T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMİMETİK MATERYALLERİN BRAKETLER ÜZERİNDEKİ *STREPTOCOCCUS MUTANS* KONSANTRASYONU VE MİNE DEMİNERALİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ARDA TABANCALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENİZ KARAÇAY

ORTODONTİ ANA BİLİM DALI
ORTODONTİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2024

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüs Ortodonti Ana Bilim Dalı Doktora Programında Arda TABANCALI tarafından hazırlanan "Biyomimetik Materyallerin Braketler Üzerindeki Streptococcus Mutans Konsantrasyonu ve Mine Demineralizasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İMZA

Danışman/Başkan: Prof. Dr. Şeniz KARAÇAY
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ortodonti Ana Bilim Dalı
Bu tezin "Doktora Tezi" olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. ……..

Üye: Prof. Dr. Derya ÇAKAN İMZA
Yeditepe Üniversitesi, Ortodonti Ana Bilim Dalı
Bu tezin "Doktora Tezi" olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
……..

Üye: Prof. Dr. Bedia Defne KEÇİK İMZA
Başkent Üniversitesi, Ortodonti Ana Bilim Dalı
Bu tezin "Doktora Tezi" olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
……..

Üye: Prof. Dr. Arzu ATAY İMZA
Bu tezin "Doktora Tezi" olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

……..

Üye: Doç. Dr. Ersin YILDIRIM İMZA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ortodonti Ana Bilim Dalı
Bu tezin "Doktora Tezi" olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum
……..

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 06/12/2024

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Arda TABANCALI

İTHAF

“Her zaman yanımda olan annem ve babama ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kendisinin öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, tezimin her aşamasına bilgi ve tecrübesi ile ışık tutan sayın danışman hocam Prof. Dr. Şeniz KARAÇAY'a,

Doktora eğitim hayatım boyunca akademik bilgi ve klinik tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Ersin YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Derya DURSUN'a,

Tez çalışmamda materyallerin üretilmesi ve deney sonrası analizlerin gerçekleştirilmesini sağlayan, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Önder ALBAYRAK'a,

Tez çalışmamın mikrobiyolojik değerlendirmelerini gerçekleştirdiğimiz Dr. Öğr. Üyesi Aysun KAYA'ya,

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, bugünlere gelmemdeki en büyük emeği veren, her zaman yanımda olduklarını ve beni desteklediklerine emin olduğum annem ve babam Filiz ve Erkan TABANCALI'ya,

Doktora eğitim hayatım ve tez çalışmam boyunca desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarıma, Dr. Öğr. Üyesi Büşra Seda YAVUZ ve Dr. Öğr. Üyesi Rumeysa BİLİCİ GEÇER'e

Doktora hayatım ve tez çalışmam sırasında desteğini ve bilgisini benimle paylaşan Dr. Esra TUNALI'ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu araştırma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023/082 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. MİNENİN YAPISI 3
2.2. BEYAZ NOKTA LEZYONLARI 5
2.2.1. Beyaz Nokta Lezyonlarının Etiyolojisi 6
2.2.2. Beyaz Nokta Lezyonlarının Histolojisi 7
2.2.3. Beyaz Nokta Lezyonlarının Klinik Görünümü ve Sınıflandırılması 8
2.2.4. Beyaz Nokta Lezyonlarından Korunma Yöntemleri 9
2.2.4.1. Hastanın risk faktörlerinin önlenmesi 9
2.2.4.2. Ortodontik materyal seçim 10
2.2.4.3. Oral hijyen eğitimi 10
2.2.4.4. Flor uygulamaları 11
2.2.4.5. Kazein fosfopeptit-amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP) 11
2.2.4.6. Argon-lazer 12
2.2.4.7. Antimikrobiyel ajanlar 12
2.2.5. Beyaz Nokta Lezyonlarının Demineralizasyon ve Remineralizasyonunu In-Vitro Olarak Değerlendirme Yöntemleri 13
2.2.5.1. Mikrosertlik ölçümü 13
2.2.5.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 14
2.2.2.3. Enerji dağılım X-ışını spektroskobu (EDX) 14
2.2.2.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) 15
2.2.2.5. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) 15
2.2.2.6. Konfokal lazer tarayıcı mikroskobu (CLSM) 15
2.2.2.7. Bilgisayarlı mikrotomografi 16
2.2.2.8. Polarize ışık mikroskobu (PLM) 16
2.2.2.9. Lazer floresans yöntemi 16

2.3. ORTODONTİK TEDAVİ VE ORAL MİKROBİYATA DEĞİŞİMİ 17
2.4. NANO HİDROKSİAPATİT 19
2.4.1. nHA'nın Remineralizasyona Etkisi 20
2.4.2. nHA'nın Oral Biyofilme Etkisi 21
2.5. ANTİMİKROBİYAL NANOPARTİKÜLLER 22
2.5.1. Bor 22
2.5.2. Gümüş 24
2.5.3. Grafen 24
3. GEREÇ VE YÖNTEM 26
3.1. MATERYALLER 26
3.2. YÖNTEM 30
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 30
3.2.1.1. Katkılı ve katkısız HA tozu üretilme yöntemi 30
3.2.1.2. Yaş kimyasal yöntem ile nano boyutta HA sentezlenmesi 31
3.2.1.3. Katı-hal yöntemi ile %2 Bor katkılı HA sentezlenmesi 31
3.2.1.4. Sentezlenen HA ve Bor katkılı HA tozlarından süspansiyonların hazırlanma prosedürü 31
3.2.1.5. Kazein fosfopeptit amorf kalsiyum fosfat (Pozitif Kontrol Grubu) 32
3.2.2. Biyomimetik Materyallerin Minenin Demineralizasyonunu Önleme Kapasitelerinin Değerlendirilmesi 32
3.2.2.1. Örnek sayısının belirlenmesi 32
3.2.2.2. Dişlerin toplanması 32
3.2.2.3. Diş örneklerinin hazırlanması 33
3.2.2.4. Başlangıç mikrosertlik ölçümlerinin yapılması 34
3.2.2.5. Materyallerin ve pH döngüsünün uygulanması 34
3.2.2.6. Materyallerin uygulanmasının ardından Vickers mikrosertlik ölçümünün gerçekleştirilmesi 36
3.2.2.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülenmesi 37
3.2.3. Biyomimetik Materyallerin Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkilerinin Değerlendirilmesi 38
3.2.3.1. Örnek sayısının belirlenmesi 38
3.2.3.2. Bakterilerin çoğaltılması 39
3.2.3.3. Solüsyonların minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi 39
3.2.3.4. Solüsyonların biyofilm oluşumunu engelleme kapasitesinin incelenmesi 41
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme 43
4. BULGULAR 44
4.1 BİYOMİMETİK MATERYALLERİN MİNENİN DEMİNERALİZASYONUNU ÖNLEME KAPASİTELERİNE AİT BULGULAR 44

4.1.1. Vickers Mikrosertlik Bulguları 44
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bulguları 46
4.2. BİYOMİMETİK MATERYALLERİN ANTİBAKTERİYAL VE ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNE AİT BULGULAR 54
4.2.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) 54
4.2.2. Solüsyonların Biyofilm Oluşumunu Engelleme Kapasitesine Ait Bulgular 54
5. TARTIŞMA 58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 76
KAYNAKLAR 78
EK 88

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Biyomimetik materyallerin mine demineralizasyonunu önleme kapasitelerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler 27

Tablo 3.2: Biyomimetik materyallerin mine demineralizasyonunu önleme kapasitelerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan araç ve gereçler..... 27

Tablo 3.3: Biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler 28

Tablo 3.4: Biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan araç ve gereçler..... 29

Tablo 3.5: Tez çalışmamızda kullanılan deney grupları..... 30

Tablo 4.1: Dişlerin deney sonu Vickers mikrosertlik ölçümleri..... 44

Tablo 4.2: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerleri.... 55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: CaHA'nın moleküler yapısı 4

Şekil 2.2: BNL'nin klinik olarak sınıflandırılması..... 9

Şekil 3.1: GC Tooth Mousse (CPP-ACP)…….... 32

Şekil 3.2: Deney için hazırlanmış küçük azı dişleri 33

Şekil 3.3: Küçük azı dişlerinin akrilik bloklar içine gömülmesi, etiketlerinin yapıştırılması ve çift kat tırnak cilası ile kaplanması 34

Şekil 3.4: Materyallerin mikro fırça yardımıya diş yüzeylerine uygulanması 35

Şekil 3.5: Gruplara ayrılan diş numunelerinin demineralizasyon/remineralizasyon süreçlerine maruz tutulması 36

Şekil 3.6: Vickers mikrosertlik ölçüm cihazı ve ölçüm sırasında diş numunesi üzerinde bıraktığı örnek iz 37

Şekil 3.7: Örnekler üzerine platin kaplamasının gerçekleştirilmesi ve deneyde kullanılan SEM cihazı..... 38

Şekil 3.8: Deneyde kullanılan biyogüvenlik kabini ve pastor fırını..... 38

Şekil 3.9: *Streptococcus mutans*'ın inkübe edilmesi..... 39

Şekil 3.10: Solüsyonların kullanım öncesinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılması 40

Şekil 3.11: Hazırlanan bakteri/distile su süspansiyonunun pipet yardımı ile kuyucuklara yerleştirilmesi 40

Şekil 3.12: Rezasurin çözeltisinin kuyucuklara yerleştirilmesi..... 41

Şekil 3.13: Çözeltininin 0,5 McFarland'a ayarlanması ve kristal viyole solüsyonunun vortexlenmesi..... 42

Şekil 3.14: Braketler üzerine kristal viyole solüsyonunun uygulanması, yıkanması ve %33'lük asetik asit süspansiyonu ile çözdürülmesi..... 42

Şekil 3.15: Braket üzerinde oluşmuş bakteri plağının krital viyole solüsyonu ile boyanması ve optik dansitenin ölçülmesi 43

Şekil 4.1: Gruplara ait Vickers mikrosertlik değerlerinin grafiksel karşılaştırılması……. 45

Şekil 4.2: Gruplara ait Vickers mikrosertlik değerlerinin Box-Plot grafikleri..... 46

Şekil 4.3: “nHA Sinterleme Öncesi” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 47

Şekil 4.4: “nHA Sinterleme Sonrası” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 48

Şekil 4.5: “%2 Bor nHA Sinterleme Öncesi” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 49

Şekil 4.6: “%2 Bor nHA Sinterleme Sonrası” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 50

Şekil 4.7: “%4 Bor nHA Sinterleme Öncesi” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 51

Şekil 4. 8: “GC Tooth Mouse” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 52

Şekil 4. 9: “Yapay Tükürük” grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme 53

Şekil 4.10: MİK hesaplanması. A: Deney grupları, B: *S. mutans* kullanılmayan sterilite kontrolü 54

Şekil 4.11: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerlerinin grafiksel karşılaştırılması 56

Şekil 4.12: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerlerinin Box-Plot grafikleri 57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP : Amorfoz Kalsiyum Fosfat

B : Bor

BNL : Beyaz Nokta Lezyonu

BHI : Brain Heart Infusion Broth

CaHA : Kalsiyum Hidroksiapatit

$Ca(OH)_2$: Kalsiyum Hidroksit

CHX : Klorheksidin

CPP : Kazein Fosfopeptit

CPP-ACP : Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Fosfat

HA : Hidroksiapatit

HAp : Hidroksiapatit Partikülü

H_3BO_3 : Borik Asit

KV : Kristal Viyole

MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

NaF : Sodyum Florür

nHA : Nano Hidroksiapatit

nHAp : Nano Hidroksiapatit Partikülü

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

S. mutans : Streptococcus Mutans

XTT : Tetrazolyum Klorür

BİYOMİMETİK MATERYALLERİN BRAKETLER ÜZERİNDEKİ *STREPTOCOCCUS MUTANS* KONSANTRASYONU VE MİNE DEMİNERALİZASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Ortodontik tedavi sırasında artan bakteriyel yükün ve bakteri asitlerinin neden olduğu Beyaz Nokta Lezyonları'nın (BNL) engellenmesi için, nano hidroksiapatit (nHA) solüsyonunun niteliklerinin bor katkısıyla geliştirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Demineralizasyonun engellenmesi aşamasında toplam 96 adet insan premolar dişi kullanıldı. Numuneler her grupta 14 diş olacak şekilde nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2), %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası (Grup 4), %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5), Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP) (Grup 6) ve Yapay Tükürük (Grup 7) olarak ayrıldı. Biyomimetik solüsyonların demineralizasyonu engelleme kapasiteleri 10 günlük pH döngüsü sonrasında Vickers mikrosertlik cihazı ölçüldü ve SEM görüntülenmesi ile değerlendirildi. Her grupta 7 tane olmak üzere toplam 49 braket üzerinde *Streptococcus Mutans* biyofilmi yetiştirilerek antibiyofilm özellikleri test edildi.

Bulgular: %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubunun (4. Grup) Vickers mikrosertlik ölçümlerinin tüm çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü (p=0,01). SEM analizinde demineralizasyonu daha fazla engellendiği ve mine yüzeylerinin daha homojen olduğu tespit edildi. Tüm gruplarda Negatif Kontrol (7. Grup) grubuna göre daha az biyofilm oluşumu gerçekleşti.

Sonuç: nHA'ya eklenen %2 bor katkısının, sinterleme sonrasında mine yüzeyinde meydana gelen demineralizasyonu önleyerek ortodontik tedavi sırasında oluşan BNL'lerin engellenmesini için umut vadeden bir biyomimetik materyal olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Beyaz Nokta, Bor, Demineralizasyon, Hidroksiapatit

EVALUATION OF THE EFFECTS OF BIOMIMETIC MATERIALS ON *STREPTOCCOCCUS MUTANS* CONCENTRATION ON BRACKETS AND ENAMEL DEMINERALIZATION

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to enhance the properties of nano hydroxyapatite (nHA) solution by adding boron to prevent White Spot Lesions (WSLs) caused by increased bacterial load and bacterial acids during orthodontic treatment.

Materials and Methods: A total of 96 human premolar teeth were used to prevent demineralization. The samples were divided into seven groups, with 14 teeth in each group: nHA Before Sintering (Group 1), nHA After Sintering (Group 2), 2% Boron nHA Before Sintering (Group 3), 2% Boron nHA After Sintering (Group 4), 4% Boron nHA Before Sintering (Group 5), Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) (Group 6), and Artificial Saliva (Group 7). The capacity of biomimetic solutions to prevent demineralization was evaluated by Vickers microhardness device measurements and SEM imaging after a 10-day pH cycling period. Antibiofilm properties were tested by growing Streptococcus mutans biofilm on 49 brackets, with 7 in each group.

Results: The Vickers microhardness measurements of the 2% Boron nHA After Sintering Group (Group 4) were found to be significantly higher than those of all other study groups ($p=0.01$). SEM analysis showed that demineralization was better prevented, and enamel surfaces were more homogeneous. All groups showed less biofilm formation compared to the Negative Control (Group 7).

Conclusion: The addition of 2% boron to nHA, after sintering, showed promise as a biomimetic material for preventing WSLs during orthodontic treatment by preventing demineralization of the enamel surface.

Key Words: White Spot, Boron, Demineralization, Hydroxyapatite

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sabit ortodontik tedavi sırasında tellerin oluşturduğu kuvveti dişe ileten braketler bakteriler için retantif alanlar oluşturmaktadırlar. Özellikle ağız hijyeni iyi olmayan hastalarda braketler etrafına tutunan bakteri plağı asit üreterek diş yüzeyinde demineralizasyona sebep olmaktadırlar. Bu demineralizasyon, estetik ve medikal yönden istenmeyen sonuçlar oluşturmaktadır. Ortodonti hastaları, ağız hijyenini korumak için çeşitli kimyasal ajanlardan yardım alabilmektedirler.

Beyaz nokta lezyonları (BNL) düz mine yüzeylerinde, opak beyaz renkte görülen, mine çürüklerinin başlangıç remineralizasyon aşaması olarak tanımlanmaktadır (1). BNL minenin demineralizasyonu sonucu yüzey altı alanının pörözitesinin genişlemesi ile azalan translüsensinin etkisiyle ancak yüzey kurutulduğunda gözlemlenebilmektedir. Bu alanlar kurutuldukları zaman beyaz opak görüntüsüyle hipokalsifiye alanlardan ayrılmaktadırlar (2). BNL bakteri asitlerinin oluşturduğu, diş çürüğünün en erken aşamasıdır. Bu aşamada yapılan bir müdahale, çürük lezyonunun engellenmesi ve daha komplike prosedürlerin uygulanma gereksiniminin önüne geçilmesini sağlamaktadır.

Bu lezyonlar ortodontik tedavinin en sık görülen yan etkileri arasındadır ve özellikle sabit ortodontik apareylerin etrafında gözükmektedir. *S. mutans* ve *Lactobacillus*'un BNL'lerde ve diş çürüklerinde patojenik bakteri florasının ana bileşenleri olduğu gösterilmiştir (3). Ortodontik tedavi sırasında yeni BNL insidansı %32,0-72,9 olarak bildirilmiş ve ortodontik tedavi süresi boyunca kaviteli lezyonların aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (4,5). Sabit apareylerin yerleştirilmesi, dental biyofilm ve bakteri kolonizasyonu ve birikim alanları sağladığından, oral mikroflorayı önemli ölçüde değiştirebilir (6). Çeşitli çalışmalar, *S. mutans* veya *Lactobacillus'*daki değişikliklerin ortodontik tedavinin ilk 2-6 ayında karmaşık ve tahmin edilemez olduğunu göstermiştir (6–8). Sabit ortodontik tedavi sırasında kullanılan braketler ile teller bakteri biyofilmlerinin tutunması için retantif yüzeyler oluşturmakta ve oral hijyenin sağlanmasını zorlaştırmaktadır.

BNL'lerin önlenmesinde ve tedavisinde güncel olarak kullanılmakta olan çeşitli kimyasal ajanlar bulunmaktadır. Ajanlar, tedavi sonrasında demineralize olmuş mine dokusunun remineralizasyonunda kullanılabilmektedirler. Öte yandan bu lezyonların oluşumundan sonra onarmak adına uygulanan tedavilerin tamamen etkili olduğunu

söyleyebilmek güçtür. Sabit ortodontik tedavi sırasında hastaların bilinçlendirilmesi ve çeşitli kimyasalların kullanılmasıyla, BNL'ye sebep olan demineralizasyonun önlenmesi çok daha kesin bir çözümdür. Klinik olarak, hekimler hastalarına oral hijyen eğitimleri vermekte ve demineralizasyonun engellenmesinde gargara, jel, diş macunu ya da sakız gibi çeşitli formlarda materyaller önermektedir.

Hidroksiapatit (HA), diş minesinin yapı taşlarından biridir ve çeşitli ürünlerin içeriklerinde yer alarak minenin güçlenledirilmesinde rol oynar. Araştırmacılar BNL'lerin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde dişin doğal yapısını taklit eden biyomimetik materyaller üzerinde çalışmaktadırlar. HA kemik yapımını ve mineralizasyonu destekleyen biyoaktif, toksik olmayan bir ürün olmasıyla diş hekimliğinde ve çene yüz cerrahisinde kullanılmaktadır (9).

Bor doğada, oksijen ve çeşitli elementlerle oluşturduğu borat tuzları halinde bulunur ve saf haline rastlamak mümkün değildir. İnsan vücudunda büyük çoğunlukla kemik ve dişlerde yer almakta olup odontojenik ve osteojenik farklılaşmayı arttırarak bu yapıların desteklenmesini sağlar. Borun kemik mineralizasyonu ve büyümesini desteklediği; ayrıca pek çok vücut fonksiyonunun gerçekleşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. HA'in yapısına eklenmiş bor katkısının, kemik defektleri üzerindeki etkileri incelenmiş olup, materyalin apatit oluşturma yeteneğini geliştirdiğini ve hücre çoğalmasını desteklediği bildirilmiştir (10,11).

Planlanan tez çalışmamın amacı, ortodontik tedavi sırasında gerçekleşen demineralizasyonun neden olduğu BNL'lerin engellenmesi ve artan bakteriyel mikroflora ile oluşturdukları biyofilmin biyomimetik yöntemlerle eliminasyonunun sağlanmasıdır. Bu hedef doğrultusunda, BNL tedavisinde kullanılmakta olan nano hidroksiapatit (nHA) solüsyonunun niteliklerinin bor katkısıyla geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca in vitro şartlarda bakteriyel biyofilm oluşturularak, farklı materyal kombinasyonlarının bakteri ile bakteri plağı üzerindeki etkileri ve mine üzerindeki remineralizasyona engel olma kapasitesi incelenecektir.

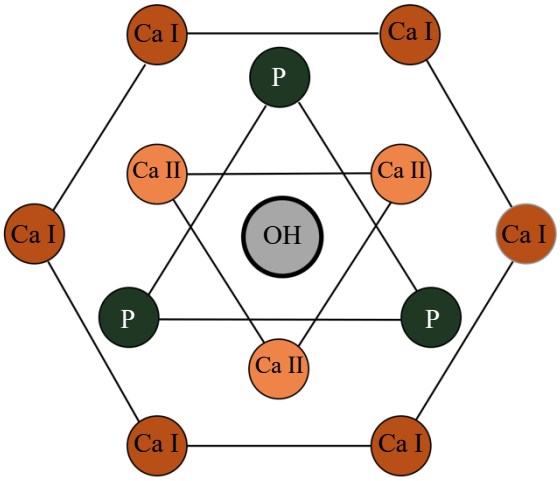
2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİNENİN YAPISI

Mine, dişlerin 1-2 mm'lik üst tabakasını kaplayan, demir ve karbon çeliği arasında sertliğe sahip bir vücut dokusudur (12). %95'ini mineraller, %1'ini organik maddeler ve %4'ünü su oluşturmaktadır (13).

Tamamen olgunlaşmış mine hücresiz bir yapıdır ve bu özelliği ile diğer diş dokularından ayrılır. Yapısının %80-90'ını karbonatlı kalsiyum hidroksiapatit (CaHA) kristalleri oluşturur, bu oran kemik ve dentinle karşılaştırıldığında (sırasıyla yaklaşık %10 ve %13) oldukça yüksektir. Bu durum, minenin olağanüstü sertliğinin ve aşınma direncinin temelini oluşturur. Mine kristalleri, boyutları ve morfolojik yapısı itibarıyla daha büyüktür ve daha tekdüze bir yapıya sahiptir, bu da onları mikroskop altında kolayca tanınabilir kılar. Kristallerin doku içerisindeki düzenli yerleşimi, minenin benzersiz optik özelliklerini ve translüsensini de beraberinde getirir. Bu düzenli yapı, ışığın mine içinde derinlemesine nüfuz etmesine ve yansıtılmasına olanak tanır. Böylece dişlerin doğal parlaklığını ve estetik görünümünü artırır. Ayrıca, mine, dişin en dış tabakası olarak, ağız ortamındaki asit saldırılarına karşı ilk savunma hattını oluşturur (14).

Mine dokusunun ana yapısı CaHA'dır ve kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olarak gösterilmektedir (15). Bir CaHA bileşiğinde (Şekil 2.1), hidroksil iyonu kalsiyum iyonlarından oluşan bir üçgen (kalsiyum II) ve kalsiyum iyonlarına göre 60° derece döndürülmüş 3 fosfat iyonu üçgeni ile çevrelenir. Bu üçgenlerin etrafında, altıgen şeklinde dizilmiş kalsiyum iyonları (kalsiyum I) yer alır (16).



Şekil 2.1: CaHA'nın moleküler yapısı

Mine kristallerinin oluşumu 3 aşamalıdır. İlk aşama kristal hale geçebilen iyonların gruplanmasını içeren başlangıç tohumlarının oluşumu olarak adlandırılır. İkinci aşama CaHA kristallerinin yapı taşlarını oluşturan oktakalsiyum fosfat iyonlarının genişlik ve uzunluk olarak iki boyutlu gelişimini kapsar. Üçüncü aşama ise oktakalsiyum fosfatların kristal yüzeylerinde çökeldiği ve oktakalsiyum fosfatın hidrolize uğrayarak CaHA kristallerini oluşturduğu üç boyutlu gelişimdir (17).

Uzunlukları 1 mm, genişlikleri 50 nm ve kalınlıkları 25 nm olan mine kristallerinin dentinden mine yüzeyine kadar kırılmadan uzanabildikleri düşünülmektedir. Mine prizmaları yaklaşık 1000 HA kristal demetinin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu prizmalar, mine matrisinde son derece düzenli bir biçimde yerleşir ve dişin dayanıklılığında ve estetik görünümünde önemli bir rol oynar. Prizmaların kesit profilleri büyük bir çeşitlilik gösterir; bazıları neredeyse mükemmel bir dairesel şekle sahipken, diğerleri daha çok anahtar deliği şeklini andırır. Bu morfolojik çeşitlilik, prizmaların mine içindeki karmaşık düzenlenişini ve işlevsel adaptasyonunu yansıtır. HA kristalleri, prizmanın uzun aksına paralel bir şekilde düzenlenmiş olup, bu düzenleme minenin mekanik özelliklerini optimize eder. Her prizmanın çevresi, kristaller arasında bir miktar sapmanın olduğu ve kristaller arası boşluğun göreceli olarak daha fazla olduğu interprizmatik bölgeler ile çevrilidir. Bu bölgeler, mine prizmaları arasındaki geçişleri ve bağlantıları sağlayarak, minenin genel bütünlüğünü ve direncini artırır. (18)

İnterprizmatik bölgeler, minenin yapısal karmaşıklığını ve mikro düzeydeki özelliklerini daha da derinleştirir. Kristallerin bu bölgelerdeki düzensiz yerleşimi, minenin esneklik ve mukavemet arasında bir denge kurmasına yardımcı olur, böylece dişler çiğneme sırasında karşılaştıkları kuvvetlere karşı daha dirençli hale gelir. Ayrıca, bu düzenlenme, minenin asitlere ve aşınmaya karşı olan direncini de etkiler; çünkü interprizmatik bölgeler, demineralizasyon ve remineralizasyon süreçlerinde aktif rol oynar. Mine prizmalarının ve interprizmatik bölgelerin bu benzersiz yapısal düzenlemesi, diş hekimliği ve malzeme bilimindeki araştırmalar için zengin bir alan sunar. Bu yapısal özelliklerin detaylı anlaşılması, mineyi taklit eden daha dayanıklı ve estetik dental malzemelerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir, aynı zamanda diş erozyonu ve çürüklerinin önlenmesinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (19). Mineyi oluşturan prizmaların yoğunluğu homojen bir dağılım göstermemektedir ve genellikle yüzeyden dentine doğru azalır. Öte yandan gözenekli yapı, sıvı ve organik madde içeriği bu yönde artmaktadır (20).

Mine dokusunun organik içeriğinin %90'ından fazlasını diğer mineralize dokulardaki kollajene benzer kabul edilen amelogenin oluşturmaktadır. Ameloblastların ana salgı ürünüdür ve mineral büyümesi için şablon oluşturmaktadır. Mine protein matriksindeki en iyi karakterize edilmiş proteindir ve dokunun düzgün bir şekilde gelişmesi için oldukça gereklidir (21). Diş minesinde bulunan diğer önemli organik yapı "enamelin" proteinidir. Bu proteinler HA'ya olan yüksek afinitelerine, asidikliklerine ve karbonhidrat içeriklerine göre gruplandırılırlar. Enamelin, HA kristallerinin büyümesini önemli ölçüde geciktirmeleriyle amelogenin proteinlerinden ayrılmaktadırlar (22).

Mine, gelişimi sırasında proteinlerle dolu bir organik matriks içine gömülmüş apatitlerden oluşmaktadır. Kristallerin oluşumunu açıklayan iki ayrı teori öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi erken kristal birikiminin mine kollajen proteinlerinin sonucu olduğu yönündedir (23). İkinci teori ise ilk kristal oluşumunun ameloblastlar tarafından salgılanan organik bir matriks üzerinde HA kristallerinin birikimine ve büyümesine neden olduğunu öne sürer (24).

2.2. BEYAZ NOKTA LEZYONLARI

BNL ağız ortamındaki karbonhidrat, tükürük ve bakteri değişkenlerinden birinin sapmasıyla, mine dokusundaki demineralizasyon ve remineralizasyon dengesinin bozulması sonucu oluşan diş çürüğünün erken aşaması olarak tanımlanmaktadır. Bakteri

asitleri, minenin yüzey ve yüzey altı mineral yapısını çözerek, mine prizmaları arasında gözenekler oluşturur. Bu etkilenen bölgede pürüzlülüğe ve yüzey parlaklığının kaybına neden olur. Işığın kırılma indisindeki değişiklik, sağlıklı mineye göre daha opak bir görünümle sonuçlanır. Demineralizasyon süreci, hipermineralize yüzey tabakası tamamen kaybolmadan önce minenin tüm kalınlığı ve dentinin bir kısmını kapsayabilir (25–28).

BNL'nin gelişimi oldukça hızlı bir prosedürdür ve 4 haftalık bir süreç içerisinde görünür hale gelebilirler ki bu iki klinik randevu arasındaki sürece tekabül eder. Pek çok vakada braketlerin çevresinde ve kötü oral hijyene sahip hastalarda diş eti sınırlarında oluşmaya başlarlar. Eğer hekimler BNL hakkında hastayı bilinçlendirmez ya da önlemini almak için harekete geçmezse daha dramatik sonuçlar doğurabilir (29). Ortodontik tedavi sonrası oluşan BNL'nin spontane iyileşmesi gözlenebilse de çalışmalar bunun remineralizasyondan ziyade diş fırçalama ile oluşan mine yüzeyi aşınması nedeniyle gerçekleştiğini göstermektedir (30).

2.2.1. Beyaz Nokta Lezyonlarının Etiyolojisi

BNL'nin opak beyaz görünümü, mine yüzeyinde gerçekleşen demineralizasyon ve bunun sonucunda minenin optik yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Ağız ortamındaki dengenin bozulması, mine kristallerinde çözünme ile sonuçlanır. Öte yandan bu durum sürekli ya da geri dönüşsüz değildir ve etiyolojisine hakim olmak, çoğu zaman çözümün anahtarıdır.

Diş çürüğünün başlatılması ve ilerlemesinde büyük rolü olan *S. mutans* prevelansındaki artış doğrudan çürük artışı ile ilişkilidir (31). Bu bakteriler asidojenik (asit üreten) ve asidürik (aside dayanıklı) olmakla birlikte diyetteki sakaroz şekerinden hücre dışı glukan sentezleme yeteneğine de sahiptirler. Bu süreç, bakteri kolonizasyonuna destek olmaktadır ve difüzyon özelliklerini arttırarak plağın çürük yapıcı özelliklerini arttırabilirler (32).

Ağız ortamında demineralizasyonun gerçekleşmesi için bakteri plağı, fermante edilebilir karbonhidrat, diş yüzeyi ve zaman ana faktörlerinin varlığı şart olmakla birlikte; tükürüğün pH'ı, akış hızı ve tampon kapasitesi faktörlere olan maruziyet üzerinde etkilidir (33). Tükürük, diş yüzeylerinin karbonhidratla temasını, plağın asiditesini ve mikrobiyal komposizyonunu azaltarak demineralizasyonun engellenmesinde yardımcı

bir faktör olarak görev alır. BNL'nin sabit ortodontik tedavi sırasında, tükürükle maruziyeti diğer bölgelere nazaran daha az olan ön keser dişlerde gözlenmesi tükürüğün etkisine güzel bir örnektir (34). Tükürük akışındaki artış; fiziksel temizleme, tamponlama ve antibakteriyel etkinliğini arttırır ve fermante edilebilir karbonhidratların ortamdan uzaklaştırılmasını destekler. Tükürük pH'ı ve tamponlama kapasitesi de bakteri asitlerinin elimine edilmesinde etkili rol oynamaktadır ve salgılanma kapasitesiyle doğru orantılıdırlar. Tükürüğün başlıca tamponlama mekanizması karbonik asit-bikarbonat sistemidir. Tükürük pH'ı ise hidrojen iyonu kaynağı ve hidrojen iyon kompleksi oluşturabilme kapasitesi ile ilgilidir. Uyarılmamış tükürüğün pH'ı 6'dan düşük olabilir ve yüksek akış hızlarında 8'e kadar çıkarak asidürik bakterilerin yaşamasını engeller, tamponlama kapasitesini arttırır ve çürük oluşumunu azaltır (35,36).

2.2.2. Beyaz Nokta Lezyonlarının Histolojisi

BNL'nin histolojik olarak incelendiğinde mineral kayıplarının mine prizmalarının merkezinde meydana geldiği gözlemlenmektedir. Bu durum, kesin olmamakla birlikte prizma merkezlerindeki düşük kristal yoğunluğundan olduğu düşünülmektedir (37).

Lezyonun en derin noktasına yarı saydam tabaka adı verilir ve dokunun kinolin solüsyonu ile boyanmasının ardından polarize ışık altında bakılmasıyla ortaya çıkar. Bu tabaka sağlıklı mine dokusunda gözlenmemektedir; çünkü sağlıklı mine dokusu ile kinolin solüsyonunun ışık kırılma katsayısı aynıdır. BNL'nin oluşumu sırasındaki mineral kaybı, minenin ışık kırılma katsayısında değişikliğe sebep olur ve böylece polarize mikroskopi ile incelendiğinde tabaka görünür hale gelir (38).

Yüzeye doğru gidildiğinde karşılaşılan bir sonraki tabakaya, karanlık tabaka adı verilmektedir ve bölgedeki gözenekler kinolin solüsyonunu absorbe edemeyecek kadar fazla olduğundan, polarize ışıl mikroskobisi altında gözlemlenememesi sebebiyle bu adı alır. Bu tabakanın daha çok remineralizasyon çalışmalarında gözlemlenmiş olması, kaynağının demineralizasyon sürecinden ziyade remineralizasyon süreci ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (38,39).

BNL'nin en büyük kısmına lezyon gövdesi adı verilir. Diğer bölgelerine nazaran daha fazla demineralizasyon ve gözenekli yapıda artış gözlemlenir. Eğer gözenek hacmi yeteri kadar büyümüşse bu bölgede bakteri penetrasyonuna rastlanır (38).

Lezyonun ağız ortamına en yakın tabakası ise yüzeyel tabaka olarak isimlendirilir. Bu bölge demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsü sonucunda daha dayanıklı ve sağlam hale gelir. Böylece lezyonu bakteri istilasına karşı koruyucu bir görev üstlenir (38).

2.2.3. Beyaz Nokta Lezyonlarının Klinik Görünümü ve Sınıflandırılması

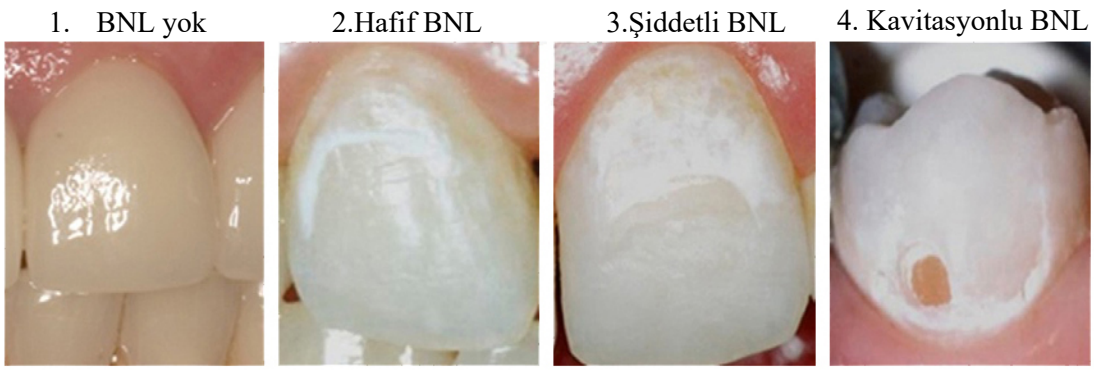
Hekimlerin, diş yüzeyinde oluşan BNL'yi ayırt edebilmesi, daha trajik sonuçlara neden olmadan harekete geçebilmesi adına önem taşır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem görsel incelemedir. Hekimler, görsel olarak lezyonların derinliği hakkında yorumda bulunamasalar da aktif ya da inaktif olduğuna karar verebilirler. Tebeşirimsi ve pürüzlü yüzey hekime lezyonun aktif, pürüzsüz ve parlak yüzeyler ise inaktif olduğunu anlatmaktadır (40,41).

BNL yüzey altı oluşumlardır ve minenin 10-30 μm'lik dış kısmının aşırı doymuş flor apatitler sayesinde sağlam kaldığı düşünülmektedir. Tükürüğün içerisinde demineralizasyonu sağlayacak proteinler ve organik materyaller bulunsa da minenin sağlam kalmış en dış kısmından geçmeyi başaramazlar. Ortodontik tedavi sonrasında oluşmuş BNL'nin tatmin edici bir ağız hijyeni sonrasında kendi kendine iyileşmesi mümkündür ya da aşınma ile demineralize olmuş tabakanın yok olması ile sonuçlanabilir. Diğer bir ihtimal lezyonun kronikleşerek mat beyaz rengini muhafaza etmesi; fakat yüzeyin pürüzsüz parlak rengini almasıdır. Eğer iyi bir ağız hijyeni ya da tedavi sağlanmamışsa lezyon rengi beyazdan kahverengi/siyaha dönebilir. En kötü sonuç ise lezyonun kavitasyonla sonuçlanması ve dentine doğru ilerlemesidir (30,42–45).

BNL'nin görsel incelenmesi ışığın farklı maddeler içerisindeki ilerleme hızına dayanarak yapılır ve buna ışığın kırılma indeksi denir. İyi bir görsel değerlendirme için yüzeyin kurutulmuş olması oldukça önemlidir. Sağlıklı minenin kırılma indeksi 1,62'dir ve yarı saydam görünür. Demineralizasyon sonrası artan mikro gözenekli yapı hava ile dolduğundan mine tebeşirimsi mat görünümüne bürünür. Kurutmadan yapılan bir görsel muayenede, gözenekler 1,33'lük değer ile minenin kırılma indeksine çok yakın olan su ile dolacağından, sonuçlar hekim için yanıltıcı olacaktır (46).

Gorelick ve ark. (34) BNL'yi klinik olarak değerlendirebilmek adına 4 aşamalı skala sunmuşlardır (Şekil 2.2):

1. Beyaz nokta lezyonu yok
2. Hafif beyaz nokta lezyonu
3. Ciddi beyaz nokta lezyonu
4. Kavitasyonlu beyaz nokta lezyonu



Şekil 2.2: BNL'nin klinik olarak sınıflandırılması

2.2.4. Beyaz Nokta Lezyonlarından Korunma Yöntemleri

BNL daha önce bahsedildiği gibi ağız ortamındaki dengenin negatif yönde bozulmasından dolayı gerçekleşir. Ağız içerisindeki karbonhidrat, tükürük ve bakteri değişkenlerinden birinin sapması, karyojenik bakterilerin dental mine dokusunu demineralize etmesi ile sonuçlanır. Ortodontik tedavi sırasında bu değişkenlerin önüne geçerek lezyon oluşumunu önlemek ya da oluşan patolojiyi erken dönemde saptayarak engellemek hekimin elindedir. Risk faktörlerinin elimine edilmesi ve çeşitli uygulamalar yoluyla ortodontik tedavi sırasında ortaya çıkabilecek estetik ve fizyolojik sorunların önüne geçilebilir.

2.2.4.1. Hastanın risk faktörlerinin önlenmesi: Bir hastanın BNL'ye olan yatkınlığı ortodontik tedavi öncesinde tespit edilebilir. Risk faktörleri hastanın diyet içeriği, oral hijyeni, tükürük bileşimi ve oral floranın değerlendirilmesi sonucunda belirlenir. Bir hastanın yüksek çürük riski altında olduğu tespit edilmesi durumunda, ortodontik tedavi öncesinde gerekli birimlere sevk edilerek bu faktörlerin ortadan kaldırılması için adım atılır (47). Var olan kavitasyonlar, ara yüz lezyonları, BNL ve

restorasyon varlığı ya da 3 yıl içerisinde çürük nedeni ile gerçekleştirilmiş diş çekimi varlığı hastayı BNL açısından yüksek riskli kategorisine sokar (48).

Ortodontik tedavi sırasında risk faktörlerinden bir tanesi de hastanın diyetindeki karyojenik besinlerin miktarıdır. Rafine şeker kullanımı, asitli ve şekerli içeceklerin tercihi ve bunların sıklığı ortodontik tedavi öncesinde hastanın BNL'ye olan yatkınlığına işaret eder. Ortodontistler hastanın diyeti ile direkt olarak ilgilenmeseler de bu verilerin varlığı hastanın tedaviye olan uyumu ve tedavi sonrasındaki BNL riskinin bilinmesi açısından önemlidir (49).

Tedaviye başlamadan önce hastanın tükürük pH'ı, akış hızı ve tamponlama kapasitesinin değerlendirilmesi hastanın BNL'ye olan yatkınlığının belirlenmesinde etkilidir.

2.2.4.2. Ortodontik materyal seçim: Ortodontik tedavi sırasında çeşitli materyaller kullanılmaktadır ve daha fazla plak tutulumuna neden olan materyallerin yüksek riskli hastaların tedavisi sırasına kullanımından kaçınılması dolaylı olarak korunma sağlayabilmektedir.

Kapaklı ve konvansiyonel braketlerin karşılaştırıldığı pek çok çalışmada, kapaklı braketlerin konvansiyonel olanlara göre çok daha az plak birikimine neden olduğu belirtilmiştir. Konvansiyonel braketlerde kullanılan elastomerik ligatürlerin yüzeylerinin plak tutulumuna sebebiyet vermesi nedeniyle yüksek riski hastalarda kapaklı braketlerin tercih edilmesi, BNL'den korunma sağlanması açısından göz önünde bulundurulabilir. Yine pek çok çalışmada, seramik braket yüzeylerinin metal olanlara göre plak tutulumunun daha fazla olması, yüksek riskli hastalarda metal braketleri avantajlı hale getirmektedir (50).

2.2.4.3. Oral hijyen eğitimi: Ortodontik tedavi sırasında kullanılan materyaller, ağız ortamında bakteri retansiyonu arttıracak alanlar oluşturmaktadır. İyi bir oral hijyene sahip olmayan hastaların, ortodontik tedavi sırasında plak yükünün artacağı ve bunun BNL ile birlikte çeşitli periodontal problemlere de yol açacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

Oral hijyen yetersizliği ve BNL'nin oluşumu arasında doğrudan bir ilişki olduğu ve bunun kadın ya da erkek hastalar arasında herhangi bir fark göz etmediği tespit edilmiştir. Ortodontik tedavi seansları sırasında hastaların oral hijyen konusunda motive

edilmesinin hastanın oral hijyeninin sağlanmasında pozitif etkileri olduğu görülse de ortodontistin her seansta bunu gerçekleştirmek için vakti olmayabilir; zira alışkanlığı olmayan bir hastanın davranışlarını değiştirmek kolay değildir. Bu noktada hastanın genel hekiminin ortodontist ile beraber çalışması tedavisi devam eden hastanın motivasyonunu sağlamak için etkili olabilir (51).

Pratikte günde iki kez dış fırçalamanın, ortodontik tedavi sırasında yeterli oral hijyen sağladığı belirtilmektedir. Hastaya alışkanlığın kazandırılması aşamasında fırçalama miktarının arttırılmasının önerilmesi etkili olabilir. Manuel ve elektrikli diş fırçalarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, elektrikli diş fırçalarının hastalara motivasyon sağlamakta etkili olduğu gösterilmiştir (52).

2.2.4.4. Flor uygulamaları: Ortodontik tedavi sırasında florür kullanımı minenin remineralizasyonunun sağlanmasında etkili sonuçlar vermektedir. Topikal florürün karyostatik etkisi, öncelikle kalsiyum florür (CaF_2) oluşturma yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Günlük topikal florür kullanımıyla birlikte, mine dekalsifikasyonunda önemli ölçüde azalma gerçekleştiği bulunmuştur. Plakta ve yeni başlayan lezyonlar içerisinde CaF_2 benzeri bir yapı biriktirir ve bu yapı bir rezervuar görevi görerek çürük atağı sırasında pH düştüğünde florür iyonlarının serbestlenmesini sağlar (53,54).

Pratikte BNL'den korunmak için çeşitli flörür içeren ürünler kullanılabilmektedir. Bunlar floridli gargaralar, jeller, diş macunları, cilalar, pit ve fissür örtücüler, bond ajanları ve adezivlerdir.

2.2.4.5. Kazein fosfopeptit-amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP): ACP 1960'ların ortasında Aaron S. Posner tarafından tanımlanan, aşırı doymuş bir kalsiyum fosfat çözeltisinden kolayca çökelen ve kolaylıkla oktakalsiyum fosfat veya apatitik ürünlere dönüşebilen remineralizatif ajandır. In vivo koşullarda HA'dan daha iyi osteokondüktiviteye, trikalsiyum fosfata göre daha iyi biyobozunurluğa ve iyi biyoaktiviteye sahip olduğu, bunların yanında sitotoksisiteye sahip olmadığı gözlenmiştir (55).

CPP'nin plak üzerinde antibakteriyel ve tamponlayıcı etkiye sahip olduğu ve *S. mutans* ile *S. sobrinus'*un büyümesine ve yapışmasına engel olduğuna inanılmaktadır. CPP-ACP'nin antikaryojenisite mekanizması, plaktaki amorf kalsiyum fosfatı arttırması, mine demineralizasyonunu baskılaması ve remineralizasyonunu arttırması üzerinedir.

Dental plakta serbest kalsiyum ve fosfat iyonu aktivelerini tamponlayarak kalsiyum ve fosfat deposu olarak görev yapar. Böylece diş minesine göre aşırı doygunluk durumunun korunmasına yardımcı olur (56).

ACP'nin CPP'ye bağlanması pH'a duyarlı bir olaydır ve pH düştükçe bağlanma azalır. pH'ın artması bağlı ACP seviyesinin artmasını sağlayarak kalsiyum ve fosfatın stabilize olmasına neden olur. Böylece kalsiyum ve fosfatların kendiliğinden çökelmesi engellenmiş olur (57). CPP'ler, karışımdaki kalsiyum fosfatı stabilize ederken aynı zamanda diş plağındaki kalsiyum fosfat seviyesini arttırarak remineralizasyona katkı sağlarlar (58).

CPP'ler molekül başına 25 kalsiyum iyonu, 15 fosfat iyonu ve 5 florür iyonu bağlayabilir. CPP-ACP'ın serbest kalsiyum ve fosfat iyonlarını tamponlayan ACP'yi diş plağında lokalize ettiği ve böylece diş minesine göre aşırı doygunluk durumunun korunarak demineralizasyonu bastırdığı ve remineralizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (59).

2.2.4.6. Argon-lazer: Son zamanlarda yapılan çalışmalarda argon lazerin, minenin yapısındaki kristal yapıda değişikliğe neden olarak dekalsifikasyonu önlemek için kullanılabileceğini göstermektedir. Argon lazerin minenin yapısında olduşturduğu bu değişiklik, asit saldırısı sırasında iyonların mineden uzaklaşmasına izin vermek yerine onları stabilize eden mikro boşluklar oluşturmasıyla açıklanmıştır. Tükürükteki kalsiyum, fosfat ve florür iyonları daha sonra bu boşluklara çökelerek, mine demineralizasyonuna dirençli alanlar yaratır (60,61).

2.2.4.7. Antimikrobiyel ajanlar: Ortodontik tedavi sırasına BNL oluşumunu engellemek için yukarıda anlatılan yöntemler denenmesine rağmen koopere edilememiş hastalarda kimyasal ajanlara başvurulması düşünülebilir. Hastaların bakteri ve plak yükünün azaltılması adına, kontrollü bir şekilde kimyasalların kullanılması, ağız sağlığı adına etkili sonuçlar verebilir.

Diğer yöntemlerle koopere edilememiş hastaların biyofilm ekolojisini değiştirmek adına kullanılabilecek antimikrobiyal ajanlardan bir tanesi %0,2 klorheksidin'dir (CHX). Günde iki kez olmak üzere 60 sn CHX ile çalkalama BNL oluşumunun engellenmesi adına etkili bir yöntemdir. Öte yandan CHX'in toksik özellikleri, tat alma bozuklukluklarına yol açması ve renklenmeye neden olması uzun süreli kullanımını mümkün kılmamaktadır. (62)

BNL'nin engellenmesinde tercih edilen bir diğer kimyasal ajan kitosan'dır. Kitosan tükürük akışını arttırır ve diş minesinden fosfat salımını engelleyerek demineralizasyonu azaltır. Çalışmalar, kitosan içeren diş macunlarının kullanımı ile braket çevresinde oluşan BNL'nin büyük ölçüde azaldığını göstermektedir. (63)

2.2.5. Beyaz Nokta Lezyonlarının Demineralizasyon ve Remineralizasyonunu In-Vitro Olarak Değerlendirme Yöntemleri

Araştırmacılar diş sert dokularındaki BNL'nin mineral yapısında yol açtığı değişikliği ölçmek ve değerlendirmek için çeşitli analitik yöntemler kullanmışlardır. Tüm tekniklerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bazıları işleyişi sebebiyle dokularda yıkıcı etki yaratabilir, mineral içeriğindeki değişikliklere karşı duyarsız olabilir veya yorumlanması sırasında sübjektif sonuçlar vermeyebilir. Bazılarınınsa erişiminin zor ve pahalı olması dezavantajları arasında yer alır.

Yüzeyaltı mineral dağılımını ve değişikleri niceliksel olarak belirleme konusunda oldukça başarılı olan mikroradyografiler pek çok araştırmacı tarafından "altın standart" olarak kabul edilse de dokuda oluşturduğu yıkım, zorlu örnek hazırlama prosedürleri ve radyasyon gereksinimi, mikroradyografilerin çalışmalar sırasında kullanımını azaltmıştır (64).

2.2.5.1. Mikrosertlik ölçümü: Sertlik genellikle 'malzemenin deformasyona karşı direnci' olarak tanımlanır. Test edilecek materyale belirlenen miktarda kuvvet uygulanması ile ölçüm gerçekleştirilir. Diş hekimliğinde mine ve dentinde gerçekleşen yüzey madde kayıplarının ve kazançların ölçümünde ya da restoratif materyallerin mekanik özelliklerinin test edilmesinde kullanılmakatadır.

Diş hekimliğinde yüzey sertliği araştırmaları için en çok Knoop ve Vickers yöntemleri kullanılmaktadır. Her ikisinin de ölçüm yapan uçları dört taraflı piramidal elmaslardan oluşur ve teknik olarak bakıldığında farkları bu elmas uçların şekillerindeki değişiklikten kaynaklanır. Vickers tekniğinde delici uç kare şeklindedir ve yüzeylerde bıraktığı izin iki köşegeninin arası mesafe ölçümü yapılır. Öte yandan Knoop tekniğinde ucun bıraktığı iz eşkenar şekilde değildir. Uzun ve kısa köşegenler arasındaki yaklaşık oran 7:1 olacak şekilde ayarlanmıştır ve sertlik hesaplamaları yapılırken yalnızca uzun köşegenden yararlanılır (65).

Diş yüzeyindeki mineral içeriğinin kaybı anlamına gelen demineralizasyon ve mineral içeriğinin artması anlamına gelen remineralizasyon mine mikrosertliğinde değişikliğe yol açar. Mikrosertlik testleri oldukça hassastır ve kısa bir demineralizasyon ya da remineralizasyon periyodu sırasında meydana gelen ufak değişiklikleri dahi ortaya çıkarabilme kapasitesine sahiptir. Dolayısıyla in vitro koşullarda yapılmış bir çalışmanın sonuçlarını değerlendirebilme konusunda oldukça başarılıdırlar (66).

2.2.5.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM): Taramalı elektron mikroskobu (SEM) esas olarak geniş bir büyütme aralığında morfoloji ve yapının incelenmesinde kullanılan bir görüntüleme yöntemidir. Sekonder elektronların tespit edilmesiyle oluşturulan görüntüler elektron ışının taradığı yüzeyin topografisi hakkında bilgi vermektedir. Mine üzerinde kullanıldığında, mine yüzeyinin incelenmesi ve mine iç yapısının incelenemesi olmak üzere iki farklı kullanım yöntemi bulunmaktadır (67).

SEM, diş hekimliği çalışmalarının hemen hemen her alanında kullanılabilen bir yöntemdir. Dişler üzerindeki demineralizasyon ve remineralizasyon, erezyon, kırık, çatlak, çürük alanlar, restoratif materyaller, diş ve restoratif materyal arasındaki bağlanım alanları gibi çeşitli konuların değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, artefakt içermeyen görüntüler elde etmek için adımlarının dikkatli bir şekilde takip edilmesi ve malzemelerin mümkün oldukça temiz bir şekilde işlenmesi büyük önem taşır (68).

SEM, çalışmacılara kantitatif sonuçlar vermediği için bir başka analiz yöntemi ile kullanıldığında en verimli sonuç alınır. Alınan görüntüler, gerçeği birebir yansıtan fiziksel kanıtlar olarak kullanılabilir ve kantitatif sonuçları görsel olarak destekleme ayrıcalığı sağlar. Yorumlanması gerektiği ve bu her zaman kolay olmadığı için, alanında uzman kişiler tarafından uygulanmalı ve açıklanmalıdır. Değerlendiren kişinin, normal ve anormal olan görüntüleri mikroskobik olarak ayırabilme yeteneğine sahip olması gerekmektedir (69).

Tekniğin uygulama ve yorumlama aşamasında oldukça dikkat ve zahmet gerektirmesine rağmen araştırmacıya görsel sonuçlar vermesi, diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında araştırılan konunun açıklığa kavuşturulması ve çeşitli durumların karşılaştırılmasını kolaylaştırması yönüyle referans standart olarak kabul edilir (70).

2.2.2.3. Enerji dağılım X-ışını spektroskobu (EDX): Enerji dağılım x-ışını spektroskobu (EDX) hızlandırılmış bir elektronun hedeflenen katı atomunundan elektron

koparması ve oluşan boşluğun bir başka elektron tarafından doldurulmasıyla oluşan x ışınlarından yararlanarak çalışmaktadır. Bu elektronsal geçişler her kimyasal element için ayrı karakteristiğe sahiptir ve elektron mikroskobunda EDS tespit sisteminin geliştirilmesi ve materyalin mikrokimyasal yapısının belirlenmesi için bir yöntem haline gelmiştir. Elementlerin farklı karakteristikleri sayesinde, test edilen numuneden yayılan x ışınları hem niteliksel hem de niceliksel olarak farklı olur ve içerek hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar (71).

2.2.2.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM): Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ilk üretildiğinde katı yüzeylerdeki atomları görselleştirebilmek adına kullanılmnaktaydı. Günümüzde bu mikroskobi dokuların fizyolojik koşullar altında yüksek çözünürlüklü görüntülerinin boyama olmadan elde edilmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca spesifik moleküllerin tanımlanması ve lokalizasyonunun yanı sıra tek molekül düzeynde molekül içi ve moleküller arası bağlarının gücünü, biyolojik moleküllerin elastikiyetini tespit etmek için de kullanılmaktadır. Bu özellikleriyle AFM, araştırmacılar için partiküler boyutta sonuç eldesi sağlamaktadır. AFM'nin tarama hızındaki yavaşlık dezavantajlarındandır. Görüntü eldesi için gereken sürede hareket eden doku içi moleküller, sonuçların bulanık gözlemlenmesine ya da hiç görüntülenememesine yol açmaktadır (72).

2.2.2.5. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR): Kızılötesi spektroskopisi (FTIR) temel olarak kızılötesi ışınımının bir malzeme tarafından dalga boyunun bir fonksiyonu olarak emilmesinin ölçümüdür. Meydana gelen absorbsiyon ile dalga boyunun grafiği FTIR değerlendirmesi olarak adlandırılır. Bu absorbsiyon, çeşitli materyallerin yapılarının tanımlanmasıyla, o malzemeyi ya da dokuyu oluşturan moleküllerin içeriğinin bilinmesi sağlanabilmektedir (73).

FTIR'ın bugünkü gelişmiş hali ile çeşitli materyaller için hızlı ve tekrarlanabilir yüksek çözünürlüklü sonuçlar elde edilebilmektedir. Kantitatif sonuçlar vermesi, her türlü organik ve birçok inorganik malzemenin tanımlanabilmesi, molekül yapısı ve içeriklerinin belirlenebilmesi sebebiyle tercih edilmektedir. Öte yandan örneklerin analiz için hazırlanma sürecindeki zorluklar ve maliyetli oluşu yöntemin dezavantajlarındandır (73).

2.2.2.6. Konfokal lazer tarayıcı mikroskobu (CLSM): Konfokal lazer tarayıcı mikroskobu (CLSM) ışık kaynağı olarak görev yapan bir lazer ışınından ve

üretilen görüntüyü işleyen bir elektronik sistemden oluşur. Son derece ince kesitler kullanarak yüksek çözünürlüklü optik görüntüler elde edilir, böylece numunenin farklı kalınlıkları boyunca farklı optik alanlar kaydedilmiş olur. Lazer ışını iğne deliiği adı verilen dar bir alandan geçer, numuneye yansır ve mikroskoba geri döner. Yansıyan ışık, tarama aynaları yardımıyla tanımlanır (74).

2.2.2.7. Bilgisayarlı mikrotomografi: Bilgisayarlı tomografi (BT) dokuların görüntülerini 1-2mm kalınlığındaki dilimler halinde almaktadır. Dilim kalınlığı, çözünürlükle doğru orantılıdır ve kalınlık azaldıkça görüntülerin çözünürlükleri artarak numune hakkında daha fazla bilgi edinilmiş olunur. Mikro BT cihazları görüntüleri 5-50 μm kesitlerinde alır ve bu normal tomografi ile karşılaştırıldığından 1 milyon kat daha küçüktür (75).

Mikro BT hem mineralize hem de yumuşak dokuların görüntülenmesinde kullanılabilir. Numunelerin ölçüm sırasında zarar görmemesi ve tekrar edilebilmesi bu yöntemin tercih edilme nedenlerinden biridir. Son derece hassas üç boyutlu görüntüler oluşturur. Öte yandan numune taramasının ve yapılandırmasının uzun zaman alması, bilgisayar uzmanlığı gerektirmesi ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında pahalı olması dezevantajları arasında gelir. Kullanımı sırasında ortaya çıkan radyasyon, özellikle çok fazla numunenin olduğu çalışmalarda kullanılmamasının sebeplerindendir (75).

2.2.2.8. Polarize ışık mikroskobu (PLM): Polarize ışık mikroskobu (PLM), bir numunenin analizi için polarize ışık kullanan bir mikroskobi şeklidir. Dişin histolojik olarak incelenmesi, diş yapılarının ve çürük sürecinin araştırılması adına kullanılır. Polarize ışık numuneyi geçtiğinde, polarizasyon durumu incelenen malzemenin optik özelliklerine göre farklı sonuçlar elde edilir. Çift kırılımlı, zayıflatıcı ve depolarize edici yapılar PLM ile incelenebilir (76).

Diş sert dokularını ve çürük sürecinin etkisini incelerken, diş sert yapıları çift kırılımlı olduğu için polarize ışık mikroskobu diş histolojisinde tercih edilen bir yöntemdir. HAP ve kollajen yapılarındaki değişimler bu mikroskobi altında gözlenebilmektedir. Öte yandan bu görüntüleme yöntemiyle mine yapısı iyi anlaşılmış olmasına rağmen HAP kristallerinin davranışları tam olarak anlaşılamamıştır (76).

2.2.2.9. Lazer floresans yöntemi: Lazer floresans yöntemi, uygun aktivasyon verildiğinde numunelerin ışık yayabileceği mekanizmasına dayanan bir görüntüleme çeşididir. Mineral kaybı yaşamış doku ve sağlıklı dokuların arasındaki floresans yayımı

arasındaki farkı esas alır. Yayılan floresan ışığın rengi; enerji, dalga boyu ve foton enerjisindeki değişiklikler nedeniyle farklıdır. Mor veya mavi uyarı ışığı, görünür ışığın daha uzun dalga boyları olan yeşil, turuncu veya kırmızı renkte yayılımlar üretir. Farklı renklerdeki ışıklar, farklı lazer floresans yöntemlerinde ve farklı marka cihazlarda kullanılabilmektedir (77).

2.3. ORTODONTİK TEDAVİ VE ORAL MİKROBİYATA DEĞİŞİMİ

Oral mikrobiyota; dişler, dil, dudaklar, yanak, diş eti dokuları, epitelyal sulkus, sert ve yumuşak damak gibi farklı yüzeylerden oluşan heterojen bir ortamı kolonize eder. Mikrobiyal türler ile konakçı organizma arasında kurulan denge, sağlık durumunun korunmasını desteklerken, bu dengenin kaybedilmesi hastalık durumu olarak isimlendirilmektedir (78–80).

Mikrobiyotanın ağız yüzeylerinde kolonizasyonu ve olgunlaşmasından sonra konaktaki biyolojik değişiklikler, kolonize olmuş mikroorganizma toplulukları arasındaki dengeyi bozabilmektedir. Pek çok faktörün etkili olabileceği bu denge değişimi, istilacı bir türün baskınlığı sonrasında hastalık olarak nitelendirilecek sonuçlar doğurabilmektedir (81,82).

Dental plak zamana ve lokasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu doğrultuda, içerisinde barındırdığı farklı bakteri kompleksleri, adezyon şekli ve metabolik etkileşimleri ile erken ve geç dönem; supra ve subgingival plaklar farklı patolojilerden sorumludurlar (83).

BNL ile ilişkili supragingival plak genellikle *S. mutans*, *Lactobasillus spp.* ve *Actinomyces spp.* türleri gibi karyojenik bakterileri içerir. Bu bakterilerin metabolik aktivasyonları dentin ve mine dokusunun demineralizasyonuna sebep olan bakteri asitlerinin üretimine neden olur. Supragingival plak aynı zamanda diş eti problemlerine neden olan gram negatif anaerobik bakterileri de içerisinde barındırır (84).

Ortodontik tedavinin mikrobiyotaya olan etkisi temel olarak plak birikimini arttırması ve ağız hijyeninin sağlanmasında güçlük yaratması olarak özetlenebilir. Biriken yiyecek artıkları, bakteri plağı ve hastaların ağız hijyenini sağlamada güçlük çekmesi diş eti hastalıkları ve çürüklerin başlaması ya da şiddetlenmesi için temel risk faktörlerinden biri olarak görülmektedir (85–87).

Ortodontik tedavi sırasında dental plaktaki mikro yapının değişimi pek çok çalışmacı tarafından ortaya konulmuştur. Pan ve ark. (88) ortodontik tedavi gören ve görmeyen iki grup üzerinde yaptığı çalışmada en yüksek bakteri kompozisyonunun üçüncü ayda ve tedavi görmekte olan hasta grubunda olduğu ortaya konmuştur. Lucchese ve ark. (86) tarafından yapılan sistematik incelemede, ortodontik tedavinin başlamasından bir ay sonra oral plaktaki niceliksel ve niteliksel değişiklikler gösterilmiştir. Buna göre, kullanılan tedavi yöntemi ne olursa olsun oral mikrobiyotada değişikliğe neden olduğu, sabit ortodontik apareylerin hareketlilere nazaran daha fazla çürük ve periodontopatojen oluşturduğu kanıtlanmıştır.

Klaus ve ark. (89), ortodontik tedavi sonrası iyi oral hijyen, kötü oral hijyen ve BNL'ye sahip kötü oral hijyen olmak üzere üç gruba ayırdığı hastalarda; *Candida albicans*, *S. mutans* ve *Laktobasillus* prevelansını ölçmek için yaptığı kesitsel çalışmada her üç türün de iyi oral hijyene sahip hasta grubunda daha az olduğu gözlenmiştir.

Topaloğlu-Ak ve ark. (90) sabit ve hareketli ortodontik apareylerle tedavi edilen hasta gruplarını incelediği çalışmada, her iki grupta da 6 aylık süreçte belirgin *S. mutans* ve *Laktobasillus* artışı olduğu ve bunun sabit grupta daha fazla olduğu belirtilmiştir. Andrucioli ve ark. (91) 16 aylık sabit ortodontik tedavi gören 18 hastanın premolar dişlerine bant yerleştirmişler ve 30 günlük kontaminasyonun ardından bu hastalarda karyojenin bakteri türlerinin diğer türlere göre belirgin bir şekilde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Ortodontik tedavi sırasında kullanılan materyal ya da yöntemler, oral mikrobiyatadaki değişim yönünden farklı etkiler gösterebilirler. Elastik ligatürlerin metal ligatürlere oranla daha fazla plak tutulumuna neden olduğu, geleneksel braketlerin ise self ligating braketlere göre daha fazla *S. mutans* çoğalmasına yol açtığı kanıtlanmıştır (92,93).

Fournier ve ark. (94) metal ve seramik braketleri karşılaştırdığında, karyojenik bakteri *S. mutans*'ın metal brakette, seramik brakete göre daha az tutulum gösterdiğini öne sürmüştür. Öte yandan Anhaoury ve ark.'nın (95) çalışmasında bu iki tür braket çeşidinin karyojenik bakteri açısından farklılık göstermediği sonucuna varılmış ve in vivo koşulların multipatojenli yapısının in vitro koşullarda yapılan çalışmalardan farklı sonuçlar vereceği açıklanmıştır.

2.4. NANO HİDROKSİAPATİT

HA insan kemik ve diş dokusunun inorganik kısmına benzer özellikler gösteren bir çeşit biyomimetik materyaldir. Biyoaktif, toksik olmayan ve osteokondüktif yapısıyla diş hekimliğinde, çene-yüz ve implant cerrahisinde kemik defektlerini onarmak amacı ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Osteokondüktif yapısı sayesinde travma ve kemik rezeksiyonu sonrasında oluşan dramatik kemik defektlerinin tedavisi için iskelet malzemesi olarak kullanımı araştırılmaktadır (96).

HA ilk olarak 1970 yılında NASA (ABD Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi) tarafından, yer çekimsiz ortamda kemik ve dişlerinde mineral kaybı gözlemlenen astronotlar için tedavi yöntemi olarak önerilmiştir. 1978 yılında bir Japon şirketi bu materyali kullanarak, ilk defa mine yüzeyini restore ettiğini iddia eden diş macununu geliştirmiş, 1993 yılında ise çürük önleyici ajan olarak onaylanmıştır. 2003 yılında HA parçacık boyutu 100 nanometreden 50 nanometreye düşürülmüş ve böylece mine yüzey altı dokusuna da etkili olması sağlanmıştır. 2006 yılına gelindiğinde diş mine remineralizasyonu ve onarımı için mevcut tabakayı kimyasal olarak kalsiyum halofosfata [$Ca_5(PO_4)_3F$] dönüşen flor ile sertleştirmek yerine, diş çevresinde yeni bir sentetik mine tabakası oluşturan alternatif bir koruyucu ajan olarak kabul görmüştür (9). Günümüzde diş hekimliği alanında çeşitli tedavi materyallerinde ve gargara, diş macunu, jeller gibi çeşitli ağız bakım ürünleri içerisinde kullanılmaktadır.

HA, insan mine dokusunun yaklaşık olarak %97'sini, dentin dokusunun ise %70'ini kapsayan inorganik içeriğin büyük bir kısmını oluşturur. Demineralize olmuş mine dokusunun reminerilasyonu sırasında çok önemli bir görev üstlenen kalsiyum ve fosfat kaynağı sağlar. Bu özelliği sebebi ile HA güncel olarak doku mühendisliğinin ana araştırma alanlarından biri haline gelmiştir. Hayvan kemiği ve deniz yapıları gibi çeşitli doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi sentetik olarak da üretilebilmektedir. Doğal kaynaklardan üretilen HA'lar daha çevre dostu, sürdürülebilir ve ekonomik olduğu söylenebilse de henüz bu şekilde üretimi gerçekleştirilen kristallerin ağız bakım ürünlerinde kullanımı araştırılmamıştır (97,98).

Sentetik olarak üretilen HA için, kalsiyum karbonat, kalsiyum hidroksit, kalsiyum nitrat, diamonyum hidrojen fosfat ve amonyum hidroksit formundaki hammaddeler kullanılır. Üretim süreci, ıslak yöntem ve katı hal reaksiyonu olarak bilinir ve bu aşamaları kalsinasyon ya da sinterleme işlemi takip eder. Bu yöntemlerin her ikisinde de

HAp'ı stokiyometrik (kütlenin korunumu) koşullarına ulaştırmak için kalsiyum oksit (CaO) ve trikalsiyum fosfat içeriğini değiştirerek kimyasal reaksiyonu kullanır. Islak yöntem hidrojen fosfat, karbonat, klorür ve sodyum iyonları gibi yabancı maddeleri içeren stokyometrik olmayan HAp tozu üretir. Bu saf olmayan ve kalsiyum eksikliği gözüken HA oluşumuna sebep olur. Çalışmalar bu durumun materyalin kimyasal düzeyse stabil olmayan bir değişken olarak göstermiştir. Öte yandan katı hal reaksiyonu stokiyometik ve iyi tanımlanmış bir kristal şekline sahip HA ürünü üretir; ancak katı hal reaksiyonu yüksek sıcaklıklar ve uzun ısıl işlemler gerektirmektedir (99).

Partikül büyüklüğü yönünden incelendiğinde güncel olarak kullanılmakta olan iki çeşit HA tipi bulunmaktadır ve bunlar nanokristalin ve mikroküme form olarak isimlendirilir. Hem nano hem de mikro partiküler yapıdaki HA ağız bakım ürünlerinde kullanılmaktadır. Mikro yapıdaki HAp'lerin boyutu 5-10 mikron arasında değişir ve yaklaşık 50 nanometre boyutlarındaki mine kristalize yapı arası boşluklardan epeyce büyüktür. Dolayısıyla bu mikro partikül boyutu remineralizasyon ve hassasiyet giderme adına yeteri kadar etki gösterememektedir. nHAp boyutu 20-100 nanometre arasında değişir ve çubuk şekilli morfolojisiyle doğal mine dokusunu taklit etmektedir. Yüksek bağlanma afinitesi ile remineralizasyonu destekleyebilmekte ve tübül tıkaması sayesinde hassasiyet giderici etki gösterebilmektedir. Ayrıca nHAp bakteri zarıyla doğrudan etkileşime geçebilecek kadar küçük olduğundan, biyofilm eliminasyonunda mikro boyutlu HAp'lere göre daha etkili olduğu düşünülmektedir (100).

2.4.1. nHA'nın Remineralizasyona Etkisi

Diş ve kemik sert dokularındaki HA kristallerinden mineral iyonlarının uzaklaştırılması demineralizasyon ve bu iyonların geri kazandırılması olayı ise remineralizasyon olarak adlandırılır. Her iki olay da dişin yüzey tabakasında görülür ve HA'nın yapısal bütünlüğü bozulmadan önemli miktarda iyon kaybı gerçekleşebilmektedir. Nitekim bu iyon kaybı estetik ve hassasiyet gibi fizyolojik problemlere yol açabilmektedir. Demineralizasyonun geri dönüşlü olması sayesinde HA kristallerinin remineralizasyonunu destekleyen çeşitli etkenlerle partiküllerin orijinal boyutlarına kadar döndürülebilmesi sağlanabilmektedir (101).

HA mine ve dentin dokusunu remineralize etmek için kalsiyum ve fosfat rezervuarı sağlamaktadır. Dentinde nHA demineralize edilmiş kollajen matrikse nüfuz ederek remineralizasyon için bir iskelet görevi görürken, erken mine lezyonlarında

gözeneklere nüfuz ederek çözünmüş fosfat ve kalsiyum iyonlarının yerini almaktadır. Diş dokusu üzerinde sentetik bir mine yüzeyi yaratan nHA bir sonraki asit atağında, asitleri nötralize edebilen tamponlayıcı bir çözelti görevi görerek kalsiyum ve fosfat iyonlarının salınımını sağlamaktadır. Aşırı miktarda salının kalsiyum ve fosfat iyonları da pH dengesini remineralizasyon için elverişli hale getirmektedir (99).

2.4.2. nHA'nın Oral Biyofilme Etkisi

Ortodontik tedavi sırasında hastaların oral hijyenlerini sağlamakta yaşadığı güçlükler, biyofilm içerisindeki asidojenik bakterilerin artmasına ve BNL oluşumuna neden olmakta, değişen mikrobiyota aynı zamanda çeşitli periodontal ve gingival hastalıkların da ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır. Ortodontik tedavi sırasında plağın mekanik ya da kimyasal olarak uzaklaştırılması araştırmacıların odak noktalarından biri haline gelmiştir.

Biyofilm kontrolünde florürlerin kullanımının plak oluşumunu etkili bir şekilde azalttığının ve periodontal sağlığı geliştirdiğinin kanıtlanmasının ardından florür ağız bakım ürünlerinde altın standart olarak kullanılmaya başlanmıştır (102,103). Antimikrobiyal olarak tercih edilen bir diğer madde olan CHX oral biyofilmin eliminasyonunda altın standart olarak kabul edilmektedir. Öte yandan CHX'in uzun süreli kullanımının ağız içerisinde renklenmeye, tat kaybına ve disbiyoz gibi yan etkilere sahip olması kullanım alanını kısıtlamaktadır. Nano-HA'nın biyofilm kontrolündeki rolü çeşitli avantajlarından dolayı araştırmacıların ilgi alanı haline gelmiştir (103).

nHA'lerin oral biyofilme olan etkisinin ardındaki mekanizma literatürde yeterince açıklanamamıştır (104). Kensche ve ark. (105) nHA'nın biyofilme olan etkisinin CHX ile karşılaştırılabilecek düzeyde olduğunu; ancak mekanizmaların birbirinden farklı çalıştığını vurgulamışlardır. Araştırmacılar nHA'nın, biyofilm formasyonuna olan etkisini iki mekanizma ile açıklamışlardır. İlk mekanizma nHA'nın mine yüzeyinde birikerek bakteri ve pelikl reseptörleri arasındaki bağlantıyı engelleyebileceği, diğer bir mekanizma ise nHA'nın doğrudan bakteri adezinleri ile etkileşme girerek bakterileri elimine edip uzaklaştırdığı yönündedir.

nHA'nın bakteri tutunmasını önleme özelliğinin partikül boyutlarıyla ilgili olduğunu öne süren çalışmalar da vardır. Buna göre daha küçük yapıdaki HAp bakteriyel

membran üzerindeki adezinlerle daha iyi etkileşime girerek bakteri hücrelerinin bağlanmasını bloke ettiği öne sürülmüştür (106).

2.5. ANTİMİKROBİYAL NANOPARTİKÜLLER

Nanopartikül 1-100 nm çapındaki parçacıkları ifade eden genel bir tanımdır. Bu partiküller, boyutları, geniş yüzey alanı/kütle oranı ve artan kimyasal reaktivite gibi gelişmiş ve benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı antibakteriyel tedavilerde ümit verici olmuşlardır. Nanopartiküllerin geniş yüzey alanı ve yüksek yük yoğunluğu, bakteri hüclerinin negative yüklü yüzeyi ile etkileşime girmesini sağlayarak antimikrobiyal aktivitenin artmasına neden olur (107–109).

Nanopartiküller, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin hücre duvarlarına tutunma ve nüfuz etme özelliği gösterirler ve ilgili iyonları salarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara neden olurlar. Bu nedenle ilaca dirençli mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesinde, tedavi edilmesinde ve biyofilm oluşumunun engellenmesinde olumlu yönde rol oynarlar (109).

Dental plak eliminasyonu diş hekimliğinin önemli araştırmalarından bir tanesidir. Antimikrobiyal nanopartiküller diş hekimliğinin çeşitli alanlarında kullanıldığı gibi, ortodonti alanında da pek çok alanda kullanılabilmektedir. Braketler, ortodontik teller, mikro implantlar ve ligatürler gibi çeşitli ortodontik malzemelere eklenen nanopartiküller biyofilm eliminasyonunda etkili rol oynamışlardır. Adeziv ajanlara ve rezinlere eklenmesiyle plak birikimi ve bakteriyel adezyonun önlenebileceği gösterilmiştir (110).

2.5.1. Bor

Bor, doğada saf halde değil; oksijen ve çeşitli elementlerle oluşturduğu borat tuzları olarak bulunmaktadır. Oksijene karşı güçlü bir çekim gösterir ve bu da güçlü kovalent bağlarının oluşmasına neden olur. Boratlar herhangi bir katyonla birleşerek diğer anyonlarla tuzlar oluşturabilse de, en sık olarak kalsiyum, sodyum ya da her ikisiyle beraber oluşturdukları formlarda gözlenirler (10).

Bor, insan vücudunda büyük miktarda kemikler ve dişlerde bulunmaktadır. Alımının arttırılmasıyla dişler ve kemiklerin mineral içeriklerinde değişikliklere neden olarak bu yapıların desteklenmesini sağlamaktadır. Odontojenik ve osteojenik farklılaşma süreçlerinin gelişmesini sağlayarak hücrelerin çoğalmasını teşvik eder (11). Bor,

magnezyum, D vitamini ve kalsiyum ile etkileşime girerek kemik metabolizmasında önemli bir rol oynar (111). Yaşlanmayla birlikte kemik yapısında meydana gelen gözeneklenme ve zayıflama bor, kalsiyum ve magnezyum arasındaki sinerjistik etki ile desteklenerek yavaşlatılabilir. Borun, kalsiyum ile girdiği etkileşim sayesinde osteoblastik hücre aktivitesini hızlandırdığı kanıtlanmıştır (112).

Bor yönünden zengin bir diyet dişin mineral yapısını, gücünü, yoğunluğunu ve mikrosertliğini arttırarak destekler. Aynı zamanda alveolar kemik yapısı üzerinde de olumlu etkileri bulunur (113). Diyetle alınan borun dişlerin mineral bileşimindeki bor konsantrasyonunu arttırdığı ve diş çevresindeki alveol kemiği üzerinde olumlu etkiler olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca dişlerin sürme öncesi büyümesinde ve gelişmesinde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (11,114).

Borun dental materyallere eklenmesi ile hem mekanik hem de antibakteriyel özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmaya başlanmıştır. İyonları serbest bırakabilen dental materyallere eklendiğinde antikaryojenik ve antimikrobiyel özelliklerin arttığı gösterilmiştir (115). Ayrıca borun dental materyellere eklenmesi ile demineralizasyonun engellendiği ve remineralizasyonun desteklentiği bulunmuştur. F ve B gibi iyonların salınımını gerçekleştirebilen dental materyallerin kullanımının antimikrobiyal, remineralize edici ve aside dirençli özellikleri sayesinde, çürük oluşumunun engellenmesinde destekleyici etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (116).

Diş hekimliğindeki bu yenilikçi uygulamalar, bor iyonları ile güçlendirilmiş adezivlerin yapışmasının uzun süre korunmasına yardımcı olan mekanik, fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olduğunu iddia etmiştir. Bu özellikler, borla güçlendirilmiş adezivlerin uzun vadede daha dayanıklı olduğunu göstermekte ve diş hekimliğinde kullanılan materyallerin ömrünün uzatılmasında umut vaat etmektedir (11). Bir çalışmada, bor nitrür nanotüplerinin adezivlere eklenmesi ile biyoaktivitenin arttırılarak diş yüzeyine daha etkin bir bağlanma sağladığı ve fizikokimyasal özelliklerin önemli ölçüde arttırıldığı bildirilmiştir (117). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda bu iyonun implantlara eklenmesi ile biyouyumun arttığı tespit edilmiştir. Bu, bor iyonlarıyla desteklenmiş implantların, doku ile daha iyi uyum sağlayarak, entegrasyonu desteklediği ve böylece implantların daha uzun ömürlü kullanımının mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. (118).

2.5.2. Gümüş

Diş hekimliğinde gümüş iyonunun kullanımı oldukça eskiye dayanmaktadır. Çeşitli materyallere eklenen gümüş, bu materyallerin antibakteriyel özelliklerini desteklemekte ve dental plak oluşumunu engelleyici yönde etki sağlamaktadır.

Gümüş iyonlarının antibakteriyel etkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olsa da, mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Nanopartiküllerin sürekli olarak gümüş iyonu salınımının bakteri eliminasyonuna neden olduğu söylenebilir (119). Gümüş iyonlarının hücre duvarı ve sitoplazmik memrana olan elektrostatik çekimi ile membran geçirgenliğinde ve bakteri zarfında bozulmalara neden olduğu varsayılan çalışmalar bulunmaktadır (120). Bir diğer teori serbest gümüş iyonlarının hücre içine alınmasıyla, bakteri içi enzimleri devre dışı bırakması ile bakterilerin eliminasyonu sağladığı yönündedir (121).

Gümüş iyonlarının antimikrobiyal etkisini ve mekanizmasını, maruz kalma ve ortamda çözünebilme miktarı etkileyebilmektedir. Sentezleme ve işlem görme yöntemleri maruz kalma ve çözünme yeteneklerini değiştirmektedir. Parçacık boyutları ve şekli gümüş iyonlarının salınımını etkilemekte, daha küresel ve küçük gümüş nanopartiküller daha geniş alanlara bağlanarak salınımı arttırmaktadır. Bu iyonlar kendi mekanik özelliklerinin yanında, çevresel ortamın özelliklerine göre de farklı salınımlar göstermektedir. Ortamdaki organik ve inorganik bileşenlerin varlığı, gümüş nanopartiküllerle kompleks oluşturarak partiküllerin çözünmesini etkileyebilir. Ayrıca çalışmalarda ortamın asiditesinin de partiküllerin salınım hızında değişikliğe yok açtığı gösterilmiştir (122–124).

Ortodontik tedavi sırasında BNL oluşumunu engellemek adına gümüş iyonları, adeziv materyallere eklenerek biyofilm adezyonunun inhibisyonu hedeflenebilir. Braket ve tellere eklenen gümüş iyonları *S. mutans*'ın bakteriyel adezyonunu engelleyici yönde rol oynamaktadır (125,126).

2.5.3. Grafen

Grafen ilk defa 2004 yılında üretilen görece yeni nanomateryallerden bir tanesidir. İki boyutlu, altıgen bir bal peteği yapısında karbonlu bir bileşiktir ve grafitin temel yapı elemanı olarak görev yapmaktadır. Geniş yüzey alanı ve üstün mekanik, fiziksel ve termal özellikleri oldukça başarılıdır. Öte yandan topaklanma özelliğine ve işleme zorluğuna

sahip olması ile birlikte üretim zorluğu negatif özellikleri arasında sayılabilmektedir (127,128).

Grafen diş hekimliğinde kullanılan materyallerle işlev görme ve birleştirilebilme yeteneği sayesinde istenilen özelliklerde üretilebilmektedir. Çeşitli işlemlerden geçirilen grafen dental adeziv, metal ve seramik gibi materyallerin içerisine katılarak özelliklerini güçlendirebilir. Grafen'in antibakteriyel mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamış olsa da, yapılan çalışmalarda hem gram negatif hem de pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu ve yüksek biyouyuma sahip olduğu gösterilmiştir (129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın etik kurulu onayı, 01.07.2022 tarihinde Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (Kayıt numarası: 22/362). Etik kurulu onayı alındıktan sonra Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalında tedaviye başlayacak olan ve premolar diş çekimi planlanmış hastalara bilgilendirme yapıldı, aydınlatılmış onam formu alınarak çekilmiş olan dişler toplandı. Çalışmamız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi. (Proje numarası: 2023/082)

Tez çalışmamızda kullanılan nHA ve bor katkılı nHA solüsyonları Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Konstrüksiyon ve İmalat Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Önder Albayrak tarafından üretildi.

Mine yüzeylerinin mikrosertlik incelemesi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülenmesi Mersin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

Materyallerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyelerinden Dr. Öğretim Üyesi Aysun Kaya ile birlikte, Üniversitemizin Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. MATERYALLER

Çalışmanın biyomimetik materyallerin mine demineralizasyonunu önleme kapasitelerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Tablo 3.1.'de, araç ve gereçler ise Tablo 3.2.'de sunuldu.

Tablo 3.1: Biyomimetik materyallerin mine demineralizasyonunu önleme kapasitelerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

KULLANILAN MALZEME	TİCARİ İSMİ
Cila Diskleri	Ruby Dent, Ruby-142
Polisaj Fırçası	Drm Dental
Su Zımparası	Nikon
Soğuk Akrilik Toz ve Likit	Integra Ortodonti Akriliği
Aplikatör	Roco
Timol Solüsyonu	ChemBio Laboratory Research
Demineralizasyon Solüsyonu	ChemBio Laboratory Research
Remineralizasyon Solüsyonu	ChemBio Laboratory Research

Tablo 3.2: Biyomimetik materyallerin mine demineralizasyonunu önleme kapasitelerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan araç ve gereçler

KULLANILAN MALZEME	TİCARİ İSMİ
Piyasemen	Kavo Smartmatic S10S
Mikromotor	Strong 210 Max
Mikrosertlik Test Cihazı	Schimadzu Corporation HMV
Taramalı Elektron Mikroskobu	Zeiss Gemini Supra™ 55

Çalışmanın biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Tablo 3.3.'te, araç ve gereçler ise Tablo 3.4.'te sunuldu.

Tablo 3.3: Biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

KULLANILAN MALZEME	TİCARİ İSMİ
24 Kuyucuklu Plate	Wuxi NEST Biotechnology
Steril Pipet Ucu 10 µl 96'lık Rackta	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Steril Pipet Ucu 100 µl 96'lık Rackta	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Steril Pipet Ucu 1000 µl 96'lık Rackta	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Steril Tek Kullanımlık Öze	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Steril Eküvyon Çubuğu Swap	Lp Italiana Spa
Steril Kapaklı Tüp	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Boncuklu Mikroorganizma Saklama Besiyerli Cryo Tüp	Microbank™ – Pro Lab Diagnostics Inc
Falcon Tüp (15ml)	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Falcon Tüp (50ml)	Microcult- Alkim Saglik Hizmetleri Sanayi ve Tic. Ltd. Sti.
Metal Braket	G&H MiniPrevail, U.S.A
%5 At Kanlı Agar	Laborlar Biyoteknoloji
%5 Koyun Kanlı Agar	Laborlar Biyoteknoloji
Mueller Hinton Broth	Laborlar Biyoteknoloji

Tablo 3.3 (devam)

Brain Heart Infusion Broth (BHI)	Laborlar Biyoteknoloji
Brain Heart Infusion Broth (BHI)	Laborlar Biyoteknoloji
Rezasurin	Loba Chemie Pvt. Ltd.
Kristal Viyole Solüsyonu (KV)	ChemBio Laboratory Research
Metanol	Scharlau Chemicals
Asetik Asit	ISOLAB Chemicals

Tablo 3.4: Biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında kullanılan araç ve gereçler

KULLANILAN MALZEME	TİCARİ İSMİ
Etüv	Binder, ED 115
Pastör Fırını	Daihan Scientific
Dijital Tartı	A&D The Smart Super Hybrid Sensor (SHS)
Vortex Cihazı	Velp Scientifica Zx3 Advanced Vortex Mixer
McFarland Ölçüm Cihazı	Biosan DEN-1B
0.5 McFarland Standart Sabiti	GBL McFarland No: 0,5/4,0
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica Arex Digital Pro
Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific Herasafe 2030i
Mikroplate Okuyucu	BioTek Synergy HTX

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Tez çalışmamızda mine demineralizasyonunu önleyebilecek, biyomimetik dental materyaller geliştirmek amacıyla, pozitif ve negatif kontrol grubu dahil toplam 7 grup oluşturulmuştur (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Tez çalışmamızda kullanılan deney grupları

GRUP NUMARASI	UYGULANAN MATERYAL
1. Grup	nHAp Sinterleme Öncesi
2. Grup	nHAp Sinterleme Sonrası
3. Grup	%2 Bor nHAp Sinterleme Öncesi
4. Grup	%2 Bor nHAp Sinterleme Sonrası
5. Grup	%4 Bor nHAp Sinterleme Öncesi
6. Grup (Pozitif Kontrol)	Kazein Fosfopeptit Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP) / Klorheksidin
7. Grup (Negatif Kontrol)	Yapay Tükürük

3.2.1.1. Katkılı ve katkısız HA tozu üretilme yöntemi: Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan HA ve B katkılı HA tozlar Prof. Dr. Önder Albayrak tarafından sentezlendi ve üretilen tozlardan süspansiyon elde edildi. Nano boyutta HA eldesinde, yaş kimyasal (asit-temelli) yöntem kullanıldı. B katkılı HA eldesinde ise yaş kimyasal yöntem ile sentezlenen HA tozları ve ticari olarak temin edilen B tozlarının belirli oranlarda kullanıldığı katı-hal yöntemi tercih edildi. Katkılı ve katkısız numune elde

etmek amacıyla kullanılan prosedürler aşağıda sunulmuş olup; sonrasında gruplara göre numune hazırlama prosedürleri açıklandı.

3.2.1.2. Yaş kimyasal yöntem ile nano boyutta HA sentezlenmesi: Yaş kimyasal yöntem ile HA sentezlenmesinde, kalsiyum hidroksit [$10Ca(OH)_2$] ile fosforik asit [H_3PO_4] reaksiyonu sonucu yabancı elementler oluşmaması, çıktı olarak HA [$Ca10(PO_4)6(OH)_2$] haricinde sadece su bulunması avantajlarından dolayı "asit-temelli metot" kullanıldı (130,131).

Manyetik karıştırıcı üzerindeki 400 ml deiyonize su içerisine 10 g $Ca(OH)_2$ (~99%, Merck, Germany) eklenerek 30 dakika karıştırıldı. Manyetik karıştırma devam ederken karışımın sıcaklığı 40 °C'ye getirildi, pH değeri 9,80±0.02 olacak şekilde süspansiyona H_3PO_4 (%85, Merck, Germany) eklendi ve 24 saat manyetik karıştırma durumunda yaşlanmaya bırakıldı. Ardından, santrifüj-dekantasyon işlemlerinden geçirilerek (5 kez) elde edilen çökelti 48 saat boyunca 110 °C'lik etüvde kurutuldu. Kurutma sonrası, agat havanda 10 dakika öğütüldü ve nanoboyutta HA tozu elde edildi (130–133). Elde edilen tozların bir kısmı sinterleme amacıyla kamara fırın içinde 1000 °C sıcaklıkta 12 saat bekletildi.

3.2.1.3. Katı-hal yöntemi ile %2 Bor katkılı HA sentezlenmesi: Katı-hal yöntemi kullanılarak B katkılı HA üretiminde, asit-temelli metot ile sentezlenen HA tozları ve ticari olarak temin edilen borik asit (H_3BO_3) (%99,5; Merck, Germany) tozları kullanıldı.

"Yaş Kimyasal Yöntem ile Nano Boyutta HA Sentezlenmesi" başlığı altında detayları verilen prosedür kullanılarak elde edilen HA tozlarına, ağırlığınca %2 ve %4 bor içerecek şekilde belirlenen miktarda toz halinde H_3BO_3 (%99,5; Merck, Germany) ilave edildi. Elde edilen karışım, farklı çaplarda (4mm ve 10 mm) toplam 40 adet seramik bilye ile, bilyeli değirmende 141 rpm'de 24 saat karıştırıldı (134).

Elde edilen toz karışım katı-hal tepkimesi amacıyla kamara fırın içinde 1000 °C sıcaklıkta 12 saat bekletilmesi ardından (sinterleme işlemi) agat havanda 10 dakika öğütüldü ve katı-hal yöntemi ile Bor katkılı HA tozu elde edildi.

3.2.1.4. Sentezlenen HA ve Bor katkılı HA tozlarından süspansiyonların hazırlanma prosedürü: Sentezlenen HA ve farklı oranlarda B katkılı HA tozları, sinterleme öncesi ve sinterleme sonrası süspansiyon hazırlanma prosedüründe kullanıldı.

Her bir gruptan 7,5 g toz agat havanda hafifçe öğütüldükten sonra manyetik karıştırıcı üzerindeki 250 ml deiyonize suya eklenip 10 dakika karıştırıldı ve 2 dakika ultrasonik homojenizasyona tabi tutularak süspansiyonlar hazırlandı.

3.2.1.5. Kazein fosfopeptit amorf kalsiyum fosfat (Pozitif Kontrol Grubu): Tez çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak CPP-ACP içerikli GC Tooth Mousse (GC Corporation, GC International, Itabashiku, Tokyo, Japan) kullanıldı (Şekil 3.1). Deney süresince üretici firma tarafından belirtilen talimatlara uygun olarak günde iki kere aplikatör yardımıyla diş yüzeylerine uygulandı.



Şekil 3.1: GC Tooth Mousse (CPP-ACP)

3.2.2. Biyomimetik Materyallerin Minenin Demineralizasyonunu Önleme Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

3.2.2.1. Örnek sayısının belirlenmesi: Çalışmamızın bu kısmı için örnek sayısının belirlenmesinde G*Power Programı (Sürüm 3.1.2.9) kullanılarak α=0,05 anlamlılık düzeyinde her grup için örnek sayısının 12 olduğunda, testin gücünün %95 olduğu belirlendi. %20 kayıp oranı göz önünde bulundurularak, her grupta n=14 olacak şekilde toplam 96 premolar dişin çalışmaya dahil edilmesine karar verildi.

3.2.2.2. Dişlerin toplanması: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalında tedaviye başlayacak olan ve premolar

diş çekimi planlanmış hastalara bilgilendirme yapıldı, aydınlatılmış onam formu alınarak çekilmiş olan dişler toplandı. Toplanan dişlerin çürüksüz, dolgusuz, BNL'siz, çekim sırasında hasar görmemiş olmasına ve yapısal bozukluğa sahip olmamasına dikkat edildi. Dişler mine çatlağı ya da hipoplastik alan varlığı açısından x2,5'lik dental loop kullanılarak incelendi. Dişler deney süresine kadar oda sıcaklığında %0,1 timol içeren serum fizyolojik karışımı içerisinde bekletildi.

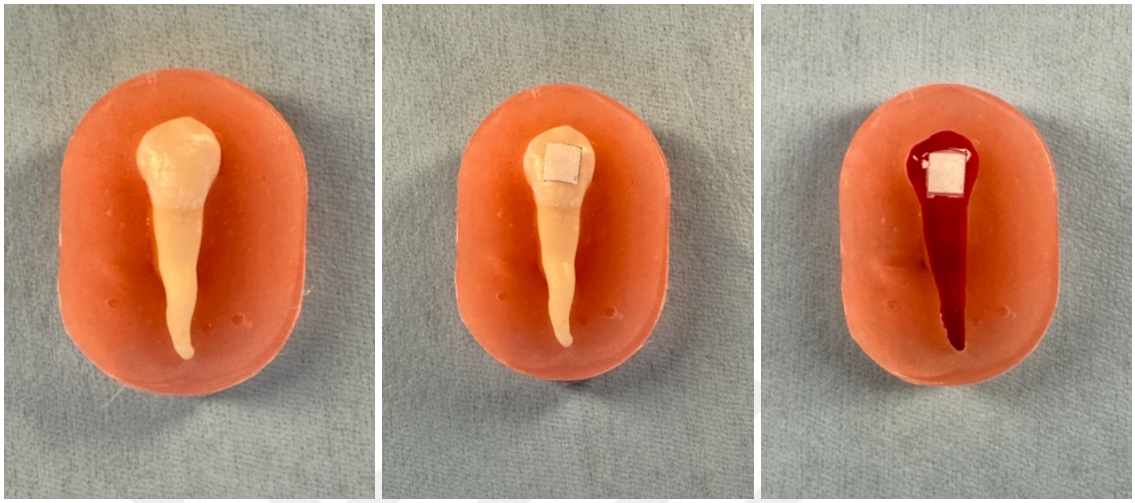
3.2.2.3. Diş örneklerinin hazırlanması: Seçilen dişlerin üzerindeki doku artıkları kretuar ile uzaklaştırıldıktan sonra bukkal yüzeyleri mikromotora takılan lastik ile temizlendi. 96 premolar diş silikon kalıplar kullanılarak bukkal yüzeyleri yukarı bakacak şekilde akrilik içerisine gömüldü. Bu sırada bukkal yüzeylere akrilik gelmemesine dikkat edildi. Bloklar 24 saatin sonunda silikon kalıplardan çıkarıldı. Daha sonra dişler distile su ile yıkandı ve mine yüzeyleri sırasıyla 900, 1200 ve 1500 gritlik silikon karbid kağıtlar ile düz ve pürüzsüz olacak şekilde zımparalandı. Zımparalama sırasında 5 saniye boyunca aynı yönde dairesel hareketlerin uygulanmasına ve işlemin distile su altında gerçekleştirilmesine dikkat edildi (Şekil 3.2). Ardından dişler, mine yüzeyinin tamamen ortadan kaldırılma ihtimaline karşı x2.5'luk loop altında tekrar incelendi.



Şekil 3.2: Deney için hazırlanmış küçük azı dişleri

Akrilik içerisine gömülmüş, zımparalanmış ve cilalanmış dişlerin bukkal yüzeylerinin orta kısımlarında 4x4 mm'lik pencereler oluşturmak amacıyla etiketler

kullanıldı. Etiket dışında kalan diş yüzeyleri aside dirençli tırnak cilası ile 2 kat boyandı ve 24 saat kurumaya bırakılmasının ardından etiketler uzaklaştırıldı (Şekil 3.3).



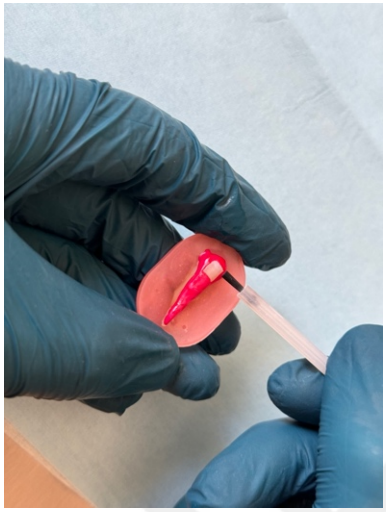
Şekil 3.3: Küçük azı dişlerinin akrilik bloklar içine gömülmesi, etiketlerinin yapıştırılması ve çift kat tırnak cilası ile kaplanması

Deney için hazırlanan dişler randomize olarak seçilerek her birinde 14 adet blok olacak şekilde 7 gruba ayrıldı.

3.2.2.4. Başlangıç mikrosertlik ölçümlerinin yapılması: Dişlerin başlangıç mikrosertliklerinin uygun değerler içerisinde olmasına önem verildi. Bu sebeple dişler Vickers Mikrosertlik Ölçüm cihazına çalışma yüzeyleri yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. İşlem görmemiş 96 dişin 4x4'lük pencerelerinin kenar bölgelerine denk gelecek şekilde 3'er ölçüm yapıldı. Elmas ucun oluşturmuş olduğu izin diagonal ucunluğu cihaz içerisindeki ölçüm sistemi ile saptandı. Sertlik değerleri, makinenin kendi ölçüm sistemi ile otomatik olarak hesaplandı. Ölçümler 15 sn boyunca 2 N'luk kuvvet uygulanması ile yapıldı.

3.2.2.5. Materyallerin ve pH döngüsünün uygulanması: Mine örneklerine 10 gün boyunca pH döngüsü modeli uygulandı. Bu süreçte dişler 6 saat demineralizasyon, 17 saat remineralizasyon sürecine maruz bırakıldı. 1 saat ise biyomimetik materyallerin uygulanması sürecine ayrıldı. Her bir gruptaki 14 diş 30 sn boyunca distile su ile yıkandıktan sonra kurulandı. Biyomimetik materyaller bir mikro fırça yardımıyla günlük

uygulamayı taklit edecek şekilde 2 dakika süreyle uygulandı (Şekil 3.4). 2 dakikanın ardından örnekler 30 sn boyunca distile su ile yıkandı ve kurulandı.



Şekil 3.4: Materyallerin mikro fırça yardımıya diş yüzeylerine uygulanması

Materyallerin uygulanmasının ardından, dişler demineralizasyon solüsyonuna aktarıldı. Demineralizasyon solüsyonu 2,2 mM $CaCl_2$, 2,2 mM NaH_2PO_4 (Sodyum Dihidrojen Ortofosfat Dehidrat), 0,05 M Asetik Asit içermekteydi ve pH 4,4 olana kadar KOH (Potasyum Hidroksit) eklenmişti. 6 saatlik demineralizasyon sürecinin ardından dişler solüsyondan çıkarıldı ve 30 sn boyunca distile su ile yıkandıktan sonra kurulandı.

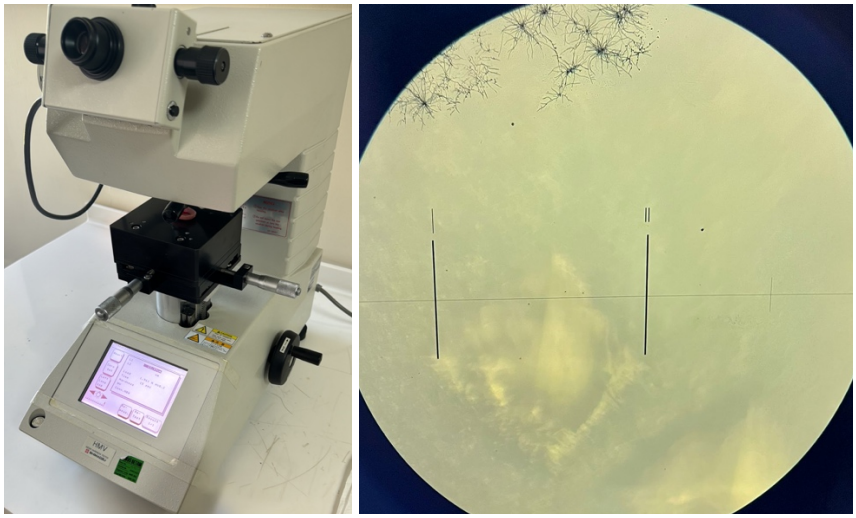
Demineralizasyon sürecinin ardından, biyomimetik materyaller bir önceki uygulamaya göre tekrarlandı. 2 dakikalık uygulamanın ardından dişler 30 sn boyunca distile su ile yıkandı ve kurulandı. Ardından örnekler remineralizasyon solüsyonuna aktarıldı. Remineralizasyon solüsyonu 0,5 mM $CaCl_2$, 0,9m M NaH_2PO_4, 0,15 M KCl (Potasyum Klorid) içeriyordu ve pH 7'ye ayarlanmıştı. 17 saatlik remineralizasyon sürecinin ardından dişler solüsyondan çıkarıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Gruplara ayrılan diş numunelerinin demineralizasyon/remineralizasyon süreçlerine maruz tutulması

Yukarıda anlatılan pH döngüsü 10 gün boyunca tekrar edildi ve son 4 gün örnekler remineralizasyon solüsyonunda bekletildi. Uygulamalar cam kaplar içerisinde gerçekleştirildi. Her uygulamada remineralizasyon ve demineralizasyon solüsyonları yenilendi. Kontrol grubuna herhangi bir materyal uygulanmadı.

3.2.2.6. Materyallerin uygulanmasının ardından Vickers mikrosertlik ölçümünün gerçekleştirilmesi: SEM görüntülemesi için her gruptan 2'şer diş ayrıldı. Kalan dişler Vickers Mikrosertlik Ölçüm cihazına çalışma yüzeyleri yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. Elmas ucun oluşturmuş olduğu izin diagonal ucunluğu cihaz içerisindeki ölçüm sistemi ile saptandı. Sertlik değerleri, makinenin kendi ölçüm sistemi ile otomatik olarak hesaplandı. Ölçümler 15 sn boyunca 2 N'luk kuvvet uygulanması ile yapıldı. Her bir örneğin 3 ayrı bölgesinden değer alındı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Vickers mikrosertlik ölçüm cihazı ve ölçüm sırasında diş numunesi üzerinde bıraktığı örnek iz

3.2.2.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülenmesi: Her gruptan ayrılmış olan 2 diş numunesi taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Gemini Supra™ 55) ile incelendi. Yüzey kaplama işleminden önce her bir örnek yüzeylerin temizlenmesi adına örnek 5 dakika %80 ethanol + %90 ethanol + %100 ethanol + %100 ethanol + %100 aseton + %100 aseton" uygulamasına tabi tutuldu ve ardından kurumaları için 37 C° ısıda 24 saat kuruması bekletildi. Örnekler metal plaka üzerine sabitlendi.

Cihaza yerleştirilen örneklerin yüzeyleri, havasız ortamda 5 nm'lik platin ile kaplandı. Kaplama işlemi tamamlanan örnekler, SEM cihazı içerisine yerleştirilerek vakumlandı ve kayıtları alındı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Örnekler üzerine platin kaplamasının gerçekleştirilmesi ve deneyde kullanılan SEM cihazı

3.2.3. Biyomimetik Materyallerin Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkilerinin Değerlendirilmesi

3.2.3.1. Örnek sayısının belirlenmesi: Biyomimetik solüsyonların antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında G*Power Programı (Sürüm 3.1.9.2 9) ile yapılan güç analizinde α=0.05 anlamlılık düzeyinde; güç değeri 0.80 olarak alındığında her grup için braket sayısı 7 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8: Deneyde kullanılan biyogüvenlik kabini ve pastor fırını

3.2.3.2. Bakterilerin çoğaltılması: Kullanılacak tüm materyaller pastor fırınında steril edildi ve tüm deney biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.8). Biyomimetik solüsyonların antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin değerlendirilmesi adına standart suş olarak KWIK-STIKTM, 0266P, ATCC* 25175TM donmuş stoğu kullanıldı. *S. mutans* ilk olarak %5 at kanlı agara pasajlandı ve CO_2'li inkübatörde 37 °C'de 1 günlük inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.9). Bu işlemin ardından yapılan 2 pasaj için %5 koyun kanlı agar kullanıldı. Bakterilerin canlandırılmasının ardından yapılacak her deney öncesinde tekrar pasaj alındı.



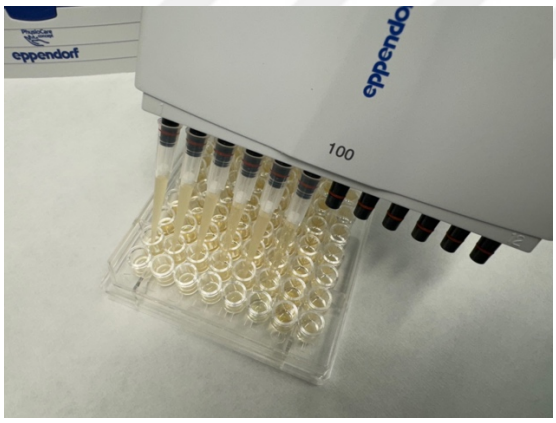
Şekil 3.9: *Streptococcus mutans*'ın inkübe edilmesi

3.2.3.3. Solüsyonların minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi: 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 100 µl Mueller Hinton Broth besiyeri multipipet kullanılarak eklendi ve ardından her bir sıranın ilk kuyucuğuna süreç boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılan test solüsyonlarından 100 µl pipetlendi (Şekil 3.10). 100 µl'lik multipipet kullanılarak ilk kuyucuktan çekilen besiyeri/solüsyon süspansiyonu bir sonraki kuyucuğa aktarılarak seri dilüsyon gerçekleştirildi. En sonunda geriye kalan 100 µl solüsyon atılarak her kuyucukta 100 µl besiyeri/solüsyon süspansiyon olması sağlandı.



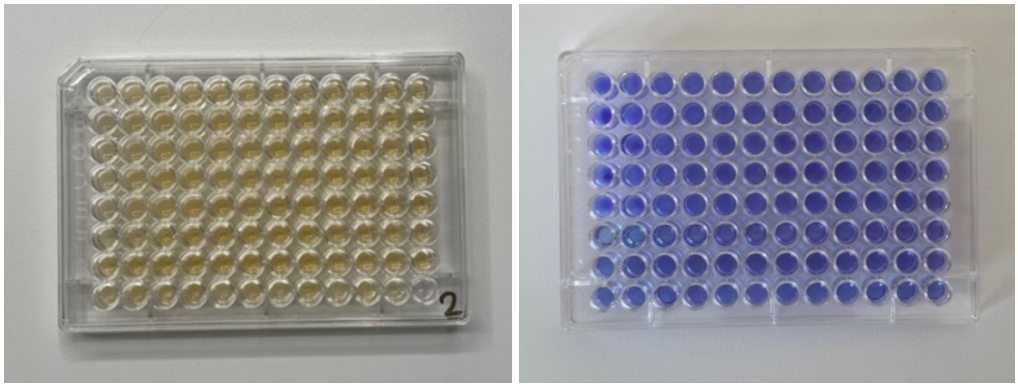
Şekil 3.10: Solüsyonların kullanım öncesinde manyetik karıştırıcı ile karıştırılması

S. mutans, taze kültürden eküvyon yardımı ile toplandı Her bir kuyucuğa, 0.5 McFarland'a ayarlanan *S. mutans*/distile su süspansiyonunda 10 µl eklendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Hazırlanan bakteri/distile su süspansiyonunun pipet yardımı ile kuyucuklara yerleştirilmesi

Resazurin çözeltisi, 270 mg'lık tozun 40 mL distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Tozun iyi karışmasını ve homojen bir çözelti olmasını sağlamak adına vorteks karıştırıcı kullanıldı. Ardından her bir kuyucuk içerisine 10 µl rezasurin çözeltisi eklendi (Şekil 3.12).

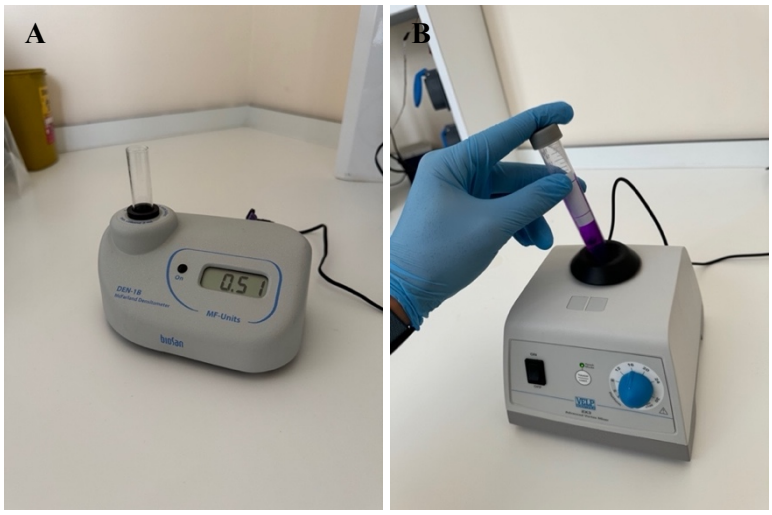


Şekil 3.12: Rezasurin çözeltisinin kuyucuklara yerleştirilmesi

Yapılan işlemler bir diğer 96 kuyucuklı plaka için tekrarlandı; fakat kuyucuklara bakteri yerleştirilmedi ve bu ikinci plate sterilite kontrolü olarak kullanıldı. Hazırlanan iki 96 kuyucuklu mikroplate 37°C'de anaerobik olarak 24 saat boyunca inkübe edildi. Ardından renk rezasurin solüsyonundaki renk değişimi görsel olarak değerlendirildi.

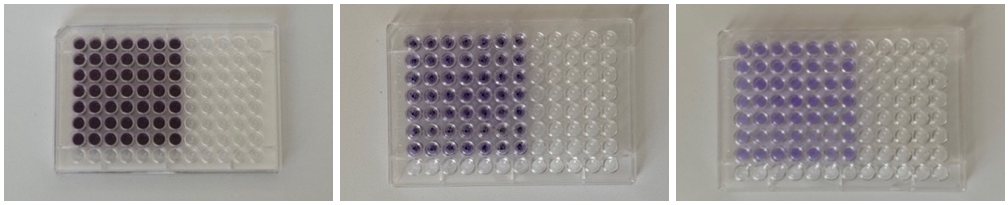
3.2.3.4. Solüsyonların biyofilm oluşumunu engelleme kapasitesinin incelenmesi: Daha önce üç kere pasaj yapılan *S. mutans* suşları, %5 koyun kanlı agar besiyerlerinde CO_2'li inkübatörde 37°C'de 24 saat boyunca bir kez daha inkübe edildi. *S. mutans*, taze kültürden eküvyon yardımı ile toplandı. Biyomimetik materyallerin biyofilm oluşumunu engelleme kapasiteleri test edilirken, BHI sıvı besiyeri kullanıldı.

Her grupta yedi adet premolar braket, ön yüzeyleri yukarı bakacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara yerleştirildi ve üzerlerine 100'er µl test solüsyonu eklendi. Her bir kuyucuğa, 0.5 McFarland'a ayarlanan %1 sükroz içeren 100 µl BHI/*S. mutans* süspansiyonu eklendi ve ardından plakalar 24 saat boyunca 37°C'de anaerobik olarak inkübe edildi (Şekil 3.13-A).



Şekil 3.13: Çözeltininin 0,5 McFarland'a ayarlanması ve kristal viyole solüsyonunun vortexlenmesi

24 saatin sonunda plakalar inkübatörden çıkarıldı ve adezyon göstermeyen bakterilerin uzaklaştırılması için 200 µl BHI ile iki kere yıkandı. İkinci yıkamanın ardından kuyucuklar içerisindeki tüm solüsyon çekildi. Braketler üzerindeki bakterilerin fiksasyonu için 15 dakika boyunca 200 µl %99 metanol eklendi.



Şekil 3.14: Braketler üzerine kristal viyole solüsyonunun uygulanması, yıkanması ve %33'lük asetik asit süspansiyonu ile çözdürülmesi

Fiksasyonun ardından braketler, yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. KV solüsyonu üretici talimatlarına uygun olarak hazırlanıp vortexlendi (Şekil 3.13-B). Aktarılan braketler 20 dakika boyunca %0,1'lik kristal viyole solüsyonuna maruz bırakıldı. Ardından KV solüsyonunun uzaklaştırılması için kuyucuklar 5 kez 200 µl distile su ile yıkandı (Şekil 3.14). Yıkamanın ardından 100 µl %33'lük asetik asit

süspansiyonu, braketler üzerine difüze olmuş KV'nin çözülmesi için kuyucuklara yerleştirildi ve 590 nanometrede optik dansitesi ölçüldü (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: Braket üzerinde oluşmuş bakteri plağının krital viyole solüsyonu ile boyanması ve optik dansitenin ölçülmesi

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışamızın istatistiksel analizleri SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences) 2017 paket programı ile yapıldı. Verilerin analizinde tanımlayıcı istatistikler, ortalama, standart sapma değerleri ile sunuldu. Ölçümlerin normal dağılımına uygunluğunu test etmek için Kolmogrov-Simirnov testi yapıldı. Yapılan ölçümlerin gruplara göre farklı olup olmadığının değerlendirilmesi Kruskall Wallis testi ile yapıldı. Farkı yaratan grubun tespit edilmesinde All-Pairwise yöntemi kullanıldı. Çalışmada 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 BİYOMİMETİK MATERYALLERİN MİNENİN DEMİNERALİZASYONUNU ÖNLEME KAPASİTELERİNE AİT BULGULAR

4.1.1. Vickers Mikrosertlik Bulguları

Vickers mikrosertlik cihazı ile yapılan ölçümlere Kolmogrov-Simirnov normallik testi uygulanmış ve eğiklik-basıklık değerleri incelendi. Dağılımların normal dağılıma uygun olmadığı görüldüğünden dolayı parametrik olmayan Kruskall Wallis testi uygulandı (K-S=0.27, p=0.01, p<0.05). Grupların deney sonu mikrosertlik değerleri Tablo 4.1'de sunuldu.

Tablo 4.1: Dişlerin deney sonu Vickers mikrosertlik ölçümleri

Grup Numarası	Uygulanan Materyal	X±s.s.	X^2	p	Fark
1. Grup	nHA Sinterleme Öncesi	111,43±19,08	59,66	0,01*	1-4 (p=0,01) 2-4 (p=0,01) 3-4 (p=0,01) 5-4 (p=0,01) 6-4 (p=0,01) 7-4 (p=0,01) 1-7 (p=0,01) 2-7 (p=0,04) 3-7 (p=0,02) 5-7 (p=0,03) 6-7 (p=0,04)
2. Grup	nHA Sinterleme Sonrası	72,00±18,06			
3. Grup	%2 Bor nHA Sinterleme Öncesi	100,99±23,2			
4. Grup	%2 Bor nHA Sinterleme Sonrası	275,64±43,92			
5. Grup	%4 Bor nHA Sinterleme Öncesi	82,65±18,24			
6. Grup (Pozitif Kontrol)	GC Tooth Mouse	75,67±12,23			
7. Grup (Negatif Kontrol)	Yapay Tükürük	29,46±13,14			

**Kurskall Wallis testi yapılmıştır. *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

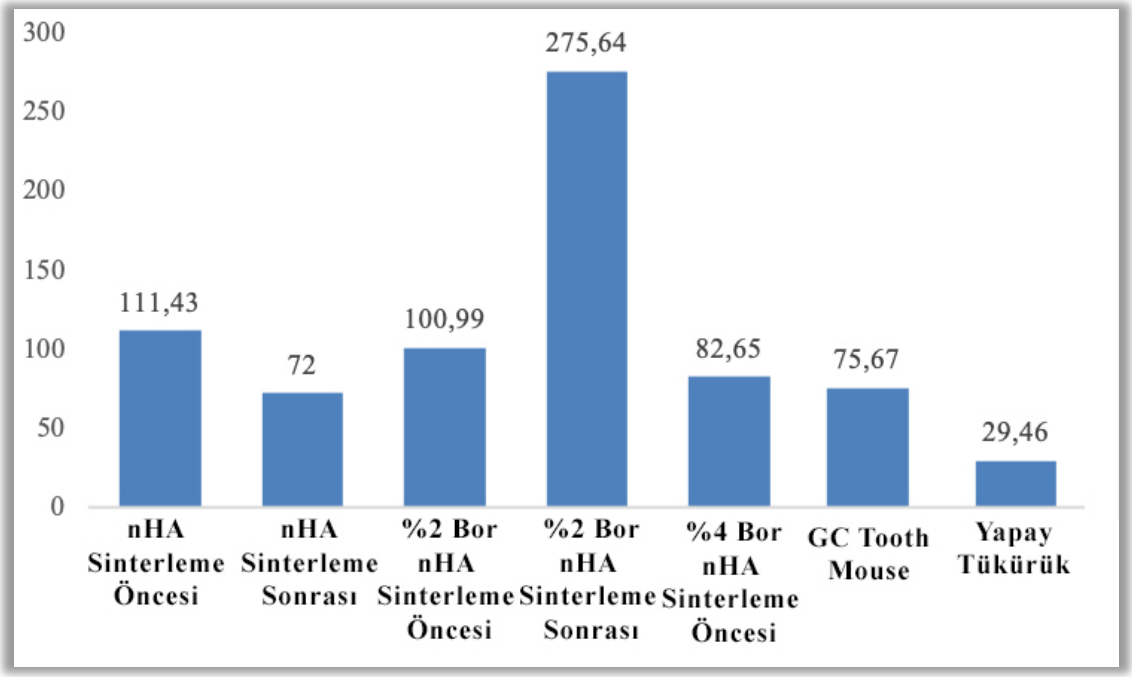
Vickerss test ölçümlerin çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde farklılık gösterdiği tespit edildi (X2=59,66, p=0,01, p<0,05). Gruplara ait değerlerin grafiksel karşılaştırılması Şekil 4.1'de, Box-Plot grafikleri Şekil 4.2'de verildi.

İkili karşılaştırma testi sonuçlarına göre %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubunun Vickers mikrosertlik ölçümlerinin tüm çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü (p=0,01).

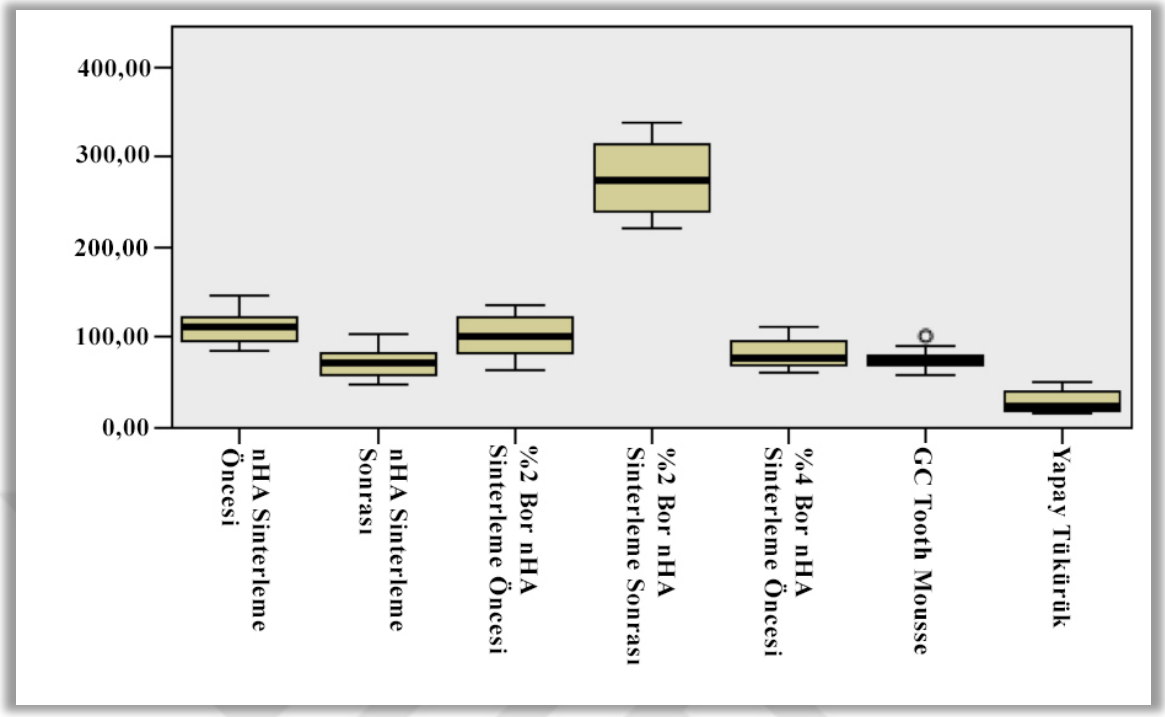
Negatif kontrol grubu olan yapay tükürük grubunun ölçümlerinin tüm çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü (p<0,05).

Vickers mikrosertlik ölçümlerinin diğer gruplarda olan nHA Sinterleme Öncesi, nHA Sinterleme Sonrası, %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi, %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi gruplarında benzer düzeylerde olduğu görüldü (p>0,05).

Negatif kontrol grubu olan yapay tükürük grubunun diğer tüm gruplara göre düşük, %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubunun ölçümlerinin tüm gruplara göre yüksek olduğu görüldü. Diğer tüm grupların ölçümlerinin ise farklı düzeylerde olmadığı tespit edildi. Pozitif kontrol grubu olan CPP-ACP'a göre yüzey sertlikleri karşılaştırıldığında yalnızca %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubu anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.



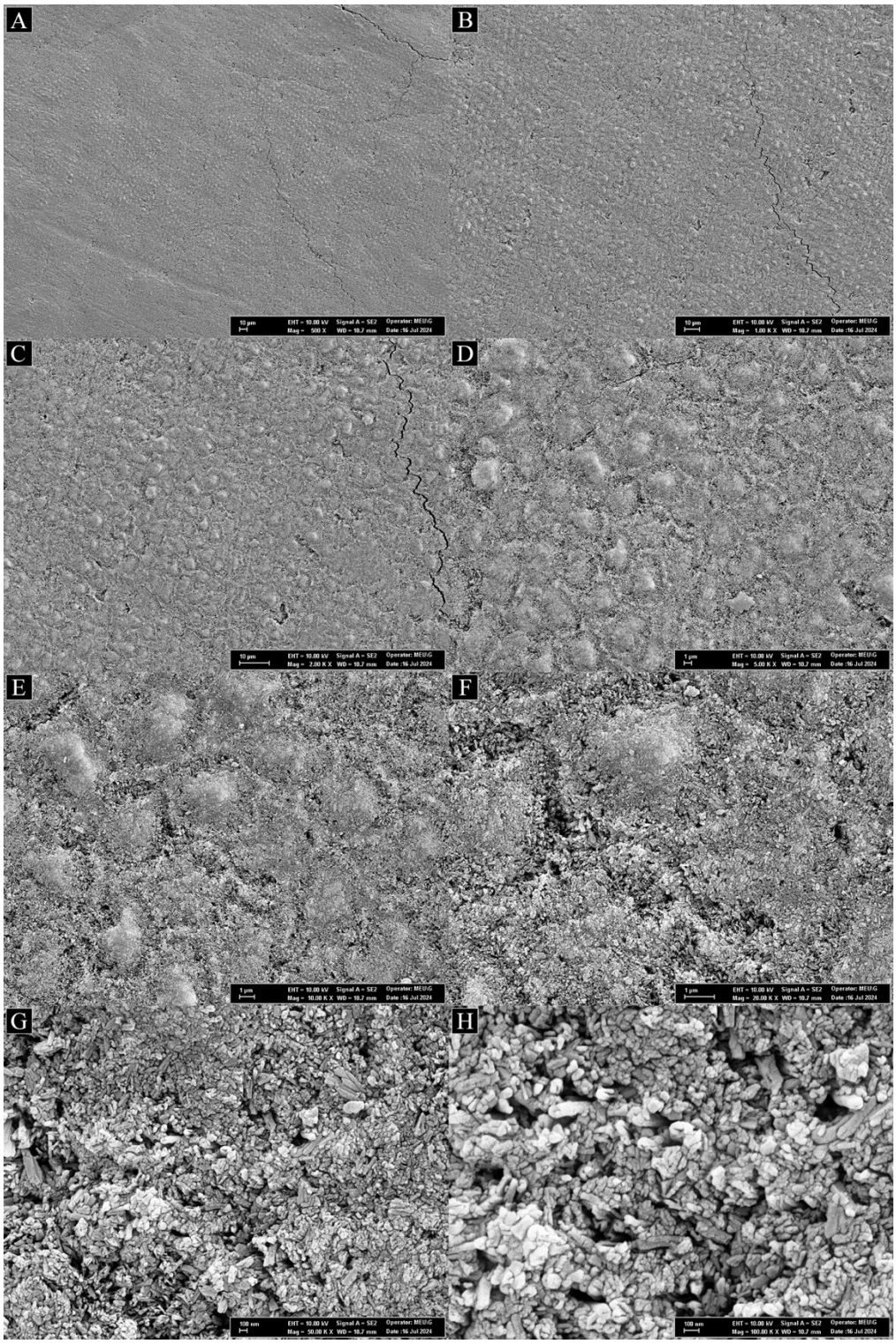
Şekil 4.1: Gruplara ait Vickers mikrosertlik değerlerinin grafiksel karşılaştırılması



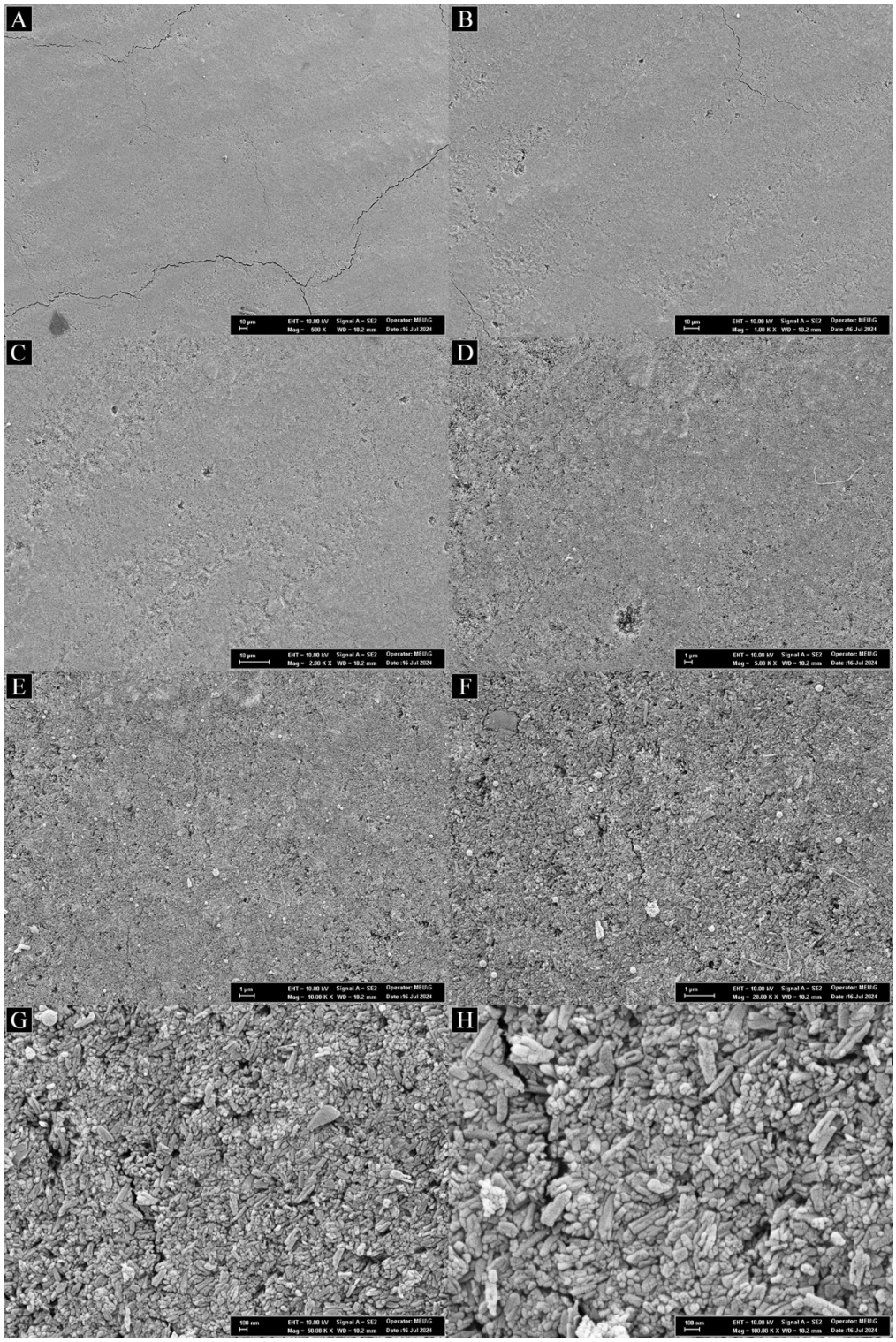
Şekil 4.2: Gruplara ait Vickers mikrosertlik değerlerinin Box-Plot grafikleri

4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bulguları

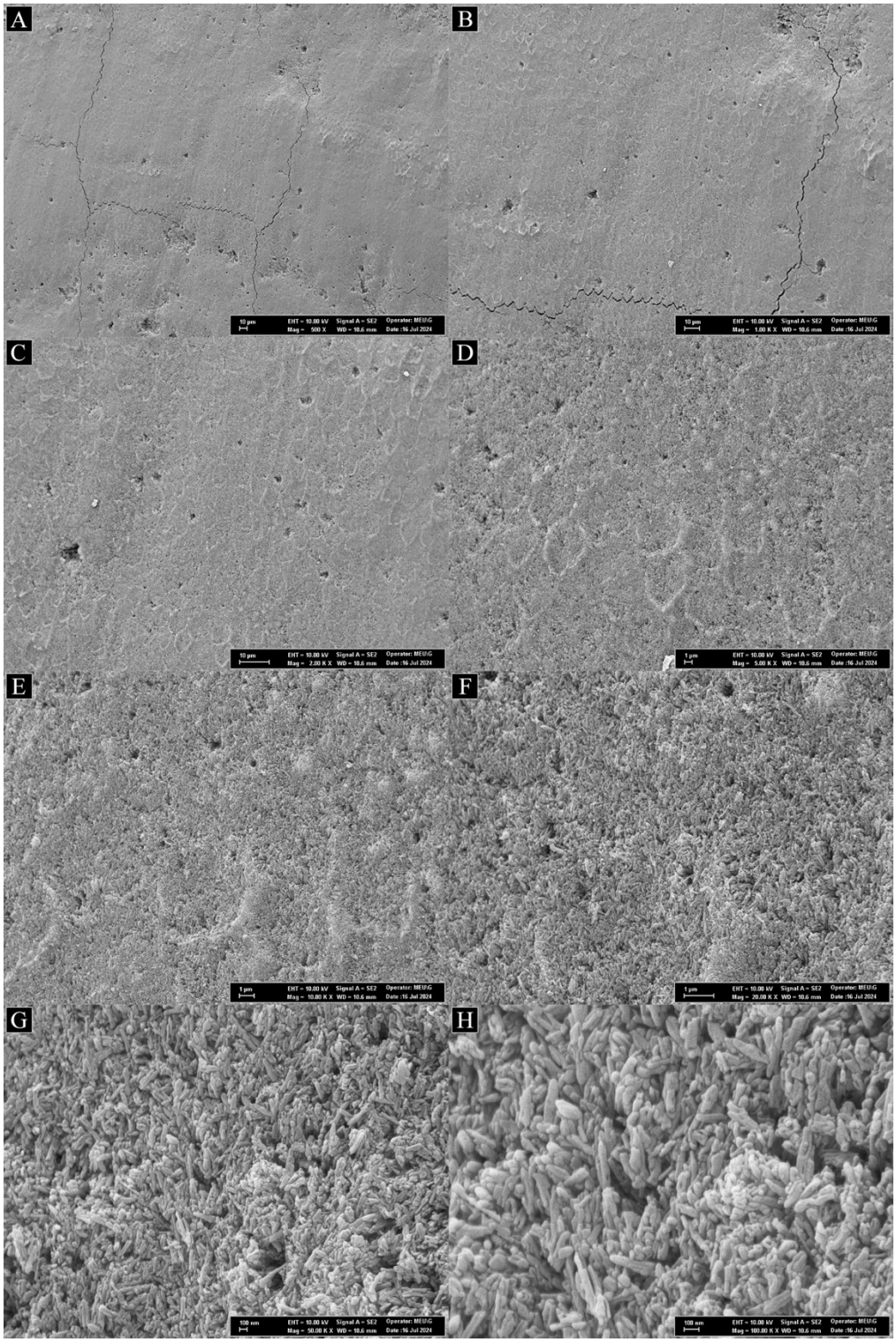
Tüm gruplara ait SEM bulguları Şekil 4.3-4.9'da sunulmuştur. Çalışmamızın negatif kontrol grubu olan Yapay Tükürük (Şekil 4.9) grubunda bal peteği görüntüsü tespit edildi. Tahrip olmuş mine prizmalarını çevreleyen interprizmatik bölgenin demineralize olduğu görüldü. HA kristalleri belirli bir düzende dağılım gösterdi ve porözlü yapı tüm bölgelerde izlendi. Deney gruplarının tümünü negatif kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda mine yüzeylerindeki demineralizasyon miktarının daha az olduğu görüldü. nHA Sinterleme Öncesi (Şekil 4.3) grubunda balık pulu görünümü gözlendi. pH döngüsü sonrasında mine prizmaları ortaya çıkmış olmasına rağmen, prizmaların baş bölgeleri nHA kristalleri ile örtülü olduğu gözlendi ve poröziteli yapıya rastlanmadı. nHA Sinterleme Sonrası (Şekil 4.4) grubunda, daha silik balık pulu görünümü oluştu; ancak Grup 1'e kıyasla daha porözlü bir yapı hakimdi. %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası (Şekil 4.6) grubu yüzey sertliği sonuçlarını destekledi ve sağlıklı mineye en yakın SEM görüntüleri elde edildi. Mine prizmaları gözlenmedi ve HA partiküllerinin her bölgede homojen olarak mine yüzeyine çöktü.



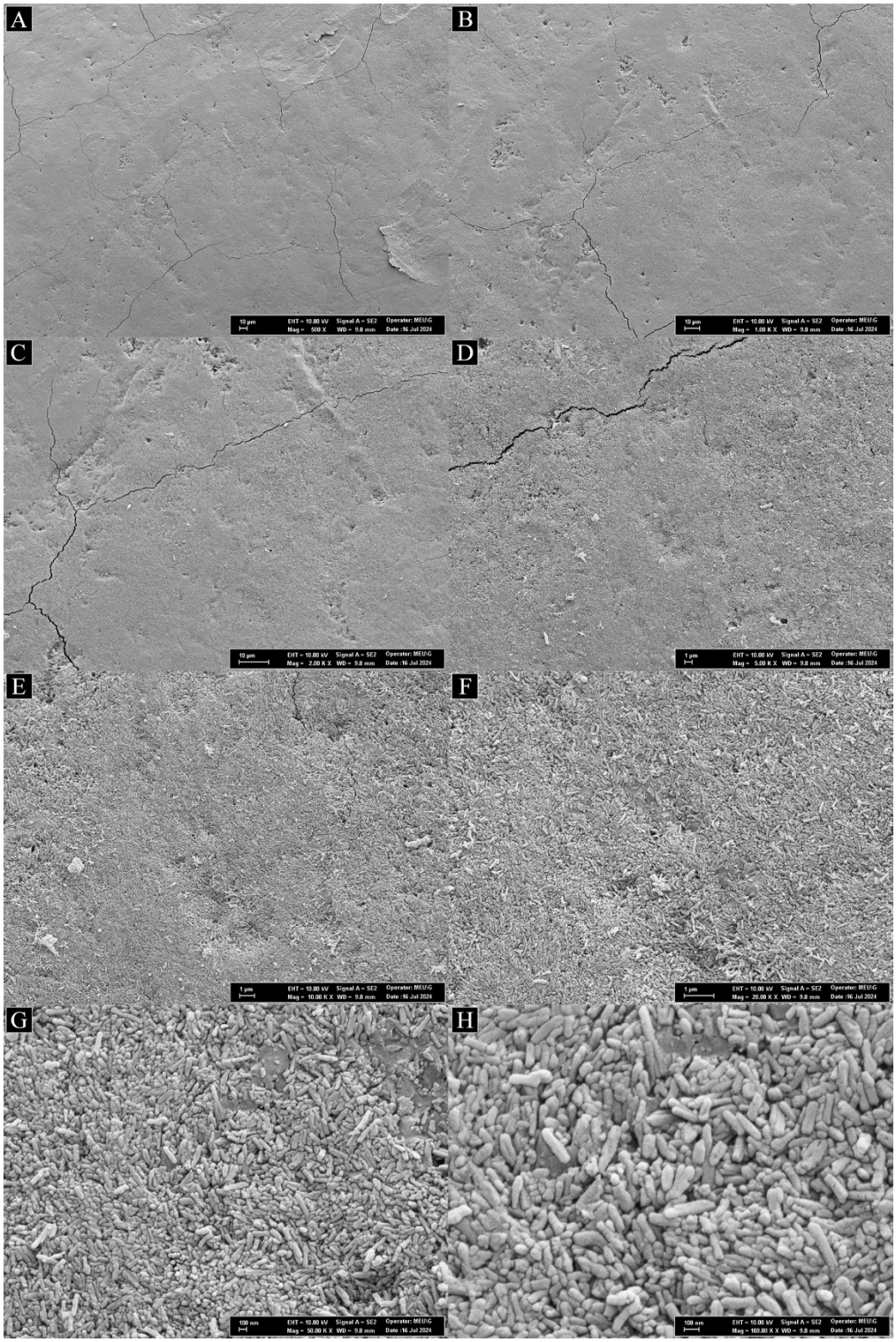
Şekil 4.3: "nHA Sinterleme Öncesi" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme



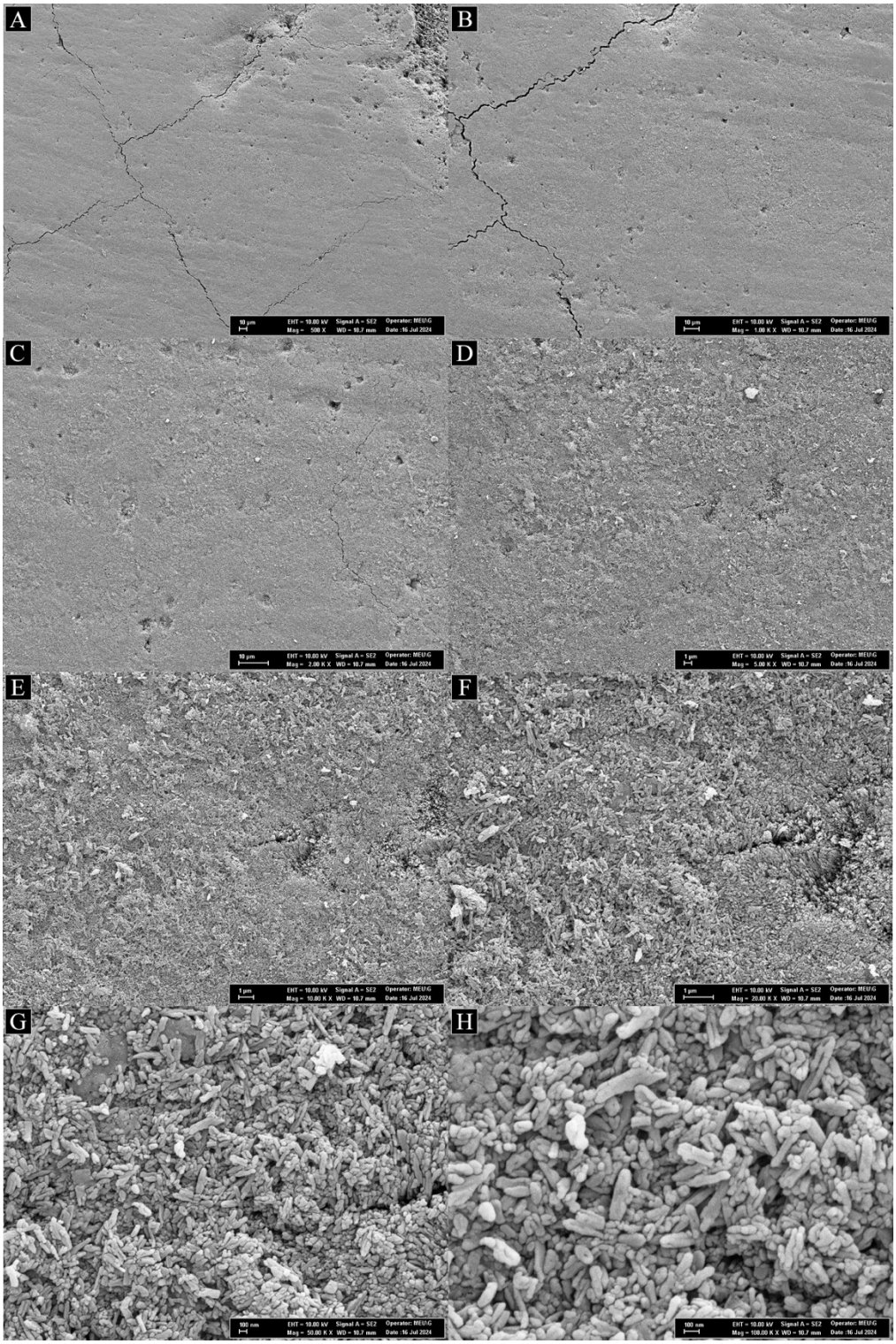
Şekil 4.4: "nHA Sinterleme Sonrası" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme



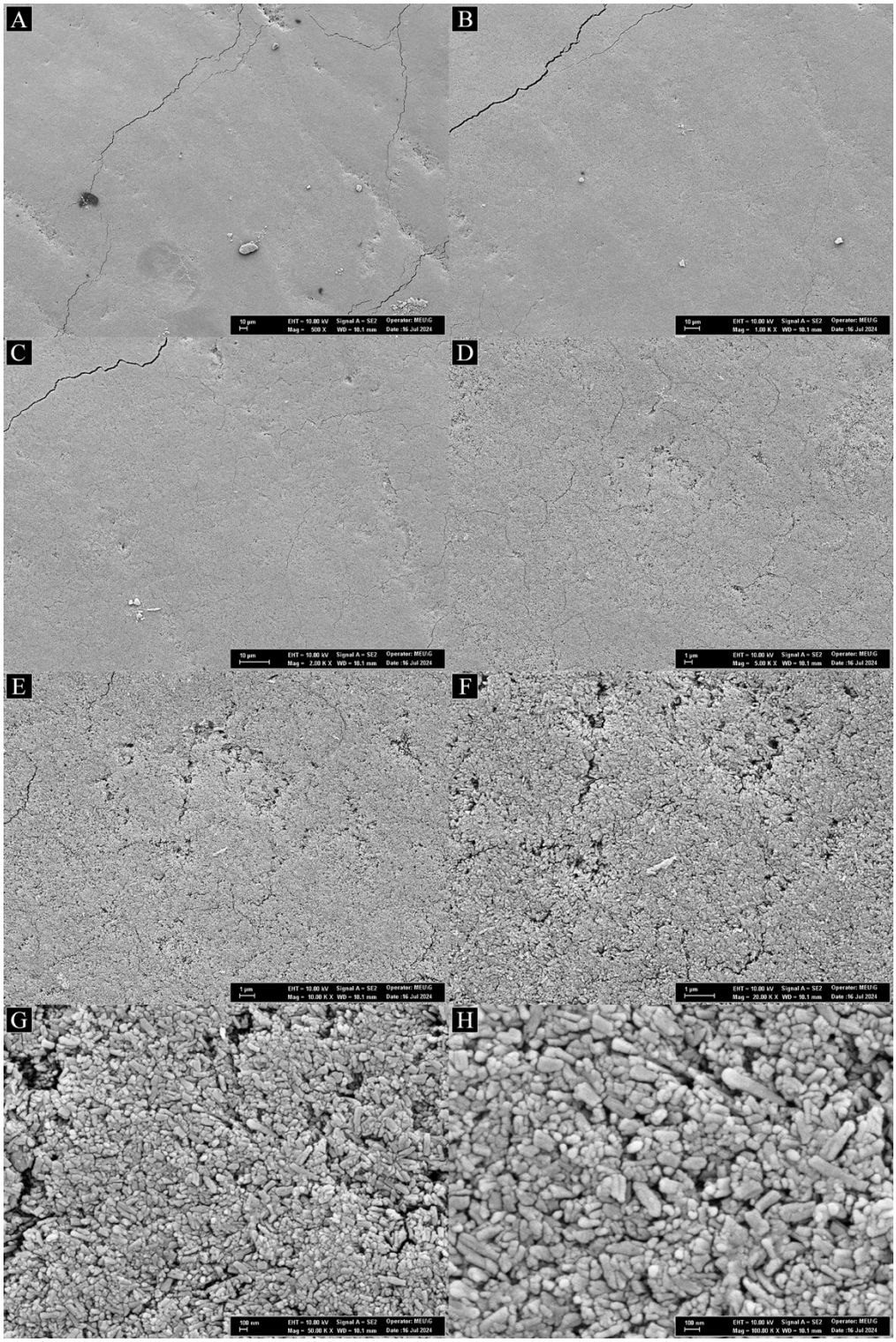
Şekil 4.5: "%2 Bor nHA Sinterleme Öncesi" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme



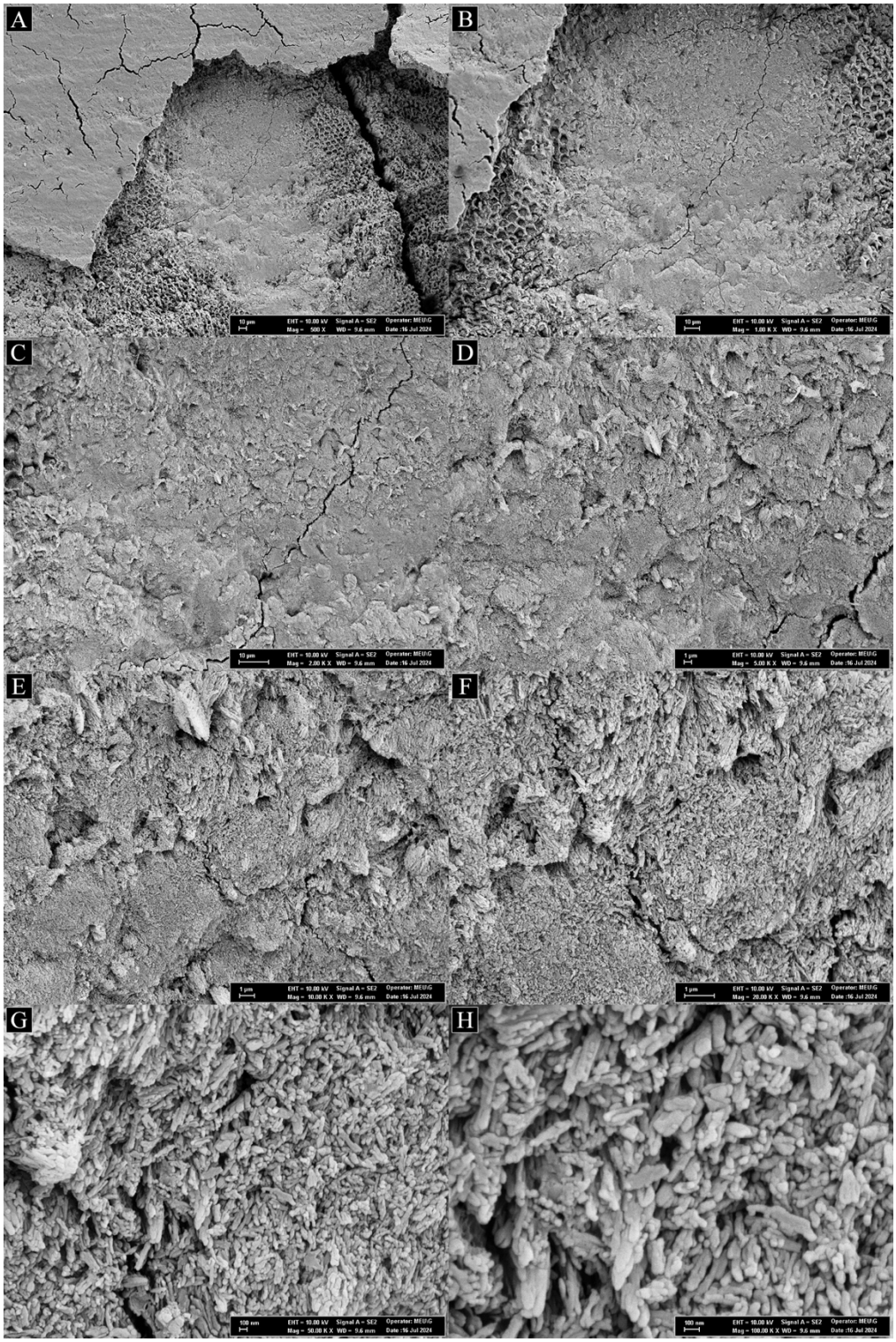
Şekil 4.6: "%2 Bor nHA Sinterleme Sonrası" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme



Şekil 4.7: "%4 Bor nHA Sinterleme Öncesi" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme



Şekil 4. 8: "GC Tooth Mouse" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme

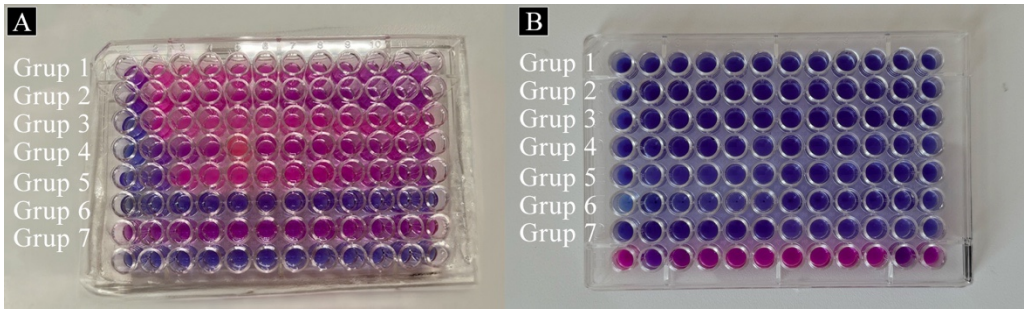


Şekil 4. 9: "Yapay Tükürük" grubuna ait SEM görüntüleri. A: 500x, B: 1.000x, C: 2.000x, D: 5.000x, E: 10.000x, F: 20.000x, G: 50.000x, H: 100.000x büyütme

4.2. BİYOMİMETİK MATERYALLERİN ANTİBAKTERİYAL VE ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNE AİT BULGULAR

4.2.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

MİK hesaplanması için her grup bir satıra yerleştirildi. Sol başta en yüksek konsantrasyon olacak şekilde seri dilüsyon tekniği (1:1, 1:2; 1:4…) ile deney gerçekleştirildi ve gözle değerlendirme yapıldı. Değerlendirme aşamasını kolaylaştırmak adına başlangıçta mavi renkte olup, canlı bakteri ile etkileşime girdiğinde pembe renk alan Rezasurin boyası kullanıldı (Şekil 4.10-A). Deney sırasında solüsyonların sterilizasyon kontrolü, bir başka mikroplak ile *S. mutans* kullanılmadan yapıldı (Şekil 4.10-B). Deney mikroplağındaki 8. satır, Rezasurin boyasının sterilitesini test etmek için kullanıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde Sinterleme Öncesi %4 Bor nHA grubunun MİK değeri 2:1, Sinterleme Öncesi %2 Bor nHA ve Sinterleme Sonrası %2 bor nHA grubunun değeri 1:1 olarak tespit edildi. Klorheksidin grubu, her derişimde etkinlik gösterirken, Sinterleme Öncesi nHA ve Sinterleme Sonrası nHA gruplarının MİK değerleri tespit edilemedi.



Şekil 4.10: MİK hesaplanması. A: Deney grupları, B: *S. mutans* kullanılmayan sterilite kontrolü

4.2.2. Solüsyonların Biyofilm Oluşumunu Engelleme Kapasitesine Ait Bulgular

Solüsyonların biyofilm oluşumunu engelleme kapasitelerinin ölçümlerine Kolmogrov-Simirnov normallik testi uygulandı ve eğiklik-basıklık değerleri incelendi.

Dağılımların normal dağılıma uygun olmadığı görüldüğünden dolayı parametrik olmayan Kruskall Wallis testi uygulandı (K-S=0,13, p=0,01, p<0,05). Solüsyonların biyofilm oluşumu engellemesine ait optik dansite değerleri Tablo 4.2'te sunuldu.

Tablo 4.2: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerleri

Grup Numarası	Uygulanan Materyal	X±s.s.	X^2	p	Fark
1. Grup	nHA Sinterleme Öncesi	0,387±0,052	83,56	p=0,01*	1-6 (p=0,01) 2-6 (p=0,01) 3-6 (p=0,01) 4-6 (p=0,01) 7-6 (p=0,01) 4-5 (p=0,02) 4-1 (p=0,01) 4-2 (p=0,01) 4-3 (p=0,01) 7-5 (p=0,01) 7-3 (p=0,01) 7-2 (p=0,01) 7-1 (p=0,01)
2. Grup	nHA Sinterleme Sonrası	0,389±0,057			
3. Grup	%2 Bor nHA Sinterleme Öncesi	0,384±0,007			
4. Grup	%2 Bor nHA Sinterleme Sonrası	0,417±0,037			
5. Grup	%4 Bor nHA Sinterleme Öncesi	0,366±0,030			
6. Grup (Pozitif Kontrol)	Klorheksidin	0,274±0,056			
7. Grup (Negatif Kontrol)	Yapay Tükürük	0,448±0,030			

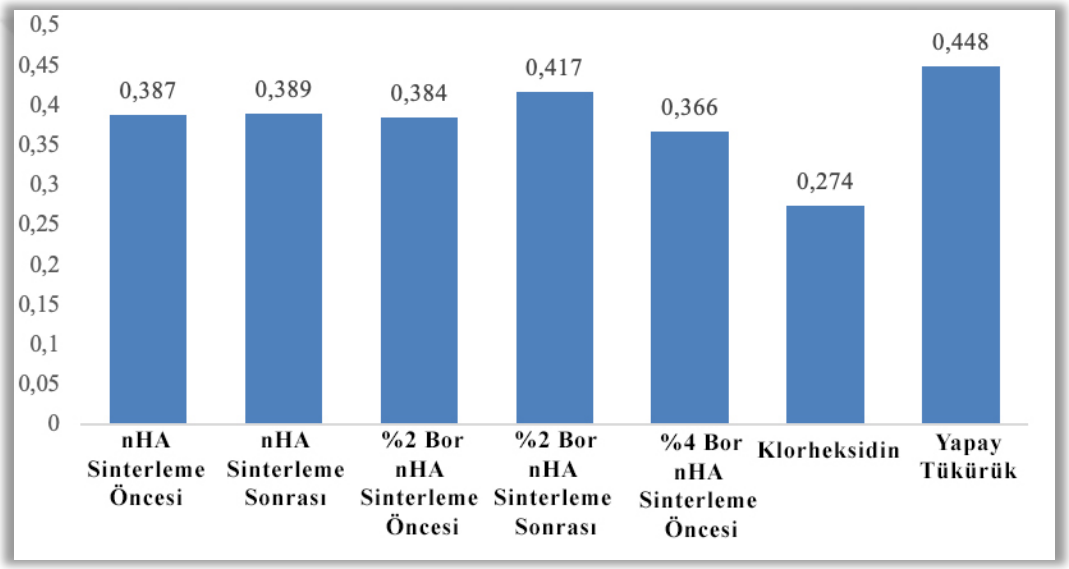
**Kurskall Wallis testi yapılmıştır. *0,05 düzeyinde anlamlı farklılık

Solüsyonların biyofilm oluşumunu engelleme kapasitelerinin ölçümlerinin çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde farklılık gösterdiği tespit edildi (X2=83,56, p=0,01, p<0,05). Gruplara ait değerlerin grafiksel karşılaştırılması Şekil 4.11'de, Box-Plot grafikleri Şekil 4.12'de verildi.

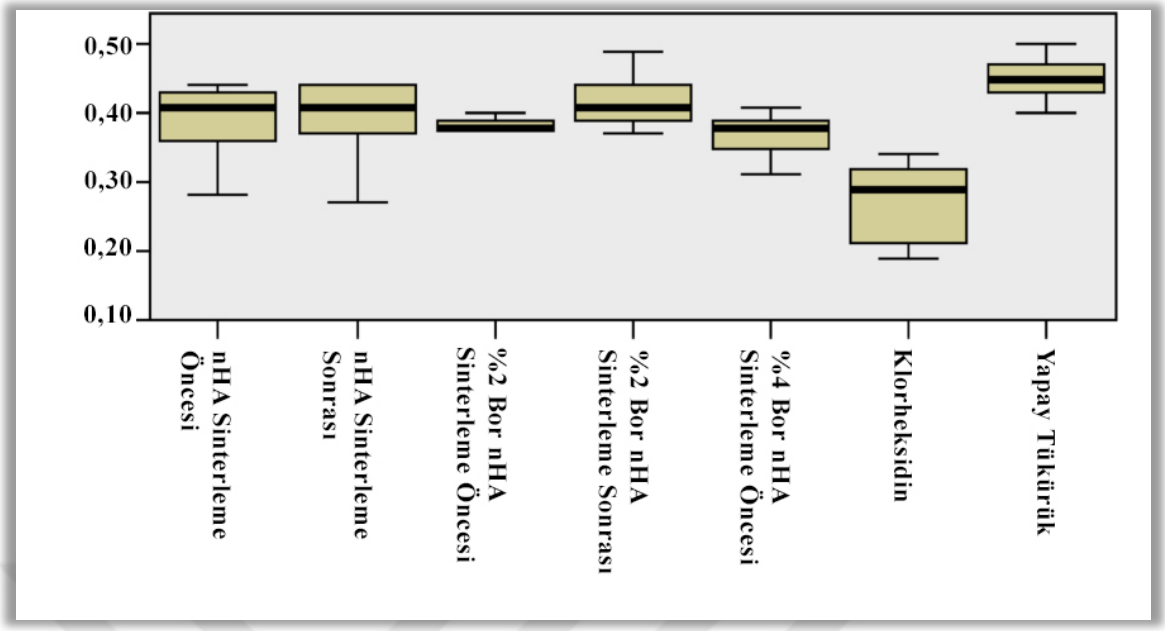
Yapılan ikili kıyaslama testi sonucunda Klorheksidin grubunun ölçümlerinin tüm gruplara göre anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü (p=0,01). Ayrıca %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubunda; %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi, %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi, nHA Sinterleme Öncesi ve nHA Sinterleme Sonrası gruplarına göre daha yüksek olduğu görüldü (p<0,05).

Yapay Tükürük grubu ölçümlerinin ise nHA Sinterleme Öncesi, nHA Sinterleme Sonrası, %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi, %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi gruplarına göre de yüksek olduğu görüldü (p=0,01).

Solüsyonların biyofilm oluşumunu engelleme kapasiteleri değerlendirildiğinde Klorheksidin grubunda diğer tüm gruplara göre düşük, Yapay Tükürük ve %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası ölçümlerinin diğer tüm gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü. %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası ve Yapay Tükürük grubunun ölçümlerinin ise farklılık göstermediği ifade edilebilir (p>0,05).



Şekil 4.11: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerlerinin grafiksel karşılaştırılması



Şekil 4.12: Solüsyonları biyofilm oluşumunu engellemesine ait optik dansite değerlerinin Box-Plot grafikleri

5. TARTIŞMA

Mine dokusunda gerçekleşen demineralisyon alanları ile karakterize olan erken çürük lezyonlarına BNL adı verilir (135). Mine demineralizasyonu normal koşullarda remineralizasyon prosedürü ile desteklenir; fakat bu döngü çeşitli sebeplerle sekteye uğradığında patolojik sonuçlar ortaya çıkar. Diş dokusu sağlam kaldığı sürece lezyonların durdurulması, hatta geri döndürülmesi mümkündür (25). Ortodontik tedavi sırasında ağız ekosistemine dahil olan pek çok aygıt, demineralizasyon/remineralizasyon sisteminde bozulmalara sebep olur. Ortodontik tedavi sırasında kullanılan sabit cihazlar asidürik bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırır ve *S. mutans* ve *Lactobasillus* düzeyinde önemli ölçüde artışa neden olur (136).

BNL'nin önlenmesi ve tedavi edilmesi adına pek çok terapötik ajan kullanılmaktadır. Rutin olarak en çok tercih edilen yöntem flor uygulamalarıdır. Yapılan çalışmalar, florür uygulamasının yapılmasına rağmen çocuklardaki diş çürüğü prevelansında artmanın devam ettiğini ve özellikle düşük sosyoekonomik yapıdan gelen hastalarda maksimum düzeyde uygulanan florun, çürük lezyonlarının engellemede yeterli olmadığını göstermiştir (137). Flor dozunun arttırılması, çocuklarda florozis ve her yaşta toksisite riskini doğurmaktadır. Bu nedenle BNL'nin önlenmesi ve tedavisi için flor konsantrasyonunu arttırmak uygun bir seçenek değildir. Başlangıç mine lezyonlarının remineralizasyonunu sağlamak için gerekli doz, çeşitli ürünlerde kullanılmasına izin verilen dozdan yüksektir (138). Toksik özelliklerinin yanında, remineralizasyon aşamasında maruz kalınan yüksek florür dozu, lezyon gövdesinden ziyade yüzey böylesinde remineralizasyona sebep olarak demineralize bölgenin homojen ve doygun bir şekilde iyileşmesine engel olur (139). Schmidlin ve ark. (140) BNL'de flor kullanımının mine dokusunda yalnızca 30 μm derinliğe etki ettiğini ve yüzey altı dokuların remineralizasyonunda yeterli olmadığını göstermişlerdir.

Mevcut materyallerin negatif özellikleri ve yetersizlikleri göz önünde bulundurulduğunda remineralizasyonu sağlamak adına biyolojik dokuları taklit edebilen biyomimetik materyallerin kullanımına yönelinmiştir. Biyomimetik materyaller doku rejenerasyonu sağlama yetenekleri sayesinde minede meydana gelen demineralizasyonu önleme ve tedavi etme adına umut vericidirler. Minenin yapısı, eşsiz fiziko-kimyasal özellikleriyle HA içeriğinden kaynaklanmaktadır. Bu özelikler mineyi sertlik, büyüklük ve fiziksel dayanıklılığa sahip bir biyomateryal haline getirir. Mine dokusunu oluşturan

HA yapısının bu özellikleri doku mühendisliğinin rejeneratif materyal çalışmaları için öncü olmuştur (141). HA, kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup insan dokularıyla son derece biyouyumlu olduğu tespit edilmiştir. Oral hijyen ürünlerinde kullanıldığında uygulanan dozlarda toksik değildir. Kemik iyileşmesini ve implantların doku ile uyumunun desteklenmesini sağlar (142).

Son zamanlarda doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda HA'nın yapısal, biyolojik ve mekanik özelliklerinin geliştirilmesi adına "bor katkılı HA" bileşiğinin araştırmasına odaklanılmıştır. Borun kemik mineralizasyonu ve büyümesini desteklediği; ayrıca beyin gelişimi, hormon metobalizması, inflamatuar yanıt gelişimi, kemik ve dişlerin büyümesi gibi süreçlerde rol oynadığı bildirilmiştir. Osteogenez ile ilgili araştırmalar, borun hormonlarla ilgili gen ekspresyonlarını ve hormonları etkileyerek osteoblastların mineralizasyon fonksiyonunda rol oynadıklarını göstermişlerdir (143). Uysal ve ark. (144) bor katkılı HA'nın biyomedikal özelliklerini inceledikleri literatür çalışmasında bor katkısının HA'nın apatit oluşturma yeteneğini geliştirdiğini, hücre proliferasyonunu ve osteojenik aktiviteyi arttırdığını belirtmişlerdir. Calis ve ark.'nın (145) kemik defektlerinin yeniden yapılandırılması üzerine yaptıkları in vivo çalışmada, ratlarda kemik defektleri oluşturulmuş ve onarım için çeşitli biyomimetik materyal iskeletleri uygulanmıştır. Deney sonucunda bor katkılı HA iskeletleri mineral yoğunluğu açısından diğer gruplara göre çok daha üstün sonuçlar vermiştir. Ayrıca yine bu grubun mineralize matris oluşturma konusunda en başarılı grup olduğu sonucuna varılmıştır. Bor katkılı HA'nın yalnızca mineralizasyon miktarına değil, aynı zamanda mineralizasyon yoğunluğuna da etki ettiğini göstermektedir. Pazarçeviren ve ark. (146) bor katkısının, HA/trikalsiyum fosfat yapısının mekanik ve kimyasal özelliklerini güçlendirdiğini tespit etmişlerdir. Bileşiğin, apatit birikimini tetikleme yeteneğinin bor katkısıyla birlikte önemli ölçüde iyileştiği ve hiçbir sitotoksiste göstermediği bildirilmiştir.

Bor katkılı HA bileşiklerinin, kemik üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda başarılı bulunması, ana inorganik bileşiği kemikte olduğu gibi HA olan diş minesi üzerinde de etkili olacağı düşünülmüştür. Bu tez çalışmasının amacı, ortodontik tedavi sırasında meydana gelen BNL'nin engellenmesi ve tedavi edilmesi adına nHA materyalinin etkinliğini araştırmak ve içerisine eklenen bor ile geliştirilmesini sağlamaktır. Bu doğrultuda, insan dokularıyla biyouyumlu, mine remineralizasyonu

sağlayabilen ve antimikrobiyal etkisiyle plak bakterilerini elimine edebilmesi beklenen bir biyomimetik ürün üretilmiş ve etkinliği test edilmiştir. Literatürde, bu materyallerin mine remineralizasyonu üzerindeki etkisi ilk defa denenmiş olup, daha önce yapılmış bir çalışma bulumamaktadır.

Mine yüzeyinde meydana gelen demineralizasyon/remineralizasyonun incelendiği çalışmalarda, seçilen yüzeylerin özellikleri sonuçları doğrudan etkilediği için oldukça önemlidir. İnsan dişi morfolojisine ve mineral yapısına yakınlığı nedeniyle en çok tercih edilen diş, sığır dişi olmasına rağmen bazı farklılıklar çalışmanın doğru sonuçlar vermesini etkileyebilir. Arends ve ark.'ı (147) sığır minesinin, insan minesine göre daha gözenekli bir yapıda olduğunu açıklamıştır. Featherstone ve ark.'ı (148) yine sığır minesindeki mineral çözülme hızının, insan dişi minesine göre daha hızlı olduğunu göstermiştir. Amaechi ve ark.'ının (149) sığır dişlerini ve insan dişlerini karşılaştırdığı çalışmada, sığır dişi minesinde erozyonun iki kat daha hızlı ilerlediği gözlemlenmiştir. Lippert ve ark. (150) mineral içeriği ve morfolojideki farklılıklar nedeniyle, in vitro koşullarda yapılan sığır ve insan dişlerine uygulanması gereken prosedürlerin birbirlerinden farklı olması gerektiğini açıklamışlardır. Çalışma, pH siklusu prosedürünün sığır minesine, insan minesine olduğundan daha hızlı etki ettiğini göstermiş ve araştırmacılar bunu mineral içeriğindeki farklılıklarla açıklamışlardır.

İnsan ve sığır dişi farklılıklarının yanında kullanılan dişin türü de önemlidir. Araştırmacılar, demineralizasyon/remineralizasyon çalışmaları için farklı diş tercihlerinde bulunmuşlardır. Sabit ortodontik tedavi, daimi dişlere uygulanabilmektedir. In vitro çalışmamızda hasar görmemiş ve yapısal bozukluğa, çatlağa ya da hipoplastik alana sahip olmayan çürüksüz dişlerin kullanılması planlanmıştır. Literatürde, Hanafy ve ark. (151); Manchery ve ark. (152); Thimmaiah ve ark. (153) remineralizasyon çalışmaları için premolar dişleri kullanmışlardır. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulup tez çalışmamız için 5 deney ve 2 kontrol (pozitif ve negatif) olmak üzere 7 grupta 14 tane olacak şekilde; çürüksüz, dolgusuz, BNL'siz, çatlağa, hipoplastik alana ve yapısal bozukluğa sahip olmayan, çekim sırasında hasar görmemiş 96 adet insan premolar diş kullanılmıştır.

Toplanan dişlerin, deney süresine kadar saklandığı solüsyonların içeriği yüzey özelliklerinin incelendiği in vitro çalışmaların doğru sonuçlar vermesi adına önemlidir. Çekilen dişlerde mikroorganizma üremesinin engellenmesi için distile su ve serum

fizyolojik içerisine çeşitli antimikrobiyal ajanlar eklenmektedir. Bu ürünler arasında formalin, kloramin T, etanol, glutaraldehit, timol gibi çeşitli kimyasallar sayılabilir (154). Aydın ve ark.'nın (155) çeşitli saklama kimyasallarının mine ve dentin mikrosertliği üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, 12 aylık saklama koşulları sonrasında timol solüsyonunun, diğer kimyasallara göre mikrosertlik üzerindeki etkisinin daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Tez çalışmamızda, toplanan dişler deney sırasına kadar %0,1 Timol içeren serum fizyolojik içerisinde bekletilmiş ve çekim sonrası 3 ay içerisinde kullanılmışlardır.

Günümüzde remineralizasyon/demineralizasyon prosedürlerinin in-vitro olarak değerlendirilmesi aşamasında pH döngüsü modelleri kullanılmaktadır. Bu modeller ilk olarak Ten Cate ve ark. (156) tarafından dişlerin düzenli aralıklarla remineralize ve demineralize edici solüsyonlara maruz bırakılması ile gerçekleştirilmiştir. In vitro pH döngüsü modelleri genellikle demineralizasyon ya da remineralizasyon modelleri olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Demineralizasyon modelleri için başlangıçta sağlam mine yüzeyleri kullanılır ve etken materyalin demineralizasyonu engelleme potansiyali değerlendirilir. Remineralizasyon modellerinde, önceden oluşturulmuş yapay çürük lezyonları üzerine etken materyalin remineralizasyona olan katkısı araştırılmaktadır (157). Esra Tunalı'nın (158) doktora tezinde bor katkılı nHAp'ın BNL üzerindeki etkileri remineralizasyon modeli uygulanarak test edilmiş olup istenen sonuca ulaşılamamış ve bunun üzerine tez çalışmamızda demineralizasyon modeli uygulanmasına karar verilmiştir.

En sık kullanılan pH döngüsü protokollerinden bir tanesi, Ten Cate (156) tarafından açıklanan, Featherstone ve ark. (159) tarafından modifiye edilen yöntemdir ve özellikle ortodontik tedavi sırasında braketler etrafında oluşan lezyonları taklit edebilme yeteneği dolayısıyla ilgi çekicidir (160). Aynı zamanda demineralizasyonun inhibisyonu ve remineralizasyonun desteklenmesini net bir şekilde ölçebilir. Bu yöntemde demineralizasyon ve remineralizasyonun dinamik döngüleri, diş örneklerinin asidik ve aşırı doymuş tampon çözeltilerine sırasıyla daldırılmasıyla taklit edilir. Etken materyal, bu iki ayrı çözeltinin değişim aşamalarında uygulanır ve ürünün demineralizasyonu engelleme başarısının değerlendirilmesini sağlar. Literatürdeki pH döngüsü protokolleri, dişlerin remineralizasyon ve demineralizasyon sıvılarına maruz kalma süreleri, deneyin

uygulandığı gün sayısı, bu sıvıların içeriği ve etken materyalin uygulanma sıklığı gibi parametreler değiştirilerek oluşturulmaktadır (157).

Ten Cate ve ark. (161) insan daimi dişleri üzerinde yaptıkları çalışmada 15 günlük pH döngüsü boyunca günde 6 saat demineralizasyon solüsyonuna, 17 saat remineralizasyon solüsyonuna maruziyet gerçekleştirmişlerdir. Nelson ve ark. (162) 10 günlük prosedürleri boyunca günde 6 saat demineralizasyon solüsyonuna, 17 saat remineralizasyon solüsyonuna maruziyet bıraktıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, 10 günlük uygulama süresince hafta sonları dişler remineralizasyon solüsyonunda bekletilmiştir. Itthagarun ve ark. (163) insan daimi dişlerini 2 günlük başlangıç demineralizasyonu ardından 10 gün boyunca pH döngüsüne sokmuştur ve etken materyali günde 3 kez olacak şekilde uygulamıştır. Casals ve ark. (164) başlangıç demineralizasyonu oluşturduktan sonra, 5 günlük pH döngüsü uygulamışlardır.

Yukarıda bahsedilen çalışmaların tümü florun remineralizasyon etkisinin tespit edilmesi amacıyla uygulanmıştır ve günümüzde diğer rejeneratif ajanların da pH döngüsü ile test edildiği araştırmalar bulunmaktadır. Oliveira ve ark. (165) 10 günlük pH döngüsü boyunca, insan molar dişlerini 6 saat demineralizasyon solüsyonunda, 18 saat remineralizasyon solüsyonunda tutarak CPP-ACP ve Sodyum Florür'ün (NaF) remineralizasyon etkilerini karşılaştırmışlardır. Gopalakrishnan ve ark. (166) 10 günlük pH döngüsü boyunca iki kere 3'er saatlik demineralizasyon periyodu uygulamışlar ve böylece materyalleri 3'er kere uygulayabilme şansı elde ederek, CPP-ACP'li ve floridli diş macunlarının etkisini araştırmışlardır. Serdar-Eymirli ve ark. (167) Er,Cr: YSGG lazer, florid ve CPP-ACP'ın antikariyojenik etkisini araştırırken 6 saatlik demineralizasyon ve 18 saatlik remineralizasyon periyodunu kullanmışlar ve döngüyü 5 gün boyunca devam ettirmişlerdir. Itthagarun ve ark. (168) % 10 HAp ve florid içeren diş macunlarının remineralizasyona etkisini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada pH döngüsünü çalkalayıcı kullanarak otonomize etmiştir. Bu sisteme göre, günde iki kez 3 saatlik demineralizasyon ve ardından 2 saatlik remineralizasyon prosedürü uygulanmıştır. Etkin materyaller birinci demineralizasyon aşamasından önce ve ikinci demineralizasyon aşamasından sonra olmak üzere 2 kere uygulanmıştır. Ardından numuneler gece boyu remineralizasyon solüsyonunda bekletilmişlerdir. Elmancy ve ark. (169) yine aynı pH döngü sistemini kullanarak, NovaMin ve nHAp içeren diş macunlarının etkilerini karşılaştırmıştır.

Literatür incelendiğinde, araştırmacıların demineralizasyon/remineralizasyon çalışmaları için farklı pH sikluslarından yararlandıkları görülmektedir. Tez çalışmamız için 6 saatlik demineralizasyon ve 17 saatlik remineralizasyon prosedürlerinin uygulandığı 10 günlük pH döngüsü kullanılması uygun bulunmuştur. Etken materyaller her seferinde taze olarak kullanılan solüsyonların değişim aşamalarında 2 dakika boyunca uygulanmıştır. Tez çalışmamızda, deneysel materyallerin önceden oluşturulmuş mine lezyonlarına remineralizasyon etkisi değil, sağlıklı minenin demineralizasyonunu engelleme kapasitesi araştırılmış olduğundan başlangıç lezyonların oluşturulmadığına dikkat edilmesi önemlidir.

Çalışmada kullanılacak pH döngüsünün seçiminin yanı sıra kullanılan remineralizasyon ve demineralizasyon solüsyonlarının içeriği de önemlidir; çünkü sonucu direkt olarak etkileyebilen bir faktördür. Tamponlu demineralizasyon/remineralizasyon solüsyonları ten Cate ve ark. (156) tarafından açıkladığı şekilde saf ve deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır. Demineralizasyon solüsyonu 2,2 mM kalsiyum klorür, 2,2 mM sodyum fosfat ve 0,05M asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'ı 1M potasyum hidroksit ile 4,4'e ayarlanmıştır. Remineralizasyon solüsyonu 1,5mM kalsiyum klorür, 0,9mM sodyum fosfat ve 0,15M potasyum klorür içermektedir ve pH 7'ye ayarlanmıştır.

Mine yüzeyinde meydana gelen demineralizasyon/remineralizasyonun kantitatif ve yansız bir şekilde değerlendirilebilmesi, doğru sonuçlar elde edebilmek adına oldukça önemlidir. Günümüzde çalışmalarda pek çok yöntem kullanılmaktadır ve bunların başında, mikrosertlik testleri, taramalı elektron mikroskobisi, enerji dağılım spektroskopisi ve komfokal lazer tarayıcı mikrokop gelmektedir.

Mine yüzeyindeki demineralizasyon, yüzeyin sertliğinde değişikliklere neden olur. Mikrosertlik testleri oldukça duyarlıdır ve çok kısa demineralizasyon süreçlerinde dahi meydana gelen değişiklikleri ortaya çıkarabilecek kapasiteye sahip oldukları için tercih edilmektedirler (66). Mine yüzeyindeki demineralizasyon/remineralizasyon etkisinin karşılaştırılması adına oldukça başarılıdırlar ve çalışmacılar tarafından sıklıkla tercih edilirler. Gümüştat ve ark. (170) NaF, NaF/SNF_2 kombinasyonlu, NovaMin ve nHAp içerikli diş macunlarının mine üzerindeki remineralizasyon etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada değerlendirme yöntemi olarak mikrosertlik ölçümü ve SEM görüntüleme yöntemini kullanmışlardır. Asadi ve ark. (171) pH döngüsüne soktukları

dişlerde nHA, sodyum florid ve biyoaktif camın dentin remineralizasyonu üzerindeki etkilerini mikrosertlik ölçümü yaparak değerlendirmişlerdir.

Literatür incelendiğinde, araştırmacıların mikrosertlik ölçümlerini SEM görüntüleme yöntemi ile desteklediği görülmektedir. SEM yüksek büyütme aralıkları altında, dişte herhangi bir tahribat oluşturmadan ve invaziv olmayan bir analiz sağlar. Ağız ortamındaki neredeyse her alanda kullanılabilecek olan bu yöntem, mine yüzeyinde meydana gelen en ufak değişiklikleri gösterebilme yeteneği sayesinde araştırmacılar için vazgeçilmez değerlendirme yöntemlerinden biri haline gelmiştir (71). Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak, tez çalışmamızın değerlendirilmesi için Vickers Mikrosertlik testi ve SEM görüntülemesi kullanılmıştır.

Tez çalışmamız, çeşitli biyomimetik materyallerin uygulandığı sağlıklı dişlerin pH döngüsü sırasında demineralizasyona olan direncinin araştırılmasını amaçlamaktadır. Bu doğrultuda, kullanılacak olan premolar dişlerin başlangıç mikrosertliklerinin değerlendirilmesi ile zarar görmüş olanların çalışmaya dahil edilmemesi doğru sonuçların elde edilmesi adına önemlidir. Lupi-Pegurier ve ark. (171) Bordeaux şarabının insan daimi premolar dişlerinin yüzey sertliğine etkisini araştırdıkları çalışmada, baz değeri elde etmek için 200 g kuvvet uygulamışlardır. 0, 10, 30, 90 ve 120 saniyelerde Vickers mikrosertlik değerlerini ölçmüşlerdir ve değerleri 322 ile 353 arasında açıklamışlardır. Çalışmamız için toplanan dişler, deney prosedürü öncesinde Vickers mikrosertlik cihazı test edilmiş olup, yüzey sertliği 322 ve 353 arasında olan dişler çalışmaya dahil edilmiştir.

Ağız mikrobiyatası dişler, dudaklar, yanak, diş eti dokuları, sert ve yumuşak damak gibi farklı yüzeylerden oluşmaktadır. Vücudun her yerinde olduğu gibi, ağız ortamında da yaşamını sürdüren konakçı mikrobiyal türler bulunmaktadır; fakat bu mikrobiyal türler ile konak arasında denge kurulmuştur. Herhangi bir nedenle, konakçı ve konak arasındaki denge bozulması durumunda hastalık ortaya çıkar. Dişlerin sürmesinin hemen ardından, çevresel faktörlerin de etkisiyle mikrobiyal flora ağız içi dokuların her bir noktasına yerleşir; fakat hormonlar, tükürük akışı değişkenlikleri, diyet, sigara kullanımı ve kötü ağız hijyeni gibi çeşitli sebeplerle konak ve konakçı arasındaki denge bozulabilir. Ortodontik tedavi, özellikle sabit cihazların kullanımı ile plak birikimine ve ağız hijyeninin sağlanmasında sektelere neden olur. Ağız mikrobiyatasının içeriğinde ve miktarındaki bu değişiklikler hastanın sağlığını etkileyebilecek sonuçlar doğurabilir (172). Innes ve ark. (173) ve Lucchese ve ark. (174) yaptıkları iki ayrı

çalışmada ortodontik cihazların oral mikrobiyata konsantrasyonunu orta dereceden yüksek dereceye kadar etkileyebildiğini ve dengenin bozulmasına neden olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar, ortodontik tedavi sırasında oral mikrobiyata içerisinde yer alan *S. mutans* ve Lactobacilli'nin sayısal varlığının, asit üretiminin ve dişe tutulum miktarının arttığını göstermişlerdir. Tüm bunlar, diş minesindeki demineralizasyon sürecini doğrudan etkliyen ve BNL'ye sebep olan faktörlerdir. Li ve ark. (175) boron nitrit ve gümüş nanopartikülleri ile güçlendirilmiş rezin materyallerin antimikrobiyal ve mekanik etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, deney ve kontrol gruplarının bakteriyel sayımlarını *S. mutans* kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Halawany ve ark. (176) Salvadora persica bitkisinin braketler üzerindeki bakteri biofilmine olan etkisini araştırdıkları çalışmada, yine *S. mutans* bakteri türünden yararlanmışlardır. Farkash ve ark. (177) yeşil çaydan elde edilen polifenollerin biyofilme olan etkisini incelediği çalışmada, *C. albicans* ve *S. mutans'*ın oluşturdukları biyofilmi kullanmışlardır. Chen ve ark. (178) iki farklı gargaranın MİK değerlerini ve antibiyofilm etkilerini araştırırken *S. mutans* bakterilerini kullanmışlardır. Araştırmacılar bu bakteriyi, mine demineralizasyonuna neden olan ana patojen olarak belirtmiş ve biyofilm oluşturma mekanizmasının açıklanmış olması nedeniyle in vitro koşullarda materyallerin etkinliklerinin değerlendirilmesinde başarılı olduğunu vurgulamışlardır. Literatür araştırması yapıldığında tez çalışmamızda biyomimetik materyallerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin incelenmesi için *S. mutans* bakteri türünün, KWIK-STIKTM, 0266P, ATCC* 25175TM suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Üretilmiş olan biyomimetik materyallerin MİK'lerinin incelenmesi adına, Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2012) yönelgesi takip edilmiştir (179). Bu aşamada daha doğru ve anlaşılır sonuçlar elde edebilmek adına rezasurin boyasından yararlanılmıştır. Rezasurin özellikle çeşitli sitotoksisite analizlerinde hücre büyümesinin indirgenmesinde kullanılan bir oksidasyon-redüksiyon katalizörü olarak kullanılmaktadır. Canlı hücrelerde oksidoredüktazlar tarafından yeniden oluşturulmak üzere indirgendiğinde pembe hale gelen mavi bir boyadır (180). Sarker ve ark. (181) MİK çalışmalarında rezasurin katalizörünün etkinliğini farklı bakteriler üzerinden denemişlerdir. Rezasurin'in MİK belirme sırasında karşılaşılan seyreltme hatalarını düzelttiğini ve sonuçların farklı bakteri suşları için test materyali olarak kullanılabileceğini açıklamışlardır. Tez çalışmamızda kullandığımız solüsyonların MİK

hesaplama aşamasında kullandığımız rezasurin boyasının hazırlanması Sarker ve ark.'nın (181) çalışmasında belirttiği talimatlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

Deney gruplarının premolar braketleri üzerindeki biyofilm oluşumunu engelleme kapasiteleri, materyallerin biyofilm oluşumu sırasında 24 saat boyunca uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Braket üzerinde biyofilmin oluşturulması Li ve ark.'nın (182) çalışmasında belirtilen talimatlar takip edilmiştir. Chen ve ark. (178) bu yöntemle braketler üzerinde oluşmuş bakteri biyofilmini optik okuyucu ile değerlendirebilmek adına Tetrazolyum Klorür (XTT) boyasını kullanmışlardır. XTT metobolik aktivite varlığında renk değiştirerek biyofilmin kendisine zarar vermeden incelenmesini sağlar ve hücre canlılığı hakkında bilgi verir.

Biyofilm miktarını göstermek adına başka analiz yöntemleri de bulunur. KV, biyofilmi göstermek için en sık kullanılan boyalardan bir tanesidir. KV, negatif yüklü yüzey moleküllerinin ve polisakkaritlerin hücre dışı matrisini boyayan temel bir protein boyasıdır. Canlı hücreler, ölü hücreler ve hücre dışı matriks bu boya ile boyanabildiği için biyofilm miktarını ölçmekte avantajlı olmasının yanı sıra fonksiyonel olarak dezavantajlı olduğu gösterilmiştir (183). Xu ve ark. (184) KV ve XTT'nin *Staphylacoccus aureus* biyofilmini tespit etme üzerindekini yeteneğini karşılaştırmıştır ve bu iki yöntem arasında belirgin bir farklılık bulunmadığını açıklamışlardır. Grossman ve ark. (185) *Staphylococcus aureus* biofilm formasyonunu KV kullanarak tespit etmişler ve bu analiz yönteminin bakteri biyofilmini göstermekte başarılı olduğunu vurgulamışlardır. Farkash ve ark. (177) yeşil çaydan elde edilen polifenollerin biyofilme olan etkisini incelediği çalışmada *Candida albicans* ve *S. mutans* içerikli biyofilmi tespit edebilmek adına KV boyası kullanmışlardır. KV'nin literatürde sıklıkla kullanılıyor olması, kolay erişilebilmesi, fiyatının uygunluğu ve XTT boyası ile benzer sonuçlar verdiğinin gösterilmesi dolayısıyla braketler üzerindeki biyofilm miktarının incelenmesi için çalışmamızda bu boyama yöntemi kullanılmıştır.

Tez çalışmamızın biyomimetik materyallerin minenin demineralizasyonunu önleme kapasitesini araştırma aşamasında, Vickers mikrosertlik bulguları gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunduğunu göstermiştir. Yüzey sertliği bakımından en iyi grup %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası (Grup 4) olarak bulunmuştur. Sonrasında sıralama yüksekten düşüğe doğru nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), %4 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5), GC Tooth

Mousse (Grup 6), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2), Yapay Tükürük (Grup 7) şeklindedir. Tüm grupların yüzey sertliği değerleri, negatif kontrol grubu olan Grup 7'ye göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Yüzey sertliği değerleri incelendiğinde tüm deney gruplarının pozitif kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiş ve Grup 4'ün istatistiksel olarak anlamlı derecede çok daha başarılı olduğu görülmüştür. Bu, tüm deney gruplarımızın minenin demineralizasyonunu engelleme kapasitesinin GC Tooth Mousse'a göre daha iyi sonuçlar verdiğini gösterirken, %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası grubunun GC Tooth Mousse'a göre istatistiksel olarak anlamlı olarak çok daha iyi olduğunu kanıtlamıştır.

Carvalho ve ark.'nın (186) nHA, CPP-ACP ve florid cilaları karşılaştırdıkları çalışmada, 7 günlük pH döngüsü kullanılmış ve yüzey sertliği Knoop mikrosertlik test cihazı ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar floridli cila ve nHA uygulamasının BNL üzerinde etkili olduğunu, CPP-ACP grubunun BNL gelişmesinde önleyici bir etken olarak işlev görmediğini göstermektedir. Vyavhare ve ark. (187) nHA, CPP-ACP ve NaF'ın mine yüzeyi üzerindeki etkilerini 3, 6, 9 ve 12 günlük pH döngüleri boyunca Vickers mikrosertlik test cihazı ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda nHA ve NaF'nin pH döngü sisteminin test edilen her zamanında remineralizasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir. Öte yandan CPP-ACP'nin anlamlı bir sonuç vermediği tespit edilmiştir ve bu durum CPP-ACP'ın lezyon yüzeyindeki apatit kristallerine bağlanarak iyonların daha derine inmesini sağlayan etki mekanizması ile açıklanmıştır. Sharma ve ark. (188) nHA (Remin Pro) ve CPP-ACP (GC Tooth Mousse) içerikli diş macunlarını karşılaştırırken, dişleri 2 gün boyunca demineralize ettikten sonra pH döngüsüne tabi tutmuşlar ve 15 ile 30. günlerde yüzey sertliği ile mineral içeriğini ölçmüşlerdir. Çalışma sonucunda, her iki ajanın da mine remineralizasyonunda başarılı olduğunu, istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da nHA içerikli macunun, CPP-ACP içerikli macuna göre minenin mikrosertliğini daha fazla desteklediğini göstermişlerdir. Yine bu çalışmaya göre, minenin kalsiyum ve fosfor içeriği değerlendirildiğinde, nHA kullanılan örnekler CPP-ACP kullanılanlara kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir. Literatür incelendiğinde, nHA ve CPP-ACP'nin karşılaştırıldığı çalışmalarda araştırmacılar CPP-ACP'nin minenin demineralizasyonunu önleme ve remineralizasyonunu destekleme konusunda yetersiz olduğunu bildirmişlerdir.

Tez çalışmamız diğer çalışmalardan farklı olarak, nHAp'nin moleküler yapısındaki değişikliklerin de karşılaştırılmasını içermektedir. nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2) ve CPP-ACP (Grup 6) gruplarının yüzey sertlikleri negatif kontrol grubu olan Yapay Tükürük (Grup 7) grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Bu deney grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmese de en yüksek yüzey sertliği nHAP Sinterleme Öncesi (Grup 1) olarak bulunmuştur.

Sentetik olarak nHAp üretilmesi sırasında kullanılan metotlar partiküllerin faz saflığı, kristallik, yoğunluk, boyut ve morfoloji gibi özelliklerini etkilemektedir. Kuru, yaş ve yüksek sıcaklık ana başlıkları altında sınıflandırılan üretim tekniklerinin her biri farklı boyut ve morfolojilerle sonuçlanır. HAp'deki bu farklılıklar, biyoaktiviteyi, mekanik ve biyolojik özellikleri etkiler (189). Cox ve ark. (190) partikül özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin, HA'e farklı biyomedikal alanlarda kullanım özelliği kazandırılması bakımından önemli olduğunu vurgulamışlardır. Özellikle remineralizasyon hedefiyle kullanılan partiküllerin saf HAp içeriğinde olması hedeflenmektedir. Öte yandan üretim aşamasında kullanılan yöntemleride trikalsiyum fosfat (TCP) gibi istenmeyen yan ürünlerin ortaya çıkması mümkündür (191). HAp, vücut içerisinde çözünmeden kalabilmesine rağmen, trikalsiyum fosfatın kararlı yapısını sürdüremeyip bozunduğu gösterilmiştir (192). Çalışmamızda kullanılan HA tozlarının üretimi için istenmeyen yan ürünlerin çıkmaması ve HA dışında yalnızca su oluşması nedeniyle "yaş kimyasal" tekniği içerisindeki "asit baz" yöntemi kullanılmıştır (191).

Mineralize dokuya daha iyi adapte olabilen, saf HAp üretimi için 1000, 1200 °C gibi yüksek ısıların, uzun süreler boyunca uygulanması işlemine "sinterleme" adı verilmektedir. HAp sinterleme işlemi öncesinde, daha küçük boyuttadır ve bu boyutlar daha iyi tutulum sağlayarak biyouyumluluk açısından avantaj sağlayan geniş yüzey alanları oluştururlar. Bu özellikler HAp yapısının mineralize dokulara daha kolay tutunmasına yardımcı olurken materyalin kolay bozunmasına neden olur. Yine küçük partiküller, aralarındaki boşlukların daha geniş olması sayesinde düşük yoğunluk sağlarlar. Öte yandan, sinterleme öncesi HAp gevşek yapıları nedeniyle düşük mekanik dirence sahiptirler ve stabil değildirler. Sinterleme sonrası, HAp birleşerek daha büyük yapılar oluşturur ve düşen yüzey alanı nedeniyle tutunma kapasiteleri ve biyoaktiviteleri azalır. Büyük yapıdaki partiküller daha iyi kristalizasyon sağlayarak HAp daha stabil ve

daha az bozunur olmasını sağlar. Bu durum, sinterlenmiş HAp biyoaktivitelerinin azalmasına rağmen uzun süre aktif kalmasını destekleyerek uzun süreli mineralizasyon desteği için etkili olmasını sağlayabilir (193,194).

Tez çalışmamızda saf nHAp sentezlemesi sırasında uygulanan sinterleme işleminin diş minesininin demineralizasyonunu engelleme üzerine etkisi değerlendirilmiş ve sinterleme işlemi uygulanan nHA grubunun (2. Grup), sinterleme öncesi gruba göre daha etkisiz olduğu görülmüştür. nHAp'e sinterleme işleminin uygulanmasının, diş minesinin demineralizasyonu önleyici etkisi üzerinde yapılan değerlendirmelerde dikkat çekici sonuçlar elde edilmiştir. Sinterleme işlemi, nHAp'nin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişikliklere yol açarak, demineralizasyon üzerindeki etkilerinde düşüşe neden olmuştur. Sinterleme sonrasında gözlenen değişikliklerden bir tanesi partikül boyutlarında gözlenen büyüme ve buna bağlı olarak yüzey alanının azalmasıdır. Yüzey alanının küçülmesi, partiküllerin diş minesine yapışmasında azalmaya yol açmış ve HA'nın mine yüzeyine tutunma kapasitesinde düşüşe sebep olmuştur. Buna göre, sinterleme işlemi öncesinde daha küçük boyutta ve geniş yüzey alanına sahip partiküller diş minesine daha fazla tutunabilirken, sinterleme sonrası oluşan daha büyük partiküller HA'in tutulum yeteneğinde azalmaya neden olmuşlardır. Biyoaktivitedeki azalmanın, 10 günlük pH döngüsü sırasında sinterlenmiş nHAp'nin diş minesinde yeteri kadar korunamaması ile sonuçlanmış olduğu düşünülmektedir. Sinterleme öncesi nHA grubunun geniş yüzey alanı sayesinde mine yüzeyine daha iyi yapışarak ve az bozularak mine yüzeyinin mikrosertliğini daha fazla muhafaza ettiği görülmüştür. Özetle, Sinterleme işlemi, nHA'nın fiziksel stabilitesini arttırarak partiküler olarak daha dayanıklı bir yapı oluşturmasına rağmen, biyoaktiflik, partikül boyuları ve yüzey alanı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, sinterleme öncesi partiküllerin diş minesini koruma üzerine daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, sinterleme işleminin nHAp'nin yapısında meydana getirdiği yapısal değişikliklerin, mine demineralizasyonu üzerindeki etkilerini gözler önüne sermekte ve BNL oluşumunun engellenmesi için hangi moleküler yapıdaki nHAp'nin kullanılması gerektiğine yönelik önemli veriler sağlamaktadır.

Bor katkısının gruplar üzerindeki etkileri incelendiğinde, nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), %4 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına

rağmen, bor katkısı oranı arttıkça yüzey sertliğinde düşüş gözlenmektedir. %2 Bor Sinterleme Sonrası nHA (Grup 4) grubunun ise mine demineralizasyonunu engelleme konusunda hem Grup 2 hem de Grup 3'e göre anlamlı derecede başarılı olduğu dikkat çekmektedir.

Bor katkılı HA sentezlenmesi sırasında ticari olarak temin edilen H_3BO_3 (%99,5; Merck, Germany) tozları kullanılmıştır ve "katı-hal" yöntemi ile üretim gerçekleştirilmiştir. Albayrak ve ark. (133) bor katkısının molekül morfolojisinde bir farklılık yaratmadığını, katkısız örneklerle karşılaştırıldıklarında boyutlarının aynı olduğunu ve sentezlenen tüm tozların herhangi bir ara faz olmaksızın HA olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Öte yandan bor katkısı yapılan HA'nın sinterlenmesi, partiküllerde birtakım değişikliklere neden olmaktadır. Albayrak ve ark. (132) başka bir çalışmada bor katkılı HA molekül yapısını sinterleme öncesi ve sonrası incelemişlerdir. Sonuçlara göre, borun sinterleme öncesi gruplarda HA yapısına katılmadığı ve H_3BO_3 yapısını koruduğu bildirilmiştir. Sinterleme sonrası gruplar incelendiğinde ise, HA moleküllerinin yapısında BO_2^- ve BO_3^{-3} yapılarının oluştuğu tespit edilmiştir ve sinterleme sonucunda borun tepkimeye girerek HA yapısına dahil olduğu açıklanmıştır. Barhein ve ark. (195) yüksek ısıda, katı hal yöntemi ile üretilen bor katkılı HA'nın, saf HA'a göre daha hızlı bozulduğunu; ancak apatit oluşturma yeteneğinin daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Sinterleme öncesi HA gruplarına H_3BO_3 eklenmesinin yüzey sertliği sonuçlarında düşüşe yol açması, borun HA'nın moleküler yapısına katılmamış olmasından kaynaklanabilir. H_3BO_3 ve HA arasında, sinterleme öncesi kimyasal bir bağlantının gerçekleşmemesi, amorf bir yapıya neden olmasına ve partiküllerin homojen bir şekilde dağılım göstermemesine neden olmuş olabilir. Bu durum, bor katkısının minenin demineralizasyonunu önleme etkisini sınırlayarak istenilen mekanik etkilerin oluşumunu azaltmıştır. Özellikle artan bor konsantrasyonlarında, partiküller arası etkileşimsizliğin daha belirgin hale gelmesi ve içerik dağılımındaki düzensizliklerin artması ile yüzey sertliği değerlerinde düşüş meydana gelmiştir. Yüzey sertliği değerlerindeki bu düşüş, H_3BO_3'ün HA yapısına dahil olmaması nedeniyle oluşmaktadır. Bu entegrasyon eksikliği, sinterleme süreci öncesinde HA partiküllerinin mine yüzeyi ile uyumunu azaltarak biyomimetik materyalin etkisini sınırlandırmaktadır. Sinterleme sonrası %2 bor katkılı HA grubu (4. Grup) tüm gruplara göre daha etkili bulunmuştur ve sinterleme

sonrasında H_3BO_3'ün, HA'nın molekül yapısına katılarak BO_2^- ve BO_3^{-3} iyonları oluşturmasının, mine üzerinde apatit oluşturma yeteneğini güçlendirdiği düşünülmektedir. Bor katkısının sinterleme sonrası molekül yapısına dahil olması, yüzey sertliğinde olumlu bir etki yaratmakta ve materyalin homojen bir yapı oluşturmasını sağlamaktadır.

Demineralizasyon sürecinin mine yüzeylerinin mikro yapısında meydana getirdiği değişim SEM görüntülemesi altında incelendiğinde, mine prizmalarının baş bölgelerinden itibaren çözünmeye başladığı, mine prizmalarını çevreleyen mine kılıfı ve interprizmatik bölgenin prizmanın kendisine göre daha az etkilendiği görülmektedir. Kısmen demineralize edilmiş minenin interprizmatik bölgelerinde HA kristal yapılarının hala izlenebiliyor olması, bu bölgelerin mine primalarının kendisine göre çok daha dayanıklı bir yapı sergilediğini göstermektedir (196). Li ve ark. (197) yaptıkları çalışmada 20 nm'lik HA partiküllerinin ve nano boyuttaki ACP'lerin mine demineralizasyonuna olan etkisini SEM ile incelemiş ve sonucunda HA parçacıklarının mine prizmaları ve interprizmatik alan yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturarak demineralizasyonu geciktirdiğini açıklamışlardır. Sharma ve ark. (188) nHA ve CPP-ACP'nin BNL'ler üzerindeki etkilerini karşılaştırdıkları çalışmayı SEM görüntüleri ile desteklemiş ve nHA'nın CPP-ACP'ye göre daha mineralize bir yüzey oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Biyomimetik materyallerin antimikrobiyel ve antibiyofilm aktivitelerinin test edilmesi aşamasında, MİK değerlerinin hesaplanması için her bir solüsyon 7,5g tozun 250ml distile suya eklenmesi ile oluşturulmuştur. Buna göre, gruplarının MİK değerleri mg/ml olarak hesaplanmıştır. Sinterleme Öncesi %4 Bor nHA grubunun MİK değeri 15mg/ml, Sinterleme Öncesi %2 Bor nHA ve Sinterleme Sonrası %2 bor nHA grubunun değeri 30mg/ml olarak tespit edilmiştir. Sinterleme Öncesi nHA ve Sinterleme Sonrası nHA gruplarının MİK değerleri tespit edilememiştir.

HA'nın etki mekanizmasının hala kesin olarak aydınlatılmamış olmasıyla birlikte, antimikrobiyel özelliklerinin bakterileri öldürmekten ziyade, adezyonu engellemek üzerine olduğunu açıklanmıştır. HA'nın antibakteriyel özelliklerine dair iki mekanizma öne sürülmüştür. Bunlarda bir tanesi HAp'nin reseptörleri bloke ederek bakterinin bağlanmasını engellediği, diğeri bakteri adezinleri ile etkileşime girerek bağlanmayı engellediği yönündedir. Öte yandan araştırmacılar, HAp'nin *S. mutans*'ın canlılığı üzerinde fark edilebilir bir etkisinin olmadığını açıklamışlardır. Bu da HA'nın etki

mekanizmasının adezyonu engelleme üzerinden gerçekleşmesini doğrular niteliktedir (198). Ciobanu ve ark. (199) gümüş partikülleri ile kombine edilmiş nHA'nın yüksek konsantrasyonlarda dahil (200 mg/ml) MİK değerlerinin tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda bor katkısız nHA solüsyonlarının MİK değerlerinin tespit edilememesi önceki çalışmaları destekler niteliktedir. Rezasurin metabolitler ile etkileşime girerek renk değiştiren bir indikatör olduğundan, inhibe olsa dahi hala canlı olan bakterilerler MİK değerinin tespit edilememesine neden olmuştur.

Bor katkısı yapılan HA solüsyonlarının MİK değerlerine olan etkisi, borun HA'nın antimikrobiyel etkilerini desteklediğini kanıtlamaktadır. Sinterleme öncesi %4 Bor nHA grubunda değerin, %2 Bor nHA gruplarına göre daha düşük gözlenmiş olmasıyla bor oranının arttırılmasının antimikrobiyel etkinlik üzerinde doğrudan bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Sinterleme öncesi %2 Bor katkılı nHA ve sinterleme sonrası %2 Bor katkılı nHA gruplarının MİK değerleri arasında fark gözlenmemesi sinterleme işleminin bor katkılı nHA'nın antimikrobiyal etkinliği üzerinde belirgin bir etki göstermediğini işaret etmektedir.

Tez çalışmamızın biyomimetik materyallerin antibiyofilm etkilerinin test edildiği aşamasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Buna göre pozitif kontrol grubu olan klorheksidin (Grup 6) grubunun tüm gruplara göre daha az biyofilm oluşumuna neden olduğu sonucuna varılmıştır. Sonrasında sıralama düşükten yükseğe doğru %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5), %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası (Grup 4) ve Yapay Tükürük (Grup 7) şeklindedir. Negatif kontrol grubu olan Grup 7 ile Grup 4 arasında anlamlı bir fark bulunmamış olup, Grup 5, Grup 3, Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı derecede fazla biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Sonuç olarak, sinterleme sonrası %2 bor nHA grubu dışındaki tüm grupların biyofilm oluşumunu engelleme üzerine etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Kensche ve ark. (198) HA, klorheksidin ve distile su gruplarının antibiyofilm etkilerini inceledikleri in situ çalışmada, HA içerikli diş macunlarının günlük kullanımı ile bakteriyel biyofilm oluşumunun kontrol edilebilineceğini belirtmişlerdir. Ağız ortamında oluşmuş 8 saatlik biyofilme uygulanan HA içerikli macunun, %0,2 klorheksidin kadar etkili olduğunu açıklamışlardır. Nobre ve ark.'nın (200) in situ

çalışmasında özel olarak hazırlanan titanyum plaklar katılımcıların ağızlarına takabilecekleri bir splint içerisine yerleştirilmiş ve 48 saat boyunca kullanılması istenmiştir. Bu süre boyunca ilgili gruplara 4 kere olmak üzere HA solüsyonu, klorheksidin ve distile su ile gargara yapmaları istenmiştir. Çalışma sonucunda, HA solüsyonunun bakteriyel biyofilm üzerine etkili olduğu bildirilmiştir. In situ olarak yapılan bir başka çalışmada nHA içeren gargaralar klorheksidin ile karşılaştırılmıştır. nHA'nın biyofilm oluşumunu engelleme üzerinde başarılı olduğu tespit edilmiş ve partiküllerin bakterileri öldürmeden bakteriyel yapışmayı engellediği açıklanmıştır. Bu etkinin oral mikrobiyatanın ekolojisinin bozulmadan antibiyofilm etkinliğini sağlama konusunda avantaj sağlayacağı belirtilmiştir (201). Tez çalışmamızda nHA içeren solüsyonların ve yapılan bor katkısının in vitro olarak braketler üzerindeki bakteri biyofilminin oluşumunu engelleme kapasiteleri değerlendirilmiş ve önceki çalışmayla uyumlu olarak nHA'nın antibiyofilm üzerindeki etkisi kanıtlanmıştır. Öte yandan bahsedilen çalışmalarda nHA içeren deney gruplarının klorheksidin kadar başarılı bulunduğu gösterilirken, bizim çalışmamızda kloreksidin grubunun diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkili bulunması çalışmamızın in vitro koşullarda yapılmış olması ile ilgili olabilir (198,200,201). In vivo koşullarda ağız içerisindeki protein ve yüzey arası etkileşimler, nHA-bakteri arasındaki dinamikleri etkileyebilmektedir. Bu da in vivo koşullardaki biyofilm ve yüzey etkileşiminin in vitro ortamdan farklı olmasına neden olabilir (202).

El-Gar ve ark. (203) farklı partikül büyüklüklerine sahip nHA gruplarının *S. mutans'ın* üzerindeki bakteriyel adezyonu önleme ve antibiyofilm etkinliğini incelemişlerdir. Kontrol grubunun NaF olarak belirlendiği çalışmada bakteriyel adezyon CFU/ml cinsinden hesaplanmış ve küçük partiküller uygulanan grupta, büyük partikül uygulanan gruba göre daha fazla bakteri yükü tespit edilmiştir. Benzer şekilde büyük partiküllü nHA uygulanan grupta en yüksek ölü bakteri miktarı ölçülmüştür. Araştırmacılar büyük partiküllü nHA'nın hem güçlü antibakteriyel hem de biyofilm oluşumunu engelleyici etkiye sahip olduğunu açıklamışlardır.

Tez çalışmamızda, bor katkısı olmayan nHA gruplarında sinterlemenin biyofilm oluşumunu engelleme üzerine etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup, değerler birbirlerine oldukça yakın tespit edilmiştir. Sinterleme sonrası birleşerek daha büyük boyutlara ulaşan nHA partiküllerinin El Gar ve ark.'nın (203) çalışmasının aksine

biyofilm oluşumunu engelleme üzerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Araştırmacıların biyofilm oluşumunu mine blokları üzerinde test etmiş olması bu sonuçların elde edilmesine yol açmış olabilir. Öte yandan %2 Bor katkısı yapılmış gruplarda (Grup 3 ve Grup 4) sinterleme sonrası en fazla biyofilm miktarınının tespit edilmesi, borun sinterleme sonrası nHA partiküllerinin moleküler yapısına katılmış olması ile ilgili olabilir. Daha önce bahsedilmiş olduğu gibi, sinterleme öncesi serbest olan H_3BO_3'ün, sinterleme sonrası nHA moleküllerinin yapısında BO_2^- ve BO_3^{-3} iyonları oluşturmaktadır (132). Grup 3 ve Grup 4 kendi aralarında değerlendirildiklerinde, bor katkısı yapılmış gruplarda sinterleme sonrası biyofilm oluşumunun arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, biyofilm oluşturulması sırasında besiyeri olarak %1 sükroz katkılı BHI kullanılmıştır. Park ve ark. (204) %5 nHA, %1 sükroz katkılı BHI besi yeri ve her ikisini de içeren 3 grubun biyofilm oluşturma potansiyellerini karşılaştırmışlar ve %1 sükroz ve nHA içeren grubun diğer iki gruba göre daha fazla biyofilm oluşumu gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun, HA'ın bakterinin polisakkarit sentezinde görev alan enzimlerin üretiminin artmasına neden olan gen aktivasyonundan kaynaklanabileceğini açıklamışlardır. Zhang ve ark. (205) dental biyofilmin demineralizasyon oluşumunu önleyici bir rezervuar ve difüzyon bariyeri olarak yaptığı işlevin araştırılması adına biyofilm modeli oluşturarak nHA'nın ve NaF'nin etkilerini incelemişlerdir. Deney sonunda, biyofilmlerin metabolik olarak aktif olmasına ve asit üretimi gerçekleştirmesine rağmen, nHA salımı gerçekleştiren bir tampon sistemi haline geldiğini göstermişlerdir. nHA'nın biyofilm varlığında, etkinliğinin arttığı ve yüksek kalsiyum içeriği sayesinde demineralizasyonun inhibisyonun sağlandığı bildirilmiştir. Biyofilm varlığı nHA'nın etkinliğini arttırırken, NaF'nin etkisini açıkça engellemiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalar biyofilm oluşumunun biyomimetik materyaller varlığında demineralizasyonun önlenmesi adına etkili olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda biyofilm oluşumunu engelleme yetisi en düşük olan %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası grubu, yüzey sertliği bakımından en iyi sonuçları vermiştir. Bu, biyofilm ve biyofilmin tampon sistemi olarak işlevinin araştırılacağı gelecek çalışmalarda, sinterleme sonrası %2 bor katkılı nHA'nın demineralizasyonu engelleme etkisinin artacağı ihtimalini düşündürmektedir. Biyofilmin %2 bor katkılı nHA için rezervuar görevi görmesi durumunda, sinterleme sonrası HA'nın molekül yapısına katılan

BO_2^- ve BO_3^{-3} iyonlarının apatit oluşturma yeteneği desteklenmiş olacaktır. Tez çalışmamız sırasında üretilmiş ve test edilmiş yeni biyomimetik materyallerin biyofilm içerisindeki davranış modülü gelecek çalışmalarda araştırılmalıdır.

Literatürde nHA'nın sinterleme öncesi ve sonrası mine yüzeyinin demineralizasyonuna olan etkisi ve *S. mutans* üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması ilk defa tarafımızdan gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, ilk defa nHA solüsyonlarına tarafımızca eklenmiş olan çeşitli yüzdelikteki bor katkısının mine demineralizasyonunu engelleme etkisi ve *S. mutans* üzerine etkinliği test edilmiştir. %2 Bor katkılı nHA grubunun sinterleme öncesi ve sonrası etkinlikleri değerlendirilerek, partiküler boyutta meydana gelen değişikliklerin etkileri karşılaştırılmıştır. Bu materyallerin tarafımızca üretilmiş ve diş hekimliği alanında ilk defa incelenmiş olması nedeniyle elde edilen sonuçların, literatür ile karşılaştırılması kısıtlı olarak yapılabilmiştir. Gelecek çalışmalarda, %4 Bor katkılı nHA grubunun sinterleme sonrası etkilerinin test edilmesi daha etkili bir materyal elde edilmesini sağlayabilir. İlk defa üretilmiş ve çalışmamızda denenmiş olan biyomimetik materyallerin, ileri araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Tez çalışmamızda laboratuvar ortamında üretilen biyomimetik materyallerin, 10 günlük pH döngüsü sürecine maruz bırakılan dişlerde, mine yüzey sertliğini koruma kapasiteleri Vickers mikrosertlik cihazı ile ölçülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Yüzey sertliği bakımından en iyi grup %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası (Grup 4) olarak bulunmuştur. Sonrasında sıralama yüksekten düşüğe doğru nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), %4 Bor Katkılı nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5), GC Tooth Mousse (Grup 6), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2), Yapay Tükürük (Grup 7) şeklindedir.

2. Tez çalışmamızda saf nHAp sentezlemesi sırasında uygulanan sinterleme işleminin mine yüzey sertliğinde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun partiküler düzeyde meydana gelen değişiklikler nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

3. Sinterleme öncesi gruplarda bor oranı arttıkça yüzey sertlik değerlerinde düşüş gözlenmiştir. HA partiküllerine eklenen H_3BO_3'ün yüzey sertliği sonuçlarında düşüşe yol açmasının, borun sinterleme öncesi HA'nın moleküler yapısına katılmamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4. %2 Bor Sinterleme Sonrası nHA (4. Grup) grubunun ise mine yüzey sertliği değerleri tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Sinterleme işlemi sonrası H_3BO_3'ün, HA'nın molekül yapısına katılarak BO_2^- ve BO_3^{-3} iyonları oluşturmasının, mine üzerinde apatit oluşturma yeteneğini güçlendirdiği düşünülmektedir.

5. SEM görüntüleri incelendiğinde, tüm deney gruplarının Yapay Tükürük (7. Grup) grubuna göre demineralizasyonu daha fazla engellendiği görülmüş ve mine yüzeylerinin daha homojen olduğu tespit edilmiştir. %2 Bor Sinterleme Sonrası nHA (4. Grup) grubunun üstün başarısı SEM görüntüleriyle desteklenmiştir.

6. %4 Bor Sinterleme Öncesi nHA grubunun (5. Grup) MİK değeri 15mg/ml, %2 Bor Sinterleme Öncesi nHA (3. Grup) ve %2 Bor Sinterleme Sonrası nHA grubunun (4. Grup) değeri 30mg/ml olarak tespit edilmiştir. Sinterleme Öncesi nHA ve Sinterleme Sonrası nHA gruplarının MİK değerleri tespit edilememiştir.

7. Biyomimetik materyallerin antibiyofilm etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol grubu olan klorheksidin (Grup 6) grubunun tüm gruplara göre daha az biyofilm oluşumuna neden olduğu sonucuna varılmıştır. Sonrasında sıralama düşükten yükseğe doğru %4 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 5), %2 Bor nHA Sinterleme Öncesi (Grup 3), nHA Sinterleme Öncesi (Grup 1), nHA Sinterleme Sonrası (Grup 2), %2 Bor Katkılı nHA Sinterleme Sonrası (Grup 4) ve Yapay Tükürük (Grup 7) şeklindedir.

8. Tez çalışmamızda saf nHAp sentezlemesi sırasında uygulanan sinterleme işleminin plak oluşumunu engelleme üzerine etkisi bulunmamıştır.

9. Sinterleme öncesi gruplarda bor oranı ile antibiyofilm özelliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

10. %2 Bor nHA Sinterleme Sonrası (4. Grup) dışında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az biyofilm tespit edilmiştir.

Tüm bulgular göz önünde bulundurulduğunda; nHA'ya eklenen %2 bor katkısının, sinterleme sonrasında mine yüzeyinde meydana gelen demineralizasyonu önleyerek ortodontik tedavi sırasında oluşan BNL'lerin engellenmesini için umut vadeden bir biyomimetik materyal olduğu gösterilmiştir. In vitro koşullarda gerçekleştirilmiş antibiyofilm etkinliği deneyinin, ağız ortamındaki biyofilm oluşumu mekanizmasının çoklu etkenleri göz önünde bulundurulduğunda, in vivo olarak test edilmesiyle daha etkili sonuçların elde edileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan biyomimetik materyaller literatürde ilk defa üretilmiş ve test edilmiş olduğundan, gelecek çalışmalarla desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Bishara, S.E., Ostby, A.W. (2008). White spot lesions: formation, prevention, and treatment. *Seminars in Orthodontics*, 14(3), 174–82.
2. Featherstone, J.D.B. (2000). The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–99.
3. Tanner, A.C.R., Sonis, A.L., Holgerson, P.L., Starr, J.R., Nunez, Y., Kressirer, C.A. (2012). White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *Journal of Dental Research*, 91(9), 853–8.
4. Richter, A.E., Arruda, A.O., Peters, M.C., Sohn, W. (2011). Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 139(5), 657–64.
5. Akin, M., Tezcan, M., Ileri, Z., Ayhan, F. (2015). Incidence of white spot lesions among patients treated with self and conventional ligation systems. *Clinical Oral Investigations*, 19(6), 1501–6.
6. Topaloglu-Ak, A., Ertugrul, F., Eden, E., Ates, M., Bulut, H. (2011). Effect of orthodontic appliances on oral microbiota 6 month follow-up. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 35(4), 433–6.
7. Pandis, N., Papaioannou, W., Kontou, E., Nakou, M., Makou, M., Eliades, T. (2010). Salivary Streptococcus mutans levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *European Journal of Orthodontics*, 32(1), 94–9.
8. Jurela, A., Repic, D., Pejda, S., Juric, H., Vidakovic, R., Matic, I. (2013). The effect of two different bracket types on the salivary levels of S. mutans and S. sobrinus in the early phase of orthodontic treatment. *The Angle Orthodontist*, 83(1), 140–5.
9. Pepla, E., Besharat, L.K., Palaia, G., Tenore, G., Migliau, G. (2014). Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Annali di Stomatologia*, 5(3), 108–14.
10. Kabu, M., Akosman, M.S. (2013). Biological effects of boron. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 225, 57–75.
11. Hakki, S.S., Bozkurt, B.S., Hakki, E.E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243–50.
12. Cole, A.S., Eastoel, E. (1988). *Biochemistry and Oral Biology* (2nd ed.). Boston: Wright.
13. LeFevre, M.L., Manly, R.S. (1938). Moisture, inorganic and organic contents of enamel and dentin from carious teeth. *The Journal of the American Dental Association and The Dental Cosmos*, 25(2), 233–42.
14. Robinson, C., Brookes, S.J., Bonass, W.A., Shore, R.C., Kirkham, J. (1997). Enamel maturation. *Novartis Foundation Symposium*, 156–174.
15. Kay, M.I., Young, R.A., Posner, A.S. (1964). Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*, 204(4963).
16. Ichijo, T., Yamashita, Y., Terashima, T. (1993). Observations on structural features and characteristics of biological apatite crystals. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, 40(3), 147–65.
17. Simmer, J.P., Fincham, A.G. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 84–108.
18. Robinson, C., Shore, R.C., Brookes, S.J., Strafford, S., Wood, S.R., Kirkham, J. (2000). The chemistry of enamel caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine,* 11(4), 481–95.
19. Robinson, C. (2009). *European Archives of Paediatric Dentistry.*
20. Robinson, C., Weatherell, J.A., Hallsworth, A.S. (1971). Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Research*, 5(1), 44–57.
21. Gibson, C.W., Yuan, Z.A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T. (2001). Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31871–5.
22. Doi, Y., Eanes, E.D., Shimokawa, H., Termine, J.D. (1984). Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins in vitro. *Journal of Dental Research*, 63(2), 98–105.

23. Landis, W.J., Burke, G.Y., Neuringer, J.R., Paine, M.C., Nanci, A., Bai, P. (1988). Earliest enamel deposits of the rat incisor examined by electron microscopy, electron diffraction, and electron probe microanalysis. *The Anatomical Record*, 220(3), 233–8.
24. Diekwisch, G.H., Berman, B.J., Gentner, S., Slavkin, H.C. (1995). Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. *Cell Tissue Research*, 279:149-167
25. Chang, H.S., Walsh, L.J., Freer, T.J. (1997). Enamel demineralization during orthodontic treatment: Aetiology and prevention. *Australian Dental Journal*, 42(5), 322–7.
26. Featherstone, J.D.B. (2000). The science and practice of caries prevention. *The Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–99.
27. Aoba, T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases,* 10(5), 249–57.
28. Øgaard, B. (1989). Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 96(5), 423–7.
29. Øgaard, B., Rølla, G., Arends, J. (1988). Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 94(1), 68–73.
30. Årtun, J., Thylstrup, A. (1986). Clinical and scanning electron microscopic study of surface changes of incipient caries lesions after debonding. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 94(3), 193–201.
31. Emilson, C.G., Krasse, B. (1985). Support for and implications of the specific plaque hypothesis. *European Journal of Oral Sciences*, 93(2), 96–104.
32. Klock, B., Krasse, B. (1979). A comparison between different methods for prediction of caries activity. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 87(2), 129–39.
33. Newborn, E. (1989). *Cariology* (3rd ed.). Chicago: Quintessence Publishing Co.
34. Gorelick, L., Geiger, A.M., Gwinnett, A.J. (1982). Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American Journal of Orthodontics*, 81(2), 93–8.
35. Andersson, R., Arvidsson, E., Crossner, C.G., Holm, A.K., Mansson, B. (1974). The flow rate, pH, and buffer effect of mixed saliva in children. *Journal of the International Association of Dentistry for Children*, 5(1), 5–12.
36. Russell, J.I., MacFarlane, T.W., Aitchison, T.C., Stephen, K.W., Burchell, C.K. (1990). Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity tests in Scottish adolescents. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 18(3), 120–5.
37. Darling, A.I. (1961). The selective attack of caries on the dental enamel. *Annals of the Royal College of Surgeons of England,* 29(6), 354–69.
38. Roberson, T.M., Heymann, H., Swift, E.J., Sturdevant, C.M. (2006). *Sturdevant's art and science of operative dentistry* (5th ed.). Edinburgh: Elsevier Mosby.
39. Silverstone, L.M. (1968). The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro. *British Dental Journal*, 125(4), 145–57.
40. Neuhaus, K.W., Graf, M., Lussi, A., Katsaros, C. (2010). Late infiltration of post-orthodontic white spot lesions. *Journal of Orofacial Orthopedics*, 71(6), 442–7.
41. Zandoná, A.F., Zero, D.T. (2006). Diagnostic tools for early caries detection. *Journal of the American Dental Association*, 137(12), 1675–84.
42. Larsen, M.J. (1990). Chemical events during tooth dissolution. *Journal of Dental Research*, 69(2), 575–80.
43. Hay, D.I., Smith, D.J., Schluckebier, S.K., Moreno, E.C. (1984). Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research*, 63(6), 857.
44. Mattousch, T., van der Veen, M., Zentner, A. (2007). Caries lesions after orthodontic treatment followed by quantitative light-induced fluorescence: a 2-year follow-up. *European Journal of Orthodontics*, 29(3), 294–8.
45. Øgaard, B. (1989). Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 96(5), 423–7.
46. Oong, E.M., Griffin, S.O., Kohn, W.G., Gooch, B.F., Caufield, P.W. (2008). The effect of dental sealants on bacteria levels in caries lesions. *Journal of the American Dental Association*, 139(3), 271–8.

47. Forsberg, C.M., Brattstrom, V., Malmberg, E., Nord, C.E. (1991). Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of Streptococcus mutans and lactobacilli. *European Journal of Orthodontics*, 13(5), 416–20.
48. Featherstone, J.D.B. (2004). The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 2(1), 259–64.
49. Marshall, T.A. (2009). Chairside diet assessment of caries risk. *Journal of the American Dental Association*, 140(6), 670–4.
50. Uzuner, F.D., Kaygisiz, E., Çankaya, Z.T. (2014). Effect of the bracket types on microbial colonization and periodontal status. *Angle Orthodontist*, 84(6), 1062–7.
51. Geiger, A.M., Gorelick, L., Gwinnett, A.J., Griswold, P.G. (1988). The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 93(1), 29–37.
52. Robinson, P., Deacon, S.A., Deery, C., Heanue, M., Walmsley, A.D., Worthington, H.V. (2005). Manual versus powered toothbrushing for oral health. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
53. Øgaard, B. (1990). Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. *Journal of Dental Research*, 69, 813–9.
54. Benson, P.E., Shah, A.A., Millett, D.T., Dyer, F., Parkin, N., Vine, R.S. (2005). Fluorides, orthodontics and demineralization: a systematic review. *Journal of Orthodontics*, 32(2), 102–14.
55. Boskey, A.L. (1997). Amorphous calcium phosphate: the contention of bone. *Journal of Dental Research*, 76(8), 1433–6.
56. Reynolds, E.C., Cai, F., Shen, P., Walker, G.D. (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *Journal of Dental Research*, 82(3), 206–11.
57. Rose, R.K. (2000). Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Archives of Oral Biology*, 45(7), 569–75.
58. Reynolds, E.C. (1987). The prevention of sub-surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra-oral model. *Journal of Dental Research*, 66(6), 1120–7.
59. Reynolds, E.C. (1997). Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *Journal of Dental Research*, 76(9), 1587–95.
60. Anderson, A.M., Kao, E., Gladwin, M., Benli, O., Ngan, P. (2002). The effects of argon laser irradiation on enamel decalcification: An in vivo study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 122(3), 251–9.
61. Elaut, J., Wehrbein, H. (2004). The effects of argon laser curing of a resin adhesive on bracket retention and enamel decalcification: a prospective clinical trial. *European Journal of Orthodontics*, 26(5), 553–60.
62. Biria, M., Jafary, M. (2015). A review on preventive measures and treatment of white spot lesions in patients with fixed orthodontic appliances. *Journal of Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*, 33(1), 106–17.
63. Mohire, N.C., Yadav, A.V. (2010). Chitosan-based polyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. *Indian Journal of Dental Research*, 21(3), 380–4.
64. Huysmans, M.C., Longbottom, C. (2004). The challenges of validating diagnostic methods and selecting appropriate gold standards. *Journal of Dental Research*, 83, C1–C10.
65. Gutiérrez-Salazar, M. del P., Reyes-Gasga, J. (2003). Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research*, 6(3), 367–73.
66. Lopes, G.C., Bonissoni, L., Baratieri, L.N., Vieira, L.C.C., Monteiro, S. (2002). Effect of bleaching agents on the hardness and morphology of enamel. Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 14(1), 24–30.
67. Risnes, S., Saeed, M., Sehic, A. (2019). Scanning Electron Microscopy (SEM) Methods for Dental Enamel. *Methods in Molecular Biology*, 1922, 293–308.
68. Scherrer, S.S., Quinn, J.B., Quinn, G.D., Wiskott, H.W.A. (2007). Fractographic ceramic failure analysis using the replica technique. *Dental Materials*, 23(11), 1397–404.
69. Paradella, T.C., Bottino, M.A. (2012). Scanning Electron Microscopy in modern dentistry research. *Brazilian Dental Science*, 15(2), 43–8.
70. Naves, L.Z., Gerdolle, D.A., de Andrade, O.S., Gresnigt, M.M. (2020). Seeing is believing? When scanning electron microscopy (SEM) meets clinical dentistry: The replica technique. *Microscopy Research and Technique*, 83(9), 1118–23.

71. Girão, A.V., Caputo, G., Ferro, M.C. (2017). Application of Scanning Electron Microscopy–Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS). *Comprehensive Analytical Chemistry*, 75, 153–68.
72. Ando, T., Uchihashi, T., Kodera, N. (2013). High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annual Review of Biophysics*, 42(1), 393–414.
73. Gaffney, J.S., Marley, N.A., Jones, D.E. (2012). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Characterization of Materials*, 1–33.
74. Yolcu, E.N., Akın Tartuk, G., Kaya, S., Eskibağlar, M. (2021). The use of confocal laser scanning microscopy in endodontics: A literature review. *Turkish Endodontic Society*, 6(2), 55–60.
75. Erpaçal, B., Adıgüzel, Ö., Cangül, S. (2019). The use of micro-computed tomography in dental applications. *International Dental Research*, 9(2), 78–91.
76. Grundmann, J., Grundmann, J., Golde, J., Steuer, S. (2024). Visualization of carious lesions with polarized and depolarized light microscopy. *Biomedical Optics Express*, 15(5), 3018–36.
77. Abdelaziz, M. (2023). Detection, Diagnosis, and Monitoring of Early Caries: The Future of Individualized Dental Care. *Diagnostics*, 13(12), 3649.
78. Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.H. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–17.
79. Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K. (2015). Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 17(3), 699–710.
80. Piancino, M.G., Isola, G., Merlo, A., Dalessandri, D., Debernardi, C., Bracco, P. (2012). Chewing pattern and muscular activation in open bite patients. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, 22(2), 273–9.
81. Zaura, E., ten Cate, J.M. (2015). Towards Understanding Oral Health. *Caries Research*, 49(1), 55–61.
82. Marsh, P.D., Head, D.A., Devine, D.A. (2014). Prospects of oral disease control in the future - an opinion. *Journal of Oral Microbiology*, 6, 26176.
83. Kwon, T., Lamster, I.B., Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462–76.
84. Tezal, M., Scannapieco, F.A., Wactawski-Wende, J., Grossi, S.G., Genco, R.J. (2006). Supragingival plaque may modify the effects of subgingival bacteria on attachment loss. *Journal of Periodontology*, 77(5), 808–13.
85. Wang, Q., Ma, J.B., Wang, B., Zhang, X., Yin, Y.L., Bai, H. (2019). Alterations of the oral microbiome in patients treated with the Invisalign system or with fixed appliances. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 156(5), 633–40.
86. Lucchese, A., Bondemark, L., Marcolina, M., Manuelli, M. (2018). Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1476645.
87. Lucchese, A., Matarese, G., Manuelli, M., Ciuffreda, C., Bassani, L., Isola, G. (2016). Reliability and efficacy of palifermin in prevention and management of oral mucositis in patients with acute lymphoblastic leukemia: a randomized, double-blind controlled clinical trial. *Minerva Stomatologica*, 65(1), 43–50.
88. Pan, S., Liu, Y., Si, Y., Zhang, Q., Wang, L., Liu, J. (2017). Prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis in adolescent orthodontic patients. *PLoS ONE*, 12(11), 0188420.
89. Klaus, K., Eichenauer, J., Sprenger, R., Ruf, S. (2016). Oral microbiota carriage in patients with multibracket appliance in relation to the quality of oral hygiene. *Head & Face Medicine*, 12(1), 28.
90. Topaloglu-Ak, A., Ertugrul, F., Eden, E., Ates, M., Bulut, H. (2011). Effect of orthodontic appliances on oral microbiota-6 month follow-up. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 35(4), 433–6.
91. Andrucioli, M.C.D., Nelson-Filho, P., Matsumoto, M.A.N., Saraiva, M.C.P., Feres, M., de Figueiredo, L.C., et al. (2012). Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 141(1), 24–9.
92. Türkkahraman, H., Sayin, M.O., Bozkurt, F.Y., Yetkin, Z., Kaya, S., Onal, S. (2005). Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *The Angle Orthodontist*, 75(2), 231–6.
93. Jing, D., Hao, J., Shen, Y., Tang, G., Lei, L., Zhao, Z. (2019). Effect of fixed orthodontic treatment on oral microbiota and salivary proteins. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(5), 4237–43.

94. Fournier, A., Payant, L., Bouclin, R. (1998). Adherence of Streptococcus mutans to orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 114(4), 414–7.
95. Anhoury, P., Nathanson, D., Christopher, Hughes, V., Socransky, S., Feres, M. (2002). Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *The Angle Orthodontist*, 72, 123–9.
96. Ratnayake, J.T.B., Mucalo, M., Dias, G.J. (2017). Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105, 1285–99.
97. Enax, J., Epple, M. (2018). Synthetic Hydroxyapatite as a Biomimetic Oral Care Agent. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 16(1), 7–19.
98. Mohd Pu'ad, N.A.S., Koshy, P., Abdullah, H.Z., Idris, M.I., Lee, T.C. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, 01588
99. Habibah, T.U., Amlani, D.V., Brizuela, M. (2022). Hydroxyapatite Dental Material. *StatPearls,* 12, 2683.
100. Chen, L., Al-Bayatee, S., Khurshid, Z., Shavandi, A., Brunton, P., Ratnayake, J. (2021). Hydroxyapatite in oral care products—a review. *Materials*, 14, 6359.
101. Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. (2016). Demineralization and remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–63.
102. Harks, I., Jockel-Schneider, Y., Schlagenhauf, U., May, T.W., Gravemeier, M., Prior, K. (2016). Impact of the daily use of a microcrystal hydroxyapatite dentifrice on de novo plaque formation and clinical/microbiological parameters of periodontal health. A Randomized Trial. *PloS ONE*, 11(7).
103. Meyer, F., Enax, J. (2019). Hydroxyapatite in Oral Biofilm Management. *European Journal of Dentistry*, 13(2), 287–90.
104. Hannig, M., Hannig, C. (2010). Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology*, 5, 565–9.
105. Kensche, A., Holder, C., Basche, S., Tahan, N., Hannig, C., Hannig, M. (2017). Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Archives of Oral Biology*, 80, 18–26.
106. Nobre, C.M.G., König, B., Pütz, N., Hannig, M. (2021). Hydroxyapatite-based solution as adjunct treatment for biofilm management: An in situ study. *Nanomaterials*, 11(9).
107. Fernandes, G.L., Delbem, A.C.B., Do Amaral, J.G., Gorup, L.F., Fernandes, R.A., Neto, F.N.D.S. (2018). Nanosynthesis of silver-calcium glycerophosphate: promising association against oral pathogens. *Antibiotics*, 7(3).
108. Saafan, A., Zaazou, M.H., Sallam, M.K., Mosallam, O., El Danaf, H.A. (2018). Assessment of photodynamic therapy and nanoparticles effects on caries models. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(7), 1289.
109. Cao, W., Zhang, Y., Wang, X., Chen, Y., Li, Q., Xing, X. (2017). Development of a novel resin-based dental material with dual biocidal modes and sustained release of Ag+ ions based on photocurable core-shell AgBr/cationic polymer nanocomposites. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 28(7).
110. Song, W., Ge, S. (2019). Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. *Molecules*, 24(6).
111. Devirian, T.A., Volpe, S.L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219–31.
112. Nielsen, F.H., Shuler, T.R. (1992). Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium, in rats. Effects on growth, blood variables, and bone mineral composition. *Biological Trace Element Research*, 35(3), 225–37.
113. Hakki, S.S., Malkoc, S., Dundar, N., Kayis, S.A., Hakki, E.E., Hamurcu, M. (2015). Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness, and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 208–15.
114. Taşlı, P.N., Doğan, A., Demirci, S., Şahin, F. (2013). Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. *Biological Trace Element Research*, 153(1–3), 419–27.
115. Demirci, S., Kaya, M.S., Doğan, A., Kalay, Ş., Altin, N.Ö., Yarat, A. (2015). Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite. *Turkish Journal of Biology*, 39(3), 417–26.

116. Pan, H.B., Zhao, X.L., Zhang, X., Zhang, K.B., Li, L.C., Li, Z.Y. (2010). Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. *Journal of the Royal Society*, Interface, 7(48), 1025–31.
117. Degrazia, F.W., Leitune, V.C.B., Samuel, S.M.W., Collares, F.M. (2017). Boron nitride nanotubes as novel fillers for improving the properties of dental adhesives. *Journal of Dentistry*, 62, 85–90.
118. Aslam, M., Ahmad, F., Yusoff, P.S.M.B.M., Chai, W.L., Ngeow, W.C., Nawi, M.K.A. (2016). Investigation of boron addition on densification and cytotoxicity of powder injection molded 316L stainless steel dental materials. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(11), 4669–81.
119. Bapat, R.A., Chaubal, T.V., Joshi, C.P., Bapat, P.R., Choudhury, H., Pandey, M. (2018). An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications,* 91, 881–98.
120. Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., Mozafari, M.R. (2018). Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8013–24.
121. Ramkumar, V.S., Pugazhendhi, A., Gopalakrishnan, K., Sivagurunathan, P., Saratale, G.D., Dung, T.N.B. (2017). Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed Enteromorpha compressa and its biomedical properties. *Biotechnology Reports*, 14, 1–7.
122. Noronha, V.T., Paula, A.J., Durán, G., Galembeck, A., Cogo-Müller, K., Franz-Montan, M. (2017). Silver nanoparticles in dentistry. *Dental Materials*, 33(10), 1110–26.
123. Jacob, J.M., John, M.S., Jacob, A., Abitha, P., Kumar, S.S., Rajan, R. (2019). Bactericidal coating of paper towels via sustainable biosynthesis of silver nanoparticles using Ocimum sanctum leaf extract. *MRE*, 6(4), 045401.
124. Khorrami, S., Jafari Najafabadi, F., Zarepour, A., Zarrabi, A. (2019). Is Astragalus gossypinus Honey a natural antibacterial and cytotoxic agent? An investigation on A. gossypinus honey biological activity and its green synthesized silver nanoparticles. *BioNanoScience*, 9(3), 603–10.
125. Hernández-Gómora, A.E., Lara-Carrillo, E., Robles-Navarro, J.B., Scougall-Vilchis, R.J., Hernández-López, S., Medina-Solís, C.E. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles on orthodontic elastomeric modules: Evaluation of mechanical and antibacterial properties. *Molecules*, 22(9).
126. Espinosa-Cristóbal, L.F., López-Ruiz, N., Cabada-Tarín, D., Reyes-López, S.Y., Zaragoza-Contreras, A., Constandse-Cortéz, D. (2018). Antiadherence and antimicrobial properties of silver nanoparticles against Streptococcus mutans on brackets and wires used for orthodontic treatments. *Journal of Nanomaterials*
127. Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666–9.
128. Geim, A.K., Novoselov, K.S. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, 6(3), 183–91.
129. Radhi, A., Mohamad, D., Abdul Rahman, F.S., Abdullah, A.M., Hasan, H. (2021). Mechanism and factors influencing the antimicrobial activities of graphene-based nanomaterials and their application in dentistry. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 1290–307.
130. Albayrak, O., Oncel, C., Tefek, M., Altintas, S. (2007) Effects of calcination on electrophoretic deposition of naturally derived and chemically synthesized hydroxyapatite. *Reviews on Advanced Materials Science*, 15, 10-15
131. Albayrak, O., El-Atwani, O., Altintas, S. (2008). Hydroxyapatite coating on titanium substrate by electrophoretic deposition method: Effects of titanium dioxide inner layer on adhesion strength and hydroxyapatite decomposition. *Surface and Coatings Technology*, 202(11), 2482–7.
132. Albayrak, Ö., Uğurlu, M. (2016). Bor katkılı hidroksiapatit üretimi ve karakterizasyonu: Bor oranı ve sinterleme sıcaklığının yapı ve mekanik özellikler üzerindeki etkisi. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31(3), 749–61.
133. Albayrak, O. (2016). Structural and mechanical characterization of boron-doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment. *Materials Characterization*, 113, 82–9.
134. Ezan, E. (2019) *Bor katkılı bifazik kalsiyum fosfat üretiminde sinterleme süresinin yapı ve mekanik özellikler üzerindeki etkisi.* (Yüksek Lisans Tezi). Mersin Üniversitesi, Türkiye.
135. Sadikoglu, I.S. (2020). White spot lesions: Recent detection and treatment methods. *Cyprus Journal of Medical Sciences*, 5(3), 260–6.

136. Lundstrom, F., Krasse, B. (1987). Streptococcus mutans and lactobacilli frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. *European Journal of Orthodontics*, 9(2), 109–16.
137. Tickotsky, N., Petel, R., Araki, R., Moskovitz, M. (2017). Caries progression rate in primary teeth: A retrospective study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 41(5), 358–61.
138. Amaechi, B.T., Van Loveren, C. (2013). Fluorides and non-fluoride remineralization systems. *Monographs in Oral Science*, 23, 15–26.
139. Ball, I.A. (1986). The "fluoride syndrome": occult caries. *British Dental Journal*, 160(3), 75–6.
140. Schmidlin, P., Zobrist, K., Attin, T., Wegehaupt, F. (2016). In vitro re-hardening of artificial enamel caries lesions using enamel matrix proteins or self-assembling peptides. *Journal of Applied Oral Science*, 24(1), 31.
141. Pandya, M., Diekwisch, T.G.H. (2019). Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. *International Journal of Oral Science*, 11(1), 1–9.
142. Limeback, H., Enax, J., Meyer, F. (2021). Biomimetic hydroxyapatite and caries prevention: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Journal of Dental Hygiene*, 55(3), 148.
143. Khaliq, H., Juming, Z., Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 31–51.
144. Uysal, İ., Yılmaz, B., Evis, Z. (2020). Boron doped hydroxapatites in biomedical applications. *Journal of Boron*, 5(4), 199–208.
145. Calis, M., Demirtas, T.T., Vatansever, A., Irmak, G., Sakarya, A.H., Atilla, P. (2017). A biomimetic alternative to synthetic hydroxyapatite: "boron-containing bone-like hydroxyapatite" precipitated from simulated body fluid. *Annals of Plastic Surgery*, 79(3), 304–11.
146. Pazarçeviren, A.E., Tezcaner, A., Keskin, D., Kolukısa, S.T., Sürdem, S., Evis Z. (2021). Boron-doped biphasic hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate for bone tissue engineering. *Biological Trace Element Research*, 199(3), 968–80.
147. Arends, J., Christoffersen, J., Ruben, J., Jongebloed, W.L. (1989). Remineralization of bovine dentine in vitro. The influence of the F content in solution on mineral distribution. *Caries Research*, 23(5), 309–14.
148. Featherstone, J.D.B., Mellberg, J.R. (1981). Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Research*, 15(1), 109–14.
149. Amaechi, B.T., Higham, S.M., Edgar, W.M. (1999). Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. *Journal of Oral Rehabilitation*, 26(8), 624–30.
150. Lippert, F., Juthani, K. (2015). Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clinical Oral Investigations,* 19(8), 1947–54.
151. Hanafy, R.A., El-Fattah, A.A., Mostafa, D., Kandil, S. (2020). Biomimetic chitosan against bioinspired nanohydroxyapatite for repairing enamel surfaces. *Journal of Biomaterials and Bioengineering,* 9(2).
152. Manchery, N., John, J., Nagappan, N., Subbiah G.K., Premnath P. (2019). Remineralization potential of dentifrice containing nanohydroxyapatite on artificial carious lesions of enamel: A comparative in vitro study. *Dental Research Journal.* 16(5), 310.
153. Thimmaiah, C., Shetty, P., Shetty, S.B., Natarajan, S., Thomas, N.A. (2019). Comparative analysis of the remineralization potential of cpp-acp with fluoride, tri-calcium phosphate and nano hydroxyapatite using SEM/EDx-an in vitro study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 11(12), 1120-1126.
154. Jaffer, S., Oesterle, L.J., Newman, S.M. (2009). Storage media effect on bond strength of orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 136(1), 83–6.
155. Aydin, B., Pamir, T., Baltaci, A., Orman, M.N., Turk T. (2015). Effect of storage solutions on microhardness of crown enamel and dentin. *European Journal of Dentistry*, 9(2), 262–6.
156. Ten Cate, J.M., Duijsters, P.P.E. (1982). Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Research*, 16(3), 201–10.
157. 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), 316–34.
158. Tunalı, E. (2021). *Ortodontik tedavi sırasında görülen beyaz nokta lezyonlarının biyomimetik materyallerle tedavisinin değerlendirilmesi* (Doktora Tezi). Hamidiye Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Türkiye.

159. Featherstone, J.D.B., Shariat, M., Brugler, S., Fir, J., White, D.J. (1988). Effect of an anticalculus dentifrice on lesion progression under pH cycling conditions in vitro. *Caries Research*, 22(6), 337–41.
160. O'Reilly, M.M., Featherstone, J.D.B. (1987). Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 92(1), 33–40.
161. Ten Cate, J.M., Timmer, K., Shariati, M., Featherstone, J.D.B. (1988). Effect of timing of fluoride treatment on enamel de- and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Research*, 22(1), 20–6.
162. Nelson, D., Coote, G.E., Shariali, M., Featherstone, J. (1992). High resolution fluoride profiles of artificial in vitro lesions treated with fluoride dentifrices and mouthrinses during pH cycling conditions. *Caries Research*, 26(4), 254–62.
163. Itthagarun, A., Wei, S.H.Y., Wefel, J.S. (2000). The effect of different commercial dentifrices on enamel lesion progression: an in vitro pH-cycling study. *International Dental Journal*, 50(1), 21–8.
164. Casals, E., Boukpessi, T., McQueen, C.M., Eversole, S.L., Faller, R.V. (2007). Anticaries potential of commercial dentifrices as determined by fluoridation and remineralization efficiency. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 8(7), 001–10.
165. de Oliveira, P.R.A., Coutinho, T.C.L., Portela, M.B., Paula, V.C.A., Tostes, M.A. (2017). Influence of biofilm formation on the mechanical properties of enamel after treatment with CPP-ACP crème. *Brazilian Oral Research*, 31, 84.
166. Gopalakrishnan, V., Anthonappa, R.P., King, N.M., Itthagarun, A. (2016). Remineralizing potential of CPP-ACP applied for 1 min in vitro. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 17(4), 231–7.
167. Serdar-Eymirli, P., Turgut, M.D., Dolgun, A., Yazici, A.R. (2019). The effect of Er,Cr laser, fluoride, and CPP-ACP on caries resistance of primary enamel. *Lasers in Medical Science,* 34(5), 881–91.
168. Itthagarun A., King N., Cheung Y. (2010). The effect of nano-hydroxyapatite toothpaste on artificial enamel carious lesion progression: An in-vitro pH-cycling study. 61(7), 6
169. Elmancy, E.M.A.E., El Aziz, A.M.A., Awad, B.G. (2022). Remineralizing effect of Novamin and nano-hydroxyapatite toothpastes on initial enamel carious lesions in primary teeth. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 89(1), 5473–8.
170. Gümüştaş, B., Birant, S., Şişmanoğlu, S. (2024). Ultrastructural investigation of the effect of toothpastes containing different remineralizing agents on demineralized enamel. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 36(4), 663–72.
171. Asadi, M., Majidinia, S., Bagheri, H., Hoseinzadeh, M. (2024). The effect of formulated dentin remineralizing gel containing hydroxyapatite, fluoride, and bioactive glass on dentin microhardness: an in vitro study. *International Journal of Dentistry,* 4788668
172. Santonocito, S., Polizzi, A. (2022). Oral microbiota changes during orthodontic treatment. *Frontiers in Bioscience*, 14(3).
173. Innes, N.P.T., Frencken, J.E., Schwendicke, F. (2016). Don't know, can't do, won't change: barriers to moving knowledge to action in managing the carious lesion. *Journal of Dental Research*, 95(5), 485–6.
174. Lucchese, A., Bondemark, L., Marcolina, M., Manuelli, M. (2018). Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. *Journal of Oral Microbiology*, 10.
175. Li, M., Wang, S., Li, R., Wang, Y., Fan, X., Gong, W. (2022). The mechanical and antibacterial properties of boron nitride/silver nanocomposite enhanced polymethyl methacrylate resin for application in oral denture bases. *Biomimetics*, 7(3), 138.
176. Halawany, H.S., Abraham, N.B., Siddiqui, Y.M., Balto, H.A., Jacob, V. (2016). Antimicrobial efficacy of salvadora persicaextracts on a monospecies biofilm on orthodontic brackets in vitro. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 14(2).
177. Farkash, Y., Feldman, M., Ginsburg, I., Steinberg, D., Shalish, M. (2019). Polyphenols inhibit candida albicans and streptococcus mutans biofilm formation. *Dentistry Journal*, 7(2).
178. Chen, Y., Wong, R.W.K., Seneviratne, C.J., Hägg, U., McGrath, C., Samaranayake, L.P. (2011). Comparison of the antimicrobial activity of Listerine and Corsodyl on orthodontic brackets in vitro. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 140(4), 537–42.
179. CLSI. (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

180. McNicholl, B.P., McGrath, J.W., Quinn, J.P. (2007). Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water Research*, 41(1), 127–33.
181. Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–4.
182. Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P. (2002). A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in Streptococcus mutans is involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 184(10), 2699–2708.
183. Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelver, N., Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 269–276.
184. Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L. (2016). Crystal Violet and XTT assays on Staphylococcus aureus biofilm quantification. *Current Microbiology*, 73(4), 474–482.
185. Grossman, A.B., Burgin, D.J., Rice, K.C. (2021). Quantification of Staphylococcus aureus biofilm formation by crystal violet and confocal microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 2341, 69–78.
186. de Carvalho, F.G., Brasil, V.L.M., Filho, T.J.S., Carlo, H.L., Santos, R.L. (2013). Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Brazilian Oral Research,* 27(6), 463–470.
187. Vyavhare, S., Sharma, D.S., Kulkarni, V.K. (2015). Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(2), 149–160.
188. Sharma, A., Rao, A., Shenoy, R., Suprabha, B.S. (2017). Comparative evaluation of nano-hydroxyapatite and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on the remineralization potential of early enamel lesions: An in vitro study. *Journal of Orofacial Sciences*, 9(1), 28–33
189. Mohd Pu'ad, N.A.S., Abdul Haq, R.H., Mohd Noh, H., Abdullah, H.Z., Idris, M.I., Lee, T.C. (2020). Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Materials Today: Proceedings,* 29, 233–239.
190. Cox, S.C., Walton, R.I., Mallick, K.K. (2015). Comparison of techniques for the synthesis of hydroxyapatite. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials,* 4(1), 37–47.
191. Albayrak, Ö., İpekoğlu, M., Altıntaş, S. (2019). Investigation of the effects of production parameters on the hydroxyapatite powder properties and coating quality. *Çukurova University Journal of the Faculty of Engineering and Architecture*, 34(4), 243-255.
192. Jalota, S., Tas, A.C., Bhaduri, S.B. (2004). Microwave-assisted synthesis of calcium phosphate nanowhiskers. *Journal of Materials Research*, 19(6), 1876–1880.
193. Lu, K. (2008). Sintering of nanoceramics. *International Materials Reviews,* 53(1), 21–38.
194. Wang, X.H., Chen, I.W. (2017). Sintering of nano-ceramics. *Nanomaterials Handbook*, 579–602.
195. Barheine, S., Hayakawa, S., Jäger, C., Shirosaki, Y., Osaka, A. (2011). Effect of disordered structure of boron-containing calcium phosphates on their in vitro biodegradability. *Journal of the American Ceramic Society*, 94(8), 2656–2662.
196. Salvati, E., Besnard, C., Harper, R.A., Moxham, T., Shelton, R.M., Landini, G. (2021). Finite element modelling and experimental validation of the enamel demineralisation process at the rod level. *Journal of Advanced Research*, 29, 167–177.
197. Li, L., Pan, H., Tao, J., Xu, X., Mao, C., Gu, X. (2008). Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. *Journal of Materials Chemistry*, 18(34), 4079–4084.
198. Kensche, A., Holder, C., Basche, S., Tahan, N., Hannig, C., Hannig, M. (2017). Efficacy of a mouthrinse based on hydroxyapatite to reduce initial bacterial colonisation in situ. *Archives of Oral Biology*, 80, 18–26.
199. Ciobanu, C.S., Iconaru, S.L., Le Coustumer, P., Constantin, L.V., Predoi, D. (2012). Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 1–9.
200. Nobre, C.M.G., Pütz, N., Hannig, M. (2020). Adhesion of hydroxyapatite nanoparticles to dental materials under oral conditions. *Scanning*, 2020(1), 6065739.
201. Hannig, C., Basche, S., Burghardt, T., Al-Ahmad, A., Hannig, M. (2013). Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence in situ. *Clinical Oral Investigations*, 17(3), 805–814.
202. Hannig, C., Hannig, M. (2009). The oral cavity–a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations*, 13(2), 123–139.

203. El-Gar, Y.H.A., Etman, W.M., Genaid, T.M., Al-Madboly, L.A. (2022). Potent antibacterial and antibiofilm activities of a synthetic remineralizing preparation of nano-hydroxyapatite against cariogenic Streptococcus mutans using an ex-vivo animal model. *Frontiers in Dental Medicine*, 3.
204. Park, M., Sutherland, J.B., Rafii, F. (2019). Effects of nano-hydroxyapatite on the formation of biofilms by Streptococcus mutans in two different media. *Archives of Oral Biology*, 107.
205. Zhang, M., He, L.B., Exterkate, R.A.M., Cheng, L., Li, J.Y., Ten Cate, J.M. 2015). Biofilm layers affect the treatment outcomes of NaF and nano-hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*, 94(4), 602–607.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.07.2022-10093

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

Toplantı Tarihi : 01.07.2022
Toplantı Sayısı : 2022/17
Karar Sayısı : 17/1

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, Prof. Dr. Şeniz KARAÇAY'ın sorumlu, Dt. Arda TABANCALI'nın yardımcı araştırmacı olduğu 22/362 kayıt numaralı "***Biyomimetik Materyallerin Braketler Üzerindeki Streptococcus Mutans Konsantrasyonu ve Mine Demineralizasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 01.07.2022 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Aslı Gibidir
Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Prof. Dr. Derya BÜYÜKKAYHAN
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Ali ÇETİN
Etik Kurul Üyesi

Prof. Dr. Recep KEŞLİ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Papatya KELEŞ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Ebru SAĞLAM
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Erhan ALABAY
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Selda RIZALAR
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

07.07.2022 Memur

Ali CEYLAN

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSFB9LT8CB&eS=10093

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