteini olarak "tavuk yumurtası akı lizozimi" kullanılmıştır. Lizozim proteini "1HEW" (254) kodu ile "Protein Veri Bankası (PDB)" (255), P11-4 (CID 16159333) ve CMC (CID 118797615) molekülleri ise "PubChem" (256) veri bankalarından alınmıştır.

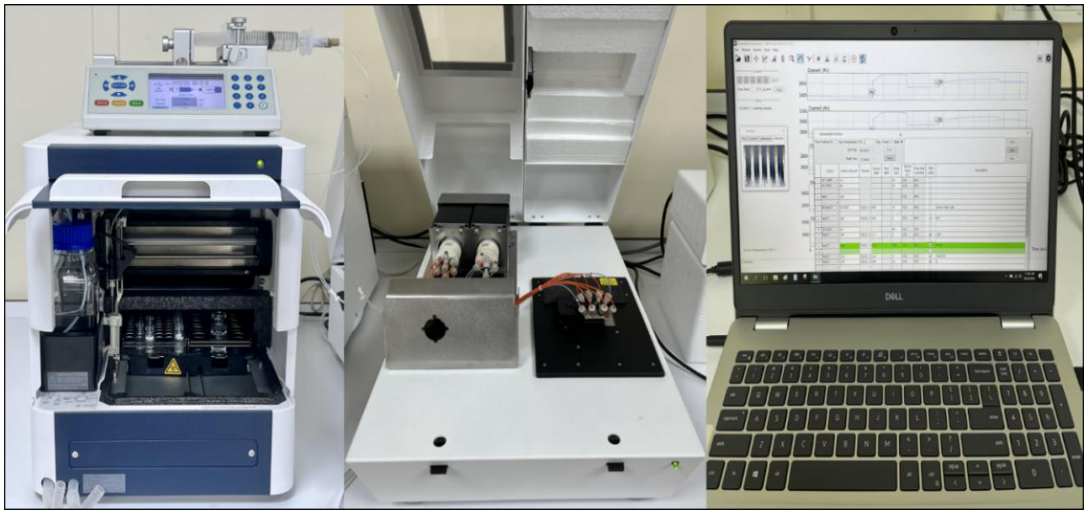
Moleküler kenetlenme işleminden önce moleküller şu adımlar izlenerek hazırlanmıştır: (i) PDB'den alınan 1HEW protein yapısından bütün hidrojen molekülleri silinmiştir, (ii) yapının polar atomlarına hidrojen atomları entegre edilmiştir, (iii) yapıdaki bütün atomlara Kollman yükleri eklenmiştir, (iv) P11-4 ve CMC molekülleri 3 boyutlu yapıya çevrildikten sonra Gasteiger yükleri eklenmiştir, (v) iki yapının da enerji minimizasyonu "Universal Force Field (UFF)" kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Protein ve ligand yapılarının hazırlanması sırasında PyMol ve AutoDockTools4 yazılım programları kullanılmıştır (257,258). Ligandların protein üzerinde moleküler kenetlenmesinin gerçekleşeceği aktif bağlanma bölgesi için "moleküler doku kutusu" Türkoğlu ve ark. (253)'in çalışmasındaki parametreler kullanılarak Autodock-Tools 1.5.7 programı ile 25x25x25 Å boyutlarında yeniden belirlenmiş (257) ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Moleküler kenetlenme işlemleri AutoDock Vina programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve her iki ligand için protein üzerinde 5 ayrı moleküler kenetlenme simülasyonu sürdürülmüştür (259).



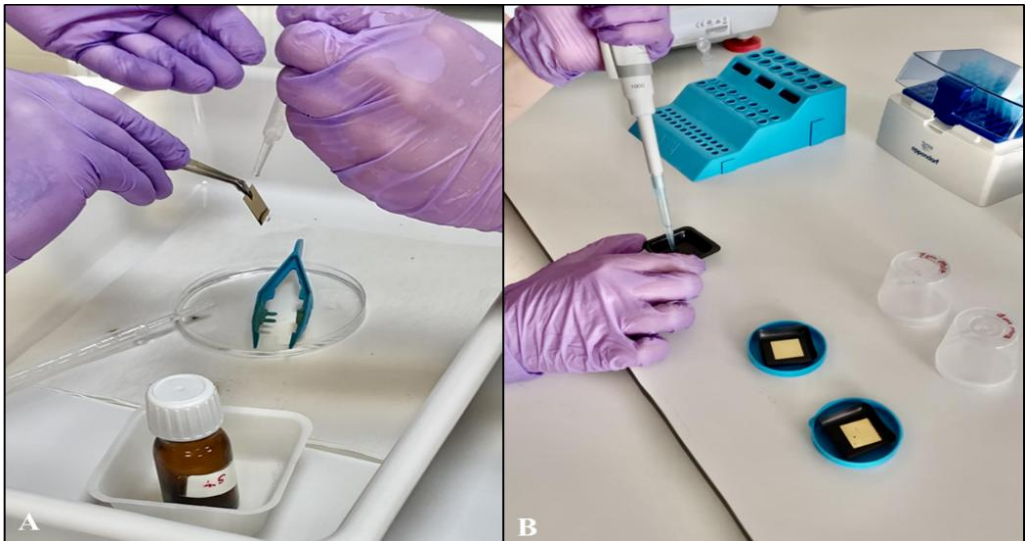
Şekil 3.2: Moleküler kenetlenme işleminin gerçekleştirilmesi için hazırlanan moleküler doku kutusu

3.2.5.3. Yüzey plazmon rezonans ile kinetik çalışmalar: SPR sistemi P11-4-lizozim ve CMC-lizozim etkileşimlerinin etiketsiz ve anlık incelenmesinde kullanılmıştır (Resim 3.14).



Resim 3.14: SPR sistem düzeneği

Yüzey plazmonları oluşturmak için altın kaplı SPR çipler kullanılmıştır. İlk olarak altın çiplerde hidrofobik yüzey katmanının giderim sürecinde asidik pirana karışımı (H_2SO_4/H_2O_2; h/h (7:1)) kullanılmıştır. Hidrofobik katmanın giderilmesini takiben çip yüzeylerine optimum lizozim immobilizasyonu sağlamak için 1 mM MUA uygulaması yapılmış ve çipler 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Resim 3.15) (260).



Resim 3.15: Altın çipe pirana uygulaması (A), MUA uygulaması (B)

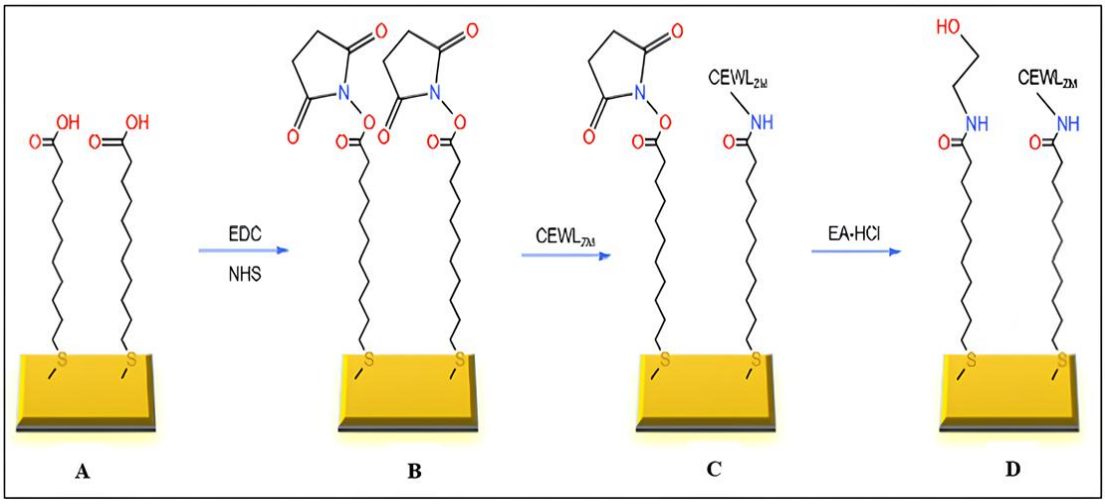
Deney düzeneğinin hazırlanmasının ardından kuruyan altın çip yüzeylerinde kalan artık MUA'ların temizliği ise 50 mM NaOH ve etanol yıkaması gerçekleştirilerek çipler deneye hazır hale getirilmiş ve analiz öncesi gerekli çözeltiler hazırlanmıştır (Resim 3.16).



Resim 3.16: SPR analizi öncesinde hazırlık aşaması

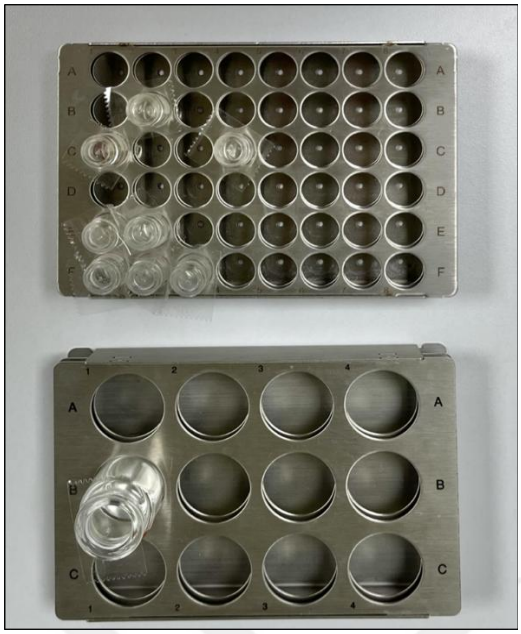
Altın çip üzerindeki MUA'ları aktifleştirmek ve fonksiyonel yüzey oluşturmak için aktivasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivasyon çözeltisi 0,05 M NHS ve 0,2 M EDC çözeltileri karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır. Lizozimin SPR sisteminde optimum immobilizasyonunu sağlamak için birleşme çözeltisi, hareketli faz, pH, akış hızı ve lizozim konsantrasyonları belirlenmiştir (261). Altın çiplerde meydana gelecek olan etkileşim için hem eşleşme sıvısı hem de hareketli faz pH 7,4 olan 1X PBS çözeltisi olarak belirlenmiştir. Tüm tampon çözeltileri, kullanımdan önce 0,22 µm gözenek çaplı hidrofilik Polieter Sülfon (PES) membran filtreden (Isolab, Türkiye) süzülmüştür. Tüm deneyler 25°C'lik sensör yüzey sıcaklığında 3'er kez gerçekleştirilmiştir. Bağlanma yüzeylerinin aktifleştirilmesi için MUA kaplı altın yüzeye NHS-EDC aktivasyon çözeltisi 450 sn boyunca 40 µL/dk akış hızı ile enjekte edilmiştir. MUA aktivasyonundan sonra, aktive edilmiş yüzeye immobilizasyon

sağlamak için 790 sn boyunca 30 µL/dk akış hızında 2,5 mg/mL lizozim enjekte edilmiştir. Geri kalan aktifleştirilmiş gruplar, spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için 300 sn boyunca 30 µL/dk akış hızında 1,0 M EA-HCl ile bloke edilmiştir (Şekil 3.3). Kinetik analizden önce, bağlanma analizi için bir kanal lizozim ile tasarlanmış ve spesifik olmayan sinyalleri, toplu kırılma indisi kaymalarını ve sıcaklık kaymalarını telafi etmek için lizozimsiz başka bir kanal referans kanalı olarak ayarlanmıştır (253).



Şekil 3.3: Altın çip yüzeyinde MUA tasarımı (A), NHS-EDC solüsyonuyla aktivasyon (B), lizozim immobilizasyonu (C), kalan aktive edici grupların bloke edilmesi (D) (253)

Bu süreçte P11-4-lizozim ve CMC-lizozim etkileşimlerinin gerçekleşmesi için farklı derişimlerde P11-4 ve CMC çözeltileri hazırlanmıştır (Resim 3.17). P11-4, 1X PBS (pH 7.4) içinde düşük derişimlerde (30-300 ppm) ve yüksek derişimlerde (5.000-12.000 ppm) aralığında artan derişimlerde hazırlanmıştır. CMC ise 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 ppm derişimlerinde hazırlanmıştır. SPR kinetik parametrelerinin belirlenmesi için hazırlanan derişimlerdeki maddeler kanallara 480 sn boyunca 30 µL/dk akış hızında altın çip üzerindeki immobilize lizozim yüzeyine enjekte edilmişlerdir.



Resim 3.17: Farklı derişimlerin ilgili SPR örnek tepsilerine yerleştirilmesi

Her farklı derişimin uygulanması sonrasında altın yüzeyde immobilize lizozim yüzeylerinin tekrar eski haline gelmesi için rejenerasyon sıvısı olarak 30 µL/dk akış hızında 240 sn boyunca 50 mM NaOH uygulanmıştır. Farklı derişime sahip analitlerin immobilize lizozim ile etkileşimi sensorgramlardan izlenmiştir.

Konsantrasyonların her bir sensorgramı için veri bölgeleri seçilmiştir. Seçilen veri bölgelerinin özdeş başlangıç ve bitiş zamanları ayarlanmış ve kinetik analiz için çalışma dosyasında örtüşen veriler oluşturulmuştur.

3.2.6. Saf P11-4 ve Karboksimetil Kitosan ile Biyoaktivite Çalışmaları

Lizozim biyoaktivite tayini için çift ışın yollu UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. İlk olarak oda sıcaklığında 250 mL, 66 mM, pH'sı 6,24 olan fosfat tamponu (reaksiyon tamponu), 740,5 mg K_2HPO_4 ve 1,667 g KH_2PO_4 kullanılarak oluşturulmuştur. Biyoaktivite çalışmalarında susbstrat olarak kullanılan *M. lysodeikticus* pH 6,24 değerine sahip 66 mM fosfat tamponu içine eklenilerek bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Sıvı ortama eklenilecek hücre miktarı, tampona karşı UV-görünür bölge spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyundaki absorbansı 0,6-0,7 değerlerinde olacak şekilde ayarlanmasıyla elde edilmiştir. Lizozim çözeltisi hazırlamak için 1 mg/mL lizozim çözeltisi soğuk reaksiyon tamponunda stok olarak hazırlanmıştır. Seri seyreltmeler ile lizozim biyoaktivite deneyi

için önerilen 200-400 U/mL'lik lizozim çözeltisi elde edilmiştir (248). Lizozim aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi için artan derişimlerde P11-4 (160-10,240 ppm) ve CMC (75-200 ppm) reaksiyon tamponu içinde hazırlanmıştır (Resim 3.18). Deneyde kullanılacak UV-görünür bölge spektrofotometre cihazında beş dakika içinde reaksiyon absorbansındaki azalma 25°C ortam şartları ve 450 nm dalga boyunda izlenmiştir. İlk olarak, tampona (blank) karşı kontrol olarak bakteri süspansiyonu ve enzim reaksiyonunun absorbansındaki azalma kaydedilmiş, akabinde farklı derişimlerde hazırlanmış test örneklerin lizozim enzimine olan etkileri zamana karşı izlenmiştir. En son olarak elde edilen verilerden maddelerin Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri elde edilmiştir.



Resim 3.18: Liyofilize *M. lysodeikticus* bakterileri (A) ve deney düzeneği (B)

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Yüzey plazmon rezonans ile P11-4-lizozim ve CMC-lizozim'in kinetik analiz deneylerinde etkileşim modeline dayalı sonuçlar Biosensing Instrument'ın (sürüm 2.0.0.3) Kinetik Analiz Yazılımı ile üç tekrarlı deneyler sonucunda elde edilmiştir. UV-görünür bölge spektrofotometre ile absorbans ve biyoetkileşim sonuçları üç tekrarlı deneyler sonucunda elde edilmiştir. Moleküler kenetlenme işlemleri AutoDock Vina programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve her iki ligand için protein üzerinde 5 ayrı

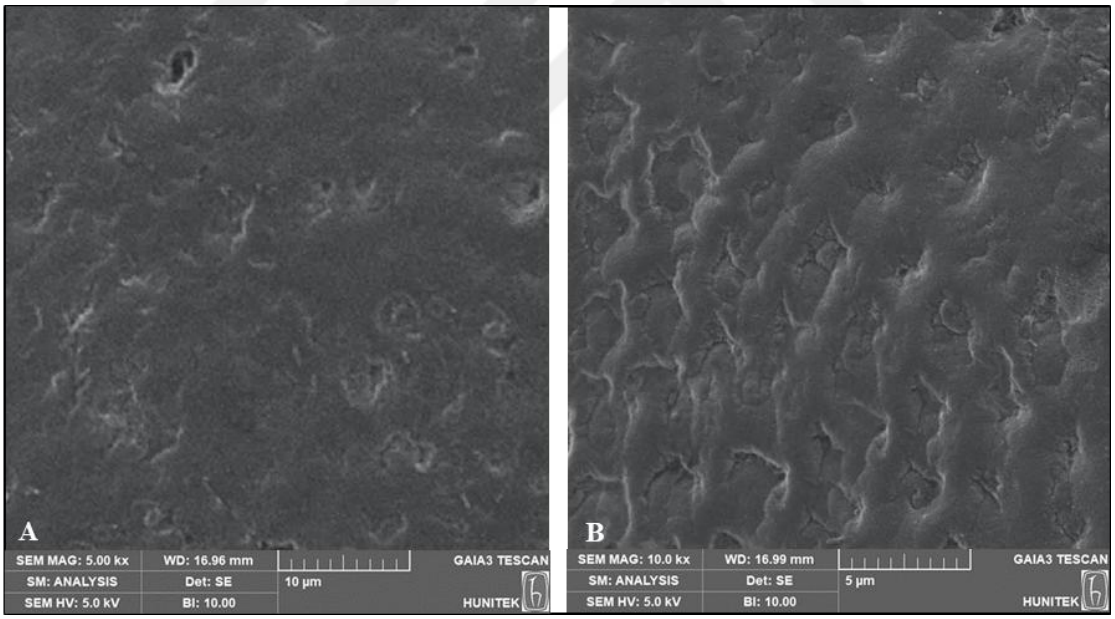
moleküler kenetlenme simülasyonu sürdürüldükten sonra her tekrar için 5 ayrı moleküler kenetlenme skoru hesaplanmıştır. Sunulan tüm veriler tekrarlı çalışmaların ortalamaları ve bunların standart sapması alınarak tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU GÖRÜNTÜLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Mine yüzeyinde demineralizasyon oluşturulmasını takiben, P11-4 ve CMC uygulanan örneklerin 28 gün sonunda yüzey topografisi ve morfolojisi incelenmiştir. Görüntüler 5.000x ve 10.000x büyütmede elde edilmiştir.

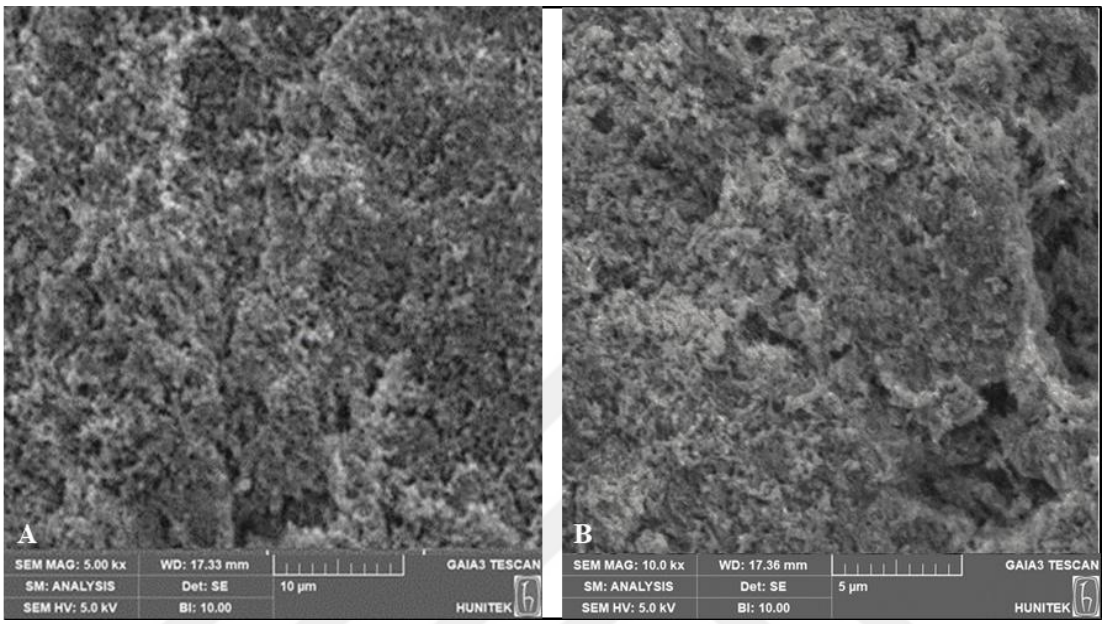
Resim 4.1 demineralize veya remineralize edilmemiş yüzeyine hiçbir işlem veya materyal uygulanmayan sağlam mine yüzeyini göstermektedir. Sağlam mine yüzeyinin bazı pitler, çizikler, mikroçatlaklar içeren fakat pürüzsüz, düz bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir.



Resim 4.1: Sağlam mine yüzeyinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri

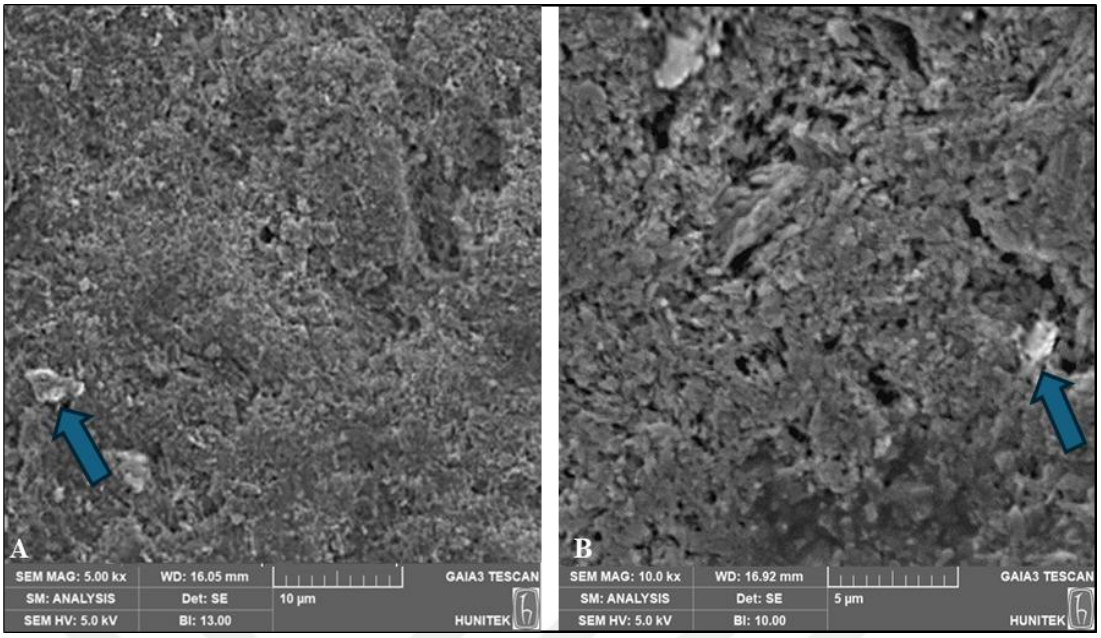
Demineralize mine yüzeyinde gözenekliliğin arttığı, yüzey yapısının bozulduğu ve porların açıldığı gözlemlenmiştir. Mine rodlarının yıkımına ve kristallerin çözünmesine bağlı yüzey homojenliği bozulmuştur. Aprizmatik mine kaybı belirgin

hale gelirken, genişlemiş interrod boşluklar ve hasar görmüş mine dokusu sonucunda bal peteği benzeri bir yapı ile karakterize mikro boşluklar ve fokal delikler tespit edilmiştir (Resim 4.2).



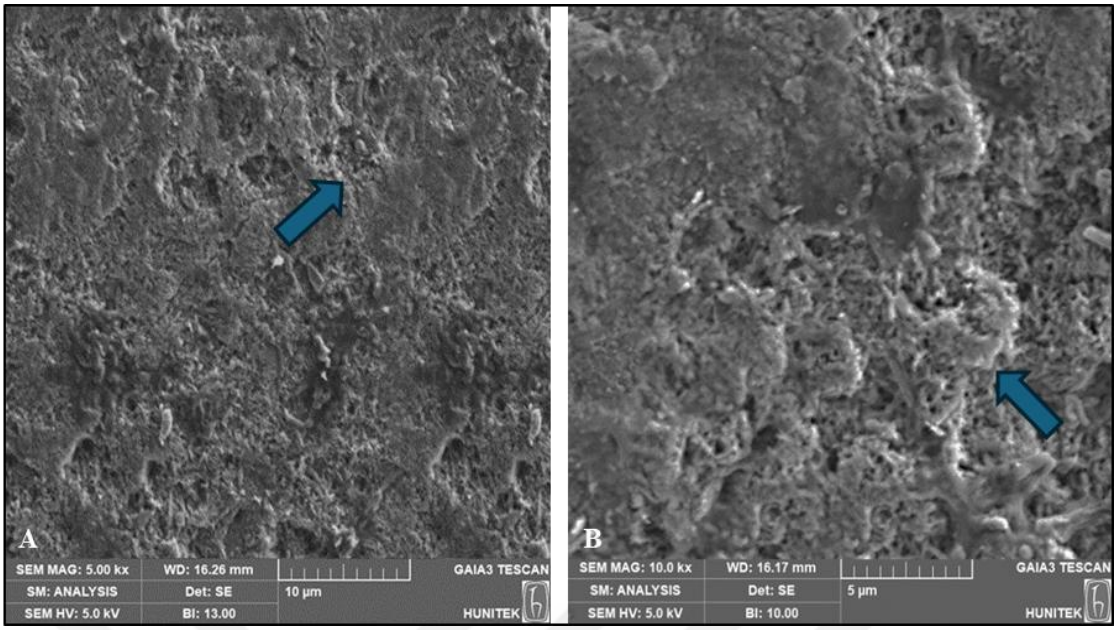
Resim 4.2: Demineralize mine yüzeyinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri

Yüzeyine herhangi bir işlem uygulanmayan demineralize diş örneklerinin (Grup 1) yapay tükürükte 28 gün bekletilmesi sonucunda küçük Ca^{2+} ve PO_4^{3-} birikimlerinin olduğu remineralizasyon alanları görülmektedir. Remineralize oluşumların sebebi yapay tükürük içerisindeki Ca^{2+} ve PO_4^{3-}'ün yüzeye çökelmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca yüzeyde küçülmeye başlayan porlar mevcutken, minenin bazı bölgelerinde ise hala demineralize alanlar mevcut olup, mine kristallerinin düzensiz ve iyi tanımlanamayan sınırları görülmektedir (Resim 4.3).



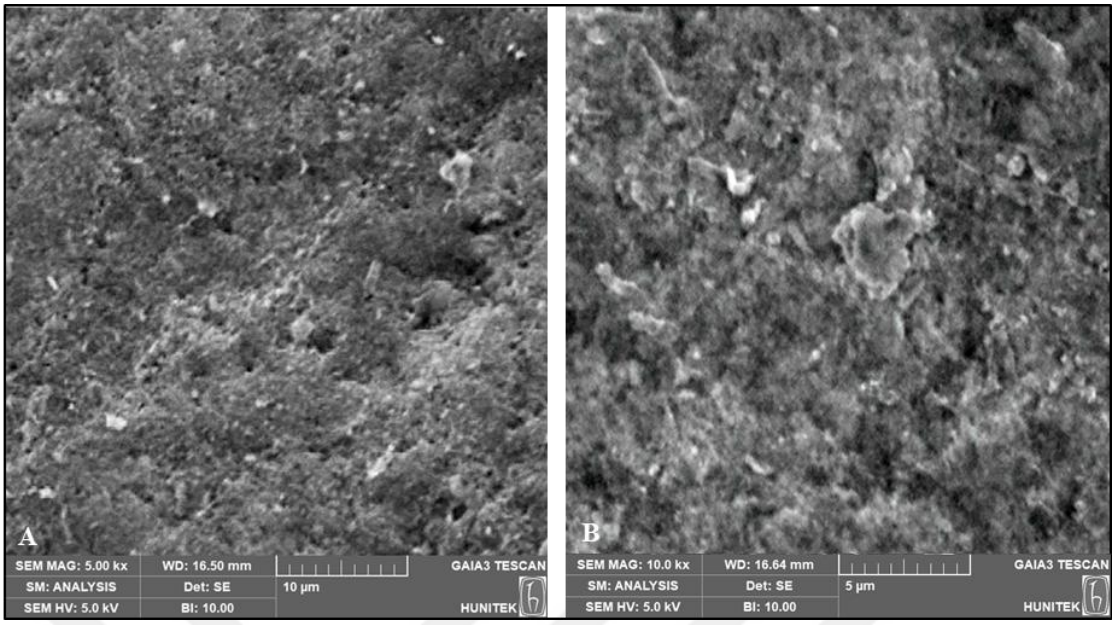
Resim 4.3: Yapay tükürükte bekletilen mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

P11-4 materyalinin mine yüzeyine uygulandığı grupta (Grup 2), demineralizasyon sonucu oluşan geniş porların küçüldüğü, porların dolmaya başladığı gözlemlenmiştir. Yüzeyde sağlam mine yüzeyine benzer şekilde mine prizmalarının dizilimine benzer dağılım görülmüştür. Demineralize alanların düzensiz homojen olmayan dağılımı kaybolmuş, yüzey bütünlüğü sağlanarak homojen, minimal gözenekli, daha düz, mineralize bir mine yüzeyi meydana gelmiştir (Resim 4.4.a). İskelet yapının oluşması ile fibriler ve lifsel şekilde materyal bir araya gelerek mineye benzer bir doku oluşturmuş ve porları belirgin şekilde küçültmüştür (Resim 4.4.b).



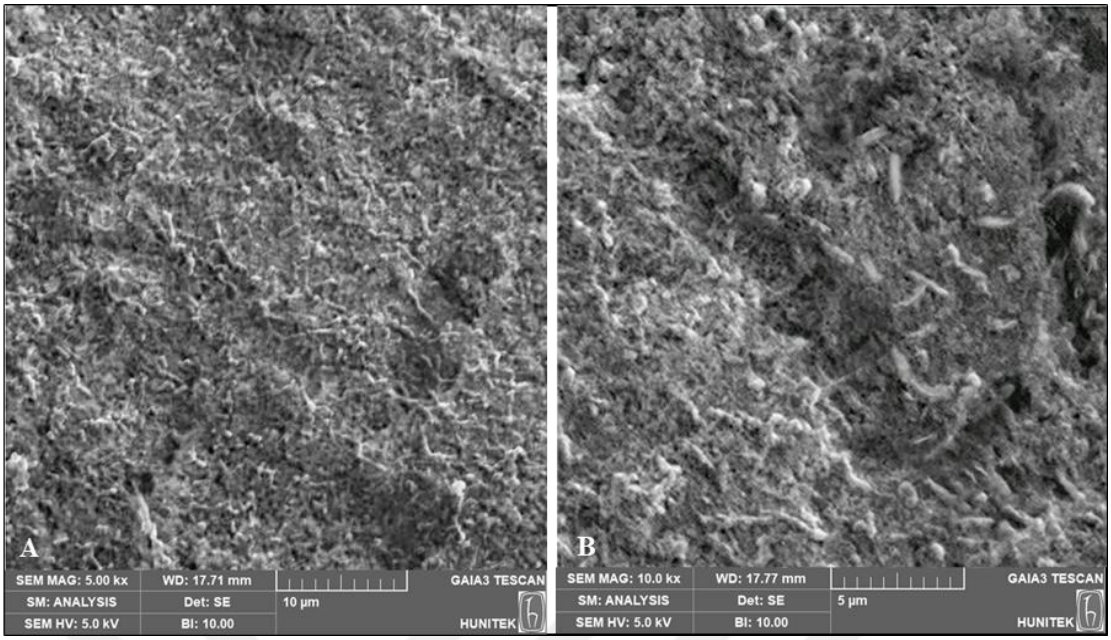
Resim 4.4: P11-4 uygulanan mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri

Karboksimetil kitosan materyalinin mine yüzeyine uygulandığı grupta (Grup 3), yüzeyde birbiri üzerine yığılmış remineralize bir yapı görülmektedir. Demineralize edilmiş mine yüzeyinin üzerine biriken ince taneli remineralize tabaka nedeniyle interprizmatik alanların tıkandığı görülebilmektedir. Yüzey düzensizliklerinde azalma ve porların boyutlarında kısmen küçülme mevcuttur. Fakat bu remineralize yapı devamlı homojenize bir süreklilik göstermemekte, yüzey kristallerle kaplanmış olmasına rağmen demineralize diş minesinin profili hala belirgindir (Resim 4.5).



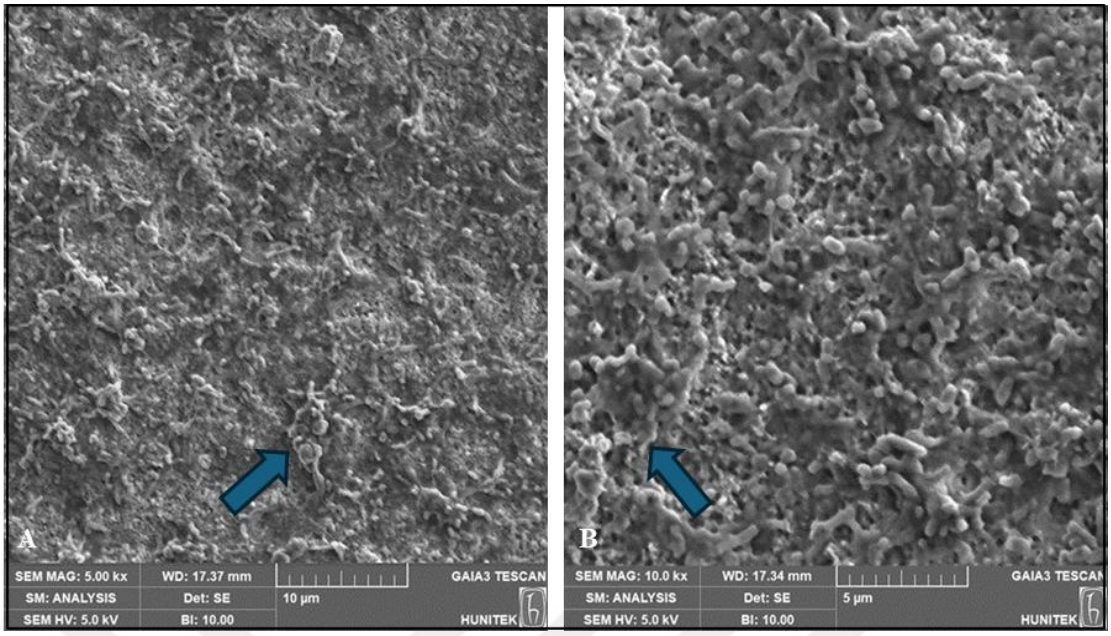
Resim 4.5: CMC uygulanan mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

Yüzeyine herhangi bir işlem uygulanmayan demineralize diş örneklerinin (Grup 4) lizozim içeren yapay tükürükte 28 gün bekletilmesi sonucunda lizozimlerin mine prizmalarının üzerini ve etrafını katman şeklinde kapladığı görülmektedir. Demineralize alanlar mevcuttur ve bu bölgeler de lizozim ile kaplanmıştır. Yer yer remineralize alanlar görülmekte, mine yüzeyinde homojen olmayan bir görünüm mevcuttur (Resim 4.6).



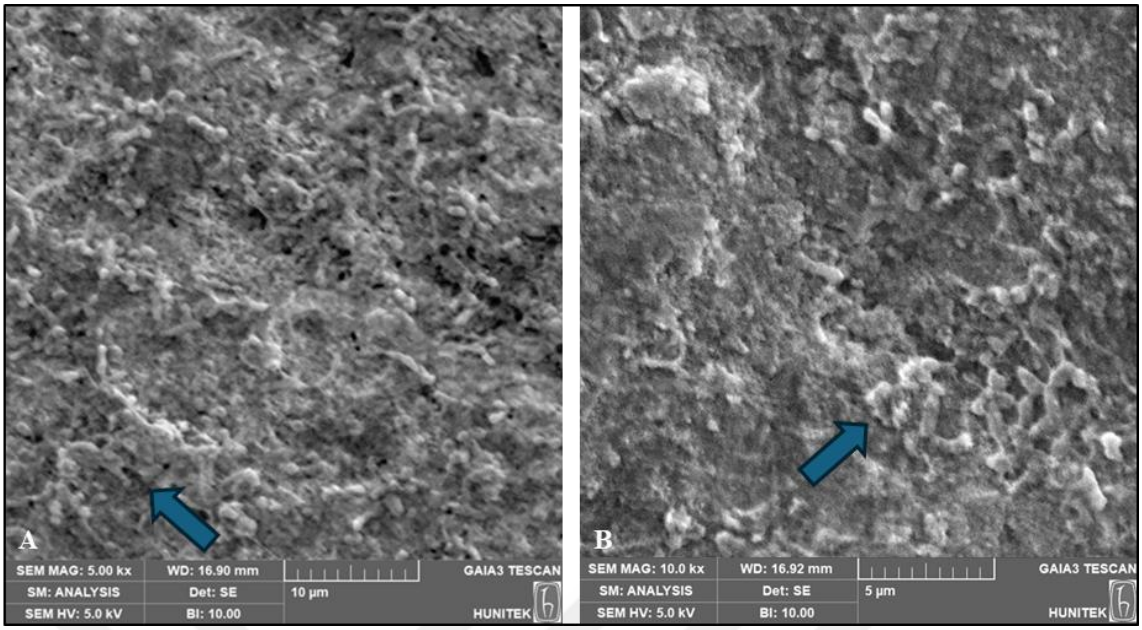
Resim 4.6: Yapay tükürükte bekletilen mine yüzeylerinin 5.000x (A) ve 10.000x büyütmedeki SEM görüntüleri

P11-4 materyalinin mine yüzeyine uygulanıp lizozim içeren yapay tükürükte 28 gün bekletildiği grupta (Grup 5), mine yüzeyinin homojen bir yüzey haline geldiği, porların küçülerek demineralize alanların neredeyse tamamının kaybolduğu, oluşan bu düzgün mine yüzeyinde lizozimlerin kendi arasında kümeleşerek mine yüzeyini kapladığı görülmektedir (Resim 4.7).



Resim 4.7: Yapay tükürük+lizozim solüsyonunda bekletilen P11-4 uygulanmış dişlerin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

Karboksimetil kitosan materyalinin mine yüzeyine uygulanıp lizozim içeren yapay tükürükte 28 gün bekletildiği grupta (Grup 6), mine yüzeyinde birbiri üzerine yığılmış remineralize yapı ve lizozimlerin birlikte katman oluşturduğu görülmektedir. Yüzey düzensizliklerinde azalma ve porların boyutlarında kısmen küçülme mevcuttur. Hem demineralize hem de remineralize olmuş bölgeleri CMC ile lizozimin kapladığı, remineralize bölgelerde lizozimin kümeleştiği gözlemlenmiştir. Genel olarak yüzeyi kaplayan remineralize yapı ve lizozim katmanı devamlı homojenize bir süreklilik göstermemektedir. Fakat demineralize diş minesinin profili hala belirgindir (Resim 4.8).



Resim 4.8: Yapay tükürük+lizozim solüsyonunda bekletilen CMC uygulanmış dişlerin 5.000x (A) ve 10.000x (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

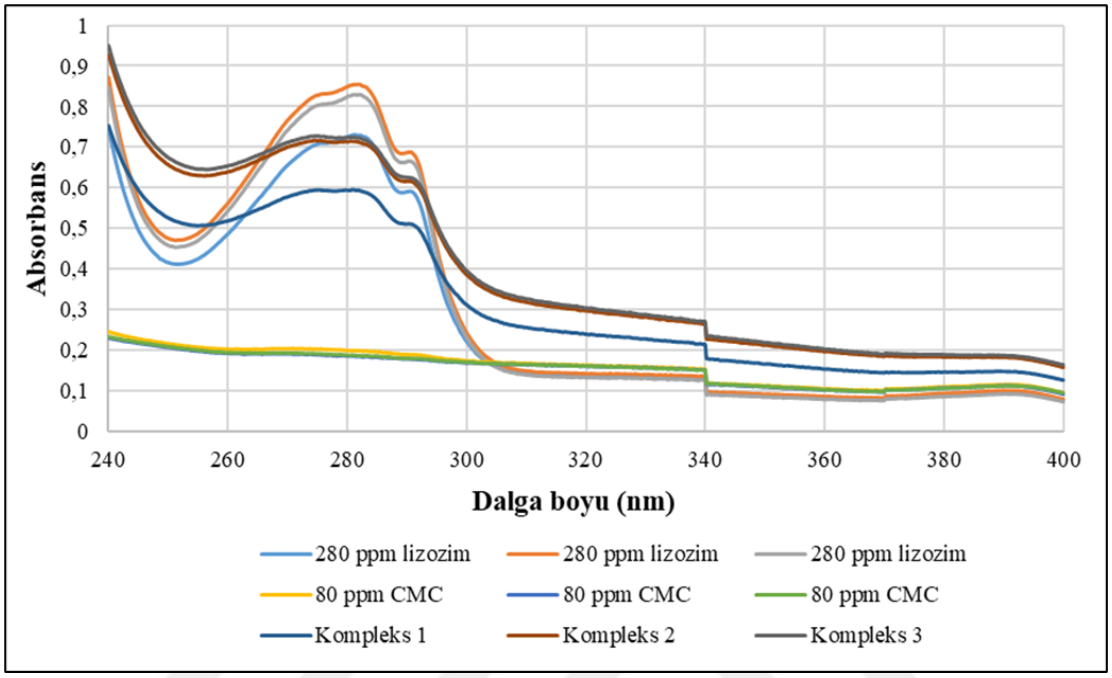
Taramalı elektron mikroskobu bulguları genel olarak değerlendirildiğinde en iyi biyomimetik etkiyi P11-4 göstermiştir. Yapay tükürük ve lizozim içeren yapay tükürük grupları arasında yani Grup 1 ve 4, Grup 2 ve 5, Grup 3 ve 6 arasında mine onarımı açısından bir fark görülmemiştir. Grup 5'de lizozimler mine yüzeyinde kendi aralarında kümeleşmeler gösterirken, Grup 6'da CMC-lizozim ile birleşerek mine üzerine yayılmıştır. Bu da CMC'nin lizozime bağlandığını göstermektedir.

4.2. BİYOETKİLEŞİM ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI

4.2.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi Çalışmalarının Sonuçları

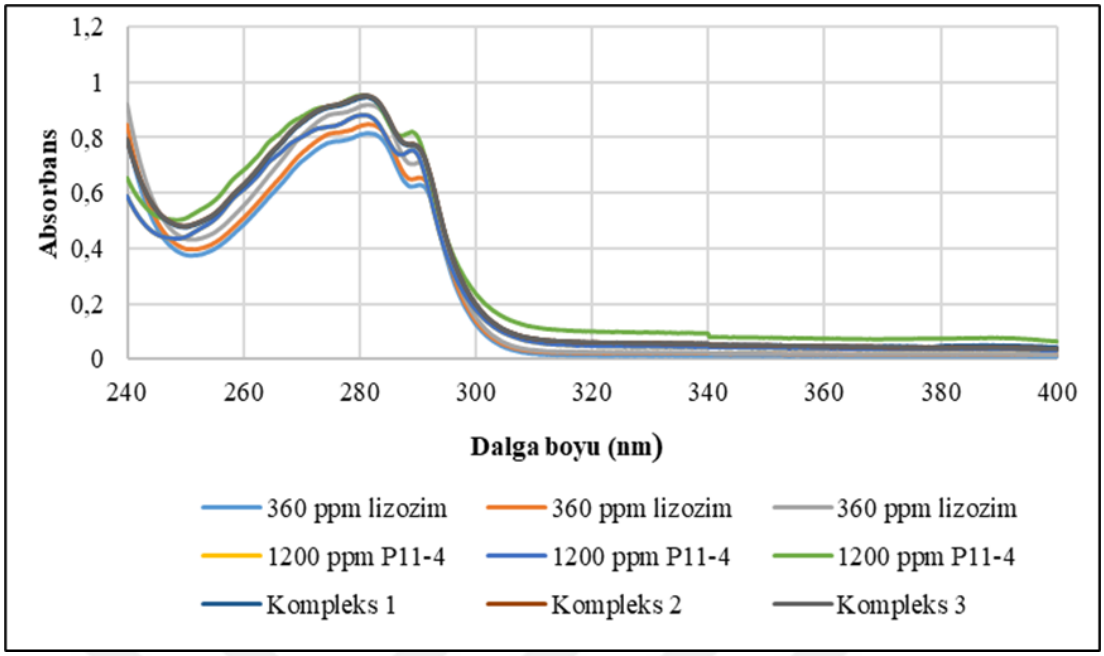
Karboksimetil kitosan, P11-4 ve lizozimin hem tek başlarına hem de CMC-lizozim ve P11-4- lizozim olmak üzere etkileşim komplekslerinin absorbsiyon spektrumları UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Şekil 4.1'den görüldüğü üzere 280 ppm lizozim, maksimum absorpsiyon bandını 281,8±0,28 nm'de olmak üzere, 290,4±0,18 ve 276,13±0,09 nm dalga boylarında karakteristik absorpsiyon bantları vermiştir. 80 ppm CMC ise 240-400 nm dalga boyu aralığındaki UV spektrumunda herhangi bir absorpsiyon bandı vermemiştir. UV absorbe edici karakteri ile lizozimin CMC ile inkübasyonu sonucu oluşturduğu kompleksin, UV görünür

bölgedeki absorpsiyon pikleri 290,2±0,16 ve 280,8±0,18 nm'ye kaymış diğer absorpsiyon piki ise 276,2±0,24 nm'de görülmüştür.



Şekil 4.1: Lizozim, CMC ve oluşturdukları kompleksin UV absorbsiyon spektrumu

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 1200 ppm P11-4, 240-400 nm dalga boyu aralığındaki UV spektrumunda maksimum absorpsonunu 280.4±0.00 nm'de, bir diğer karakteristik bandını ise 289,06±0,11 nm'de vermiştir. 360 ppm lizozim, maksimum absorpsiyon bandını 281,46±0,11 nm'de olmak üzere, bir diğer karakteristik absorpsiyon bandını 290,4±0,00 nm'de vermiştir. P11-4 ile lizozimin inkübasyonu sonucu oluşan kompleks, maksimum absorpsiyon bandını 281,13±0,30 nm'de ve diğer karakteristik bandını 289,0±0,00 nm'de vermiştir.

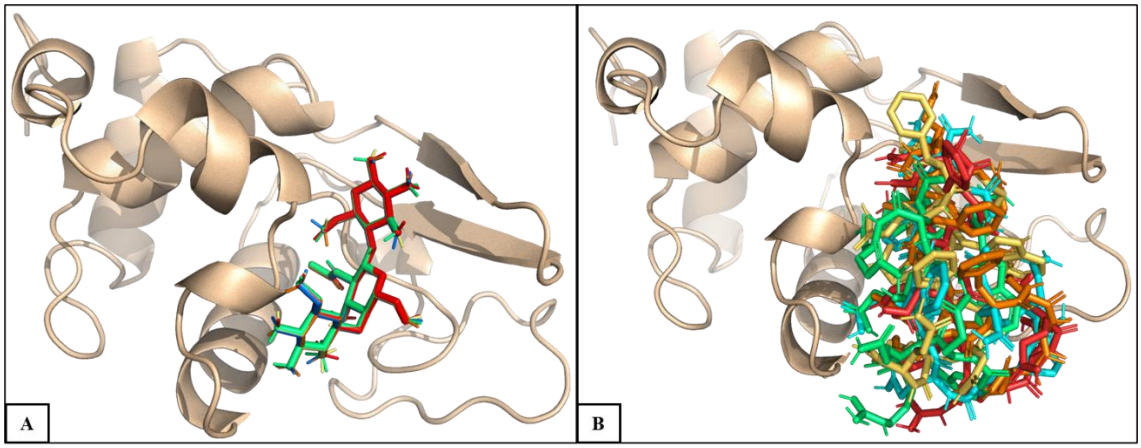


Şekil 4.2: Lizozim, P11-4 ve oluşturdukları kompleksin UV absorbsiyon spektrumu

UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı ile yapılan analiz sonuçlarına göre CMC ve P-11'ün lizozim ile bir etkileşim kompleksi oluşturduğu açıktır. Ancak bu etkileşimin doğası moleküler kenetlenme ve SPR ile yapılan etkileşim çalışmaları ile aydınlatılmıştır.

4.2.2. Moleküler Kenetlenme Yöntemi ile Etkileşim Sonuçları

Karboksimetil kitosan ve P11-4 ligandlarının lizozim proteini ile gerçekleştirdiği biyoetkileşimin moleküler kenetlenme yöntemi ile elde elde edilen konformasyonları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. CMC için 5 adet moleküler kenetlenme simülasyonunda neredeyse birebir aynı pozisyonlar elde edilirken bu durum P11-4'ün çok büyük olması ve CMC'ye göre esnek yapısından dolayı geçerli olmamıştır.



Şekil 4.3: CMC ve P11-4 için lizozim ile moleküler kenetlenme sonuçları: CMC-lizozim için elde edilen moleküler kenetlenme pozisyonu (A), P11-4-lizozim için elde edilen moleküler kenetlenme pozisyonu (B)

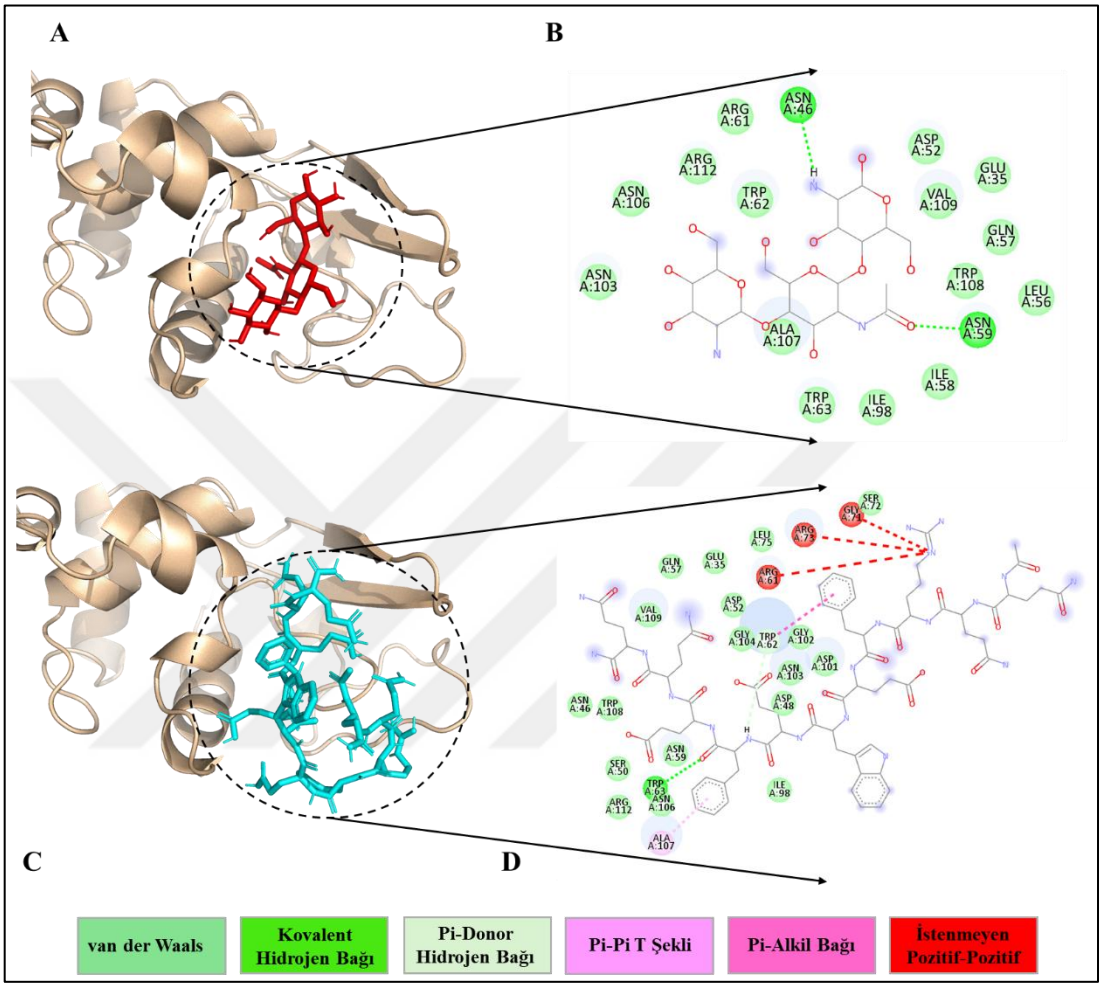
Beş tekrarlı moleküler kenetlenme skorlarının ortalaması CMC-lizozim için -7,3±0,00 kcal/mol; P11-4-lizozim için ise -5,46±0,38 kcal/mol olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Her iki molekül için de moleküler kenetlenme analizi ile ortalama skorlarına bakıldığında CMC'nin lizozime, P11-4'ten daha iyi bir bağlanma eğilimi gösterdiği görülmüştür.

Tablo 4.1: P11-4 ve karboksimetil kitosanın lizozim ile etkileşiminin moleküler kenetlenme skorları

Moleküler kenetlenme simülasyonları (kcal/mol)						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**Ortalama**
P11-4	-5,0	-5,8	-5,9	-5,4	-5,2	**-5,46±0,38**
CMC	-7,3	-7,3	-7,3	-7,3	-7,3	**-7,3±0,00**

Komplekslerdeki ilişkileri etkileşim bağları bağlamında incelemek için her bir kompleks için en düşük enerjiye sahip olan yapı seçilmiş ve iki boyutlu etkileşim

haritaları incelenmiştir (Şekil 4.4). Tüm moleküler kenetlenme işlemlerine ait iki boyutlu etkileşim haritaları EK 3'te bulunmaktadır.



Şekil 4.4: En düşük enerjili moleküler kenetlenme sonuçlarını veren kompleks yapıların iki boyutlu etkileşim haritaları: CMC ve lizozimin moleküler kenetlenme işlemi sonucunda elde edilen bir kompleksi (A), CMC-lizozim iki boyutlu etkileşim haritası (B), P11-4 ve lizozimin moleküler kenetlenme işlemi sonucunda elde edilen bir kompleksi (C), P11-4-lizozim iki boyutlu etkileşim haritası (D)

Her iki molekül için de iki boyutlu etkileşim haritaları incelendiğinde lizozimin aktif bağlanma amino asitleri olan Asn46 ve Asn59'un, CMC ile kovalent hidrojen bağı oluşturduğu görülmüştür. Bunun yanında CMC, aktif bağlanma bölgesine tamamen girebilmiş ve yine aktif bağlanma amino asitleri olan Leu56-Ile58, Arg61-Trp63, Ile98,

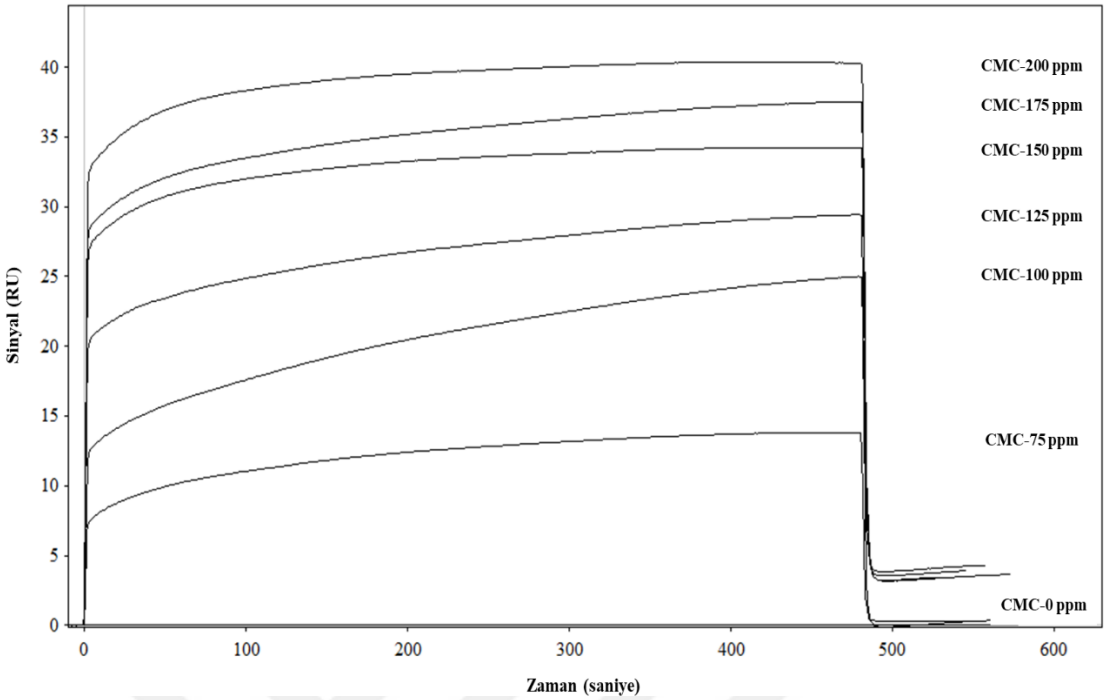
Asn103, Asn106-Val109 tarafından yoğun bir van der Waals bağı ile tamamen çevrelenmiştir (Şekil 4.4.a-b).

İkinci etkileşim kompleksinde, bazı aktif amino asitlerin P11-4'ün bir kısmını çevrelediği görülse de P11-4 aktif bölgeye CMC kadar etkili bir şekilde giriş yapamamıştır (Şekil 4.4.c-d). Buna ek olarak, aktif bağlanma amino asitleri olan Arg61, Gly71 ve Arg73 ile istenmeyen pozitif yük-pozitif yük etkileşime girmiştir. Oluşan pi bağları ise P11-4'ün genel olarak aromatik gruplar içermesinden kaynaklanmıştır.

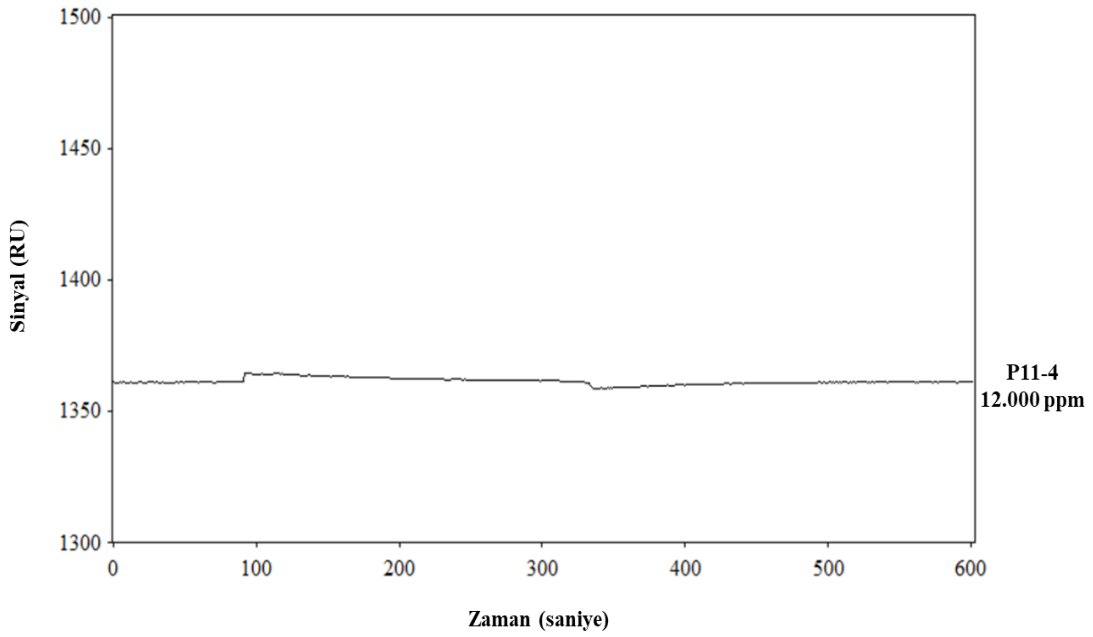
4.2.3. Yüzey Plazmon Rezonans ile Kinetik Çalışmaların Sonuçları

Karboksimetil kitosan ve P11-4'ün lizozime olan ilgisi ve kinetik sabitlerinin belirlenmesi SPR tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmobilize lizozim ile artan derişimlerde (75-200 ppm) CMC'nin referans alınmış deneysel SPR sensorgramı Şekil 4.5'te verilmiştir. CMC-lizozim etkileşiminin tekrarlanan SPR analiz sonuçları EK-4'te sunulmuştur. 75 ppm CMC'den önceki konsantrasyonlarda anlamlı SPR sinyali elde edilememiş, 200 ppm konsantrasyondan sonrası da artan konsantrasyonun "S" döngüsünde dengeye yaklaştığı ve istenmeyen "kütle taşınma etkisi"nden kaçınmak için denenmemiştir. Sensorgramdan görüleceği üzere artan derişimlerde CMC lizozim ile kaplanmış SPR sensör yüzeyinden geçerken SPR sinyalinde konsantrasyona bağlı olarak artış gözlenmektedir. Bağlanma etkileşim sürecinde tüm CMC konsantrasyonlarının lizozime maruziyeti dengeye ulaştıktan sonra sonlandırılmıştır. Şekil 4.5'te lizozim maruziyeti sonunda sinyalin belli bir dengeye ulaştığı ve net RU değerlerinden CMC moleküllerinin lizozim yüzeyine bağlı kaldığı, dolayısıyla etkileşim meydana geldiği anlaşılmaktadır. İmmobilize lizozim yüzeyinden CMC'nin ayrışması düzeyi ayrıca iki molekül arasında tersinir bir etkileşim olduğuna da işarettir. Aynı konsantrasyon ve deneysel şartlarda tekrarlanan üç tekrarlı SPR bağlanma etkileşim çalışmalarının benzer sinyal artışları vermesi yapılan deneyin tutarlılığı açısından önemlidir.

P11-4 ile immobilize lizozimin SPR bağlanma etkileşim çalışmaları artan derişimlerde P11-4'ün immobilize lizozim yüzeyine enjekte edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Denenen en yüksek konsantrasyondaki (12.000 ppm) P11-4'ün immobilize lizozim yüzeyine enjekte edilmesi sonucu elde edilen SPR sensorgramı Şekil 4.6'da verilmiş olup, ilgili sensorgramdan görüldüğü üzere iki molekül arasında anlamlı bir SPR sinyali elde edilememiştir.



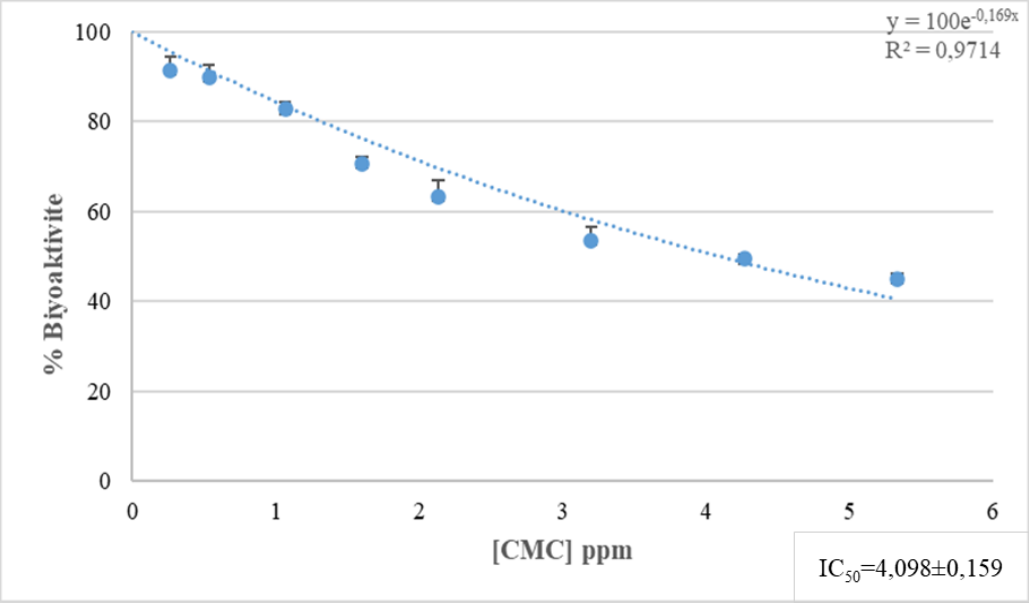
Şekil 4.5: Artan derişimlerde (75-200 ppm) CMC ile immobilize lizozim etkileşiminin referans alınmış deneysel SPR etkileşim sensorgramı



Şekil 4.6: 12.000 ppm P11-4 ile immobilize lizozim etkileşiminin referans alınmış deneysel SPR etkileşim sensorgramı

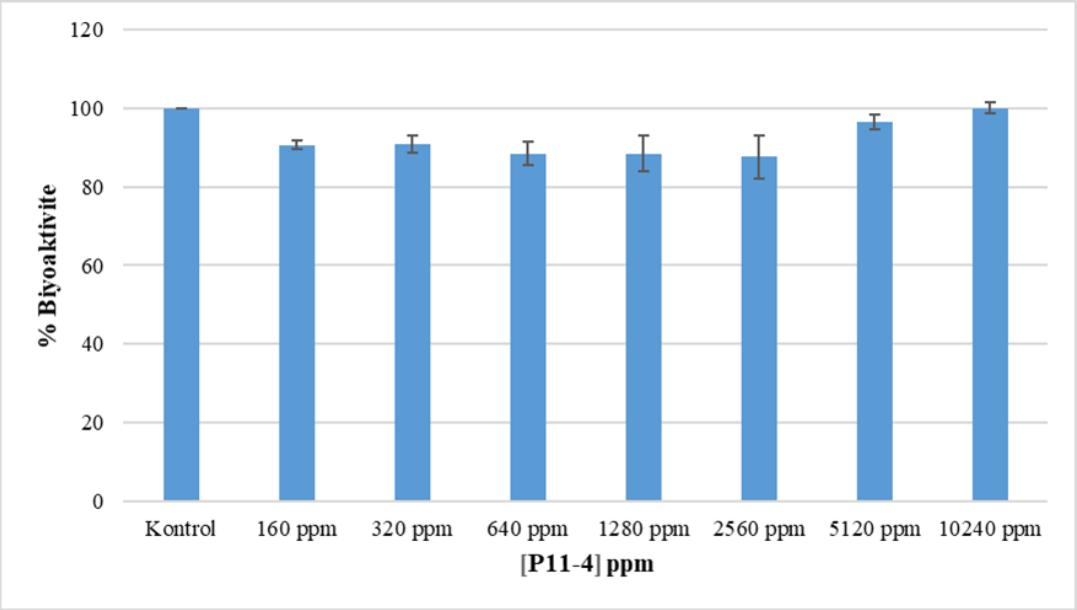
4.3. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARININ SONUÇLARI

Karboksimetil kitosan ve P11-4'ün lizozim enziminin aktivitesi üzerine etkileri UV-görünür bölge spektrofotometrisinde *M. lysodeikticus* hücrelerinin lizisi sonucu oluşan absorbans farkına göre araştırılmıştır. Tekrarlanan biyoaktivite deneylerinin sonuçları EK-5'te sunulmuştur. CMC'nin biyoaktivite(%)-[CMC] grafiklerini oluşturmak için 75-200 ppm aralığında sekiz farklı konsantrasyonda CMC hazırlanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine belirgin bir etki gösteren CMC'in küvet içi konsantrasyonları ile biyoaktivite(%)-[CMC] grafiği çizilmiş ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü tekrar sonucunda IC_{50} değerleri sırasıyla, 4,03 ppm; 3,984 ppm; 4,279 ppm olarak bulunmuştur. Üç tekrarlı çalışmaların sonucunda IC_{50} değeri ise 4,098±0,159 ppm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.7: CMC'nin lizozim aktivitesi üzerine etkisi üç tekrarlı deney grafiği

P11-4 artan derişimlerde biyoaktivite çalışmasına olanak vermediğinden ilgili molekülün biyoaktivite çalışması artan derişimlerde (160-10.240 ppm aralığında) 7 farklı konsantrasyon kullanılarak % aktivite olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). P11-4'ün artan derişimlerde lizozim enzimi üzerine anlamlı derecede bir inhibisyonu olmamıştır.



Şekil 4.8: P11-4'ün lizozim aktivitesi üzerine üç tekrarlı deney grafiği

Elde edilen sonuçlara göre P11-4 lizozim enzimi üzerine etkili bir aktivasyon ve/veya inhibisyon göstermezken, CMC'nin P11-4'e göre lizozim aktivitesi üzerine anlamlı derecede bir inhibisyon etkisi görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Tükürük, spesifik ve spesifik olmayan etkilere sahip, fiziksel ve kimyasal özellikleri yoluyla ağız ve diş sağlığını etkileyen karmaşık bir sıvıdır (262). Tükürüğün besinlerin sindirimi, ağız boşluğunun mekanik temizliği, tat verici maddelerin çözünmesi, ağız ortamının nemlenmesi ve kayganlaşması, çiğneme, yutma ve konuşmanın artikülasyonunu kolaylaştırması, antibakteriyal etkinlik, çürük oluşumunu engellemesi gibi pek çok görevi bulunmaktadır (263). Tükürük bilinen birçok fonksiyonunun yanı sıra, yapılan güncel çalışmalarda yapısındaki biyomarkerlar ile çeşitli hastalıkların teşhisine imkan vermesi, ilaçların seçici taşınması sağlaması, proteomik ve genomik çalışmalara imkan veren çok sayıda protein ve peptid barındırmasının kanıtlanması ile son yıllarda önem kazanan bir biyolojik sıvı olmuştur (37,264,265). 2014'te Florida'da düzenlenen VI. Dünya Oral Tıp Çalıştayı'nın bildirisinde tükürük hem ağız hem de genel sağlık için vazgeçilmez olan çok sayıda özellik ve işleve sahip, dikkate değer derecede karmaşık bir sıvı olarak tanımlanmıştır (20).

Demineralizasyon diş yüzeyinden çeşitli sebeplerle dişin mine-dentin gibi sert dokularında mevcut Ca^{2+} ve PO_4^{3-} gibi inorganik iyonların diş yüzeyinden uzaklaşması ile meydana gelmektedir (1). Diş çürüğü bakteriyel olarak indüklenen çok faktörlü bir hastalıktan, aynı zamanda kalıtsal tükürük faktörlerinden de etkilenebilen bir hastalıktır (60). Literatürde tükürüğün akış hızı, pH'ı, tamponlama kapasitesi, antimikrobiyal etkinliği ve diş çürüğüne olan etkisini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (18,60,61,72,266). Kılınç ve ark. (267) 2015 yılında yaşları 5-13 aralığında olan 180 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada tükürük pH'ı ve tükürük akış hızının, diş çürüğü ile ilişkisini değerlendirdikleri çalışmada diş çürüğü olan çocukların tükürük akış hızı ve pH'ının çürük olmayan çocuklara oranla anlamlı derecede düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Animireddy ve ark. (268) 2014 yılında 4-12 yaş aralığındaki çocukların tükürüklerinde pH, akış hızı, tamponlama kapasitesi ve viskoziteyi değerlendirdikleri çalışmada benzer şekilde bu parametrelerin çürük aktivitesini etkilediğini ve çürük aktivitesi için tükürüğün bu özelliklerinin belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Bunun dışında mevcut araştırmalar artık çürükler ve ağız diş sağlığı için risk faktörlerini belirlemenin yanı sıra çürük gelişimine karşı koruma sağlayabilecek veya çürük oluşumunu engelleyebilecek çözümleri

bulmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle biyolojik olarak tükürüğün kendi antibakteriyal doğal savunma mekanizmasından faydalanmak, diş yapısını koruyacak ve/veya onaracak olan ağız diş sağlığı ürünlerinin dış ortamdan uygulanması ve yenilikçi yaklaşım olarak bu iki seçeneğin kombinasyonun kullanılması geliştirilen stratejiler arasında yer almaktadır (75,269–272). Bu bağlamda tez çalışmamızın amacı diş remineralizasyonunda modern teknolojilerle geliştirilen materyaller ile doğal tükürük bileşenlerinin kendi aralarında ve diş üzerinde etkilerinin tespit edilip, tükürük komponentlerinin ve remineralizasyon ajanlarının kombinlendiği etkili ağız diş sağlığı ürünlerinin üretilmesine katıkıda bulunmak olarak belirlenmiştir.

İnsan tükürük proteomunun analizleri sonucunda yeni keşfedilen proteinlerle birlikte yaklaşık 3000 farklı protein ve peptit karakterize edilmiştir (273). Bu proteinlerin ve peptitlerin çoğu antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklere sahipken, bazıları ağız dokularını kayganlaştırmakta, bazıları tükürükteki yüksek Ca^{2+} konsantrasyonlarını korumaya yardımcı olmakta, bazıları sindirime yardımcı olmakta, kalan enzimler ise karbondioksitin karbonik asitlere dönüşümünü katalize ederek işlevsel hale gelmektedirler (55,84). Ağız boşluğunda besinler, tükürük proteinleri, glikoproteinler, diş eti oluğu sıvısı gibi etkenlerin oluşturduğu nemli ve sıcak ortam bakteriler, mantarlar, virüsler, arkeler ve protozoalar olmak üzere birçok farklı mikroorganizmanın büyümesi için uygun bir ekosistem meydana getirmektedir (274). Yapılan çalışmalar sağlıklı bireylerde, ağız ortamında yerleşik mikrobiyata tür sayısının 250-300 aralığında olup yerleşik olmayanlarla birlikte ortalama 700 farklı türün ağız ortamında bulunduğunu ve bunlar arasında en çok Streptococcus cinsinin görüldüğünü belirtmektedir (275,276). Tükürüğün spesifik olmayan bağışıklık savunma mekanizmasının önemli bir parçası olarak lizozim, antibakteriyal özelliği ile *S. mutans* gibi zararlı türlerin eliminasyonunu sağlayarak ağız boşluğunun ekolojik dengesini korumaktadır (277). Lizozim ve diş çürüğü arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (278–280). Felizardo ve ark. (281) 2010 yılında 12 yaş grubunda 80 çocukta yaptıkları çalışmada tükürüklerinde lizozim değeri ortalama 91,56 mg/mL ve üzeri olan çocukların çürük, eksik ve dolgulu diş sayısı değerlerinin, lizozim değeri 81,55 mg/mL olan çocukların çürük, eksik ve dolgulu diş sayısı değerlerlerine göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Moslemi ve ark. (142) 2015 yılında 36-71 ay yaş aralığındaki 42 çocukta yaptığı çalışmada, çürüksüz çocuklarda lizozim miktarının ortalama 9573 ng/mL, Erken Çocukluk Çağı Çürüğü (EÇÇ) olan çocuklarda ise bu

oranın 2180 ng/mL'ye düştüğünü ve anlamlı bir fark meydana geldiğini göstermişlerdir. Lizozimin diş çürüğünü engellemeye yönelik antibakteriyal aktivitesine bağlı olarak ağız-diş sağlığı ürünlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur (102,282). Octiara ve ark. (283) 2022 yılında 14-35 ay yaş grubundaki 68 EÇÇ'li çocukta yaptıkları klinik çalışmada çocuklara florürsüz lizozim içeren diş macununu 5 hafta boyunca kullanmalarını sağlamış ve 5 hafta sonunda Ig A, lizozim aktivitesi, *S. mutans* koloni sayısı ve çürük, eksik ve dolgulu diş sayısı değerlerini karşılaştırmışlardır. Lizozimli diş macunu kullandıktan sonra, EÇÇ'li çocukların tükürüklerinde Ig A'da ve *S. mutans* sayısında kontrol grubuna göre daha fazla azalma görülmüş, lizozim aktivitesinde en yüksek artış EÇÇ'li çocuklarda görülmüştür. Lizozim hem *S. mutans*'a karşı olan yüksek antibakteriyal aktivitesi, hem ağız boşluğunda her bireyde doğal bulunan ve dolayısıyla alerji, yan etki, uzun stabilite gibi riskleri barındırmayan bir protein (282) olması sebebi ile çalışmamızda lizozim tercih edilmiştir.

Diş minesi, ağız içinde yapısının demineralizasyon ve remineralizasyon arasındaki sürekli bir denge ile korunduğu biyolojik bir dokudur (284). Güncel literatür, mineralize diş dokularını uzun vaadede koruyabilecek doğru bir dengenin sağlanması için demineralizasyonun geciktirilmesi ve remineralizasyonun artırılması gerektiğini ileri sürmektedir (285). Bu bağlamda yapılan güncel çalışmalarla görünüm, biyomekanik ve işlevsel yeterlilikler açısından doğal bir dişin özelliklerini taklit eden, dişi koruyan ve etkilenen diş yapısının onarımını sağlayan biyomimetik materyaller gündeme gelmiştir (286). Kendiliğinden birleşen peptit P11-4 peptitlerin birleşerek lif oluşumuna kadar ilerlemesi ve uygulandığı bölgede üç boyutlu bir iskele üretmesiyle diş dokusunu taklit edebilen bir materyaldir (193). Literatürde P11-4'ün diş üzerine etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (8,9,193,194). Fakat bu materyal hem tükürük tarafından yönlendirilen doğal remineralizasyonu desteklemesi, hem de fonksiyonunu gerçekleştirdiği ortam diş ve tükürük olmasına rağmen, P11-4'ün diş yüzeyi haricinde, tükürük veya tükürük komponentleri ile olan etkileşimlerine dair çalışmalar literatürde mevcut değildir. Ayrıca kendiliğinden birleşen peptitlerin yan etkilerinin az olması sebebiyle ilaç salımında kullanılabilir olması (189), biyokimyasal ortama bağlı olarak serbest enerjiyle kendi kendine birleşebilme yeteneğinin olması (287) sebebiyle tez çalışmasında etkileşimlerine bakılan materyallerden biri P11-4 olarak seçilmiştir.

Karboksimetil kitosan, kitosana karboksil gruplarının eklenmesiyle elde edilen bir biyopolimerdir (12). Diş hekimliğinde CMC içerikli bir ürün piyasada henüz bulunmamaktadır. Kitosana kıyasla çözünürlüğünün fazla olması, Ca^{+2} ile kompleks oluşturabilme yeteneği, poliamfoterik özelliği, antibakteriyal özellik, biyouyumluluk, biyomimetik özellik, geniş pH aralığında etkinlik gösterebilmesi gibi gelişmiş özellikleri sebebiyle diş hekimliği alanında üzerinde çalışılan deney aşamasında bir materyaldir (11,197). Literatürde CMC'nin dentin üzerindeki biyomimetik etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (198,288,289). Huang ve ark. (198) 2019 yılında CMC'nin çürük dentin üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmada kollejen fibrillerin arasında tipik iğne benzeri hidroksiapatit kristallerinin biriktiğini, CMC uygulanan dentin yüzey sertliğinin belirgin oranda arttığını göstermişlerdir. CMC'nin mine üzerindeki biyomimetik etkinliğini inceleyen çalışmalar ise sınırlı sayıda olup, yapılan çalışmalarda CMC ve ACP kombinasyonunun etkilerine bakılmıştır (201,290,291). Xiao ve ark. (290) 2017 yılındaki çalışmalarında CMC/ACP ve kimerik peptit ile oluşturdukları karışımı demineralize mine yüzeyine uygulamış ve mine benzeri kristallerin demineralize yüzeye sıkıca bağlandığını ve oluşan mine benzeri kristallerin iyi organize ve güçlü mekanik özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir. Elien ve ark. (252) 2023 yılında yapay çürük oluşturdukları 24 adet süt dişinde %2,5 ve %5 konsantrasyonlarında CMC/ACP jelinin mine yüzey sertliğine olan etkisini 7 gün sonunda CPP-ACP ile kıyaslamışlardır. Mine yüzey sertliğindeki değişim en fazla %5 CMC, sonra %2,5 CMC ve en son ise CPP-ACP'de olduğunu CMC konsantrasyonu arttıkça CMC etkinliğinin de arttığı sonucuna varmışlardır. CMC'nin mine üzerinde etkisiyle ilgili yeterli sayıda çalışma olmaması, saf halinin kullanıldığı çalışmaların mevcut olmaması, başka biyomimetik materyaller ile kıyaslamasının yapıldığı çalışmalar olmaması ve uygun pH duyarlılığı, çözünürlük, emilebilirlik, bozunma ürünlerinin toksik olmaması, kontrollü biyolojik parçalanabilirlik, iyi adezyon gibi özellikleri açısından kontrollü ilaç salımı, biyoetkileşim gibi çalışmalar açısından uygun bir materyal olması (292) sebebiyle tez çalışması için CMC seçilmiştir.

Diş hekimliğinde *in-vitro* çalışmalar, potansiyel yeni materyalleri veya teknikleri *in-vivo*, yani hayvanlar ve insanlar üzerinde daha fazla test edilmek üzere değerlendirmek için yapılan çalışmaların temelini oluşturmaktadır (293). Literatürde hem materyallerin çürük üzerine olan etkilerinin incelendiği, hem de maddelerin birbirleriyle etkileşimlerinin incelendiği çok sayıda *in-vitro* çalışma mevcuttur (294–

297). *In-vitro* protokoller, diş dokularından mineral kaybı ve kazanımında meydana gelen dinamiklerin ve materyallerin çürük önleyici aktivitesiyle ilişkili reaksiyon dinamiklerinin ayrıntılı çalışılmasını mümkün kılmakta, ağız ortamına yakın bir ortam oluşturulabilmektedir. Benzer şekilde, profil uygulamalarında, *in-vitro* protokoller, maddelerin etkinliğinin ucuz, hızlı ve hassas değerlendirmesini mümkün kılmaktadır (293). *In-vitro* çalışmalar sayesinde kontrollü sabit koşullar altında tek değişkenli deneyler yapılabilmekte böylelikle çalışmayı olumsuz etkileyebilecek etkenler elimine edilmektedir (298). *In-siliko* çalışmalar ise, biyolojik çalışmalarla paralel ilerleyen, bilgisayar simülasyonu kullanılarak yapılan çalışmalardır (299). *In-siliko* çalışmaların protein-madde etkileşimleri, maddelerin aktif bölgelerinin tanımlanması ile yeni ilaç ve analogların üretilmesi, maddelerin etki biçimlerinin tanımlanmasını sağlamak gibi pek çok avantajı olup, maliyeti az bir yöntemdir (300). Diş hekimliği alanında *in-siliko* çalışmalar *in-vitro* çalışmalar kadar çok olmasa da, literatürde yapılan çalışmalar mevcuttur (301,302). *In-vitro* ve *in-siliko* çalışmaların bahsedilen avantajlarından dolayı tez çalışmasında bu yöntem temelinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

In-vitro remineralizasyon çalışmalarda hem insan hem de hayvan dişleri kullanılabilmektedir. Literatürde hayvan dişlerinin kullanıldığı çalışmalarda en çok sığır, domuz, koyun, rat dişleri kullanılmıştır (303,304). Özellikle sığır dişlerinin boyut olarak büyük olması, kolay temin edilmesi ve etik açıdan risk taşımaması gibi sebeplerden dolayı tercih edildiği gösterilmiştir (303). Fakat çalışmalar insan ve hayvan dişlerinin mineleri ve dentinlerinin organik, inorganik içeriğinin birebir aynı olmadığını ve morfolojik, kimyasal, yapısal farklılıkların olduğunu göstermektedir (303,305). Tez çalışmasında kullanılan materyallerin etkilerinin gerçeğe yakın görülmek istenmesi ve dişler arasındaki farklılıkların deney sonuçlarını etkilememesi için çekilmiş ve sağlam 20 yaş dişleri tercih edilmiştir.

Literatürde dental materyallerin demineralizasyon üzerine etkileri, remineralizasyon kapasiteleri gibi etkileri dişlerin mine ve dentin dokusunda değerlendirilmektedir (306–309). Minenin, %96'sı inorganik maddeden %3'ü su ve %1'i ise proteinler, lipitler gibi organik bileşenlerden oluşmaktadır (310). Yapısal olarak hidroksiapatit kristalleri minede organize hiyerarşik mikro yapı oluşturmaktadır. Bu dizilim diş minesine yüksek direnç sağlamaktadır (311). Dentinin ise %70'ini inorganik maddeler, %20'sini organik bileşenler ve %10'unu su oluşturmaktadır (312).

Dentin yapısal olarak mineye göre daha yüksek bir organik matrise sahiptir, daha gözenekli ve geçirgendir. Bu nedenle çürüklerin dentinde mineye göre hızlı ilerleme potansiyeli fazladır (313). Mine ve dentinin yapısal ve bileşen olarak farklılıklarından dolayı bu iki dokunun da fiziko-kimyasal, mekanik özellikleri, remineralizasyon ve demineralizasyondan etkilenme dereceleri değişmektedir (312). Talwar ve ark. (312) 2019 yılında üç farklı diş macununun mine ve dentinde etkilerini değerlendirmişler, deney sırasında demineralizasyon oluşturdukları örneklerde dentinde meydana gelen mineral kaybı ve demineralizasyon derinliğinin mineye göre 1,5 kat daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Minenin ağız ortamı ve tükürük ile birebir temasta olması, yapısının homojen olması, ağızda demineralizasyon ve remineralizasyondan etkilenen ilk doku olması (314) ve dentin dokusundaki remineralizasyonun mine dokusuna göre daha karmaşık ve zor olmasından dolayı (288) tez çalışmasında mine dokusu tercih edilmiştir.

Diş dokusunda demineralizasyon inorganik yapının, kimyasal veya bakteri kaynaklı asit sebebiyle çözünmesi sonucu meydana gelmektedir (1). Literatürde mine dokusunda yüzey altı demineralizasyon için asitlendirilmiş ortamlar kullanılarak çeşitli *in-vitro* ve *in-situ* modeller geliştirilmiştir (315–317). Geliştirilen bu modellerde dişler 16 saat ile 2 gün arasında laktik ve asetik asit gibi organik asitlerde bekletilerek kimyasal demineralizasyon oluşturulmuştur (318,319). Çalışmalarda ideal demineralizasyon oluşum aralığının pH 4,4-5,0 arasında olduğu belirtilmiştir (315,320). Güncel remineralizasyon çalışmalarında demineralizasyon solüsyonu olarak asetik asit içeren pH 4,4'e sabitlenmiş demineralizasyon solüsyonunda dişler 72-96 saat aralığında bekletilmektedir (249,321). Bu nedenle deneyde dişler 96 saat boyunca 2,2 mM $CaCl_2$, 2,2 mM KH_2PO_4 ve 0,05 M asetik asit içeren pH'ı 4,4'e sabitlenmiş demineralizasyon solüsyonunda bekletilmiştir.

Yapay tükürük, doğal tükürüğün belirli komponentlerini içeren, özellikle remineralizasyon çalışmalarında yapay ağız ortamının taklit edilmesini sağlayan ve test materyalleriyle reaksiyona giren bir içeriktir (322). Literatürde *in-vitro* remineralizasyon çalışmalarında en ideal ortamın ağızı taklit edebilen etkenlerin dahil edildiği, yani organik tükürük bileşenlerinin mevcudiyeti, sıcaklık, dental plak gibi etkenlerle sağlanabileceği belirtilmiştir (320). Birebir ağız ortamının taklidi imkansız olsa da en azından tükürük bileşimini taklit edebilmek için literatürde yapay tükürük içeriği olarak

karboksimetilselüloz, mineral tuzları, florür, tatlandırıcılar ve koruyucu maddelerin sulu çözeltileri çeşitli miktarlarda kullanılmıştır (323). Tez çalışmasında hem ağız ortamının taklit edebilmesi, ağız ortamındaki doğal remineralizasyonun ve iyon dengesinin sağlanabilmesi, sabit pH sağlanabilmesi, kolay üretilebilmesi açısından yapay tükürük tercih edilmiştir. Literatürde tükürükte bulunan lizozim miktarı bireyden bireye değişmekte olduğu ve ortalama 1 L tükürükte 0,11 gr lizozim olduğu belirtilmiştir (37,61). Bu nedenle tez çalışmada 3. 4. ve 5. gruplar için hazırlanan yapay tükürük içeriğine 0,11 gr/L lizozim eklenerek, diş yüzeylerine uygulanan materyallerin lizozim varlığında ve yokluğunda etkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu, diş hekimliğinde mine-dentin gibi diş dokularının ve kullanılan dental materyallerin çeşitli büyütme derecelerinde yüzey morfolojilerinin incelenmesine ve buna bağlı değerlendirme yapılmasına olanak tanıyan bir yöntemdir (324). Remineralizasyon çalışmalarında yüksek çözürlüğe sahip olması ile remineralize alanların mikro-nano düzeyinde incelenebilmesi, diş yüzeyindeki remineralizasyon sonrası mine ve dentin yüzeyinde gözeneklilik, pürüzlülük, çatlaklar gibi bozuklukların ne kadar onarıldığının yani yüzey topografisindeki değişimlerin görülebilmesi, kristal yapı ve mineral dağılım analizinin yapılabilmesi SEM'in avantajları arasında yer almaktadır (324). Sindhura ve ark. (325) yapay çürük oluşturdukları 24 adet premolar dişte P11-4 ve CPP-ACP'nin 1 hafta, 1 ay ve 3 ay sonundaki etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada materyallerin remineralizasyon ve biyomimetik etkilerini SEM ile incelemişlerdir. Yoğurucu Değerli ve ark. (326), 2023 yılında P11-4 ve gümüş diamin florürün dentin üzerindeki biyomimetik etkilerini SEM, FTIR ve Küçük Açı X-Işını Saçılımı (SAXS) analizleri ile incelemişlerdir. Zhu ve ark. (327), CMC-ACP ve şimerik lizin içerikli nanojelin yapay çürük oluşturulan mine yüzeyindeki etkilerini SEM ile incelemişlerdir. Tez çalışmasında P11-4 ve CMC uygulanan dişlerin lizozim eklenen ve eklenmeyen yapay tükürük solüsyonlarında bekletildikten sonra madde-lizozim komplekslerinin mine yüzeyine olan etkinliklerini morfolojik olarak değerlendirmek amacıyla SEM analizi yapılmıştır.

Ultraviyole-görünür bölge absorbsiyonu diş hekimliğinde, dental materyallerin ya da biyomoleküllerin ışıkla etkileşimlerini inceleyerek, dolgu materyalleri, kaplama malzemelerinin optik özelliklerinin tespiti ve madde karakterizasyonu, maddelerin biyokimyasal süreçleri ve etkileşimlerini tayin etmek gibi pek çok alanda

kullanılmaktadır (328,329). Quasim ve ark. (330) 2017 yılında kitosan membranların periodontal tedavide rehberli doku rejenerasyonu için membran yüzey katmanı olarak kullanılabilirliğini inceledikleri çalışmada, UV-görünür bölge spektroskopisini kitosanın bozunma çalışmalarını gerçekleştirirken moleküllerdeki belirli fonksiyonel grupları tanımlamak için kullanmışlardır. UV-görünür bölge spektroskopisinin yüksek duyarlılığıyla düşük konsantrasyonlardaki maddelerin etkileşimini bile belirleyebilmesi, yüksek işaretleme hassasiyeti ile ölçümlerin doğruluğunu arttırması gibi avantajlara sahip olması (328) nedeniyle tez çalışmasında P11-4, CMC ve lizozimin etkileşimlerinin tespiti ve etkileşim komplekslerinin absorpsiyon spektrumlarının belirlenmesi amacıyla UV-görünür bölge spektroskopisi tercih edilmiştir.

Ligand-protein komplekslerinin yapısını tahmin eden kenetlenme algoritmaları, ilaç tasarımı, biyokimya, diş hekimliği gibi alanlarda uygulanabilmektedir. Günümüzde protein veritabanlarından elde edilen yapılar ile analitler karşılaştırılarak moleküler kenetlenme algoritmalarının test edilmesi ve doğrulanması *in-siliko* ortamda mümkün hale gelmiştir (331). Diş hekimliğinde çürük yapan bakteri proteinleri ile materyallerin ya da besin içeriklerinin etkileşimi, osteointegrasyon için osteopontin gibi proteinlerle biyomateryallerin etkileşimi, kompozit materyallerde doldurucu ve monomer etkileşimi gibi diş hekimliğinin çoğu alanında gündeme gelen bir tekniktir (301,332,333). Tez çalışmasında moleküler kenetlenme, P11-4-lizozim ve CMC-lizozim arasındaki etkileşimi bağlanma enerjisine göre belirleyebilmek ve söz konusu biyoetkileşimleri *in-vitro* şartlara ilaveten bilgisayar ortamında moleküler düzeyde anlayabilmek ve biyolojik süreci daha etkili şekilde analiz edebilmek amacıyla tercih edilmiştir.

Yüzey plazmon rezonans, yüksek hassasiyet ve özgüllükle moleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı ve etiketsiz kantifikasyonuna izin veren optik temelli bir cihazdır. SPR, kinetik, afinite ve termodinamik gibi alanlarda değerli biyofiziksel veriler sağlayarak ligandlar ve analitler arasındaki moleküler etkileşimlerin değerlendirilmesinde yaygın bir popülerlik kazanmıştır (253). Fakat literatürde diş hekimliği alanında SPR ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. SPR biyosensörü oluşturulup çürüklerin erken tespiti, hidroksiapatit kaplı dişi taklit eden SPR biyosensörü ile dental plak etkileşiminin incelenmesi, dental materyallerdeki alerjen maddelerin antijenlerle etkileşiminin tespiti gibi çalışmalar mevcuttur (334–336). Dişlerde remineralizasyon amaçlı kullanılan materyallerin bağlanma mekanizmasının

gerçekleştiği alan olan ağız ortamındaki tükürük içerikleri ile ilgili etkileşimleri SPR ile inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. SPR cihazında madde etkileşimlerinin sayısal veri ve grafik şeklinde elde edilebilmesi, analiz için küçük hacimdeki numunelerin yeterli olması, etkileşime bakılacak yapı çiftlerine özel biyosensör üretilebilmesi, yüksek seçicilik ve özgüllüğe sahip olması SPR'nin avantajları arasında yer almaktadır (238,253,337). Bu nedenle tez çalışmasında SPR ile biyomimetik madde-lizozim arasındaki etkileşim ve bu etkileşimin bağlanma ve ayrışma süreçlerinin sensorgramdan izlenmesi hedeflenmiştir.

Yüzey plazmon rezonansda izlenen etkileşimlerde kullanılan algılama platformları için yüzey plazmonlarının oluştuğu metal katman, bir diğer ifade ile cam prizma ve numune çözeltisi arasında optik yüzey sensörü olarak alüminyum, bakır, altın ve gümüşten faydalanılmaktadır (261). Bazı çalışmalarda, gümüş çip yüzeyleri bir SPR metal katmanı olarak kullanılmıştır. Kumar ve ark. (338), gümüş çiplerin kimyasal kararsızlık ve hava ile temastan sonra hızlı okside olması gibi dezavantajlarını bildirmiştir. Literatürde bu durumun aksine altın çiplerin olağanüstü mekanik ve kimyasal kararlılığının yanı sıra düşük oksidasyon gücü nedeniyle SPR cihazları için en ideal metal yüzey katmanı olduğu bildirilmiştir (339). Bu nedenle tez çalışmasında yürütülen SPR analizlerinde altın çip yüzeyler tercih edilmiştir.

Yüzey plazmon rezonans analizlerinde, temel aşama, metal yüzeyi farklı kimyasal kaplamalarla modifiye etmek ve SPR çipini ligand immobilizasyonu için hazırlamaktır. Herhangi bir kullanımdan önce, metal yüzey temizlenmeli ve aktive edilmelidir (339). Literatürde metal yüzeyinden organik ve inorganik bileşenlerin uzaklaştırılarak temizlenmesinde yüzey ön işlemleri olarak piranha karışımı, konsantre NaOH çözeltisi, amonyak-peroksit su karışımı ve oksijen plazma aşındırması gibi teknikler mevcuttur (340). Franko ve ark. (341) 2014 yılında çiplerin temizliğinde aseton-izopropanol-etanol, pirana, potasyum hidroksit ve ozon plazma yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada, pirana çözeltisinin en yüksek adsorpsiyon derecesini sağladığını gözlemlemişlerdir. Pirana solüsyonun etkili oksidasyona sahip olarak altın yüzeyi etkili hidrofilik bir yüzeye dönüştürebilmesinden dolayı çalışmada pirana solüsyonu tercih edilmiştir.

Ligand-analit bağlanma çalışmalarında biyomoleküllerin immobilizasyonu için karboksimetillenmiş dekstran, MUA ve 3-merkaptopropionik asit ve bunların türevleri

dahil olmak üzere çeşitli kendiliğinden birleşen monokatmanlar geliştirilmiştir. Kendiliğinden birleşen monokatmanların seçimi, çip yüzey özelliklerinin hassas bir şekilde kontrol edilmesine, ligand immobilizasyonunun en üst düzeye çıkarılmasına ve bağlanma özelliklerinin optimize edilmesine olanak sağlamaktadır. Literatürde MUA'nın SPR bağlanma çalışmaları için kendiliğinden oluşan katmanların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan ve iyi karakterize edilmiş kimyasallardan biri olduğu belirtilmiştir (342).

Lizozim-ligand etkileşimlerinde lizozim aktivitesinin *M. lysodeikticus* hücrelerinin lizizi ile belirlenmesi en yaygın yaklaşımdır (343). *M. lysodeikticus*'un hücre duvarı, lizozimin hedeflediği spesifik bağlara sahip peptidoglikan tabakasından oluştuğu için, lizozimin enzimatik aktivitesi açısından oldukça uygun bir substrattır. Lizozim, bakteri hücre duvarlarını parçalayarak hücrenin lizise uğramasına neden olmakta ve bu süreç absorbans azalması şeklinde UV-görünür bölge spektrofotometre cihazı ile hızlı ve güvenilir şekilde ölçülebilmektedir (248). Diş hekimliğinde lizozim-pelikıl etkileşimlerinde ya da implant yüzey modifikasyonları ile lizozim etkileşimi gibi alanlarda *M. lysodeikticus* ile lizozim aktivitesine bakan çalışmalar mevcutur (343,344). P11-4-lizozim ve CMC-lizozim etkileşiminin lizozim aktivitesine olan etkisini görebilmek amacıyla tez çalışmasında ilgili maddelerin lizozim üzerindeki aktivitesine bakılmıştır.

Yeni keşfedilen P11-4 peptidi, mine remineralizasyonu için biyomimetik temelli rejenerasyon sistemi kullanılarak çürüğün erken aşamalarında tedavisini sağlayan bir maddedir ve literatürde P11-4 uygulaması sonrası mine ve dentin yüzeyinde meydana gelen değişimleri SEM ile inceleyen çalışmalar mevcuttur (251,325,345–347). Yoğurucu Değerli ve ark. (326), P11-4 ve gümüş diamin florürün demineralize dentin üzerinde etkilerini SEM, FTIR ve SAXS analizleri ile inceledikleri çalışmada SEM görüntülerinde, gümüş diamin florürün remineralizasyon oluştururken, P11-4'ün demineralize dentinde inter tübüler dentini daralttığını, fibriler ve lifler halinde iskeletsel yapı oluşumu ile biyomimetik etki yarattığını gözlemlemişlerdir. Tez çalışmamızda ise Grup 2'de, P11-4 uygulaması sonrasında demineralize mineye ve Grup 1'e göre yüzey bütünlüğü sağlanarak, sağlam mine yüzeyine benzer homojen, düz, porların tıkandığı bir yüzey oluşmuştur. Shetty ve ark. (348)'ın 2023 yılında 20 adet yapay çürük oluşturdukları premolar dişlerin yarısına P11-4, diğer yarısına ise flor

vernik uyguladıkları ve 21 gün sonunda Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılım X Işını Spektrometrisi (SEM-EDX) ile mine yüzeylerini değerlendirdikleri çalışmada, çalışmamızı destekler şekilde P11-4 grubunda tüm gözenekli demineralize alanların dolduğunu ve yüzey bütünlüğünün sağlam mine ile benzer hale geldiğini, fosfor içeriğinin de flor grubuna göre yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Suda ve ark. (345) 2018 yılında 26 adet sığır dişinde portakal suyu ile erozyon oluşturdukları çalışmada P11-4'ün etkisini SEM ile inceledikleri çalışmada erozyona bağlı aşınan minede P11-4 sonrası demineralizasyonun etkilerinin minimal seviyeye inmiş olduğunu ve hidroksiapatit benzeri kristaller oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Sindhura ve ark. (325) 2018 yılında 24 adet yapay çürük oluşturdukları premolar dişlerde P11-4 ve CPP-ACP'nin etkilerini 1 hafta, 1 ay ve 3 ay sürelerle SEM ve SEM-EDX analizleri ile karşılaştırmışlardır. 1 haftalık değerlendirmede gözenek hacminde azalma, 1 aylık değerlendirmede prizma çekirdeklerinin etrafında mineral birikimi kanıtları, 3 aylık değerlendirmede ise, mineral birikiminin doğal mine yüzeyine benzerlik gösterdiğini ve 3 ay sonunda en çok mineral birikiminin P11-4 grubunda olduğunu tespit etmişlerdir.

Karboksimetil kitosan remineralizasyon ya da biyomimetik amaçlı diş hekimliğinde kullanımı olan bir ürüne sahip olmamasına rağmen, diş dokuları üzerinde materyalin, biyouyumluluğuna ve biyomimetik etkilerine dair çalışmalar mevcuttur (11,12,201,288,349,350). Mohapatpour ve ark. (291) 2022 yılında CMC ve aljinant içerikli bir biyomembranın mine rejenerasyonu kapasitesini araştırmışlardır. Oluşturulan membranlarda dental epitel hücre hattının (HAT-7), 1, 7 ve 14 gün sonunda canlılığını ve morfolojilerini koruyabildiğini, alkalen fosfataz salgılayabildiğini ve SEM görüntülemesinde hücrelerin yüzeyinde çeşitli amorf küresel yapılar oluştuğunu gözlemlemişlerdir ki bu durum mineralizasyonun başladığını ve ameloblast farklılaşması olduğunu işaret etmektedir. Saravana ve ark. (349) 2024 yılında yumurta kabuğundan elde ettikleri nanohidroksiapatitin yapay çürük oluşturulmuş dentin yüzeyinde CMC'li ve CMC'siz uygulandıktan sonraki etkilerini SEM, FTIR, TEM, XRT analizleri ile değerlendirmişlerdir. Nanohidroksiapatit uygulanan grupta tübüllerin tıkanması gözlemlenirken, CMC ve nanohidroksiapatit uygulanan grupta homojen apatit çökelmesi iyi tanımlanmış kristallerle karakterize edilen intratübüler tıkanma gözlemlenilmiştir. Tez çalışmasında CMC uygulanan diş yüzeylerinden elde edilen SEM görüntü sonuçlarında Grup 3'te, literatürdeki çalışmalara benzer olarak minenin üzerinde yığılı ince remineralize bir yapı ile birlikte porların boyutlarında kısmen

küçülme görülmüştür. Fakat remineralize yapı tamamen homejen olmayıp, belirgin demineralize alanlar da mevcuttur. SEM görüntüsünde demineralize mineye kıyasla CMC grubunda yüzeyde yığılmış ince mineralize yapıların sebebi jel formundaki CMC'ye Ca^{2+} çökelmesi ile ince bir yüzey katmanı formu oluşmasından kaynaklanmaktadır. Han ve ark. (350) 2017 yılında tavşan dişlerinin dentin dokusuna kitosan jel uygulaması sonrasında dentin tübüllerinde küçülme ve tıkanma gözlemlemiş ve kitosan jelin hidroksiapatit benzeri kristallerin oluşum için çok yönlü bir büyüme ortamı oluşturduğunu çünkü mine apatitinin ilk oluşumunun jel benzeri organik matriste meydana geldiğini, oluşturulan jel formu ile bu sürecin taklit edilebildiğini belirtmişlerdir. Grup 3'te porların kısmen küçülmesi ve tıkanması bu küçük mineral yapıların, lezyon yüzeyine nüfuz etme ve tüm lezyon derinliği boyunca remineralizasyonu artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızı destekler şekilde Wang ve ark. (11) 2022 yılında CMC ve kitosanın bakteriyel ekstraselüler polimerik maddenin biyomineralizasyonu sürecindeki rolünü araştırdıkları çalışmada CMC'nin (%65,07) kitosana (%55,66) kıyasla daha yüksek Ca^{2+} çökelmesini sağladığı, CMC yüzeyinde nükleasyonun, Ca^{2+}'nin $–NH_2$, –OH, –COOH ve $–NHCOCH_3$ gruplarına bağlanmasıyla tetiklendiği sonucuna ulaşmışlardır. Li ve ark. (12) 2023 yılında aynı şekilde CMC gibi polisakkaritlerin çekirdeklenme şablonları olarak hareket edebileceğini ve Ca^{2+} adsorpsiyonunun mevcut bağlanma bölgeleri tarafından desteklendiğini göstermişlerdir. Yani CMC, Ca^{2+} ile güçlü bağlanma yeteneği sayesinde porların küçülmesi için nükleasyon alanları oluşturmaktadır. Fakat tamamen homojenize bir hidroksiapatit kristali oluşumları görülmeyip, demineralize minenin profilinin hala belirgin olmasının sebebi ise CMC jelinin saf olarak kullanılması, ACP gibi stabilize edilebilir ve hidroksiapatit oluşumu için yavaş, sabit salınabilir bir Ca^{2+} ve PO_4^{3-} kaynağı eklenmemesi, yapay tükürükteki Ca^{2+}, PO_4^{3-} ile hızlıca birleşerek kalsiyum-fosfat kristalleri olarak çökelmiş olması ve kalan Ca^{2+}'lerin sadece CMC'nin negatif yüklü bölgelerine bağlanabilmesinden kaynaklanmaktadır (11). Bu da yeterli bir biyomimetik etki görülmemesine sebep olmuştur. Nimbeni ve ark. (201) 2023 yılında çalışmamıza benzer şekilde yapay çürük oluşturdukları premolar dişlerde CMC, ACP ve florür karışımından oluşturdukları remineralizasyon jelini 7 gün boyunca demineralize yüzeylere uygulamışlar, 7 gün sonunda SEM analizinde jelin uygulandığı grupta demineralize mine yüzeyine göre yüzeyde ince granüler bir tabakanın birikmesi nedeniyle prizmalar arası gözenekliliklerin tıkandığını, SEM-EDX

analizinde ise en yüksek kalsiyum-fosfat oranının jel uygulanan grupta olduğunu tespit etmişlerdir. ACP'nin CMC ile birlikte kullanıldığında ACP'den Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarının yavaş ve tutarlı bir şekilde salındığını, ve remineralizasyonu indükleyen aşırı doymuş bir ortam yarattığını, böylelikle Ca^{2+} ve PO_4^{3-}'ün hidroksiapatit kristallerine dönüştüğünü belirtmişlerdir. Aditya ve ark. (351) 2022 yılında CMC/ACP kombinasyonu ile oluşan kristallerin karakterizasyonunu inceledikleri çalışmada CMC'nin ACP'yi stabilize etme ve parçacıkların hızlıca kalsiyum-fosfat kristallerine dönüşümüne uğramasını önleme yeteneği olduğunu belirtmişlerdir.

Grup 4'te lizozim içeren yapay tükürük grubunda yer yer remineralize alanlar görülmekte, mine yüzeyi tamamen lizozimle kaplı olup, demineralize mine görünümü mevcuttur. Tez çalışmamızın tersine Guo ve ark. (352) lizozimi Polietilenglikol (PEG) ile konjuge etmişler ve demineralize dişlerin pit ve fissür bölgelerine uygulayıp, 28 gün boyunca her hafta diş yüzeyindeki değişiklikleri incelemişlerdir. SEM ile incelemede kontrol gruplarının aksine, lizozim-PEG grubunda mine yüzeyinde sürekli ve homojen bir mineral tabakası olduğunu ve yeni oluşmuş mineral tabakasının, doğal mine prizmasına benzer altıgen prizma yapısında bir yapı sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bunun sebebinin de lizozimin PEG ile konjugasyonu sonucu $–NH_2$, –OH ve –COOH grupları dahil olmak üzere bol miktarda fonksiyonel gruplarının açığa çıkmasıyla lizozimin diş üzerinde amiloid benzeri aggregatlar oluşturarak, tükürükten gelen Ca^{2+} ve PO_4^{3-} için olası bağlanma bölgeleri sağlaması ve bu iyonların daha sonra birbirleriyle reaksiyona girerek hidroksiapatit oluşturması olarak açıklamışlardır. Fakat çalışmamızda Grup 4'te lizozimin demineralize bölgelerin olduğu bölgeleri kaplaması ve bu bölgelere entegre olması gerçek ağız ortamında lizozimin *S. mutans*'lara karşı antibakteriyal etkinlik gösterip demineralizasyonun daha da ilerlemesini engellemesi açısından iyi bir göstergedir.

Literatürde lizozim ve peptit etkileşimlerinin etkisini diş yüzeyinde inceleyen çok sınırlı sayıda çalışma bulunmuştur. Fang ve ark. (353)'ın 2022 yılında lizozimden bir nanofilm oluşturup, lizozim nanofilmi ile polifenmüsin peptidini birleştirilerek, *S. mutans*'ı inhibe eden ve remineralizasyonu indükleyen çok işlevli bir membran oluşturmayı amaçladıkları çalışmada, SEM görüntüleri sonucunda polifenmüsin ile birleşen lizozim nanofilm kaplı mine yüzeyinde, tek başına lizozim nanofilm kaplı mineye göre Ca^{2+} ve PO_4^{3-} kaybının daha fazla engellendiği ve mine benzeri kristaller

oluştuğu görülmüş ayrıca *S. mutans* inhibisyonunu da daha fazla sağladığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında ise Grup 5'te, P11-4 porların tıkanmasını sağlamış homojen yüzey meydana getirmiş aynı zamanda lizozimler kendi arasında ayrıca yüzeyde kümeleşmiştir. Bu da gerçek ağız ortamında P11-4'ün biyomimetik görevini yerine getirirken aynı zamanda lizozimlerin kendi arasında kümeleşerek diş yüzeyini kaplamasıyla antibakteriyal etkinlik sağlanması açısından iyi bir göstergedir.

Tez çalışmasında Grup 6'da, hem demineralize hem de remineralize olmuş bölgeleri CMC ve lizozimin birlikte kapladığı, remineralize bölgelerde lizozimin kümeleştiği gözlemlenmiştir. Song ve ark. (200) 2021 yılında, tez çalışmamıza benzer şekilde demineralize mine üzerinde aprizmatik mine tabakası oluşturmak amacıyla CMC, ACP ve lizozim içerikli, ACP'nin lizozim ve CMC ile kapsüle edildiği jel üretmişlerdir. SEM görüntülemesinde mine üzerinde CMC-ACP ve lizozimin ile nanoküreler halinde mine prizmaları boyunca katman katman biriktiğini, demineralize olmuş mine yüzeyinin, yoğun bir aprizmatik mine benzeri bir tabaka ile tamamen kaplandığını ve rejeneratif kristallerin morfolojisinin ve düzeninin, aprizmatik mineye benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Grup 6'da bu çalışmadan farklı olarak saf CMC uygulandığı için yeniden tamamen aprimatik bir mine oluşumu gözlenmemekte, mine yüzeyinde ara ara demineralize profil belirgindir. Song ve ark. (289) 2018 yılında CMC, ACP ve lizozim içerikli, ACP'nin lizozim ve CMC ile kapsüle edildiği, kontrollü-yavaş iyon salımı ile dentinde biyomimetik etki yaratmayı amaçladıkları bir jel üretmişler ve jelin morfolojisini TEM, jeldeki elementlerin dağılımını EDX, demineralize dentin tübülleri üzerindeki etksini ise SEM ve XRT ölçümleri ile değerlendirmişlerdir. SEM analizlerinde dentinin üzerinin jel ile tamamen kaplandığını ve tübüllerin 4-8 μM kadar derinlikte tıkandığını ve bu tıkanmanın dentin benzeri bir mineralizasyon ile gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu çalışmayı destekler şekilde deneyimizde mine üzerinde kompleks oluşturan CMC-lizozim demineralize alanlara entegre olmuş ve iyonları içine hapsederek yavaş salınım ile remineralizasyondan ziyade kısmen de olsa biyomimetik etki sağlamıştır.

Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi, proteinlerin yapısal değişikliklerini ve protein-ligand gibi kompleks oluşumlardaki konformasyonel değişiklikleri araştırmak için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (354). Spektral eğriler ve absorbans bantları farklı koşullar altında analiz edilerek, bir kompleks oluşumu

çözümlenebilmekte ve buna bağlı olarak indüklenen yapısal değişikliklere dair fikir edinilebilmektedir. Lizozim için genellikle UV-görünür bölge spektroskopisinde 280 nm'deki tipik absorpsiyon pikinden sorumlu ana aromatik amino asit kalıntılarını tirozin, fenilalanin ve triptofan oluşturmaktadır. En büyük katkıyı ise triptofan sağlamaktadır (355). Tez çalışmasında da UV-görünür bölge spektrofotometre cihazında lizozim için tipik olan iki ana zirve görülmüştür. Lizozimin maksimum absorpsiyon bandı 281,8±0,28 nm'de olmak üzere, 276,13±0,09 ve 290,4±0,18 nm dalga boylarında iki karakteristik absorpsiyon bantları vermiştir. Lizozimin ortalama 281 nm maksimum absorpsiyon bandı, proteinin genel yapısının korunup korunmadığı hakkında bilgi verirken; 290,4 nm ve 276,13 nm bantları, lizozimin aromatik amino asitlerinin çevresel faktörlere veya diğer moleküllerle etkileşime duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu zirvelerin yoğunluğunda veya konumunda değişiklik meydana gelmesi ise genel olarak yapıda meydana gelen değişiklikler, denatürasyon ya da lizozim-ligand oluşumunu göstermektedir (356). Wang ve ark. (357) 2010 yılında, bisfenol A'nın lizozim ve tripsin ile etkileşimlerini UV-görünür bölge spektroskopisi ile incelemişlerdir. Lizozimin UV absorbsiyonu 218 nm'de güçlü bir band ve 280 nm'de maksimuma sahip zayıf bir band görmüşlerdir. Bisfenol A'nın eklenmesi ile birlikte, lizozimin UV bölgesindeki zirvelerinin 237 nm'ye kaydığını ve absorbsiyonu belirgin şekilde azaldığını gözlemlemişler ve bisfenol A ile lizozim arasında güçlü bir bağlanma ve yüksek bir afinite olduğu sonucuna varmışlardır. Tez çalışmasında ise CMC, UV-görünür bölge spektrofotometre cihazında CMC, 240-400 nm dalga boyu aralığında herhangi bir absorpsiyon bandı vermemiştir. Fakat CMC ile lizozimin inkübasyonu sonucu UV spektrumu elde edilen kompleksin ise maksimum absorpsiyon bandı 280,8±0,18 nm'ye kaymış, diğer karakteristik bantlardan biri 290,2±0,16 nm'ye kayarken diğeri 276,2±0,24 nm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca reaksiyon sonucu oluşan kompleksin absorbansında ciddi bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum kompleksin lizozime atfedilen UV absorbsiyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Huang ve ark. (358) 2016 yılında gümüş iyonlardan, kuatenerize CMC kullanılarak etkili ve basit bir yöntemle gümüş nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve yapısının karakterize edilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, UV-görünür bölge absorbsiyonunda kuatenerize CMC'nin 300–600 nm aralığında hiçbir tepe noktası göstermediğini, ancak gümüş iyonları ile birleştirildiğinde 405 nm'de karakteristik absorbsiyon bandını gösterdiğini gözlemleyerek gümüş iyonlarının indirgenerek CMC içinde gümüş nanopartiküllerini

oluşturduğunu göstermişlerdir. CMC'nin UV absorpsiyonunun zayıf olması, yapısında konjuge sistemler veya aromatik gruplar gibi UV ışığını güçlü bir şekilde absorbe eden fonksiyonel grupların bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Polimer yapısı nedeniyle CMC, özellikle UV aralığında (200-400 nm) anlamlı bir pik göstermemektedir (359). Wei ve ark. (360) 2013 yılında ciltte hiperpigmentasyonu engellemesi için tirozinaz enzimini inhibe eden Ile-Gln-Ser-Pro-His-Phe-Phe polipeptitlerden oluşan kendiliğinden birleşen bir peptit üretmişlerdir. UV ışınımı öncesinde peptit çözeltisinin UV-görünür bölge spektrumunda, 230 ve 260 nm'de peptidin aromatik kalıntılarına işaret eden iki absorpsiyon zirvesi gösterdiğini, UV ışığına maruz kalındıktan sonra ise zirvelerde belirgin bir kayma veya genişleme olmadığını gözlemlemişlerdir. Tez çalışmasında ise P11-4 ve lizozim ayrı ayrı incelendiğinde her ikisinin de UV spektrumunda benzer maksimum absorpsiyon dalga boyları sergilemiş (yaklaşık 280-281 nm), P11-4 ile lizozim kompleksinin spektral özelliklerinde küçük kaymalar meydana gelmiştir. Bu bulgu, P11-4 ve lizozim arasındaki etkileşimin UV absorpsiyon spektrumunda minimal bir değişiklik yarattığını göstermektedir.

Moleküler kenetlenme gibi çeşitli *in-siliko* tekniklerin geliştirilmesiyle, diş materyalleri ve biyolojik dokular arasında veya protein-madde arasındaki etkileşimlerin moleküler boyutta incelenerek bağlanma bölgeleri ve enerjileri gibi daha ayrıntılı verilerin elde edilmesi mümkün hale gelmiştir (361). Afiyah ve ark. (362) 2024 yılında CMC'nin zerdaçalın ana maddesi olan kurkumin ve B3 vitamini bileşeni olan nikotinamid ile etkileşimine baktıkları çalışmada CMC'nin iki madde ile olan etkileşimlerinin daha çok hidrojen bağları ile gerçekleştiğini ve bağlanma enerjilerini CMC-kurkumin -17,08 kJ/mol, CMC-nikotinamid -12,05 kJ/mol şeklinde bularak bileşiğin önemli bir kararlığa sahip olduğunu göstermişlerdir. Carvalho ve ark. (363) 2023 yılında P11-4'ün tip 1 kollajen ile etkileşimini moleküler kenetlenme analizi kullanılarak araştırmışlardır. Oluşan P11-4/kollajen modelinde P11-4'ün β-tabaka konformasyonunda tip I kollajenin KGHRGFSGL motifine spesifik olarak bağlandığı ve kollajen zincirleri ile güçlü etkileşimler oluşturduğu ortaya konulmuştur. Türkoğlu ve ark. (253) 2024 yılında lizozim ve tannik asidin etkileşimine baktıkları çalışmada elde edilen moleküler kenetlenme sonucuna göre tannik asidin yoğun bir van der Waals ve elektrostatik etkileşimler ile kovalent hidrojen bağları ağı oluşturarak lizozim ile etkileşime girdiğini ve lizozimin aktif bölgesindeki yarığı doğrudan bloke ederek protein ile sıkı bir etkileşime girdiğini göstermişlerdir. Sayğı ve ark. (260) β-sitosterolün

lizozim ile olan etkileşimine baktıkları çalışmadaki moleküler kenetlenme sonucu lizozim ve β-sitosterolün arasında kovalent hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve van der Waals etkileşimlerinin oluştuğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmamızda ise P11-4 ve CMC'nin lizozim ile moleküler kenetlenme analizleri sonucunda sırasıyla bağlanma enerjileri -5,46±0,38 kcal/mol ve -7,3±0,00 kcal/mol olarak bulunmuş, Türkoğlu ve ark.'ın tannik asit ve Saygı ve ark.'ın β-sitosterol çalışmaları ile kıyaslandığında CMC lizozime β-sitosterolden daha iyi, tannik asite göre ise daha kötü bağlanmıştır (253,260). Tez çalışmamızda CMC'nin lizozime P11-4'ten daha iyi bir enerji ile bağlandığı görülmüştür. Lizozimin neredeyse bütün aktif amino asitleri CMC'yi çevrelemiş ve CMC-lizozim kompleksi arasında van der Waals ve hidrojen bağları ile sağlanan yoğun bir etkileşim ağı oluştuğu gözlemlenmiştir. P11-4-lizozim kompleksinde ise üç adet aktif amino asit ile birbirini iten bir etkileşim gözlemlenmiştir ve P11-4'ün büyük bir kısmının dışarıda kalıp lizozimin aktif bölgesini etkili bir şekilde işgal edememesi, ligandın protein ile etkili bir etkileşime giremediğini göstermiştir. Bu sebeplerle CMC çevresinde oluşan kovalent bağlar ile yoğun van der Waals etkileşim ağı, CMC'nin lizozime P11-4'ten daha iyi bir bağlanma eğilimi göstermesini açıklayabilir. P11-4 ve CMC'nin lizozim ile olan biyoaktivite deneyleri de moleküler kenetlenme sonuçlarını destekler niteliktedir.

Yüzey plazmon rezonans, gerek ağız ortamının ve dişin taklidine imkan sunan gerekse hastalardan alınan belirli hücreler kullanarak canlı etkileşim süreçlerini doğrudan gözlemleme imkanı sağlayan yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Türkoğlu ve ark. (253) 2024 yılında yemek endüstrisinde kullanılan ve aynı zamanda çay ve şarap gibi içecekler içinde bulunan tannik asidin ağız içinde lizozim ile etkileşiminin olabileceği hipoteziyle yaptıkları çalışmada lizozim ve tannik asidin etkileşimlerini moleküler kenetlenme, moleküler dinamik simülasyonları ve SPR analizi ile incelemişlerdir. SPR'de 20-150 μM arasında farklı derişimlerde tannik asit ile immobilize lizozim arasındaki Denge Sabiti (K_D) değerini 41,7 μM olarak tespit edilmiş ve bu iki madde arasındaki etkileşimin orta derecede bir afiniteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Saygı ve ark. (260) 2024 yılında bitkilerde, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan bir sterol olan β-sitosterolün lizozim ile olan etkileşimini yine aynı parametreler ile incelemişler ve SPR'de 20-150 μM arasında farklı derişimlerde β-sitosterol ile immobilize lizozim arasındaki K_D değerini 71,34±9,79 μM olarak tespit etmişlerdir. Vornicescu ve ark. (335), altın çip yüzeyini hidroksiapatit ile kaplayarak

SPR için yapay bir diş modeli oluşturmuşlar ve tükürükte bulunan ve pelikıl formasyonunda görev alan yüksek molekül ağırlıklı müsin olan MG1'in hidroksiapatit ile etkileşimini tespit etmek için için %5-%100 derişimlerde tükürük kullanarak ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sensorgramda iki aşamalı bağlanma olduğunu, ilk olarak altın yüzeye bağlanmanın, proteinlerin adsorpsiyonuna karşılık gelen sabit hızda bir bağlanma süreci gibi olduğunu, bunu takiben, bağlı proteinlerin yeniden organizasyonu nedeniyle pelikıl oluşum sürecinin olgunlaşmasını temsil eden ikinci bir aşama gerçekleştiğini tespit ederek, pelikıl ve diş yüzeyi arasındaki etkileşimi göstermişlerdir. Vorninescu ve ark. (364) 2015 yılında yaptıkları çalışmada dental pelikıl ve *S. mutans* arasındaki etkileşimleri gözlemlemek için SPR kullanmışlardır. Hidroksiapatit kaplı altın çip yüzeyine gerçek tükürük uygulanıp 30 dk boyunca yüzeyde pelikıl oluşumu beklenilmiş ardından çip yüzeyi *S. mutans*'a maruz bırakılmıştır. Elde edilen sensorgramda ilk bağlanma eğrisi, tükürük proteinlerinin hidroksiapatit kaplı yüzeye hızlı bir şekilde bağlanması olarak görülmüş, ikinci bağlanma eğrisinde *ise S. mutans*'ın yüzey ile etkişimi ve 2 saat sonunda bu bağlanmanın en yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Tez çalışmamızda SPR deneyi sonucunda Türkoğlu ve ark.'ın çalışmalarını destekler şekilde CMC'nin artan miktarlarda lizozim ile kaplanmış altın çip yüzeyinden geçerken SPR sinyalinde artış gözlemlenmiştir. P11-4 ile immobilize lizozim arasında ise anlamlı SPR etkileşim sinyalleri elde edilememiştir. *In-siliko* çalışmalardan elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak P11-4 ile immobilize lizozim arasındaki etkileşimin doğası elektrostatik ve hidrofobik temellidir. SPR profilinde herhangi bir değişiklik olmadığından anlamlı bir SPR sinyali üretilememesinin nedeni; (i) iki biyomolekül arasında meydana gelen zayıf ve/veya geçici etkileşimin anlamlı bir sinyal oluşturamaması ve (ii) P11-4'ün etkileşim kurabileceği bağlanma amino asit residularının lizozim proteinin immobilize edilme sürecinde fonsiyonel ara faz ile etkileşen bölgede kaldığından yönelim kaynaklı bir bağlanmama durumu ortaya çıkmasından kaynaklanabilir.

Yüzey plazmon rezonansı ile iki molekül arasındaki afinitenin belirlenmesinde analit olarak yüzeydeki yapı ile etkileşecek molekülün homojen bir yapıda olması ideal olandır (365). Normalde bitki ekstreleri gibi birçok biyolojik bileşen içeren maddelerde SPR sensorgramlarında K_D değerini mg/mL gibi birimlerle vermek genellikle daha doğrudur (366). Ancak, tezde kullanılan ve genellikle ticari olarak elde edilen CMC'nin komplike moleküler yapısı ve birden fazla alt grup barındırması sebebiyle CMC'nin

molekül ağırlığı çok değişken olabilmektedir (367). Bu durum, belirli K_D değerinin güvenilirliğini zorlaştırabilir. Bu nedenle SPR bağlanma etkileşimlerinin izlendiği çalışmalardaki homojenliğin sağlanamadığı durumlarda K_D değerini mg/L yerine doğrudan bağlanma eğilimi (örneğin SPR'de rezonans yanıtı) ölçmek daha uygundur (368). Bu nedenle tez çalışmasında bağlanma profili veya SPR yanıtı (RU cinsinden) gibi daha genel bağlanma ölçüm sonuçlarını sunmak tercih edilmiştir.

M. lysodeikticus ile yapılan testler, lizozim enziminin aktivitesini yüksek bir hassasiyetle ve özgüllük ile belirleyebilmektedir (343). Literatürde lizozim aktivitesinin değerlendirildiği çalışmalar, çalışmamızı destekler şekilde lizozimin *M. lysodeikticus* bakterilerini parçalanması sonucu meydana gelen absorbanstaki azalma ile ölçülmüştür (343,344,369). Chifor ve ark. (344) 2022 yılında titanyum oksit nanopartiküllerinin gümüş, altın ve lizozim ile modifiye edilmesiyle implantlar için antibakteriyel özelliklere sahip kaplamalar geliştirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada lizozimin enzimatik aktivitesi, *M. lysodeikticus* bakterilerinin parçalanmasıyla ölçülmüş ve 450 nm'deki absorbansın azalması izlenmiştir. Ölçülen absorbansdaki azalma miktarlarına göre modifiye edilmiş yüzeylere kaplanan lizozimin antibakteriyel etki gösterdiği, ancak serbest lizozime kıyasla daha yavaş bir tepki verdiği bulunmuştur. Hannig ve ark. (369) 2006 yılında altın, titanyum, amalgam, seramik, kompozit ve rezin üzerinde lizozimin aktivitesini inceledikleri çalışmada, lizozim aktivitesini *M. lysodeikticus* bakterilerinin parçalanmasıyla ölçerek 400 nm dalga boyundaki absorbans azalmasına yoğunlaşmışlardır. Çalışmanın sonucunda lizozim aktivitesini tüm örneklerde gözlemlemişler, yüzeye bağlı iken lizozim aktivitesini ortalama 5,04 ± 1,55 U/cm², yüzeyden ayrıyken de 18,71 ± 5,56 U/cm² olarak ölçmüşler ve yüzeylerin pelikıla bağlı haldeki lizozim aktivitesine büyük bir etkisi olmadığı göstermişlerdir. Hannig ve ark. (343) 2005 yılında ağzın farklı bölgelerinin ve pelikıl oluşum süresinin lizozim aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmada, 5 mm çaplı mine levhaları deneklerin yanak ve ağız bölgelerine sabitlemişlerdir. Bu levhalar, 3 ve 30 dk süreyle bekletilmiştir. Pelikıl oluşumundan sonra levhalar üzerindeki lizozim aktivitesi *M. lysodeikticus* kullanılarak belirlenmiştir. 3 dk bekletilen levhadaki pelikılda bulunan lizozim aktivitesini 13,54 ± 11,42 U/cm², 30 dk bekletileni ise 16,08 ± 12,81 U/cm² olarak bulmuşlar ve enzim aktivitesinin, pelikıl oluşum süresi veya oluşum yerinden etkilenmediğini göstermişlerdir. Literatürdeki lizozim aktivite çalışmalarında zaman, yüzey, pH gibi değişkenlerin birim alandaki lizozim aktivitesine olan etkisi incelenirken

çalışmamızda farklı olarak madde derişimine bağlı olarak IC_{50} değeri hesaplanmıştır. Bu da maddenin etki ettiği konsantrasyon aralığını tespit edebilmek açısından önem taşımaktadır (370). Çalışmamızda CMC, lizozim ile etkileşime girip ortalama 4,098±0,159 ppm derişimde lizozimin aktivitesini yarıya düşürmüştür. Yani lizozimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyon özelliği göstermiştir. P11-4 ise tam tersine lizozimi inhibe veya aktive etmemiştir. Bunun sebebi ise CMC'nin içerdiği negatif -COOH, $-NH_2$ ve -OH grupları ile lizozimin pozitif yüklü aminoasit bölgeleri arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler lizozimin aktif bölgesinde yer alan substrat bağlanma bölgelerini etkileyebilir ve bu şekilde enzim aktivitesini inhibe edebilirler (289). P11-4'ün yapısı ise lizozimin aktif bölgesi ile herhangi bir aktivite gerçekleştirecek şekilde etkileşime girmeye uygun gözükmemektedir. Sonuç olarak lizozimin aktif bölgesiyle doğru bir geometri oluşturamamakta, aktif bölgede etkili bir kenetlenme gerçekleşmediğinden herhangi bir inhibisyonun ya da aktivasyon gözlenememektedir.

Son yıllarda protein sentezindeki ilerlemeler sayesinde, proteinler ve peptitler artık en hızlı büyüyen farmasötik sınıflardan birini temsil etmektedir. Doğal proteinlerin kimyasal yapısını değiştirebilme yeteneği, daha stabil, yüksek özgüllük ve etkililik gösteren, düşük toksisite içeren analogların geliştirilmesine olanak tanımaktadır (155). Bu da lizozim gibi proteinlerin ağız diş sağlığı alanındaki ürünlere entegre edilerek hem tükürüğün antimikrobiyal etkinliği gibi savunma mekanizmasından faydalanılması hem de çürüğün engellenmesi ya da tedavisi için gerekli ürünlerle birarada kullanılabilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır. Altın ve ark. (132) yaptıkları çalışmada lizozim ve laktoferrin içeren yapay tükürük formunun *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkilerini lizozim/laktoferrin içermeyen yapay tükürük ile karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada yapay tükürükte 4 saat bekletilen hidroksiapatit disklerinde *S. mutans* kolonizasyonunu incelemiş, lizozim/ laktoferrin içermeyen grupta 400.000-600.000 CFU/mL ve lizozim/laktoferrin gruplarında ise 200.000 CFU/mL'nin altında *S. mutans* tespit edilmiş ve anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir. Barbe ve ark. (152) 2016 yılında yaptıkları çalışmada lizozim içerikli GUM Hydral ve Biotène Oralbalance markalarının ağız gargarası ve jel versiyonlarının ağız kuruluğu olan hastaların klinik semptomları üzerindeki etkinliğini belirlemişlerdir. 40 hasta 28 gün boyunca ağız gargaralarını ve jelleri kullanmış, 28 gün sonunda 2 grupta da yutma güçlüğü, halitosis, plak indeksi skorlarında anlamlı bir azalma görülmüştür. Tez çalışmamızda ise elde ettiğimiz

bulgular özellikle CMC'ye göre P11-4 materyali lizozimle etkileşime girip lizozimin aktivitesini inhibe etmediği için hem biyomimetik hem de antibakteriyal etkinliğe sahip ürünler üretilebileceği konusunda zemin hazırlamıştır.

Bakteriyel kolonizasyonun azaltılması, çürüğün engellenmesi gibi amaçlarla kompozitlere ve mukoadeziv özellikte yapılara lizozim, kitosan, flor, CMC gibi antibakteriyal veya remineralize edici ajanların eklenerek ağız içinde kontrollü salım yapan ürünler çürüklerin oluşumunu azaltmada potansiyel araçlardır (371). Polat ve ark. (372) 2016 yılında çürük önleyici pH duyarlı kontrollü flor salım sisteminin *S. mutans*'a karşı antimikrobiyal etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, 9, 30 ve 45 mg sodyum florür içeren kitosan, flor ve Eudragit polimerini içeren yapı oluşturmuşlardır. Florun kontrollü bir şekilde salımının *S. mutans* üzerindeki etkisini değerlendirmek için standart yüzey alanına sahip test diskleri hazırlamışlardır. pH 5,5'in altına düştüğünde polimerik yapıdan florür salımı başladığı ve özellikle 30 ve 45 mg florür salımında 8. saatte *S. mutans* sayısının sıfırlandığı, 9 mg florürde ise 24. saatte sayının sıfıra indiğini tespit etmişlerdir. Edmans ve ark. (155) terapötik proteinlerin oral mukozaya taşınıp kontrollü ilaç salımı oluşması için lizozimi polimer nanoliflerine entegre etmişler ve ağız ortamında mukoadezyon özelliği olan bantlar üretmişlerdir. Lizozim içerikli mukoadeziv bantların ilaç salımını 2 saat boyunca ölçmüşlerdir. Bantlar içinde elde edilen lifli membranlar, klinik olarak arzu edilen bir hızda lizozim salımı sağlamış ve 2 saat sonunda %90 ± 13 kümülatif salıma ulaşmışlardır. Ayrıca lizozim enzim aktivitesini korunma oranını ise %96,1 ± 3,3 olarak bulmuşlar, böylelikle lizozimin kontrollü ilaç salımı yaparken aynı zamanda enzimatik özelliklerini kaybetmediğini, lizozimin ağız ortamında kontrollü ilaç salımında kullanılabilecek ideal özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir. Xu ve ark. (373) 2020 yılında periodontal hastalıkların tedavisi için CMC kullanılarak doksisiklin taşıyıcılı polielektrolit kompleks nanoparçacıkları hazırlanmıştır. Bu nanoparçacıkların *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)'e karşı bakteriyostatik etkisini ve insan diş eti fibroblastlarında NLRP3 inflamasyonu ve interlökin-1β ile ilişkili gen ve proteinlerinin regülasyonuna olan etkisini incelemişlerdir Çalışma sonucunda *P. gingivalis*'in güçlü bir şekilde inhibe edildiğini, ayrıca, nanoparçacıkların NLRP3 inflamasyonu ve interlökin-1β'nın hem gen hem de protein seviyelerini etkili bir şekilde aşağı regüle ettiğini göstermişlerdir. Tez çalışmamızdan ve literatürden yola çıkıldığında CMC hem biyomimetik bir ajan olarak hem de taşıyıcı bir ajan olarak kullanılabilen bir ajandır. Lizozimle etkileşime girip

belirli derecede lizozimi inhibe etme özelliği gösterse de lizozimle etkileşime girmeyecek şekilde modifiye edildiğinde lizozim ile birlikte kullanılabilirliği açısından ümit vaadedebilir.

Tez çalışmamızda elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde ve literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen bulgular P11-4 ve CMC'nin biyomimetik bir materyal olarak uygulandığında materyallerin diş üzerine etkisi, lizozim üzerine etkisi ve P11-4-lizozim/CMC-lizozim içerikli hem diş yüzeyini onaran hem de *S. mutans* gibi çürük yapıcı bakterilere karşı antibakteriyal etki gösterebilen ürünlerin geliştirilmesi olmak üzere üç açıdan değerlendirilebilmektedir:

P11-4 demineralize mine yüzeyinde biyomimetik açıdan mine onarımını sağlayan ideal bir materyaldir. Tez çalışmasında mine yüzey karakterizasyonunda biyomineralizasyon ve biyomimetik açıdan en ideal sonuçlar P11-4 ile elde edilmiştir. CMC'de mine onarımını gerçekleştirmiştir. Fakat P11-4 kadar ideal şekilde minenin taklit edilip, tüm demineralize alanların yok olduğu bir etkisi gözlemlenmemiştir. Fakat CMC mine yüzeyinde yarattığı bu etki ile biyomimetik açıdan ümit vaadeden bir materyaldir.

Tez çalışmasında lizozimin CMC ve P11-4 ile biyoetkileşim ve biyoaktivitesi SPR, moleküler kenetlenme, UV-görünür bölge analizi ve *M. lysodeikticus* bakterilerinin inhibisyonu ile değerlendirilmiştir. Tüm parametreler sonucunda CMC'nin lizozim ile etkileşime girdiği, bu etkileşimin de CMC'nin lizozimin aktif bölgesine bağlanarak gerçekleştirdiği ve bu etkileşim sonucunda lizozimde belirli derecede inhibisyon meydana geldiği gözlemlenmiş, P11-4'ün anlamlı derecede lizozim ile etkileşime girmediği hatta lizozimi etkili bir şekilde inhibe etmediği gözlemlenmiştir. Bu veriler lizozim ve materyal etkinliği açısından P11-4'ün CMC'ye göre avantaja sahip olabileceğini göstermektedir. CMC diş yüzeyine uygulandığında lizozimle etkileşime girerek lizozimin etkinliğini belirli seviyede inhibe edeceği elde edilen sonuçlardan görülmektedir. Fakat ağız ortamında tükürüğün diğer antimikrobiyal savunma mekanizmaları ve içerikleri göz önünde bulundurulduğunda meydana gelen inhibisyonun totalde tükürüğün savunma mekanizmasını ne derecede etkileyeceği konusunda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. P11-4'ün ise diş yüzeyine uygulandığında lizozimin etkinliğine negatif anlamda etkide bulunmayıp, kendi biyomimetik etkinliğini de aynı anda gerçekleştirebileceği görülmektedir.

P11-4-lizozim/CMC-lizozim içerikli biyomimetik ve antibakteriyal etkili ürün geliştirme çerçevesinde ise; tez çalışmamızda yapay tükürük ve lizozim içeren gruplarda P11-4 grubunda lizozim mine yüzeyinde kümeleşme gösterirken, CMC grubunda ilgili madde lizozim ile birleşerek mine yüzeyine ve demineralize mine yüzeyine dağılım göstermiştir. Bu da biyoetkleşim ve biyoaktivite parametrelerimizi destekler şekilde aslında lizozimin mine yüzeyinde P11-4 ile etkileşime girmediğini, CMC'nin ise tam tersi etkileşime girdiğini göstermektedir. CMC lizozim ile anlamlı derecede etkileşime girip, lizozimin etkinliğini inhibe etme kapasitesine sahip olduğundan CMC modifiye edilerek lizozimi inhibe etmeyecek şekilde bir biyomimetik-antibakteriyal ürün üretilebilir veya CMC-lizozim etkileşiminden literatürde olduğu gibi diş yüzeyinde biyomimetik remineralizasyon oluşması için iyon depolayan ve yavaş iyon salımının gerçekleşmesini sağlayan bir iskele olarak faydalanılabilir. P11-4 ise lizozim ile anlamlı derecede etkileşime girmeyip lizozimi inhibe etmediği için, tez çalışmamız P11-4-lizozim veya biyomimetik ajan-lizozim temelli ağız ve diş sağlığı ürünlerinin geliştirilebilirliği açısından bir zemin oluşturmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İn-vitro ortamda demineralizasyon oluşturulan mine modelinde P11-4 ve CMC'nin mine yapısı üzerine etkilerinin hem SEM ile tespit edildiği hem de bu materyallerin lizozim ile etkileşiminin ve biyoaktivitesinin değerlendirildiği tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1) Taramalı elektron mikroskobu görüntülemesinde en iyi biyomimetik etkiyi sağlayan madde tüm gruplar arasında P11-4 olmuştur. CMC biyomimetik etki yaratmış fakat P11-4 kadar etki göstermemiştir.

2) Lizozim içeren ve içermeyen gruplar madde uygulanmayan, P11-4 ve CMC bazında kendi aralarında ikili karşılaştırıldığında biyomimetik açıdan bir fark görülmemiştir.

3) Taramalı elektron mikroskobu görüntülemesinde lizozim içeren yapay tükürük gruplarında, P11-4'ün uygulandığı grupta lizozim kümelenmeleri görülürken, CMC'de ise lizozimin CMC ile biraraya gelerek mine yüzeyinde dağılım yaptığı görülmüştür.

4) Ultraviyole-görünür bölge spektrospisinde 280 ppm lizozim, maksimum absorpsiyon bandını 281,8±0,128 nm'de olmak üzere, 290,4±0,18 ve 276,13±0,09 nm dalga boylarında karakteristik absorpsiyon bantları vermiştir. CMC ile lizozimin inkübasyonu sonucu oluşturduğu kompleksin, UV absorpsiyon pikleri 290,2±0,16 ve 280,8±0,18 nm'ye kaymış diğer absorpsiyon piki ise 276,2±0,24 nm olarak değişmiştir. CMC, lizozim ile etkileşime girerek absorbanslarda değişme meydana getirmiştir.

5) Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisinde P11-4 ile lizozimin inkübasyonu sonucu oluşan kompleks, maksimum absorpsiyon bandını 281.13±0.30 nm'de ve diğer karakteristik bandını 289.0±0.00 nm'de vermiştir.

6) Tez çalışmamızda ise P11-4 ve CMC'nin lizozim ile moleküler kenetlenme analizleri sonucunda sırasıyla bağlanma enerjileri 5,46±0,38 kcal/mol ve -7,3±0,00 kcal/mol olarak bulunmuş, CMC'nin lizozime P11-4'ten daha iyi bir enerji ile bağlandığı görülmüştür.

7) Karboksimetil kitosan-lizozim kompleksi arasında van der Waals ve hidrojen bağları ile sağlanan yoğun bir etkileşim ağı oluştuğu gözlemlenmiştir.

8) P11-4-lizozim kompleksinde ise üç adet aktif amino asit ile birbirini iten bir etkileşim gözlemlenmiştir. P11-4'ün lizozim ile etkili bir etkileşime girmemiştir.

9) Yüzey plazmon rezonansdan elde edilen sensorgramdan artan CMC derişimlerinde artan sinyaller görülmüş, lizozim maruziyeti sonunda sinyalin belli bir dengeye ulaştığı ve net RU değerlerinden CMC moleküllerinin lizozim yüzeyine bağlı kaldığı ve etkileşim meydana geldiği görülmüştür. İmmobilize lizozim yüzeyinden CMC'nin ayrışma düzeyi ayrıca iki molekül arasında tersinir bir etkileşim olduğuna da işarettir.

10) P11-4 ile immobilize lizozimin SPR bağlanma etkileşim çalışmalarında ise P11-4'ün immobilize lizozim yüzeyine enjekte edilmesi sonucu elde edilen SPR sensorgramlarında anlamlı bir SPR sinyali elde edilememiştir. Lizozim ile P11-4 etkileşimi anlık olarak izlenememiştir.

11) Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometrisinde *M. lysodeikticus* lizisi sonucu oluşan absorbans farkına göre CMC'nin IC_{50} değeri ortalama 4,098±0,159 ppm olarak hesaplanmış, CMC lizozimin aktif bölgesinden bağlanarak lizozimde inhibisyon etkisi göstermiştir.

12) P11-4 artan derişimlerde biyoaktivite çalışmasına olanak vermediğinden biyoaktivitesi % aktivite olarak tespit edilmiş ve P11-4'ün artan derişimlerde lizozim enzimi üzerine anlamlı derecede bir inhibisyonu olmamıştır.

13) Karboksimetil kitosan diş yüzeyine uygulanabilir biyomimetik bir materyal üretilmesi açısından ümit vadetmektedir.

14) CMC diş yüzeyine uygulandığında tükürükteki lizozimi inhibe edebilir fakat totalde tükürüğün antibakteriyal kapasitesine ne derecede etki edeceği bilinmemektedir. Bu nedenle daha fazla *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

15) Karboksimetil kitosan lizozim ile anlamlı derecede etkileşime girip, lizozimin etkinliğini inhibe etme kapasitesine sahip olduğundan CMC modifiye edilerek lizozimi inhibe etmeyecek şekilde bir biyomimetik-antibakteriyal ürün üretilebilir.

16) P11-4 diş üzerine uygulandığında tükürük içerisindeki lizozimi inhibe etmeyebilir.

17) Biyomimetik amaçlı üretilen P11-4 lizozim ile etkileşime anlamlı derecede girmediği ve lizozimi inhibe etmediği için lizozimle kombine edilerek biyomimetik-antibakteriyal ürün üretilmesi açısından ümit vadetmektedir.

KAYNAKLAR

1. Neel, E., 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,*11, 4743-4763. https://doi.org/10.2147/IJN.S107624.
2. Mohamad Saberi, F. N., Sukumaran, P., Ung, N. M., & Liew, Y. M. (2022). Assessment of demineralized tooth lesions using optical coherence tomography and other state-of-the-art technologies: a review. *BioMedical Engineering Online*, 21(1), 83. https://doi.org/10.1186/S12938-022-01055-X.
3. World Health Organization (WHO). (2022). Global Oral Health Status Report: Towards Universal Health Coverage for Oral Health by 2030: Summary of the WHO European Region. *Dental Abstracts*, 57(2), 1–120. https://www.who.int/team/noncommunicable-diseases/global-status-report-on-oral-health-2022.
4. Edikli, Ş., & Akal, N. (2021). Başlangıç çürük lezyonlarının kendiliğinden birleşen peptit P11-4 sistemi ile biyomimetik remineralizasyonu. *Türkiye Klinikleri Çocuk Diş Hekimliği - Özel Konular,* 7(1), 56–62.https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-baslangic-curuk-lezyonlarinin-kendiliginden-birlesen-peptit-p11-4-sistemi-ile-biyomimetik-remineralizasyonu-92347.html.
5. Ten Cate, J. M. (2008). Remineralization of deep enamel dentine carries lesions. *Australian Dental Journal*, 53(3), 281–285. https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2008.00063.X.
6. Goswami, S. (2018). Biomimetic dentistry. *Journal of Oral Research and Review*, 10(1), 28. https://doi.org/10.4103/JORR.JORR_3_17.
7. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides--a clinical safety trial. *British Dental Journal*, 215(4), e6. https://doi.org/10.1038/SJ.BDJ.2013.741.
8. Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., & Aggeli, A. (2007). Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *Journal of Dental Research*, 86(5), 426–430. https://doi.org/10.1177/154405910708600507.
9. Kind, L., Stevanovic, S., Wuttig, S., Wimberger, S., Hofer, J., Müller, B., & Pieles, U. (2017). Biomimetic remineralization of carious lesions by self-assembling peptide. *Journal of Dental Research*, 96(7), 790–797. https://doi.org/10.1177/0022034517698419.
10. Müller, W. E. G., Tolba, E., Schröder, H. C., Neufurth, M., Wang, S., Link, T., Al-Nawas, B., & Wang, X. (2015). A new printable and durable N, O-carboxymethyl chitosan-Ca^{2+}-polyphosphate complex with morphogenetic activity. *Journal of Materials Chemistry. B*, 3(8), 1722–1730. https://doi.org/10.1039/C4TB01586J.
11. Wang, Z., Su, J., Ali, A., Yang, W., Zhang, R., Li, Y., Zhang, L., & Li, J. (2022). Chitosan and carboxymethyl chitosan mimic biomineralization and promote microbially induced calcium precipitation. *Carbohydrate Polymers*, 287, 119335. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119335.
12. Li, Z., Zeng, Y., Ren, Q., Ding, L., Han, S., Hu, D., Lu, Z., Wang, L., Zhang, Y., & Zhang, L. (2023). Mineralization promotion and protection effect of carboxymethyl chitosan biomodification in biomimetic mineralization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 234, 123720 https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123720.
13. Eylül, D., Sağlık, Ü., Yüksek, M., Ağız, O., Sağlığı, D., İzmir-Türkiye, P., İnciraltı, P. (2018). Çocuklarda diş çürüğü ve etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,* 32(3), 219–226. https://doi.org/10.5505/DEUTFD.2018.70883.
14. Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, P. D., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, B. R., & Reynolds, E. C. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 13(4), 547–564. https://doi.org/10.1007/S10989-007-9109-9.
15. Li, D., Zhu, M., Xu, C., Chen, J., & Ji, B. (2011). The effect of Cu^{2+} or Fe^{3+} on the noncovalent binding of rutin with bovine serum albumin by spectroscopic analysis. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 74–79. https://doi.org/10.1016/J.SAA.2010.08.069.
16. Das, S., Langbang, L., Haque, M., Belwal, V. K., Aguan, K., & Singha Roy, A. (2021). Biocompatible silver nanoparticles: An investigation into their protein binding efficacies, anti-bacterial effects and cell cytotoxicity studies. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(4), 422–434. https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2020.12.003.

17. Stahelin, R. V. (2013). Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions. *Molecular Biology of the Cell*, 24(7), 883–886. https://doi.org/10.1091/MBC.E12-10-0713.
18. Thavarajah, R., Ranganathan, K., & Nair, A. S. (2012). Saliva and dental practice. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 1(2), 72–76. https://doi.org/10.4103/2277-8632.98328.
19. Dodds, M., Roland, S., Edgar, M., & Thornhill, M. (2015). Saliva a review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team*, 2(1–8), 15123. https://doi.org/10.1038/bdjteam.2015.123.
20. Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: a review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2015.03.004.
21. Diaz-Arnold, A. M., & Marek, C. A. (2002). The impact of saliva on patient care: a literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 88(3), 337–343. https://doi.org/10.1067/mpr.2002.128176.
22. Kart, Ö., & Yarat, A. (2020). Saliva as a diagnostic tool in oral diseases. *Experimed*, 10(3), 135-139. https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0042.
23. Edgar, W. M. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 172(8), 305–312. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4807861.
24. de Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. A. N., de Lima, A. A. S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 72–80. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18335122/.
25. Forcella, L., Filippi, C., Waltimo, T., & Filippi, A. (2018). Measurement of unstimulated salivary flow rate in healthy children aged 6 to 15 years. *Swiss Dental Journal*, 128(12), 962–967. https://doi.org/10.61872/sdj-2018-12-472.
26. Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778.
27. Silvers, A. R., & Som, P. M. (1998). Salivary glands. *Radiologic Clinics of North America*, 36(5), 941–966. https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70070-1.
28. Sreebny, L., & Vissink, A. (2010). *Dry mouth, the malevolent symptom: a clinical guide* (1st ed.). New York: Wiley-Blackwell.
29. Mandel, I. D. (1987). The functions of saliva. *Journal of Dental Research*, 66(2), 623–627. https://doi.org/10.1177/00220345870660S203.
30. Tenovuo, J. (1997). Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 25(1), 82–86. https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1997.tb00903.x.
31. Gutman, D., & Ben-Aryeh, H. (1974). The influence of age on salivary content and rate of flow. *International Journal of Oral Surgery*, 3(5), 314–317. https://doi.org/10.1016/S0300-9785(74)80069-4.
32. Aktaş, A., Giray, B., & Aktaş, G. (2009). Tükürük salya ; Özellikleri ve görevleri tanı açısından değeri. *ADO Klinik Bilimler Dergisi*, 3(2), 361–367. https://dergipark.org.tr/tr/pub/adoklinikbilimler/issue/54081/729865.
33. Fox, P. C. (1989). Saliva composition and its importance in dental health. *Compendium*. 13, 457-60. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2605592/.
34. Tabak, L. A. (2001). A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *Journal of Dental Education*, 65(12), 1335–1339. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780651/.
35. Kaufman, E., & Lamster, I. B. (2002). The diagnostic applications of saliva— a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 197–212. https://doi.org/10.1177/154411130201300209.
36. Aps, J. K. M., & Martens, L. C. (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, 150(2–3), 119–131. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026.
37. Madalli, V. B. (2013). Saliva- a diagnostic tool. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 11(6), 96–99. https://doi.org/10.9790/0853-1169699.
38. Pedersen, A., Sørensen, C., Proctor, G., & Carpenter, G. (2018). Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Diseases*, 24(8), 1399–1416. https://doi.org/10.1111/odi.12867.

39. Lynge Pedersen, A. M., & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80, S3–S12. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.010.
40. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., & Gaš, B. (2003). Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 24(4), 671–677. https://doi.org/10.1002/elps.200390079.
41. Guan, Y., Chu, Q., & Ye, J. (2004). Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: potential application in fast diagnosis of gout. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(7–8), 913–917. https://doi.org/10.1007/s00216-004-2848-y.
42. Guo, T., Rudnick, P. A., Wang, W., Lee, C. S., DeVoe, D. L., & Balgley, B. M. (2006). Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-Tandem MS. *Journal of Proteome Research*, 5(6), 1469–1478. https://doi.org/10.1021/pr060065m.
43. Huang, C.-M. (2004). Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 49(12), 951–962. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.06.003.
44. Siqueira, W. L., Salih, E., Wan, D. L., Helmerhorst, E. J., & Oppenheim, F. G. (2008). Proteome of human minor salivary gland secretion. *Journal of Dental Research*, 87(5), 445–450. https://doi.org/10.1177/154405910808700508.
45. Cunha-Cruz, J., Scott, J., Rothen, M., Mancl, L., Lawhorn, T., Brossel, K., & Berg, J. (2013). Salivary characteristics and dental caries. *The Journal of the American Dental Association*, 144(5), e31–e40. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0159.
46. Özkoçak, B. B., Karaarslan, E., & Aytaç, F. (2017). Salivary proteins and effects on dental caries: review. *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences*, 23(1), 56–64. https://doi.org/10.5336/dentalsci.2015-47210.
47. Pedersen, A., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117–129. https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x.
48. Nauntofte, B., & Jensen, J. (1999). Salivary secretion. İçinde Y. Tadataka & D. Alpers (Ed.), *Textbook of Gastroenterology.* Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 263-278.
49. Schenkels, L. C. P. M., Veerman, E. C. I., & Nieuw Amerongen, A. V. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 6(2), 161–175. https://doi.org/10.1177/10454411950060020501.
50. Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (1997). An optimization model for mastication and swallowing in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1389), 1715–1721. https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0238.
51. Peyron, M.-A., Gierczynski, I., Hartmann, C., Loret, C., Dardevet, D., Martin, N., & Woda, A. (2011). Role of physical bolus properties as sensory ınputs in the trigger of swallowing. *Plos One*, 6(6), e21167. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021167.
52. Emekli, N., Yarat, A., Kadir, T., Tunalı, T., Çorak, A., & Pişiriciler, R. (2008). Some proteins and enzymes in saliva. İçinde N. Emekli & A. Yarat (Ed.), *Tükürük: Histolojisi Fizyolojisi Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası.* Nobel Tıp Kitabevleri; 225-270.
53. Hamosh, M., & Burns, W. A. (1977). Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). Laboratory investigation; *a Journal of Technical Methods and Pathology*, 37(6), 603–608. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/599904/.
54. Hamosh, M., & Scow, R. O. (1973). Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 88–95. https://doi.org/10.1172/JCI107177.
55. Amerongen, A. N., & Veerman, E. (2002). Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12–22. https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x.
56. Karaoğlanoğlu, S., & Çolak, M. (2001). Tükürük akış hızı, ph ve tamponlama kapasitesi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi,* 11(2), 59-62. https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunidfd/issue/2509/32086.
57. Kivelä, J., Laine, M., Parkkila, S., & Rajaniemi, H. (2003). Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and non-pregnant women. *Archives of Oral Biology*, 48(8), 547–551. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(03)00096-7.
58. Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO_2. *Archives of Oral Biology*, 45(1), 8–12. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00119-3.

59. Bardow, A., Nyvad, B., & Nauntofte, B. (2001). Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Archives of Oral Biology*, 46(5), 413–423. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(01)00003-6.
60. Lenander-Lumikari, M., & Loimaranta, V. (2000). Saliva and dental caries. *Advances in Dental Research*, 14, 40–47. https://doi.org/10.1177/08959374000140010601.
61. Wang, Renke. (2016). Saliva and dental caries. İçinde Z. Xuedong (Ed.), *Dental Caries.* Springer Berlin Heidelberg; 59-71.
62. Mandel, I. D. (1989). The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *Journal of the American Dental Association*, 119(2), 298–304. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.1989.0211.
63. Johnson, D. A. (1987). Regulation of salivary glands and their secretions by masticatory, nutritional and hormonal factors. İçinde R. Boca (Ed.), *The Salivary System*. CBC Press; 136-155.
64. Roth, G. I., & Calmes, R. (1981). *Oral Biology*. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company.
65. Motsuo, R. (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(2), 216–229. https://doi.org/10.1177/10454411000110020501.
66. Hahn Berg, I. C., Rutland, M. W., & Arnebrant, T. (2003). Lubricating properties of the initial salivary pellicle — an AFM study. *Biofouling*, 19(6), 365–369. https://doi.org/10.1080/0892701031000161857l.
67. Grant, D. A., Stern, I. B., & Listgarten, M. A. (1988). Saliva. İçinde *Periodontics*. C.V. Mosby; 135-146.
68. Tabak, L. A. (1990). Structure and function of human salivary mucins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1(4), 229–234. https://doi.org/10.1177/10454411900010040201.
69. Eliasson, L., Carlén, A., Almståhl, A., Wikström, M., & Lingström, P. (2006). Dental plaque pH and micro-organisms during hyposalivation. *Journal of Dental Research*, 85(4), 334–338. https://doi.org/10.1177/154405910608500410.
70. Gibbins, H. L., Proctor, G. B., Yakubov, G. E., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. *Oral Diseases*, 20(7), 707–713. https://doi.org/10.1111/ODI.12194.
71. Chaudhury, N. M. A., Shirlaw, P., Pramanik, R., Carpenter, G. H., & Proctor, G. B. (2015). Changes in saliva rheological properties and mucin glycosylation in dry mouth. *Journal of Dental Research*, 94(12), 1660–1667. https://doi.org/10.1177/0022034515609070.
72. Dowd, F. J. (1999). Saliva and dental caries. *Dental Clinics of North America*, 43(4), 579–597. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10553245/.
73. Scannapieco, F., & Levine, M. (1993). Salivary mucins and dental plaque formation. İçinde W. Bowen & L. Tabak (Ed.), *Cariology for the Nineties*. University of Rochester Press; 87-105.
74. Rudney, J. D. (1995). Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 6(4), 343–367. https://doi.org/10.1177/10454411950060040501.
75. van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253. https://doi.org/10.1159/000077762.
76. McNabb, P. C., & Tomasi, T. B. (1981). Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology*, 35, 477–496. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.35.100181.002401.
77. WHO. Oral Health. WHO Fact Sheets (İnternette) Erişim 06.11.2024, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health.
78. MacHiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A., & Nyvad, B. (2020). Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by orca and cariology research group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14. https://doi.org/10.1159/000503309.
79. Rather, Dr. S. H., Kazi, Dr. S., & Kazi, Dr. S. (2020). The role of remineralizing agents used in dentistry: an update then and now. *Saudi Journal of Biomedical Research*, 5(7), 183–187. https://doi.org/10.36348/SJBR.2020.V05I07.003.
80. Batu, Ş. (2021). Tükürük fonksiyonunda yaşlanmaya bağlı görülen değişikliklerin ağız ve diş sağlığı üzerindeki etkisi. *Türkiye Klinikleri Restoratif Diş Tedavisi - Özel Konular,* 7(2), 20–26. https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-tukuruk-fonksiyonunda-yaslanmaya-bagli-gorulen-degisikliklerin-agiz-ve-dis-sagligi-uzerindeki-etkisi-96914.html.

81. İmren, A., Koruyucu, M., İnce, E. B. T., & Akıncı, M. T. (2020). Çürük aktivite testleri (derleme). *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 30(2), 330–336. https://doi.org/10.17567/ATAUNIDFD.510000.
82. Vila, T., Rizk, A. M., Sultan, A. S., & Jabra-Rizk, M. A. (2019). The power of saliva: antimicrobial and beyond. *Plos Pathogens*, 15(11), e1008058. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008058
83. Sultan, A. S., Kong, E. F., Rizk, A. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2018). The oral microbiome: a lesson in coexistence. *Plos Pathogens*, 14(1), e1006719. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006719.
84. Hof, W., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A. V., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs In Oral Science*, 24, 40–51. https://doi.org/10.1159/000358783.
85. Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D. J., Trinchieri, G., Segre, J. A., & Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*, 337(6098), 1115–1119. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225152.
86. Min, B.-M. (2023). Saliva. İçinde B.-M. Min (Ed.), *Oral Biochemistry*. Springer; 99-124.
87. Koga-Ito, C. Y., Martins, C. A. P. de, Balducci, I., & Jorge, A. O. C. (2004). Correlation among mutans streptococci counts, dental caries, and IgA to Streptococcus mutans in saliva. *Brazilian Oral Research*, 18(4), 350–355. https://doi.org/10.1590/S1806-83242004000400014.
88. Smith, D. J., Taubman, M. A., & Ebersole, J. L. (1979). Effect of oral administration of glucosyltransferase antigens on experimental dental caries. *Infection and Immunity*, 26(1), 82-84. https://doi.org/10.1128/IAI.26.1.82-89.1979.
89. Lagerlöf, F., & Oliveby, A. (1994). Caries-protective factors in saliva. *Advances in Dental Research*, 8(2), 229–238. https://doi.org/10.1177/08959374940080021601.
90. Murdoch, C. C., & Skaar, E. P. (2022). Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 20(11), 657–670. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6.
91. Adlerova, L., Bartoskova, A., & Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Journal of Veterinary Medicine*, 53(9), 457–468. https://doi.org/10.17221/1978-VETMED.
92. Baker, E. N. (2005). Lactoferrin: a multi-tasking protein par excellence. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2529–2530. https://doi.org/10.1007/S00018-005-5366-Y.
93. Hoogendoorn, H., Piessens, J. P., Scholtes, W., & Stoddard, L. A. (1977). Hypothiocyanite ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. I. Identification of the inhibiting compound. *Caries Research*, 11(2), 77–84. https://doi.org/10.1159/000260252.
94. Riva, A., Puxeddu, P., del Fiacco, M., & Testa-Riva, F. (1978). Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in human parotid and submandibular glands. *Journal of Anatomy*, 127(Pt 1), 181–191. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1235654/
95. Miyasaki, K. T., & Nemirovskiy, E. (1997). Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 12(1), 27–32. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1997.tb00363.x.
96. Ortiz, G. C., Rahemtulla, B., Tsurudome, S. A., Chaves, E., & Rahemtulla, F. (1997). Quantification of human myeloperoxidase in oral fluids. *European Journal of Oral Sciences*, 105(2), 143–152. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00193.x.
97. Ihalin, R., Loimaranta, V., & Tenovuo, J. (2006). Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(2), 261–268. https://doi.org/10.1016/J.ABB.2005.07.004.
98. Tenovuo, J., Mansson-Rahemtulla, B., Pruitt, K. M., & Arnold, R. (1981). Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity*, 34(1), 208–214. https://doi.org/10.1128/IAI.34.1.208-214.1981.
99. Ashby M. T. (2008). Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. Journal of *Dental Research*, 87(10), 900–914. https://doi.org/10.1177/154405910808701003.
100. Mikola, H., Waris, M., & Tenovuo, J. (1995). Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. *Antiviral Research*, 26(2), 161–171. https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)00073-H.
101. Lumikari, M., Soukka, T., Nurmio, S., & Tenovuo, J. (1991). Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 36(2), 155–160. https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90078-9.

102. Tenovuo, J., Lumikari, M., & Soukka, T. (1991). Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia*, 87(2), 197–208. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1896432/
103. Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D., & Troxler, R. F. (1988). Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects *on Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(16), 7472–7477. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68522-9.
104. Mackay, B. J., Denepitiya, L., Iacono, V. J., Krost, S. B., & Pollock, J. J. (1984). Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans. Infection and Immunity*, 44(3), 695–701. https://doi.org/10.1128/IAI.44.3.695-701.1984.
105. Xu, T., Levitz, S. M., Diamond, R. D., & Oppenheim, F. G. (1991). Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infection and Immunity*, 59(8), 2549–2554. https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2549-2554.1991.
106. White, S. H., Wimley, W. C., & Selsted, M. E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(4), 521–527. https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80038-7.
107. Khurshid, Z., Naseem, M., Sheikh, Z., Najeeb, S., Shahab, S., & Zafar, M. S. (2016). Oral antimicrobial peptides: types and role in the oral cavity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 515–524. https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2015.02.015.
108. Barrera, J., Tortolero, S., Rivas, A., Flores, C., & Gonzales, E. (2013). Increased expression and levels of human β defensins (hBD2 and hBD4) in adults with dental caries. *Journal of Health Sciences*, 3(2), 88–97. https://doi.org/10.17532/JHSCI.2013.70.
109. Wattanarat, O., Makeudom, A., Sastraruji, T., Piwat, S., Tianviwat, S., Teanpaisan, R., & Krisanaprakornkit, S. (2015). Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1-3 levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*, 15(1), 19. https://doi.org/10.1186/s12903-015-0003-0.
110. Aguirre, A., Testa-Weintraub, L. A., Banderas, J. A., Dunford, R., & Levine, M. J. (1992). Levels of salivary cystatins in periodontally healthy and diseased older adults. *Archives of Oral Biology*, 37(5), 355–361. https://doi.org/10.1016/0003-9969(92)90018-4.
111. Bell, J. E., Cunningham, E., Belt, C., Featherstone, J. D. B., & Bell, J. (1997). Examination of the potential structure of human salivary cystatins based on computer modelling. *Archives of Oral Biology*, 42(10–11), 761–772. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(97)00007-1.
112. Shomers, J. P., Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D., & Hay, D. I. (1982). Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *Journal of Dental Research*, 61(2), 397–399. https://doi.org/10.1177/00220345820610020 60.
113. Henskens, Y. M. C., Van Den Keijbus, P. A. M., Veerman, E. C. I., Van Der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Snoek, C. M., Van Der Velden, U., & Nieuw Amerongen, A. V. (1996). Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *Journal of Periodontal Research*, 31(1), 57–65. https://doi.org/10.1111/J.1600-0765.1996.TB00464.X.
114. Mookherjee, N., Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Cathelicidins.* Handbook of Biologically Active Peptides, 77–84. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00015-4.
115. Gorr, S. U. (2009). Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2000, 51(1), 152–180. https://doi.org/10.1111/J.1600-0757.2009.00310.X.
116. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098.
117. Heilborn, J. D., Frohm Nilsson, M., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O., Borregaard, N., & Ståhle-Bäckdahl, M. (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide ll-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(3), 379–389. https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2003.12069.X.
118. Fábián, T. K., Hermann, P., Beck, A., Fejérdy, P., & Fábián, G. (2012). Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *International Journal of Molecular Sciences*,13(4), 4295–4320. https://doi.org/10.3390/IJMS13044295.
119. Vitorino, R., Calheiros-Lobo, M. J., Duarte, J. A., Domingues, P. M., & Amado, F. M. L. (2008). Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. *Journal of Separation Science*, 31(3), 523–537. https://doi.org/10.1002/JSSC.200700486.
120. Gusman, H., Travis, J., Helmerhorst, E. J., Potempa, J., Troxler, R. F., & Oppenheim, F. G. (2001). Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infection and Immunity*, 69(3), 1402–1408. https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1402-

1408.2001/ASSET/7D0B67BA-23EE-4BCC-B80A-D426728238E3/ASSETS/GRAPHIC/II0311345006.JPEG.
121. Leito, J. T. D., Ligtenberg, A. J. M., Nazmi, K., & Veerman, E. C. I. (2009). Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1102–1110. https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2009.00575.X.
122. Rayment, S. A., Liu, B., Offner, G. D., Oppenheim, F. G., & Troxler, R. F. (2000). Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. *Journal of Dental Research*, 79(10), 1765–1772. https://doi.org/10.1177/00220345000790100601.
123. Slomiany, B. L., Murty, V. L. N., Piotrowski, J., & Slomiany, A. (1996). Salivary mucins in oral mucosal defense. *General Pharmacology*, 27(5), 761–771. https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02050-0.
124. White, M. R., Helmerhorst, E. J., Ligtenberg, A., Karpel, M., Tecle, T., Siqueira, W. L., Oppenheim, F. G., & Hartshorn, K. L. (2009). Multiple components contribute to ability of saliva to inhibit influenza viruses. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1), 18–24. https://doi.org/10.1111/J.1399-302X.2008.00468.X.
125. Lamont, R. J., Demuth, D. R., Davis, C. A., Malamud, D., & Rosan, B. (1991). Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. *Infection and Immunity*, 59(10), 3446. https://doi.org/10.1128/IAI.59.10.3446-3450.1991.
126. Oho, T., Yu, H., Yamashita, Y., & Koga, T. (1998). Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans. Infection and Immunity*, 66(1), 115–121. https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.115-121.1998.
127. Schwartz, S. S., Zhu, W. X., & Sreebny, L. M. (1995). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 40(10), 949–958. https://doi.org/10.1016/0003-9969(95)00055-T.
128. Tenovuo, J. (2002). Antimicrobial agents in saliva—protection for the whole body. Journal *Dental Research*, 81(12), 807–809. https://doi.org/10.1177/154405910208101202.
129. Ganz, T. (2006). Lysozyme. İçinde *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Elsevier; 649-653.
130. Fleming, A., Allison, V. D., & Fleming, A. (1922). Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. *British Journal of Experimental Pathology*, 3(5), 252-260. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2047739/.
131. Hannig, C., Hannig, M., & Attin, T. (2005). Enzymes in the acquired enamel pellicle. *European Journal of Oral Sciences*, 113(1), 2–13. https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.2004.00180.X.
132. Tonguc Altin, K., Topcuoglu, N., Duman, G., Unsal, M., Celik, A., Selvi Kuvvetli, S., Kasikci, E., Sahin, F., & Kulekci, G. (2021). Antibacterial effects of saliva substitutes containing lysozyme or lactoferrin against *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 129, 105183. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2021.105183.
133. Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S., & Guebitz, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology Journal*, 8(1), 97–109. https://doi.org/10.1002/BIOT.201200313.
134. Jafari, M., & Mehrnejad, F. (2016). Molecular insight into human lysozyme and its ability to form amyloid fibrils in high concentrations of sodium dodecyl sulfate: a view from molecular dynamics simulations. *Plos One*, 11(10), e0165213. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165213.
135. Artymiuk, P. J., & Blake, C. C. F. (1981). Refinement of human lysozyme at 1.5 Å resolution analysis of non-bonded and hydrogen-bond interactions. *Journal of Molecular Biology*, 152(4), 737–762. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90125-X.
136. Gálvez-Iriqui, A. C., Plascencia-Jatomea, M., & Bautista-Baños, S. (2020). Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3), 360-380. https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-6.
137. Cao, D., Wu, H., Li, Q., Sun, Y., Liu, T., Fei, J., Zhao, Y., Wu, S., Hu, X., & Li, N. (2015). Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *Plos One*, 10(2), e0118626. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0118626.
138. Monteiro, J. M., Pereira, A. R., Reichmann, N. T., Saraiva, B. M., Fernandes, P. B., Veiga, H., Tavares, A. C., Santos, M., Ferreira, M. T., Macário, V., VanNieuwenhze, M. S., Filipe, S. R., & Pinho, M. G. (2018). Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. *Nature*, 554(7693), 528–532. https://doi.org/10.1038/nature25506.

139. Jana, M., Ghosh, A., Santra, A., Kar, R. K., Misra, A. K., & Bhunia, A. (2017). Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: action of lysozyme revisited. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498, 395–404. https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.060.
140. Wang, S. W., & Wang, T. Y. (2022). Study on antibacterial activity and structure of chemically modified lysozyme. *Molecules*, 28(1), 95. https://doi.org/10.3390/MOLECULES28010095.
141. Rudney, J. D., & Smith, Q. T. (1985). Relationships between levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase, and secretory immunoglobulin A in stimulated parotid saliva. *Infection and Immunity*, 49(3), 469–475. https://doi.org/10.1128/IAI.49.3.469-475.1985.
142. Moslemi, M., Sattari, M., Kooshki, F., Fotuhi, F., Modarresi, N., Sadrabad, Z. K., & Shadkar, M. S. (2015). Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries. *Journal of Dental Research*, 9(2), 109-114. https://doi.org/10.15171/JODDD.2015.022.
143. Laible, N. J., & Germaine, G. R. (1985). Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis:* inhibition by chitin oligosaccharides. *Infection and Immunity*, 48(3), 720. https://doi.org/10.1128/IAI.48.3.720-728.1985.
144. Liljemark, W. F., Bloomquist, C. G., & Germaine, G. R. (1981). Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral *Streptococci* to hydroxyapatite. *Infection and Immunity*, 31(3), 935-941. https://doi.org/10.1128/IAI.31.3.935-941.1981.
145. Tenovuo, J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Diseases*, 8(1), 23–29. https://doi.org/10.1034/J.1601-0825.2002.1O781.X.
146. Bleiweis, A. S., Craig, R. A., Coleman, S. E., & van de Rijn, I. (1971). The streptococcal cell wall: structure, antigenic composition, and reactivity with lysozyme. *Journal of Dental Research*, 50(5), 1118–1129. https://doi.org/10.1177/00220345710500051401.
147. Iacono, V. J., MacKay, B. J., DiRienzo, S., & Pollock, J. J. (1980). Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *Infection and Immunity*, 29(2), 623–632. https://doi.org/10.1128/iai.29.2.623-632.1980.
148. Iwamoto, Y., Watanabe, T., Tsunemitsu, A., Fukui, K., & Moriyama, T. (1971). Lysis of streptococci by lysozyme from human parotid saliva and sodium lauryl sulfate. *Journal of Dental Research*, 50(6), 1688. https://doi.org/10.1177/00220345710500066201.
149. Zaura, E., Brandt, B. W., Prodan, A., Teixeira De Mattos, M. J., Imangaliyev, S., Kool, J., Buijs, M. J., Jagers, F. L., Hennequin-Hoenderdos, N. L., Slot, D. E., Nicu, E. A., Lagerweij, M. D., Janus, M. M., Fernandez-Gutierrez, M. M., Levin, E., Krom, B. P., Brand, H. S., Veerman, E. C., Kleerebezem, M., … Keijser, B. J. (2017). On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *The ISME Journal*, 11(5), 1218–1231. https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2016.199.
150. Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P., Wu, P. C., & So, M. (1997). The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *Journal of Pathology, Microbiology & Immunology*, 105(7–12), 875–883. https://doi.org/10.1111/J.1699-0463.1997.TB05097.X.
151. Bergamo, A., & Sava, G. (2024). Lysozyme: *a natural product with multiple and useful antiviral properties. Molecules*, 29(3), 652. https://doi.org/10.3390/MOLECULES29030652.
152. Barbe, A. G., Schmidt-Park, Y., Hamacher, S., Derman, S. H. M., & Noack, M. J. (2018). Efficacy of GUM® Hydral versus Biotène® oralbalance mouthwashes plus gels on symptoms of medication-induced xerostomia: a randomized, double-blind, crossover study. *Clinical Oral Investigations*, 22(1), 169–180. https://doi.org/10.1007/S00784-017-2096-0.
153. Gil-Montoya, J. A., Guardia-López, I., & González-Moles, M. A. (2008). Evaluation of the clinical efficacy of a mouthwash and oral gel containing the antimicrobial proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in elderly patients with dry mouth-a pilot study. *Gerodontology*, 25(1), 3–9. https://doi.org/10.1111/J.1741-2358.2007.00197.X.
154. Kirstilä, V., Lenander-Lumikari, M., Söderling, E., & Tenovuo, J. (1996). Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia. *Acta Odontologica Scandinavica*, 54(6), 391–397. https://doi.org/10.3109/00016359609003557.
155. Edmans, J. G., Murdoch, C., Santocildes-Romero, M. E., Hatton, P. V., Colley, H. E., & Spain, S. G. (2020). Incorporation of lysozyme into a mucoadhesive electrospun patch for rapid protein delivery to the oral mucosa. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 112. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.110917.
156. API Lysozyme | Bioseutica® Bioseutica. Erişim 12 Mart 2024, https://www.bioseutica.com/products/api-lysozyme.

157. Kocak, M. M., Ozcan, S., Kocak, S., Topuz, O., & Erten, H. (2009). Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of *Streptococcus mutans* in saliva. *European Journal of Dentistry*, 3(1), 57-61. https://doi.org/10.1055/s-0039-1697406.
158. BioXtra Dry Mouth Products - BioXtra Dry Mouth Products. BioXtra. Erişim 21 Ekim 2024, https://www.bioxtra.ca/shop-now.html.
159. Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53(3), 286–291. https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2008.00064.X.
160. Farooq, I., & Bugshan, A. (2020). The role of salivary contents and modern technologies in the remineralization of dental enamel: a narrative review. *F1000Research*, 9, 171. https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.22499.3.
161. Lussi, A., Von Salis-Marincek, M., Ganss, C., Hellwig, E., Cheaib, Z., & Jaeggi, T. (2012). Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. *Caries Research*, 46(6), 507–512. https://doi.org/10.1159/000339783.
162. Zheng, J., Huang, H., Shi, M. Y., Zheng, L., Qian, L. M., & Zhou, Z. R. (2011). In vitro study on the wear behaviour of human tooth enamel in citric acid solution. *Wear*, 271(9–10), 2313–2321. https://doi.org/10.1016/J.WEAR.2010.11.027.
163. Lussi, A., Megert, B., Shellis, R. P., & Wang, X. (2012). Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *The British Journal of Nutrition*, 107(2), 252–262. https://doi.org/10.1017/S0007114511002820
164. Lussi, A., & Jaeggi, T. (2008). Erosion-diagnosis and risk factors. *Clinical Oral Investigations*, 12 Suppl 1(Suppl 1), 5–13. https://doi.org/10.1007/S00784-007-0179-Z.
165. Lei, C., Jiyao, L., Xu, H. H. K., & Xuedong, Z. (2016). Demineralization and remineralization. İçinde *Dental Caries: Principles and Management.* Springer Berlin Heidelberg; 71-83.
166. Anil, A., Ibraheem, W., Meshni, A., Preethanath, R., & Anil, S. (2022). Demineralization and remineralization dynamics and dental caries. İçinde L.-C. Rusu, L. C. Ardelean, & S. A. Gehrke (Ed.), *Dental Caries - The Selection of Restoration Methods and Restorative Materials* (1st ed., Vol. 1). IntechOpen; 1-19.
167. 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), 139–144. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603.
168. Featherstone, J. D. B. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–899. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307.
169. Vaughn, J. S., Woerner, W. R., Lindsley, D. H., Nekvasil, H., Hughes, J. M., & Phillips, B. L. (2015). Hydrogen environments in low -OH, F, Cl apatites revealed by double resonance solid-state NMR. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(51), 28605–28613. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.5B10561.
170. Chen, C., Wang, Z., Saito, M., Tohei, T., Takano, Y., & Ikuhara, Y. (2014). Fluorine in shark teeth: its direct atomic-resolution imaging and strengthening function. *Angewandte Chemie*, 53(6), 1543–1547. https://doi.org/10.1002/ANIE.201307689.
171. Malcangi, G., Patano, A., Morolla, R., De Santis, M., Piras, F., Settanni, V., Mancini, A., Di Venere, D., Inchingolo, F., Inchingolo, A. D., Dipalma, G., & Inchingolo, A. M. (2023). Analysis of dental enamel remineralization: a systematic review of technique comparisons. *Bioengineering*, 10(4), 472. https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10040472.
172. Navazesh, M., & Kumar, S. K. S. (2008). Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *Journal of the American Dental Association*, 139, 35-40. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.2008.0353.
173. Cury, J. A., Tenuta, T. M. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Brazilian Oral Research*, 23(1), 23–30. https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000500005.
174. Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5), 493-502. https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500001.
175. Soi, S., & Viyanak, V. (2013). Fluorides and their role in demineralisation and remineralisation. *Journal of Dental Sciences and Oral Rehabilitation*, 14, 19–21. https://www.researchgate.net/publication/292059761_FLUORIDE_AAND_THEIR_ROLE_IN_DEMINERALIZATION_AND_REMINERALIZATION.
176. Surendranath, P., Krishnappa, S., & Srinath, S. (2022). Silver diamine fluoride in preventing caries: a review of current trends. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 15(2), 247-251. https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10005-2167.

177. Castro-Muñoz, R., Correa-Delgado, M., Córdova-Almeida, R., Lara-Nava, D., Chávez-Muñoz, M., Velásquez-Chávez, V. F., Hernández-Torres, C. E., Gontarek-Castro, E., & Ahmad, M. Z. (2022). Natural sweeteners: Sources, extraction and current uses in foods and food industries. *Food Chemistry*, 370, 130991. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130991.
178. Jeong, G. J., Khan, F., Tabassum, N., & Kim, Y. M. (2024). Alteration of oral microbial biofilms by sweeteners. *Biofilm*, 7, e100171. https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2023.100171.
179. Gupta, M. (2018). Sugar substitutes: mechanism, availability, current use and safety concerns-an update. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(10), 1888-1894. https://doi.org/10.3889/OAMJMS.2018.336.
180. Sezer, B., & Kargül, B. (2020). Çürük yönetiminde güncel remineralizasyon ajanları. *Türkiye Klinikleri Diş Hekimliği Bilimleri Dergisi*, 26(3), 472–486. https://doi.org/10.5336/DENTALSCI.2019-71685.
181. Haghgoo, R., Ahmadvand, M., & Moshaverinia, S. (2016). Remineralizing effect of topical novamin and nano-hydroxyapatite on caries-like lesions in primary teeth. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(8), 645–649. https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-1905.
182. Huang, S. B., Gao, S. S., & Yu, H. Y. (2009). Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomedical Materials*, 4(3), e034104. https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/3/034104.
183. Farooq, I., Moheet, I. A., Imran, Z., & Farooq, U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate (CPP–ACP) complex. *King Saud University Journal of Dental Sciences*, 4(2), 47–51. https://doi.org/10.1016/J.KSUJDS.2013.03.004.
184. Schüpbach, P., Neeser, J. R., Golliard, M., Rouvet, M., & Guggenheim, B. (1996). Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans Streptococci. *Journal of Dental Research*, 75(10), 1779–1788. https://doi.org/10.1177/00220345960750101101.
185. Reynolds, E. C., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., Walker, G. D., Morgan, M. V., & Reynolds, C. (2008). Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dental Research*, 87(4), 344–348. https://doi.org/10.1177/154405910808700420.
186. Srinivasan, K., & Chitra, S. (2015). Emerging trends in oral health profession: the biomimetic – a review. *Archives of Dental and Medical Research*, 1, 40–47. https://www.semanticscholar.org/paper/Emerging-Trends-in-Oral-Health-Profession%3A-The-Srinivasan-Chitra/27b9b29a2fece6529656eff1fe9873ae5d884e3a.
187. Ruan, Q., & Moradian-Oldak, J. (2015). Amelogenin and enamel biomimetics. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 3(16), 3112-3129. https://doi.org/10.1039/C5TB00163C.
188. Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., & Stupp, S. I. (2008). Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical Reviews*, 108(11), 4754–4783. https://doi.org/10.1021/CR8004422.
189. Edwards-Gayle, C. J. C., & Hamley, I. W. (2017). Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(28), 5867–5876. https://doi.org/10.1039/C7OB01092C.
190. Lee, S., Trinh, T. H. T., Yoo, M., Shin, J., Lee, H., Kim, J., Hwang, E., Lim, Y. B., & Ryou, C. (2019). Self-assembling peptides and their application in the treatment of diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5850. https://doi.org/10.3390/IJMS20235850.
191. Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., & Simmer, J. P. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 270–299. https://doi.org/10.1006/JSBI.1999.4130.
192. Gibson, C. W., Yuan, Z. A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J. T., Decker, S., Piddington, R., Harrison, G., & Kulkarni, A. B. (2001). Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31871–31875. https://doi.org/10.1074/JBC.M104624200.
193. Bonchev, A., Vasileva, R., Dyulgerova, E., & Yantcheva, S. (2021). Self-assembling peptide p11-4: a biomimetic agent for enamel remineralization. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(2), 899–907. https://doi.org/10.1007/S10989-020-10136-1/METRICS.
194. Firth, A., Aggeli, A., Burke, J. L., Yang, X., & Kirkhani, J. (2006). Biomimetic self-assembling peptides as injectable scaffolds for hard tissue engineering. *Nanomedicine*, 1(2), 189–199. https://doi.org/10.2217/17435889.1.2.189.
195. Curodont repair – ZWP online – das Nachrichtenportal für die Dentalbranche. ZWP Online. Erişim 21 Ekim 2024, https://www.zwp-online.info/produkte/produktinformationen/curodont-repair.

196. Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). Chitosan: an overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256. https://doi.org/10.3390/POLYM13193256.
197. Kalaithong, W., Molloy, R., Nalampang, K., & Somsunan, R. (2021). Design and optimization of polymerization parameters of carboxymethyl chitosan and sodium 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonate hydrogels as wound dressing materials. *European Polymer Journal*, 143, 110186. https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.110186.
198. Huang, Z., Qi, Y., Zhang, K., Gu, L., Guo, J., Wang, R., & Mai, S. (2019). Use of experimental-resin-based materials doped with carboxymethyl chitosan and calcium phosphate microfillers to induce biomimetic remineralization of caries-affected dentin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 89, 81–88. https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2018.09.008.
199. Zhao, X., Zhou, L., Li, Q., Zou, Q., & Du, C. (2018). Biomimetic mineralization of carboxymethyl chitosan nanofibers with improved osteogenic activity in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 195, 225–234. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.04.090.
200. Song, J., Li, T., Gao, J., Li, C., Jiang, S., & Zhang, X. (2021). Building an aprismatic enamel-like layer on a demineralized enamel surface by using carboxymethyl chitosan and lysozyme-encapsulated amorphous calcium phosphate nanogels. *Journal of Dentistry*, 107, e103599. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2021.103599.
201. Nimbeni, B. S., Nimbeni, S. B., Divakar, D. D., & Samiullah, M. (2023). Carboxymethyl chitosan-fluoride-doped amorphous calcium phosphate: a novel remineralizing gel. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 16(5), 748–753. https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10005-2669.
202. 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. https://doi.org/10.1039/C1CC13661E.
203. Fan, Y., Sun, Z., & Moradian-Oldak, J. (2009). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, 30(4), 478–483. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.10.019.
204. Chander, N. G. (2018). Characterization of dental materials. *The Journal of the Indian Prosthodontic Society*, 18(4), 289-290. https://doi.org/10.4103/JIPS.JIPS_292_18.
205. Leng, Y. (2013). Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
206. Paradella, T. C., & Bottino, M. A. (2012). Scanning electron microscopy in modern dentistry research. *Brazilian Dental Science*, 15(2), 43–48. https://doi.org/10.14295/BDS.2012.V15I2.798.
207. Saghiri, M. A., Asgar, K., Lotfi, M., Karamifar, K., Saghiri, A. M., Neelakantan, P., Gutmann, J. L., & Sheibaninia, A. (2012). Back-scattered and secondary electron images of scanning electron microscopy in dentistry: a new method for surface analysis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70(6), 603–609. https://doi.org/10.3109/00016357.2011.645057.
208. Risnes, S., Saeed, M., & Sehic, A. (2019). Scanning electron microscopy (SEM) methods for dental enamel. *Methods in Molecular Biology*, 1922, 293–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_27.
209. Looking at materials up close - The Scanning Electron Microscope | Rolls-Royce UTC. (n.d.). Rolls-Royce UTC. Erişim 21 Ekim 2024, https://www.rrutc.msm.cam.ac.uk/outreach/articles/the-scanning-electron-microscope.
210. Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L., & Liu, S. Q. (2016). Insights into protein–ligand ınteractions: mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), e144. https://doi.org/10.3390/IJMS17020144.
211. Altuntaş, V., Gök, M. (2020). Protein – protein etkileşimi tespit yöntemleri, veri tabanları ve veri güvenilirliği. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 19, 722–733. https://doi.org/10.31590/EJOSAT.724390.
212. Smith, A. W. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1539–1550. https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.04.007.
213. Dakhale, R., Paul, P., Achanta, A., Ahuja, K. P., & Meshram, M. (2023). Nanotechnology innovations transforming oral health care and dentistry: a review. *Cureus*, 15(10), e46423. https://doi.org/10.7759/CUREUS.46423.
214. Robinson, A. M., Bannister, M., Creeth, J. E., & Jones, M. N. (2001). The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 186(1–2), 43–53. https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00481-2.

215. Perozzo, R., Folkers, G., & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24(1–2), 1–52. https://doi.org/10.1081/RRS-120037896.
216. Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1–12. https://doi.org/10.1155/2014/147648.
217. Roche, D. B., & McGuffin, L. J. (2016). In silico identification and characterization of protein-ligand binding sites. *Methods in Molecular Biology*, 1414, 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3569-7_1.
218. Picollo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 4(4), 322-331. https://doi.org/10.1515/PSR-2018-0008/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
219. Passos, M., & Saraiva, M. L. (2019). Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896–904. https://doi.org/10.1016/J.MEASUREMENT.2018.12.045.
220. Tissue, B. M. (2012). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. *Characterization of Materials*, 1–13. https://doi.org/10.1002/0471266965.COM059.PUB2.
221. Passos, M. L. C., Sarraguça, M. C., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2019). Spectrophotometry Organic Compounds. *Encyclopedia of Analytical Science*, 9, 236–243. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14465-8.
222. Nelson, D. J., & Percy, J. M. (2014). The influence of structure on reactivity in alkene metathesis. *Advances in Physical Organic Chemistry*, 48(C), 81–188. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800256-8.00002-3.
223. UV-Vis Spectroscopy: Principle, Instrumentation, and Applications - Instrumental Analysis - PSIBERG. Erişim 15 Haziran 2024, https://psiberg.com/uv-vis-spectroscopy/#google_vignette.
224. Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., & Alvala, M. (2019). Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. İçinde V. Gaitonde, P. Karmakar, & A. Trivedi (Ed.), *Drug Discovery and Development- New Advances.* IntechOpen; 1-20. https://doi.org/10.5772/intechopen.85991.
225. Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 60, 273–343. https://doi.org/10.1016/BS.PMCH.2021.01.004.
226. Mashiach, E., Schneidman-Duhovny, D., Andrusier, N., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2008). FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Research*, 36, 229-232. https://doi.org/10.1093/NAR/GKN186.
227. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. https://doi.org/10.1007/S12551-013-0130-2/METRICS.
228. Ohno, K., Kamiya, N., Asakawa, N., Inoue, Y., & Sakurai, M. (2001). Application of an integrated MOZYME+DFT method to pKa calculations for proteins. *Chemical Physics Letters*, 341(3–4), 387–392. https://doi.org/10.1016/S0009-2614(01)00499-7.
229. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384–13421. https://doi.org/10.3390/MOLECULES200713384.
230. Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein & Peptide Science*, 7(5), 407–420. https://doi.org/10.2174/138920306778559395.
231. Dias, R., & de Azevedo Jr., W. (2008). Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*, 9(12), 1040–1047. https://doi.org/10.2174/138945008786949432.
232. Yanaştırma (moleküler) - Vikipedi. Erişim 7 Temmuz 2024, https://tr.wikipedia.org/wiki/Yana%C5%9Ft%C4%B1rma_%28molek%C3%BCler%29.
233. Piliarik, M., Vaisocherová, H., & Homola, J. (2009). Surface plasmon resonance biosensing. *Methods in Molecular Biology*, 503, 65–88. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_5.
234. Türkoğlu, E. A. (2020). Molecularly-imprinted nanomaterial-based surface plasmon resonance biosensors in molecular diagnosis. İçinde *Applications of Nanomaterials in Agriculture, Food Science, and Medicine*. IGI Global; 1-28.
235. Van Der Merwe, P. A. (2000). Surface plasmon resonance. İçinde S. E. Harding & B. Z. Chowdhry (Ed.), *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry*. Oxford University Press; 137-170.
236. Velasco-Garcia, M. N. (2009). Optical biosensors for probing at the cellular level: a review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(1), 27–33. https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2009.01.013.

237. Uzun, L. (2008). Production of kits for hepatitis diagnosis (*Doktora tezi*). Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
238. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S., & Kim, M. (2015). Surface *plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. Basel*, 15(5), 10481. https://doi.org/10.3390/S150510481.
239. Koyun, S. (2017). Protein C tayinine yönelik yüzey plazmon rezonans sensörlerin hazırlanması (*Yüksek lisans tezi*). Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
240. Surface Plasmon Resonance (SPR) | Center for Macromolecular Interactions. Erişim 10 Mayıs 2024, https://cmi.hms.harvard.edu/surface-plasmon-resonance.
241. Borja, R. (2011). Biogas production. İçinde *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier; 785-798. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00126-4.
242. Vigneswaran, C., Ananthasubramanian, M., & Kandhavadivu, P. (2014). Enzyme technology. *Bioprocessing of Textiles*, 1–22. https://doi.org/10.1016/B978-93-80308-42-5.50001-9.
243. Richard, J. P. (2022). Enabling role of ligand-driven conformational changes in enzyme evolution. *Biochemistry*, 61(15), 1533-1542. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.2C00178.
244. Helal, R., & Melzig, M. F. (2008). Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay. *Die Pharmazie*, 63(6), 415–419. https://doi.org/10.1691/ph.2008.7846
245. Hankiewicz, J., & Swierczek, E. (1974). Lysozyme in human body fluids. *Clinica Chimica Acta*, 57(3), 205–209. https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90398-2.
246. Song, Z. H., & Hou, S. (2003). A new analytical procedure for assay of lysozyme in human tear and saliva with immobilized reagents in flow injection chemiluminescence system. *Analytical Sciences : The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 19(3), 347–352. https://doi.org/10.2116/ANALSCI.19.347.
247. Vidal, M. L., Gautron, J., & Nys, Y. (2005). Development of an ELISA for quantifying lysozyme in hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2379–2385. https://doi.org/10.1021/JF048692O.
248. Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8(C), 302–309. https://doi.org/10.1016/0006-3002(52)90045-0.
249. Soares, R., Ataide, I. N., Fernandes, M., & Lambor, R. (2017). Assessment of enamel remineralisation after treatment with four different remineralising agents: a scanning electron microscopy (sem) study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(4), ZC136. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23594.9758.
250. Dimić, I. D., Cvijović-Alagić, I. L., Kostić, I. T., Perić-Grujić, A. A., Rakin, M. P., Putić, S. S., & Bugarski, B. M. (2014). Metallic ion release from biocompatible cobalt-based alloy. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(4), 571–577. https://doi.org/10.2298/CICEQ130813039D.
251. Kamal, D., Hassanein, H., Elkassas, D., & Hamza, H. (2020). Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 12(2), e161–e168. https://doi.org/10.4317/JCED.56295.
252. Elien, T., Sutadi, H., & Suharsini, M. (2023). Concentration-dependent effect of carboxymethyl chitosan amorphous calcium phosphate on the surface hardness of primary tooth enamel. *Journal of Oral Science*, 65(3), 168–170. https://doi.org/10.2334/JOSNUSD.23-0084.
253. Türkoğlu, E. A., Taştekil, I., & Özbek Sarica, P. (2024). Surface plasmon resonance, molecular docking, and molecular dynamics simulation studies of lysozyme interaction with tannic acid. *Food Science & Nutrition*. 12(10), 7392-7404.https://doi.org/10.1002/FSN3.4315.
254. Cheetham, J. C., Artymiuk, P. J., & Phillips, D. C. (1992). Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 A resolution. *Journal of Molecular Biology*, 224(3), 613–628. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90548-X.
255. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., & Zardecki, C. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 58, 899–907. https://doi.org/10.1107/S0907444902003451.
256. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), 1388–1395. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA971.

257. Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. https://doi.org/10.1002/JCC.21256.
258. Schrödinger, LLC. (2020). The PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.2r3pre). Erişim 6 Ekim 2024, http://pymol.sourceforge.net/faq.html#CITE
259. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. https://doi.org/10.1002/JCC.21334.
260. Sayğı, T. K., Pınar, E. G., Taştekil, I., Sarıca, P. Ö., Topçu, G., & Türkoğlu, E. A. (2024). Elucidation of the binding interaction between β-sitosterol and lysozyme using molecular docking, molecular dynamics and surface plasmon resonance analysis. *Chemistry & Biodiversity*, e202401470. https://doi.org/10.1002/CBDV.202401470.
261. Türkoğlu, E. A. (2024). Enhancement of ligand ımmobilization on gold surface by optimizing monolayer concentration and pre-concentration studies for surface plasmon resonance analysis of rutin-lysozyme interaction. *ChemistrySelect*, 9(9), e202303232. https://doi.org/10.1002/SLCT.202303232.
262. Tiwari, M. (2011). Science behind human saliva. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 2(1), 53-58. https://doi.org/10.4103/0976-9668.82322.
263. Park, M., Chung, J., Kim, Y., Chung, S., & Kho, H. (2007). Viscosity and wettability of animal mucin solutions and human saliva. *Oral Diseases*, 13(2), 181–186. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01263.x.
264. Castagnola, M., Scarano, E., Passali, G. C., Messana, I., Cabras, T., Iavarone, F., Cintio, G. Di, Fiorita, A., Corso, E. De, & Paludetti, G. (2017). Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 37(2), 94-101. https://doi.org/10.14639/0392-100X-1598.
265. Madhav, N. V. S., Shakya, A. K., Shakya, P., & Singh, K. (2009). Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release*, 140(1), 2–11. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2009.07.016.
266. Cunha-Cruz, J., Scott, J. A., Rothen, M., Mancl, L., Lawhorn, T., Brossel, K., & Berg, J. (2013). Salivary characteristics and dental caries: evidence from general dental practices. *Journal of the American Dental Association*, 144(5), e31. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.2013.0159.
267. Kılınç, G., Çetin, M., & Ellidokuz, H. (2015). The relationship of salivary flow rate and salivary pH on dental caries in children. *The Journal of Pediatric Research*, 2(2), 87–91. https://doi.org/10.4274/jpr.64935.
268. Animireddy, D., Bekkem, V. T. R., Vallala, P., Kotha, S. B., Ankireddy, S., & Mohammad, N. (2014). Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 5(3), 324-328. https://doi.org/10.4103/0976-237X.137931.
269. Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R., Wells, N., Berndt, J., & Dale, B. A. (2005). Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3883-3888. https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3883-3888.2005.
270. Grant, M., Kilsgård, O., Åkerman, S., Klinge, B., Demmer, R. T., Malmström, J., & Jönsson, D. (2019). The human salivary antimicrobial peptide profile according to the oral microbiota in health, periodontitis and smoking. *Journal of Innate Immunity*, 11(5), 432-444. https://doi.org/10.1159/000494146.
271. Yao, L., Li, Y., Fu, D., Wang, Y., Hua, C., Zou, L., & Jiang, L. (2024). The damage and remineralization strategies of dental hard tissues following radiotherapy. *BMC Oral Health*, 24(1), 805. https://doi.org/10.1186/S12903-024-04561-7/TABLES/2.
272. Sharif, M. K., Saleem, M., & Javed, K. (2018). Food materials science in egg powder industry. İçinde *Role of Materials Science in Food Bioengineering*. Elsevier; 505-537.
273. Grassl, N., Kulak, N. A., Pichler, G., Geyer, P. E., Jung, J., Schubert, S., Sinitcyn, P., Cox, J., & Mann, M. (2016). Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Medicine*, 8(1), 44. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0293-0.
274. Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865.
275. Keijser, B. J. F., Zaura, E., Huse, S. M., Van Der Vossen, J. M. B. M., Schuren, F. H. J., Montijn, R. C., Ten Gate, J. M., & Crielaard, W. (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of

healthy adults. *Journal of Dental Research*, 87(11), 1016–1020. https://doi.org/10.1177/154405910808701104.
276. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
277. Sun, H., Chen, Y., Zou, X., Li, Q., Li, H., Shu, Y., Li, X., Li, W., Han, L., & Ge, C. (2016). Salivary secretory immunoglobulin (siga) and lysozyme in malignant tumor patients. *BioMed Research International*, 2016, e8701423 https://doi.org/10.1155/2016/8701423.
278. Octiara, E., Sutadi, H., Siregar, Y., & Primasari, A. (2022). Lysozyme quantity and quality in relation with early childhood caries: a longitudinal study. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 10(4), 652–659. https://doi.org/10.56499/JPPRES22.1362_10.4.652.
279. Hertel, S., Hannig, C., & Sterzenbach, T. (2023). The abundance of lysozyme, lactoferrin and cystatin S in the enamel pellicle of children – Potential biomarkers for caries? *Archives of Oral Biology*, 146, 105598. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2022.105598.
280. de Andrade, F. B., de Oliveira, J. C., Yoshie, M. T., Guimarães, B. M., Gonçalves, R. B., & Schwarcz, W. D. (2014). Antimicrobial activity and synergism of lactoferrin and lysozyme against cariogenic microorganisms. *Brazilian Dental Journal*, 25(2), 165–169. https://doi.org/10.1590/0103-6440201302257.
281. Felizardo, K. R., Gonçalves, R. B., Schwarcz, W. D., Poli-Frederico, R. C., Maciel, S. M., & Andrade, F. B. (2010). An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity. *Revista Odonto Ciência,* 25(4), 344–349. https://doi.org/10.1590/S1980-65232010000400004.
282. Tsuji, R., Shinohara, Y., Nagadome, H., & Terada, Y. (2008). Application of anti-microbial protein lysozyme for dental materials. *Prosthodontic Research & Practice*, 7(2), 225–227. https://doi.org/10.2186/PRP.7.225.
283. Octiara, E., Sutadi, H., Siregar, Y., & Primasari, A. (2022). The use of lysozyme toothpaste to prevent early childhood caries (ECC) in 2 years old children. *Journal of International Dental and Medical Research*, 15(2), 623–629. https://scholar.ui.ac.id/en/publications/the-use-of-lysozyme-toothpaste-to-prevent-early-childhood-caries-.
284. Sanavia, C., Tatullo, M., Bassignani, J., Cotellessa, S., Fantozzi, G., Acito, G., Iommiello, A., Chiavistelli, L., Sabatini, S., & Nardi, G. M. (2017). Remineralization strategies in oral hygiene: a position paper of ıtalian society of oral hygiene sciences-S.I.S.I.O. working group. *The Open Dentistry Journal*, 11(1), 527-538. https://doi.org/10.2174/1874210601711010527.
285. Lata, S., Varghese, N., & Varughese, J. (2010). Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *Journal of Conservative Dentistry ,* 13(1), 42-46. https://doi.org/10.4103/0972-0707.62634.
286. Zafar, M. S., Amin, F., Fareed, M. A., Ghabbani, H., Riaz, S., Khurshid, Z., & Kumar, N. (2020). Biomimetic aspects of restorative dentistry biomaterials. *Biomimetics*, 5(3), 34. https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS5030034.
287. Vahedifar, A., & Wu, J. (2022). Self-assembling peptides: Structure, function, in silico prediction and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 476–494. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.11.020.
288. Chen, Z., Cao, S., Wang, H., Li, Y., Kishen, A., Deng, X., Yang, X., Wang, Y., Cong, C., Wang, H., & Zhang, X. (2015). Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. *Plos One*, 10(1), e0116553. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116553.
289. Song, J., Wang, H., Yang, Y., Xiao, Z., Lin, H., Jin, L., Xue, Y., Lin, M., Chen, F., Zhu, M., Zhao, Y., Qiu, Z., Li, Y., & Zhang, X. (2018). Nanogels of carboxymethyl chitosan and lysozyme encapsulated amorphous calcium phosphate to occlude dentinal tubules. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 29(6), 84. https://doi.org/10.1007/S10856-018-6094-9.
290. Xiao, Z., Que, K., Wang, H., An, R., Chen, Z., Qiu, Z., Lin, M., Song, J., Yang, J., Lu, D., Shen, M., Guan, B., Wang, Y., Deng, X., Yang, X., Cai, Q., Deng, J., Ma, L., Zhang, X., & Zhang, X. (2017). Rapid biomimetic remineralization of the demineralized enamel surface using nano-particles of amorphous calcium phosphate guided by chimaeric peptides. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 33(11), 1217–1228. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2017.07.015.
291. Mohabatpour, F., Yazdanpanah, Z., Papagerakis, S., Chen, X., & Papagerakis, P. (2022). Self-crosslinkable oxidized alginate-carboxymethyl chitosan hydrogels as an injectable cell carrier for in

vitro dental enamel regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2), 71. https://doi.org/10.3390/JFB13020071.
292. Chen, S. C., Wu, Y. C., Mi, F. L., Lin, Y. H., Yu, L. C., & Sung, H. W. (2004). A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 96(2), 285–300. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2004.02.002.
293. Faggion, C. M. (2012). Guidelines for reporting pre-clinical in vitro studies on dental materials. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 12(4), 182–189. https://doi.org/10.1016/J.JEBDP.2012.10.001.
294. Gangrade, A., Gade, V., Patil, S., Gade, J., Chandhok, D., & Thakur, D. (2016). In vitro evaluation of remineralization efficacy of different calcium- and fluoride-based delivery systems on artificially demineralized enamel surface. *Journal of Conservative Dentistry*, 19(4), 328-331. https://doi.org/10.4103/0972-0707.186449.
295. Coradin, T., Porporatti, A. L., & Bosco, J. (2023). Assessing in vitro remineralization of primary artificial caries: A systematic review of multi-techniques characterization approaches. *Dentistry Review*, 3(4), 100073. https://doi.org/10.1016/J.DENTRE.2023.100073.
296. Şivet, E. A., Nur, A., Gökçe, P., & Kargül, B. (2023). Effect of different remineralization agents on artificial caries lesion: an in-vitro study. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 13(2), 330–336. https://doi.org/10.33808/CLINEXPHEALTHSCI.1103037.
297. Bhadoria, N., Gunwal, M. K., Kukreja, R., Maran, S., Devendrappa, S. N., & Singla, S. (2020). An in vitro evaluation of remineralization potential of functionalized tricalcium phosphate paste and cpp-acpf on artificial white spot lesion in primary and permanent enamel. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 13(6), 579-584. https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10005-1813.
298. 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), 175-197. https://doi.org/10.1177/08959374950090030101.
299. Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9-20. https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707305.
300. Beyleveld, G., White, K. M., Ayllon, J., & Shaw, M. L. (2013). New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. *Antiviral Research*, 100(1), 120–132. https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.07.018.
301. Sangavi, R., Muthumanickam, S., Malligarjunan, N., Jothi, R., Boomi, P., Arivudainambi, S., Raman, M., Joshi, C. G., Pandian, S. K., & Gowrishankar, S. (2023). In silico analysis unravels the promising anticariogenic efficacy of fatty acids against dental caries causing *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-16. https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2283155.
302. Vijayashree Priyadharsini, J., Smiline Girija, A. S., & Paramasivam, A. (2018). In silico analysis of virulence genes in an emerging dental pathogen A. baumannii and related species. *Archives of Oral Biology*, 94, 93–98. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2018.07.001.
303. Tanaka, J. L. O., Medici Filho, E., Salgado, J. A. P., Salgado, M. A. C., de Moraes, L. C., de Moraes, M. E. L., & Castilho, J. C. de M. (2008). Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Brazilian Oral Research*, 22(4), 346–351. https://doi.org/10.1590/S1806-83242008000400011.
304. Han, S., Fan, Y., Zhou, Z., Tu, H., Li, D., Lv, X., Ding, L., & Zhang, L. (2017). Promotion of enamel caries remineralization by an amelogenin-derived peptide in a rat model. *Archives of Oral Biology*, 73, 66–71. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2016.09.009.
305. Ortiz-Ruiz, A. J., Teruel-Fernández, J. de D., Alcolea-Rubio, L. A., Hernández-Fernández, A., Martínez-Beneyto, Y., & Gispert-Guirado, F. (2018). Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 218, 7–17. https://doi.org/10.1016/J.AANAT.2017.12.012.
306. Maden, E. A., Acar, Ö., Altun, C., & Polat, G. G. (2017). The effect of casein phosphopeptide-amorf calcium phosphate and acidulated phosphate fluoride gel on dental erosion in primary teeth: an in vitro study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 41(4), 275–279. https://doi.org/10.17796/1053-4628-41.4.275.
307. Akgun, O. M., Haman Bayari, S., Ide, S., Guven Polat, G., Yildirim, C., & Orujalipoor, I. (2021). Evaluation of the protective effect on enamel demineralization of CPP-ACP paste and ROCS by vibrational spectroscopy and SAXS: An in vitro study. *Microscopy Research and Technique*, 84(12), 2977–2987. https://doi.org/10.1002/JEMT.23857.

308. Dawasaz, A. A., Togoo, R. A., Mahmood, Z., Ahmad, A., & Thirumulu Ponnuraj, K. (2023). Remineralization of dentinal lesions using biomimetic agents: a systematic review and meta-analysis. *Biomimetics*,159, 8(2), 159. https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS8020159.
309. 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. https://doi.org/10.3390/IJMS16034615.
310. Xu, J., Shi, H., Luo, J., Yao, H., Wang, P., Li, Z., & Wei, J. (2022). Advanced materials for enamel remineralization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 995881. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.985881.
311. Fan, Y., Sun, Z., & Moradian-Oldak, J. (2009). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, 30(4), 478-483. https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.10.019.
312. Talwar, M., Borzabadi-Farahani, A., Lynch, E., Borsboom, P., & Ruben, J. (2019). Remineralization of demineralized enamel and dentine using 3 dentifrices—an in vitro study. *Dentistry Journal*, 7(3), 91. https://doi.org/10.3390/DJ7030091.
313. Jones, S. J. (1987). Dentine mineralization, demineralization and microhardness: recent studies using scanning microscopies. İçinde A. Thylstrup, S. A. Leach, & V. Qvist (Eds.), *Dentine and Dentine Reactions in the Oral Cavity*. IRL Press Ltd., Oxford, İngiltere; 33–55.
314. Ionescu, A. C., Degli Esposti, L., Iafisco, M., & Brambilla, E. (2022). Dental tissue remineralization by bioactive calcium phosphate nanoparticles formulations. *Scientific Reports 2022*,12(1), 59-94. https://doi.org/10.1038/s41598-022-09787-5.
315. Boyle, E. L., Higham, S. M., & Edgar, W. M. (1998). The production of subsurface artificial caries lesions on third molar teeth. *Caries Research*, 32(2), 154–158. https://doi.org/10.1159/000016446.
316. Argenta, R. M. O., Tabchoury, C. P. M., & Cury, J. A. (2003). A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, 17(3), 241–246. https://doi.org/10.1590/S1517-74912003000300008.
317. Ferreira, R. I., Haiter-Neto, F., Tabchoury, C. P. M., & Bóscolo, F. N. (2007). In ıtro induction of enamel subsurface demineralization for evaluation of diagnostic imaging methods. *Journal of Applied Oral Science*, 15(5), 392. https://doi.org/10.1590/S1678-77572007000500004.
318. Arnold, W. H., Heidt, B. A., Kuntz, S., & Naumova, E. A. (2014). Effects of fluoridated milk on root dentin remineralization. *Plos One*, 9(8), e104327. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104327.
319. Vieira, A. R., Gibson, C. W., Deeley, K., Xue, H., & Li, Y. (2015). Weaker dental enamel explains dental decay. *Plos One*, 10(4), e0124236. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124236.
320. Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., Magalhães, A. C., Rios, D., Honório, H. M., & Delbem, A. C. B. (2010). PH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *Journal of Applied Oral Science*, 18(4), 316. https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000400002.
321. Özdemir, Ş., Taran, P. K., Mammadlı, N., Altınova, İ. S., & Gazioğlu, I. (2022). Remineralization potential of P11-4 and fluoride on secondary carious primary enamel: a quantitative evaluation using microcomputed tomography. *Microscopy Research and Technique*, 85(2), 807–812. https://doi.org/10.1002/JEMT.24052.
322. Leung, V. W. H., & Darvell, B. W. (1997). Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of Dentistry*, 25(6), 475–484. https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00068-1.
323. Malallah, O. S., Garcia, C. M. A., Proctor, G. B., Forbes, B., & Royall, P. G. (2018). Buccal drug delivery technologies for patient-centred treatment of radiation-induced xerostomia (dry mouth). *International Journal of Pharmaceutics*, 541(1–2), 157–166. https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.02.004.
324. Syed, J. (2018). Scanning electron microscopy in oral research. *Journal of The Pakistan Dental Association*, 26(4), 189–195. https://doi.org/10.25301/JPDA.264.189.
325. Sindhura, V., Uloopi, K. S., Vinay, C., & Chandrasekhar, R. (2018). Evaluation of enamel remineralizing potential of self-assembling peptide P11-4 on artificially induced enamel lesions in vitro. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 36(4), 352–356. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_255_18.
326. Yoğurucu Değerli, G. (2023). İn-vitro dentin çürüğü modelinde florür vernik, gümüş diamin florür ve peptid P11-4 uygulamasının dentin nano yapısı üzerine etkilerinin SEM, FTIR ve SAXS yöntemleri kullanılarak incelenmesi (*Doktora tezi)*. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

327. Zhu, Y., Yan, J., Mujtaba, B. M., Li, Y., Wei, H., & Huang, S. (2021). The dual anti-caries effect of carboxymethyl chitosan nanogel loaded with chimeric lysin ClyR and amorphous calcium phosphate. *European Journal of Oral Sciences*, 129(3), e12784. https://doi.org/10.1111/EOS.12784.
328. Kaczmarek, K., Leniart, A., Lapinska, B., Skrzypek, S., & Lukomska-Szymanska, M. (2021). Selected spectroscopic techniques for surface analysis of dental materials: a narrative review. *Materials*, 14(10), 2624. https://doi.org/10.3390/MA14102624.
329. Xiao, Z., Yu, S., Li, Y., Ruan, S., Kong, L. B., Huang, Q., Huang, Z., Zhou, K., Su, H., Yao, Z., Que, W., Liu, Y., Zhang, T., Wang, J., Liu, P., Shen, D., Allix, M., Zhang, J., & Tang, D. (2020). Materials development and potential applications of transparent ceramics: A review. *Materials Science and Engineering Reports*, 139, 100518. https://doi.org/10.1016/J.MSER.2019.100518.
330. Qasim, S. B., Najeeb, S., Delaine-Smith, R. M., Rawlinson, A., & Ur Rehman, I. (2017). Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration. *Dental Materials*, 33(1), 71–83. https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2016.10.003.
331. McConkey, B., Sobolev, V., & Edelman, M. (2002). The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*, 83, 469–475. https://weizmann.elsevierpure.com/en/publications/the-performance-of-current-methods-in-ligand-protein-docking.
332. Ardani, I. G. A. W., Nugraha, A. P., Suryani, M. N., Pamungkas, R. H. P., Vitamamy, D. G., Susanto, R. A., Sarno, R., Fajar, A., Kharisma, V. D., Nugraha, A. P., & Noor, A. (2022). Molecular docking of polyether ether ketone and nano-hydroxyapatite as biomaterial candidates for orthodontic mini-implant fabrication. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 10(4), 676–686. https://doi.org/10.56499/JPPRES22.1371_10.4.676.
333. Saini, R. S., Binduhayyim, R. I. H., Gurumurthy, V., Alshadidi, A. A. F., Aldosari, L. I. N., Okshah, A., Kuruniyan, M. S., Dermawan, D., Avetisyan, A., Mosaddad, S. A., & Heboyan, A. (2024). Dental biomaterials redefined: molecular docking and dynamics-driven dental resin composite optimization. *BMC Oral Health*, 24(1), 557. https://doi.org/10.1186/S12903-024-04343-1/TABLES/4.
334. Alam, M. K., Dhasarathan, V., Natesan, A., Nambi, R., Zaman, M. U., Ganji, K. K., Basri, R., Munisekhar, M. S., Nagarajappa, A. K., & Abutayyem, H. (2022). Human teeth disease detection using refractive ındex based surface plasmon resonance biosensor. *Coatings*, 12(10), 1398. https://doi.org/10.3390/COATINGS12101398.
335. Vornicescu, D., Penta, V., & Keusgen, M. (2023). An analytical tooth model based on surface plasmon resonance chips coated with hydroxyapatite used for ınvestigation of the acquired dental pellicle. *Physica Status Solidi (a)*, 220(22), 2300146. https://doi.org/10.1002/PSSA.202300146.
336. József, B., Máté, K., Melinda, S., Géza, V., & Csaba, H. (2015). Binding properties of components removable from dental base plate, analysed by Fourier-Transform Surface Plasmon Resonance (FT-SPR) method. *Fogorvosi Szemle*, 108(1), 13–18. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26117954/.
337. Türkoğlu, E. A., & Aydın, F. G. (2023). Surface plasmon resonance binding study on the interaction of acetazolamide and bovine serum albumin. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 13(4), 703–709. https://doi.org/10.33808/CLINEXPHEALTHSCI.1218956.
338. Kumar, R., Pal, S., Verma, A., Prajapati, Y. K., & Saini, J. P. (2020). Effect of silicon on sensitivity of SPR biosensor using hybrid nanostructure of black phosphorus and MXene. *Superlattices and Microstructures*, 145, 106591. https://doi.org/10.1016/J.SPMI.2020.106591.
339. Topor, C. V., Puiu, M., & Bala, C. (2023). Strategies for surface design in surface plasmon resonance (SPR) sensing. *Biosensors*, 13(4), 465. https://doi.org/10.3390/BIOS13040465.
340. Niegelhell, K., Leimgruber, S., Grießer, T., Brandl, C., Chernev, B., Schennach, R., Trimmel, G., & Spirk, S. (2016). Adsorption studies of organophosphonic acids on differently activated gold surfaces. *Journal of Surfaces and Colloids*, 32(6), 1550–1559. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.5B04467.
341. Rodríguez-Franco, P., Abad, L., Muñoz-Pascual, F. X., Moreno, M., & Baldrich, E. (2014). Effect of the transducer's surface pre-treatment on SPR aptasensor development. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 191, 634–642. https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.10.046.
342. Sinha, R. K. (2021). Wavelength modulation based surface plasmon resonance sensor for detection of cardiac marker proteins troponin I and troponin T. *Sensors and Actuators A: Physical*, 332, 113104. https://doi.org/10.1016/J.SNA.2021.113104.
343. Hannig, C., Hoch, J., Becker, K., Hannig, M., & Attin, T. (2005). Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Archives of Oral Biology*, 50(9), 821–828. https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2005.01.006.
344. Chifor, E., Bordeianu, I., Anastasescu, C., Calderon-Moreno, J. M., Bratan, V., Eftemie, D. I., Anastasescu, M., Preda, S., Plavan, G., Pelinescu, D., Ionescu, R., Stoica, I., Zaharescu, M., &

Balint, I. (2022). Bioactive coatings based on nanostructured TiO_2 modified with noble metal nanoparticles and lysozyme for Ti dental implants. *Nanomaterials*, 12(18), 3186. https://doi.org/10.3390/NANO12183186.

345. Suda, S., Takamizawa, T., Takahashi, F., Tsujimoto, A., Akiba, S., Nagura, Y., Kurokawa, H., & Miyazaki, M. (2018). Application of the self- assembling peptide P11-4 for prevention of acidic erosion. *Operative Dentistry*, 43(4), E166–E172. https://doi.org/10.2341/17-175-L.
346. Memarpour, M., Razmjouei, F., Rafiee, A., & Vossoughi, M. (2022). Remineralization effects of self-assembling peptide P11-4 associated with three materials on early enamel carious lesions: An in vitro study. *Microscopy Research and Technique*, 85(2), 630–640. https://doi.org/10.1002/JEMT.23937.
347. Elewa, S. S., Elzainy, M. A., & Hussein, S. I. (2023). The effect of self assembling peptides versus sodium fluoride varnish on artificially induced enamel lesions in human premolars, in vitro study. (scanning electron microscope and energy dispersive x-ray analysis). *Egyptian Dental Journal*, 69(4), 2793–2805. https://doi.org/10.21608/EDJ.2023.228076.2674.
348. Shetty, S. S., & Nekkanti, S. (2023). Remineralization potential of a novel biomimetic material (self-assembling peptide p11-4) on early enamel caries: an in vitro study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 24(3), 181–187. https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-3490.
349. Saravana Karthikeyan, B., & Mahalaxmi, S. (2024). Biomimetic dentin remineralization using eggshell derived nanohydroxyapatite with and without carboxymethyl chitosan — an in vitro study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 270, 132359. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.132359.
350. Mohabatpour, F., Duan, X., Yazdanpanah, Z., Tabil, X. L., Lobanova, L., Zhu, N., Papagerakis, S., Chen, X., & Papagerakis, P. (2022). Bioprinting of alginate-carboxymethyl chitosan scaffolds for enamel tissue engineering in vitro. *Biofabrication*, 15(1), e015007. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ACAB35.
351. Putranto, A. W., Suprastiwi, E., Meidyawati, R., & Agusnar, H. (2022). Characterization of novel cement-based carboxymethyl chitosan/amorphous calcium phosphate. *European Journal of Dentistry*, 16(4), 809–814. https://doi.org/10.1055/S-0041-1739449.
352. Yang, X., Guo, J., Hu, B., Li, Z., Wu, M., Guo, H., Huang, X., Liu, X., Guo, X., Liu, P., Chen, Y., Li, S., Gu, Y., Wu, H., Xuan, K., & Yang, P. (2022). Amyloid-mediated remineralization in pit and fissure for caries preventive therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 11(19), e2200872. https://doi.org/10.1002/ADHM.202200872.
353. Fang, Z., Zhang, Y., Cao, C. Y., Li, Q. L., & Wong, H. M. (2022). Constructing an anti-S. mutans and mineralizing membrane by combination self-assembled lysozyme with antimicrobial peptide. *Materials & Design*, 220, 110891. https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2022.110891.
354. Qin, P., Liu, R., & Teng, Y. (2011). Perfluorodecanoic acid binding to hemoproteins: new insights from spectroscopic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3246–3252. https://doi.org/10.1021/JF200092Y.
355. Rial, R., González-Durruthy, M., Somoza, M., Liu, Z., & Ruso, J. M. (2021). Unraveling the compositional and molecular features involved in lysozyme-benzothiazole derivative interactions. *Molecules*, 26(19). https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195855.
356. Pan, X., Liu, R., Qin, P., Wang, L., & Zhao, X. (2010). Spectroscopic studies on the ınteraction of acid yellow with bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, 130(4), 611–617. https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2009.11.004.
357. Wang, Y. Q., Chen, T. T., & Zhang, H. M. (2010). Investigation of the interactions of lysozyme and trypsin with biphenol A using spectroscopic methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(3), 1130–1137. https://doi.org/10.1016/J.SAA.2009.12.071.
358. Huang, S., Wang, J., Zhang, Y., Yu, Z., & Qi, C. (2016). Quaternized carboxymethyl chitosan-based silver nanoparticles hybrid: microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial activity. *Nanomaterials*, 6(6), 118. https://doi.org/10.3390/NANO6060118.
359. Liu, J., Lu, J. feng, Kan, J., Tang, Y. qing, & Jin, C. hai. (2013). Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 85–93. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.08.040.
360. Wei, R., Jin, C. C., Quan, J., Nie, H. L., & Zhu, L. M. (2014). A novel self-assembling peptide with UV-responsive properties. *Biopolymers*, 101(3), 272–278. https://doi.org/10.1002/BIP.22346.
361. Saini, R. S., Binduhayyim, R. I. H., Gurumurthy, V., Alshadidi, A. A. F., Bavabeedu, S. S., Vyas, R., Dermawan, D., Naseef, P. P., Mosaddad, S. A., & Heboyan, A. (2024). In silico assessment of biocompatibility and toxicity: molecular docking and dynamics simulation of PMMA-based dental

materials for interim prosthetic restorations. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 35(1), 28. https://doi.org/10.1007/S10856-024-06799-7/TABLES/7.
362. Kimia Sains dan Aplikasi, J., Hana Afiyah, L., Hudiyanti, D., Cholid Djunaidi, M., Dewi Prasasty, V., Zulaikha Hildayani, S., & Siahaan, P. (2024). Molecular properties of carboxymethyl chitosan and its complexes with curcumin and nicotinamide in drug delivery applications: molecular docking and molecular dynamic study. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 27(4), 160–166. https://doi.org/10.14710/JKSA.27.4.160-166.
363. Carvalho, R. G., Patekoski, L. F., Puppin-Rontani, R. M., Nakaie, C. R., Nascimento, F. D., & Tersariol, I. L. S. (2023). Self-assembled peptide P11-4 interacts with the type I collagen C-terminal telopeptide domain and calcium ions. *Dental Materials*, 39(8), 708–717. https://doi.org/10.1016/j.dental.2023.06.004.
364. Vornicescu, D., Penta, V., Keusgen, M., & Demetrescu, I. (2015). Early dental plaque formation investigated using surface plasmon resonance (SPR). *UPB Scientific Bulletin, Series B:Medicine, Materials Science*, 77(1), 143–148.
365. Lortlar Ünlü, N., Bakhshpour-Yucel, M., Chiodi, E., Diken-Gür, S., Emre, S., & Ünlü, M. S. (2024). Characterization of receptor binding affinity for vascular endothelial growth factor with interferometric imaging sensor. *Biosensors*, 14(7), 315. https://doi.org/10.3390/BIOS14070315.
366. Li, L., Xu, H., Zhou, J., Yu, J., Copeland, L., & Wang, S. (2021). Mechanisms underlying the effect of tea extracts on in vitro digestion of wheat starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(29), 8227–8235. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C02526/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF1C02526_0009.GIF.
367. Wang, R., Guo, J., Lin, X., Chen, S., & Mai, S. (2020). Influence of molecular weight and concentration of carboxymethyl chitosan on biomimetic mineralization of collagen. *RSC Advances*, 10(22), 12970–12981. https://doi.org/10.1039/D0RA00999G.
368. Honarmand, S., Dabirmanesh, B., Amanlou, M., & Khajeh, K. (2019). The interaction of several herbal extracts with α-synuclein: Fibril formation and surface plasmon resonance analysis. *Plos One*, 14(6), e0217801. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217801.
369. Hannig, C., Wasser, M., Becker, K., Hannig, M., Huber, K., & Attin, T. (2006). Influence of different restorative materials on lysozyme and amylase activity of the salivary pellicle in situ. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 78(4), 755–761. https://doi.org/10.1002/JBM.A.30758.
370. Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103. https://doi.org/10.1016/J.AB.2016.06.025.
371. Yao, S., Chen, S., Wang, R., Zhang, K., Lin, X., & Mai, S. (2022). Antibacterial activity and bonding performance of carboxymethyl chitosan–containing dental adhesive system. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 119, 103269. https://doi.org/10.1016/J.IJADHADH.2022.103269.
372. Polat Güven, G., Akgün Martı, Ö., Şimşek, B., Saraçlı, M. A., Heper, S., & Hasırcı, N. (2016). Fluoride-containing anti-caries pH-sensitive release system and its effect on streptococcus mutans. *Fluoride*, 49(4), 458–466. https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS.
373. Xu, S., Zhou, Q., Jiang, Z., Wang, Y., Yang, K., Qiu, X., & Ji, Q. (2020). The effect of doxycycline-containing chitosan/carboxymethyl chitosan nanoparticles on NLRP3 inflammasome in periodontal disease. *Carbohydrate Polymers*, 237, 116163. https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116163.

EKLER

EK-1A. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 23.08.2023-20750

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

Toplantı Tarihi : 21.07.2023
Toplantı Sayısı : 2023/14
Karar Sayısı : 14/24

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan Prof. Dr. Günseli Güven Polat'ın sorumlu, Dt. Nur Irmak Erakman ve Dr. Öğr. Üyesi Emir Alper Türkoğlu'nun yardımcı araştırmacı olduğu 23/342 kayıt numaralı ***"İNVİTRO DEMİNERALİZE MİNE MODELİNDE P11-4 VE KARBOKSİMETİL KİTOSANIN MİNE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM İLE TESPİTİ VE TÜKÜRÜK LİZOZİMİ İLE ETKİLEŞİMİNİN VE BİYOAKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 21.07.2023 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER
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

14.08.2023 Memur
17.08.2023 Başkan

Feyzanur SEZGİN
Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSRK8CC1H5&eS=20750

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır. 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'nun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1B. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.09.2024-399204

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-46418926-050.04--399204 25.09.2024
Konu : 23-342/Dilekçe

Sayın Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT

21.07.2023 tarihli ve 14/24 karar sayılı "İN-VİTRO DEMİNERALİZE MİNE MODELİNDE P11-4 VE KARBOKSİMETİL KİTOSANIN MİNE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM İLE TESPİTİ VE TÜKÜRÜK LİZOZİMİ İLE ETKİLEŞİMİNİN VE BİYOAKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı uygun bulunan çalışmanın başlığının "İN-VİTRO DEMİNERALİZE MİNE MODELİNDE P11-4 VE KARBOKSİMETİL KİTOSANIN MİNE YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM İLE TESPİTİ VE LİZOZİM İLE ETKİLEŞİMİNİN VE BİYOAKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" olarak değiştirilmesi Etik Kurulumuzca uygun görülmüş olup arşiv kayıtlarına eklenmiştir.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Ek:Dilekçe

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :*BSELP6K8N7* Pin Kodu :41162 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys

Adres:Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Kampüsü, Tıbbiye Cad. No:38 Selimiye
Telefon:0216 346 36 38 Faks:0216 346 36 40
Web:http://sbu.edu.tr
Kep Adresi:sbu@hs01.kep.tr

Bilgi için: Feyzanur SEZGİN
Ünvanı: Memur

Bu belge,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 "İn-Vitro Demineralize Mine Modelinde P11-4 ve Karboksimetil Kitosanın Mine Yapısı Üzerine Etkilerinin Sem ile Tespiti ve Lizozim ile etkileşiminin ve Biyoaktivitesinin Değerlendirilmesi" isimli bilimsel araştırma çalışmasında kullanılabilmesi için izin istenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Çekilmiş dişlerin, "İn-Vitro Demineralize Mine Modelinde P11-4 ve Karboksimetil Kitosanın Mine Yapısı Üzerine Etkilerinin Sem ile Tespiti ve Lizozim ile Etkileşiminin ve Biyoaktivitesinin Değerlendirilmesi" isimli çalışmada diş çürüğünün durdurulması için kullanılabilecek materyallerin etkinliği, klinikte kullanımı sonucu avantaj sağlanıp sağlanılmayacağı 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 klinik bilgileriniz çalışmanın herhangi bir aşamasında kullanılmayacak, yalnızca çekilmiş diş çalışma içinde değerlendirilecektir.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİ:

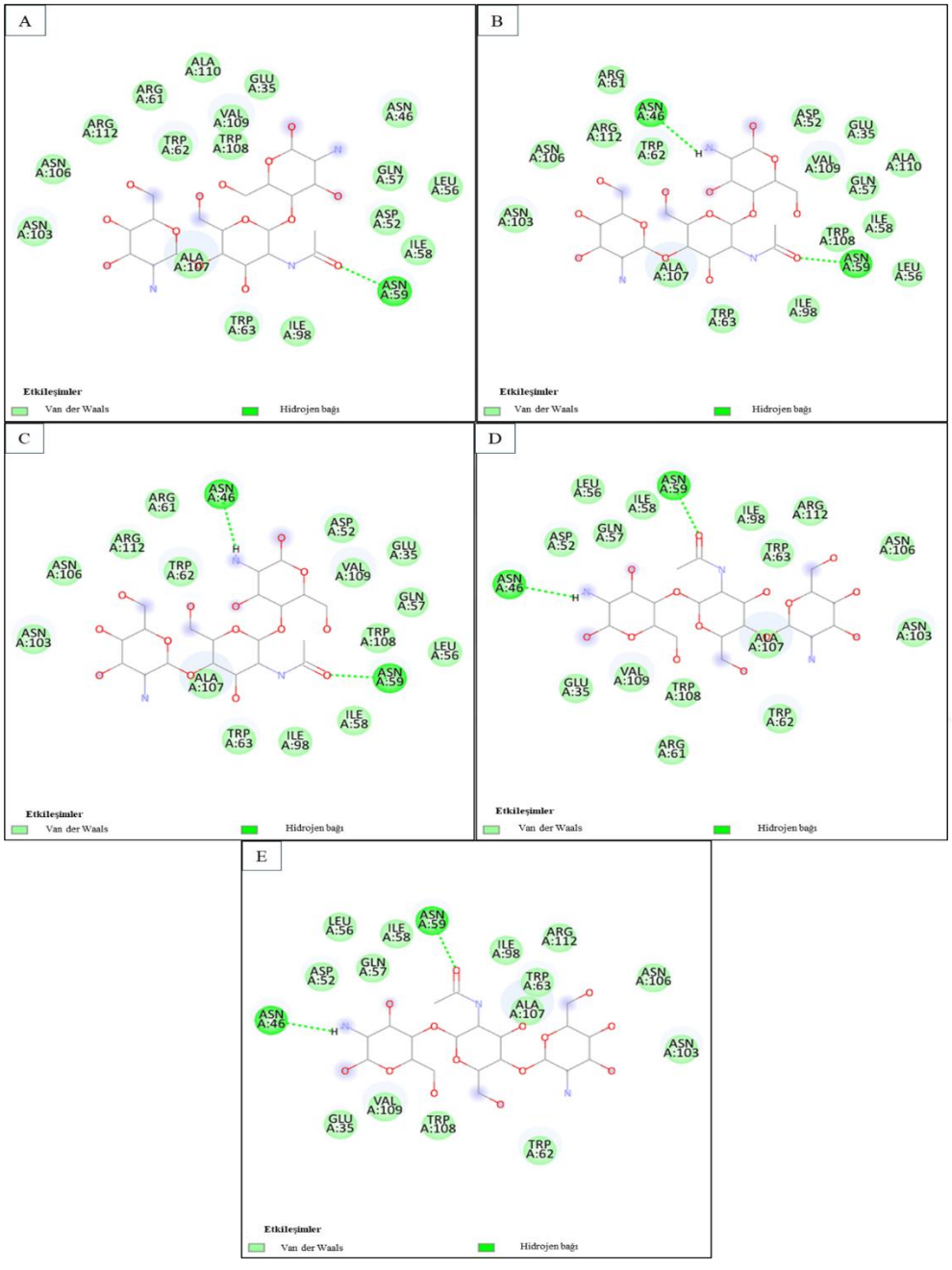
Adı Soyadı: Nur Irmak Erakman, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı
Telefon:

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

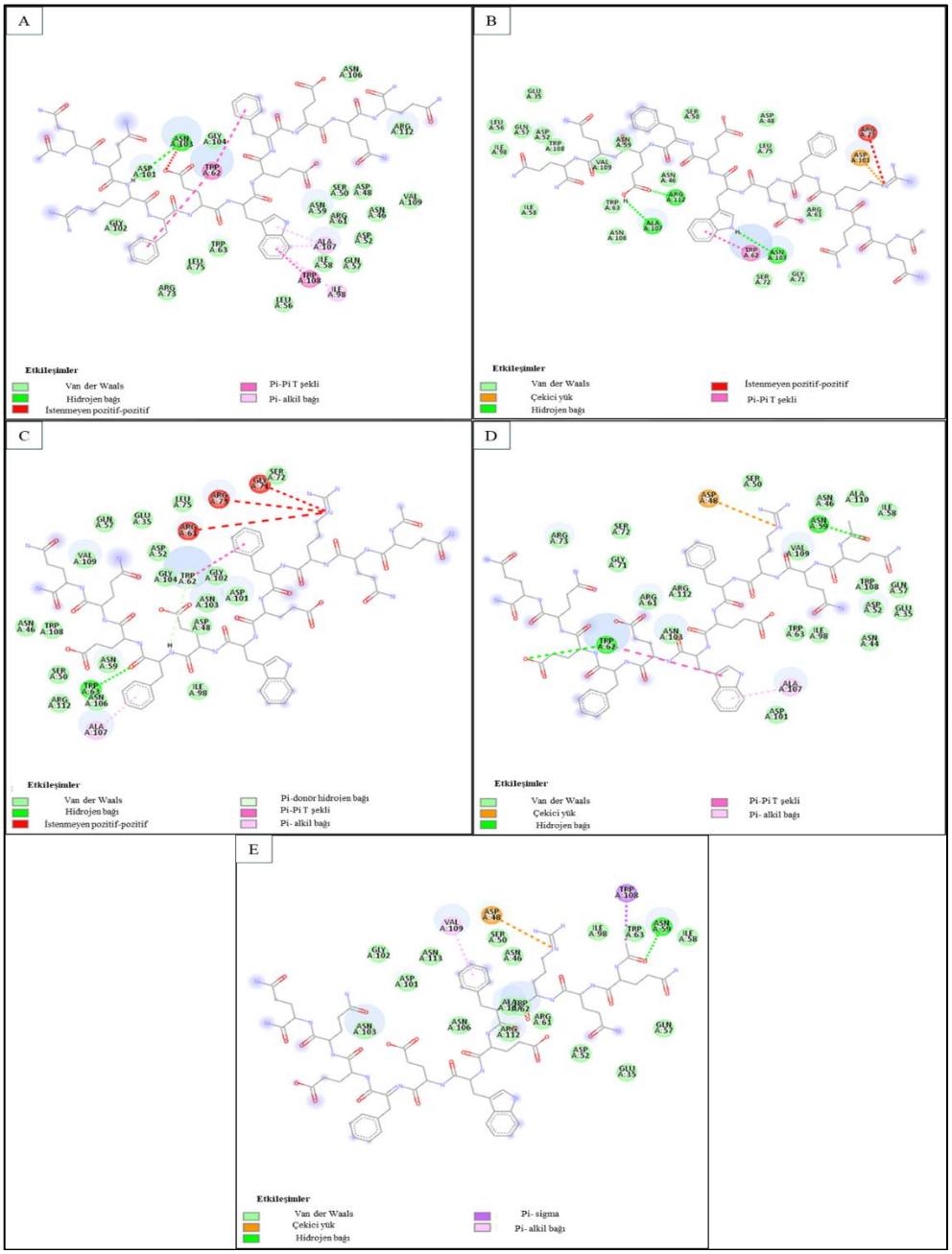
Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı.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

Gönüllü Adı Soyadı:
Araştırmacı Adı Soyadı:
Tarih ve İmza: Tarih ve İmza:

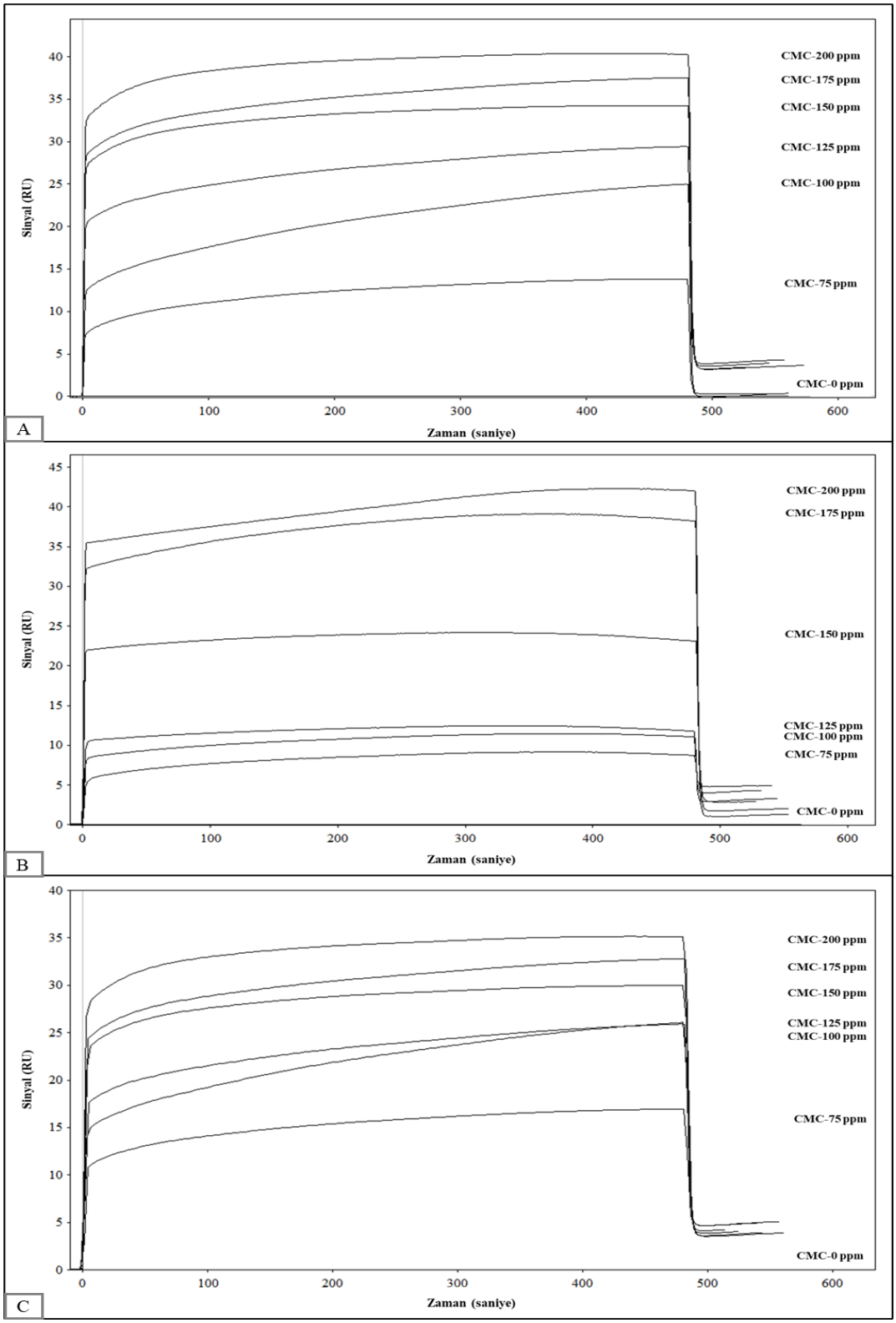
EK-3A. CMC-Lizozim Etkileşiminin Tekrarlanan Moleküler Kenetlenme Analizi Sonuçları



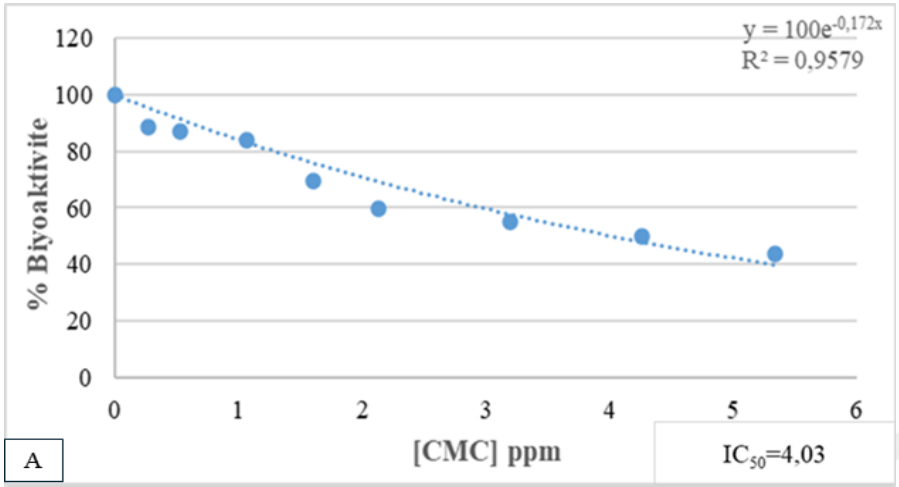
EK-3B. P11-4-Lizozim Etkileşiminin Tekrarlanan Moleküler Kenetlenme Analizi Sonuçları

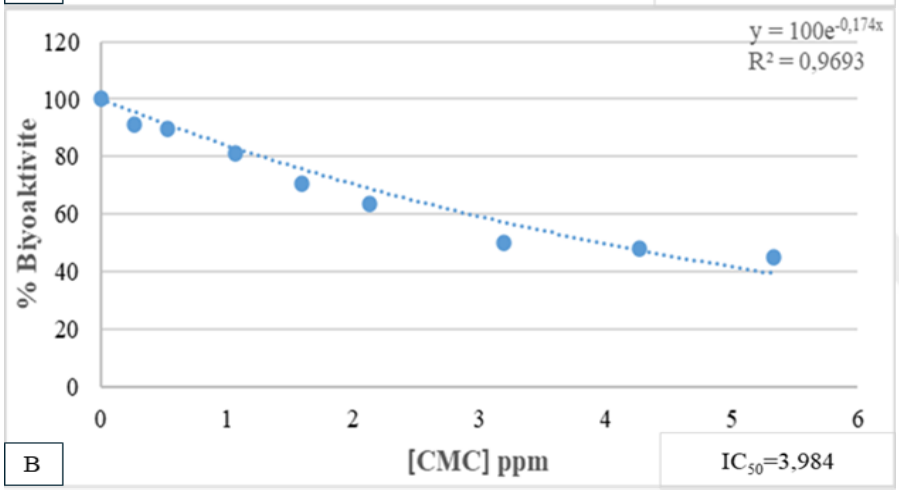


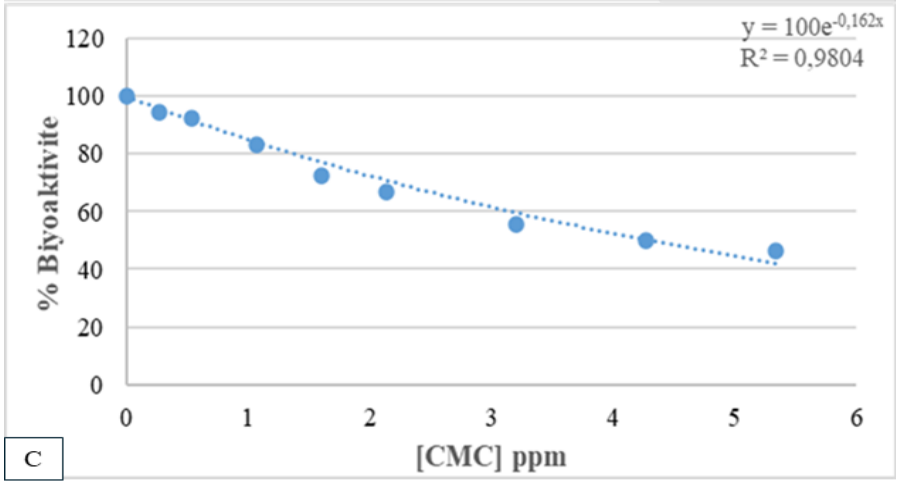
EK-4. CMC-Lizozim Etkileşiminin Tekrarlanan SPR Analiz Sonuçları



EK-5A. CMC'nin Lizozim Biyoaktivitesine Etkisinin Tekrarlı Sonuçları







EK-5B. P11-4'ün Lizozim Biyoaktivitesine Etkisinin Tekrarlı Sonuçları

