T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN-VİTRO DENTİN ÇÜRÜĞÜ MODELİNDE FLORÜR VERNİK, GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR VE PEPTİD P11-4 UYGULAMASININ DENTİN NANO YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM, FTIR VE SAXS YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

GİZEM YOĞURUCU DEĞERLİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜNSELİ GÜVEN POLAT

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
MAYIS/2023

İTHAF

"Sevgili annem ve babam Sakine ve Cemal Yoğurucu' ya, kardeşim Emre'ye ve eşim Doğu Ekin'e ithaf ediyorum."

TEŞEKKÜR

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

Doktora eğitimimin başlangıcında ve sonrasında bana destek olup bilgi ve tecrübesi ile her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Ceyhan Altun hocama,

Tez çalışmamda analizlerin yorumlanmasında büyük katkısı olan, interdispliner çalışmanın önemini anlamama sebep olan Prof. Dr. Semra İde hocama,

Tez çalışmam sırasındaki değerli katkılarından dolayı, tez izleme komitesindeki Doç. Dr. Ersin Yıldırım ve Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Türkoğlu Kayacı hocama,

Doktora eğitimimde ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Cafer Ataş, Dt. Ayça Kurt, Dt. Nur Irmak Erakman ve tüm Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı ailesine,

İhtiyaç duyduğum her konuda, her zaman yanımda olan, yol göstericim, destekçim ve hayat arkadaşım, sevgili eşim Doğu Ekin Değerli' ye,

Bana hep inanan, güvenen, başarılarımın yegane kaynağı; annem Sakine, babam Cemal ve kardeşim Emre Yoğurucu' ya tekkür ederim...

Bu doktora tez çalışmasını bilimsel araştırmalar projesi kapsamında 2022/027 numaralı proje ile destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
RESİMLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. DENTİN YAPISI 4
2.2. DENTİN ÇÜRÜĞÜ 7
2.3. KRİTİK pH 8
2.4. DEMİNERALİZASYON 10
2.5. REMİNERALİZASYON 11
2.6. İN-VİTRO DENTİN ÇÜRÜĞÜ MODELLERİ 12
2.6.1. Biyofilm Modeli 12
2.6.2. Kimyasal Olarak Oluşrulan İn-vitro Çürük Modeli 13
2.6.2.1. pH siklus modeli (demineralizasyon ve remineralizasyon döngü modeli): 13
2.6.2.2. Asit tamponlar kullanılarak oluşturulan in vitro demineralizasyon modeli (basit demineralizasyon modeli): 13
2.7. ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN GÜNCEL MATERYALLER 14
2.7.1. Sodyum Florür Vernik 17
2.7.2. Gümüş Diamin Florür 19
2.7.3. Kendiliğinden Birleşen Peptit P11-4 23
2.8. SEM, FTIR, SAXS ANALİZLERİ 28
2.8.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 28
2.8.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi 29
2.8.3. Küçük Açılı X Işını Saçılması (SAXS) Analizi 30
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. DENEY ÖNCESİ HAZIRLIK SÜRECİ 33
3.1.1. Örnek Sayısının Belirlenmesi 33

3.1.2. Diş Örneklerinin Hazırlanması 33
3.1.3. Dentin Dokusunda İn-vitro Olarak Çürük Oluşturulması 38
3.2. DENEY SÜRECİ....39
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması 41
3.2.2. P11-4 (Self Assembling Peptid) (Kendiliğinden Birleşen Peptid) (1. Grup) 41
3.2.3. GDF (Gümüş Diamin Florür) (2. Grup) 43
3.2.4. Florür Vernik (3. Grup) 45
3.2.5. Negatif Kontrol Grubu (4. Grup) 45
3.2.6. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi....45
3.2.7. Örneklerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) İle İncelenmesi 46
3.2.8. Örneklerin Küçük Açılı X-Işını (Small-angle X-ray scattering (SAXS) ile İncelenmesi 47
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM 49
4. BULGULAR....50
4.1. SEM Görüntülerinin Analiz Sonuçları....50
4.2. FTIR Görüntülerinin Analiz Sonuçları 53
4.3. SAXS Görüntülerinin Analiz Sonuçları....61
5. TARTIŞMA 64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....76
KAYNAKLAR 78
EKLER 91

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Florid vernik piyasa formları .....…19

Tablo 2.2: GDF piyasa formları..... 20

Tablo 3.1: Çalışma grupları ve kullanılan materyaller…….41

Tablo 4.1: Normal dentin ve deney gruplarımıza ait FTIR spektrum değerleri (cm^{-1})…….54

Tablo 4.2: Grupların spektrum değerleri açısından değerlendirilmesi…… 55

Tablo 4.3: Post Hoc değerlendirme sonuçları……..56

Tablo 4.4: Gruplarda Amid A spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları……... 59

Tablo 4.5: Gruplarda Amid I spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları……... 60

Tablo 4.6: Gruplarda Amid II spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları……... 60

Tablo 4.7: Gruplarda Organik + v3 $CO3^{-2}$ spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları……. 61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Dentinin kimyasal bileşimi (A), dişi oluşturan dokular (B) ve dentinin histolojik yapısı (C) 5

Şekil 2.2: Stephan eğrisi 10

Şekil 2.3: Demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsü 12

Şekil 2.4: Primer yapıdan SAP 'a dönüşüm 24

Şekil 2.5: P11-4'ün organik yapısı ……...25

Şekil 2.6: (a) Çürük lezyonu (b) P11-4 uygulaması (c) Üç boyutlu iskelenin oluşumu (d) Mavi altıgen şekilde gösterilen HAP kristallerinin iskele etrafında kendiliğinden oluşması 26

Şekil 2.7: SEM sisteminin temel elemanları ……28

Şekil 2.8: Normal dentin FTIR spektrumu ……...…….30

Şekil 2.9: Şematik olarak küçük ve geniş açılı X ışını saçılma sisteminin temel elemanları ……..31

Şekil 2.10: HRTEM görüntüsü üzerinde farklı nanoskopik oluşumların ve nanoskopik dağılımlarının görselleştirilmesi ……...…….32

Şekil 3.1: Deney akış şeması……...40

Şekil 3.2: Saçılma geometrisi ve saçılma vektörü ifadesinin elde edilişi…...……...49

Şekil 4.1: Çalışma gruplarına ait FTIR analizi grafiklerinin kıyaslanması ...……...55

Şekil 4.2: Grupların Amid A bantlarına ait spektrum değerleri……..56

Şekil 4.3: Grupların Amid I bantlarına ait spektrum değerleri……..……57

Şekil 4.4: Grupların Amid II bantlarına ait spektrum değerleri……..58

Şekil 4.5: Grupların organik + ν_3 CO_3^{-2} bantlarına ait spektrum değerleri……59

Şekil 4.6: Çalışmamızda elde edilen nanomorfolojiler ve boyutlar…… 62

Şekil 4.7: Çalışmamızda elde edilen nano oluşum uzaklık dağılımları ……63

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1: GDF ve KI içeren dental ürün ...……...23

Resim 2.2: P11-4 peptidinin fibriller yapısının SEM görüntüsü (174) ……..25

Resim 2.3: P11-4 içeren dental ürünler ...……...27

Resim 3.1: Çalışmada kullanılan çekilmiş diş örnekleri 34

Resim 3.2: Çekilmiş dişlerin soğuk akrile gömülmüş hali 35

Resim 3.3: Çalışmada kullanılan mikro kesme cihazı..... 35

Resim 3.4: Dişlerin kesme cihazına yerleştirilmesi 36

Resim 3.5: Dentin kesitlerinin kalınlığının ayarlanması 37

Resim 3.6: Hazırlanan dentin kesitleri 37

Resim 3.7: Çalışmada kullanılan polisaj cihazı 38

Resim 3.8: pH siklusunda kullanılan "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan demineralizasyon solüsyonu..... 39

Resim 3.9 : pH siklusunda kullanılan "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan remineralizasyon solüsyonu 40

Resim 3.10: %2' lik sodyum hipoklorit uygulaması..... 42

Resim 3.11: %35' lik fosforik asit uygulaması 42

Resim 3.12: P11-4 peptit uygulaması..... 43

Resim 3.13: GDF uygulaması 1. Aşama 44

Resim 3.14: GDF uygulaması 2. aşama 44

Resim 3.15: Florür vernik uygulaması 45

Resim 3.16: Çalışmada kullanılan taramalı elektron mikroskobu (SEM)..... 46

Resim 3.17: Çalışmada kullanılan FTIR cihazı 47

Resim 3.18: SAXS deney sisteminin genel görünümü 48

Resim 4.1: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine P11-4 (1.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri ……...50

Resim 4.2: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine SDF (2.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri ……...51

Resim 4.3: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine florür vernik (3.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri ……...52

Resim 4.4: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerinin pH sikusu sonundaki (4.Grup); X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri ……52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAPD : Amerikan Pediatrik Diş Hekimliği Birliği

Ag : Gümüş

Ca^{2+} : Kalsiyum İyonu

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$: Kalsiyum Hidroksi Apatitten Kalsiyum Klorür

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür

CPP-ACP : Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat

CPP-ACFP : Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Florid Fosfat

dk : Dakika

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GDF : Gümüş Diamin Florür

H^+ : Hidrojen İyonu

HAP : Hidroksi Apatit

HAPH : Hidroksiapatit Hekzagonal

HAPL : Hidroksiapatit Lamellar

HRTEM : Yüksek Çözünürlüklü Elektron Mikroskobu

ICDAS : Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi

KOH : Potasyum hidroksit

MMP : Matriks Metalloproteinaz

µCT : Bilgisayarlı Mikro Tomografi

µm : Mikrometre

NaH_2PO_4 : Sodyum Dihidrojen Ortofosfat Dehidrat

pH : Asit Baz Değeri

PO_4^{3-} : Fosfat İyonu

SAP **:** Kendiliğinden Birleşen Peptitler

SAXS : Küçük Açılı X Işını Saçılması Analizi

SEM **:** Taramalı Elektron Mikroskobu

TCP **:** Trikalsiyum Fosfat

TEM **:** Geçirimli Elektron Mikroskobu

WHO **:** Dünya Sağlık Örgütü

İN-VİTRO DENTİN ÇÜRÜĞÜ MODELİNDE FLORÜR VERNİK, GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR VE PEPTİD P11-4 UYGULAMASININ DENTİN NANO YAPISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN SEM, FTIR VE SAXS YÖNTEMLERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Dentin çürüğüne uygulanan kendiliğinden birleşen peptid P11-4, gümüş diamin florür (GDF) ve florür verniğin yapısal etkilerinin; topografik, moleküler ve nano ölçekte üç boyutlu olarak SEM, FTIR ve SAXS yöntemleriyle tespit edimesi ve P11-4 peptidinin, GDF ve florür vernikle karşılaştırmalı olarak incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızın çekilmiş insan dişlerinden elde edilen 40 adet dentin kesiti hazırlanarak yapılması planlanmış, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu 'ndan 46418926-050.01sayılı kararla onay alınmasını takiben başlamıştır. Çürüksüz 3. molar dişler %1 timol içeren distile suda 4°C sıcaklıktaki saklama koşullarında en fazla 1 ay bekletildikten sonra 5x3x1mm boyutlarında kesitler hazırlandı. Dentin kesitleri, pH:5,0 olan solüsyonda 37°C ‘de 72 saat bekletilerek yapay çürük lezyonları oluşturuldu. Dentin diskleri randomize olarak 4 ayrı gruba ayrıldı. Üretici firma yönergelerine uygun olarak hazırlanan; P11-4 birinci gruba, GDF ikinci gruba, florür vernik üçüncü gruba uygulandı. 28 gün boyunca pH siklusunda sırasıyla; 3 saat demineralizasyon, 2 saat remineralizasyon, tekrar 3 saat demineralizasyon ve 16 saat boyunca remineralizasyon solüsyonunda bekletildi. pH siklusunun tamamlanmasının ardından SEM, FTIR ve SAXS analizleri yapıldı.

Bulgular: İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunn’s test kullanıldı. Değerlendirmeler sonucunda P11-4 materyalinin, florür vernik ile benzer özellikler gösterdiği anlaşılmıştır.

Sonuç: Elde edilen veriler ışığında P11-4 peptidi dentin çürüğünü biyomimetik iyileştirmede kullanılacak bir materyal olabilir.

Anahtar Kelimeler: FTIR, GDF, P11-4, SAXS, SEM

INVESTIGATION OF EFFECTS OF FLUORIDE VARNISH, SILVER DIAMINE FLUORIDE AND PEPTIDE P11-4 APPLICATION ON DENTIN NANO STRUCTURE IN IN-VITRO DENTIN CARIES MODEL USING SEM, FTIR AND SAXS METHODS

ABSTRACT

Aim: Structural effects of self-assembled peptide P11-4, silver diamine fluoride (SDF) and fluoride varnish applied to dentin caries; to determine the topographic, molecular and nanoscale three-dimensionally using SEM, FTIR and SAXS methods and to compare the p11-4 peptide with SDF and fluoride varnish.

Materials and Methods: Our study was planned to be carried out by preparing 40 dentin sections obtained from extracted human teeth and started following the approval of the Health Sciences University Hamidiye Scientific Research Ethics Committee with the decision numbered 46418926-050.01. After the third permanent molar teeth to be used were kept in distilled water containing 1% thymol for a maximum of 1 month under storage conditions at 4°C, dentin discs of 5x3x1mm were prepared. The prepared dentin discs were kept in a solution with a pH value of 5.0 at 37°C for 72 hours, resulting in the formation of artificial caries lesions. Then, the dentin discs were randomly divided into 4 groups. Materials prepared in accordance with the manufacturer's instructions; P11-4 was applied to the first group, SDF to the second group and fluoride varnish to the third group. After the application of the materials, the dentin sections were in the pH cycle for 28 days, respectively; 3 hours demineralization (2.2 mM CaCl2 · 2H2O, 2.2 mM KH2PO4 and 0.05 M acetic acid, pH: 5.0), 2 hours remineralization (1.5 mM CaCl2 · 2H2O, 0.9 mM KH2PO4 and 130 mM KCl, pH: 7.0), again 3 hours demineralization and kept in remineralization solution for 16 hours. The solutions used at the beginning of each cycle were prepared fresh.

After the pH cycle was completed, SEM, FTIR and SAXS analyzes were performed.

Results: For statistical evaluations, IBM SPSS Statistics 22 software was used. The suitability of the parameters to the normal distribution was evaluated with Kolmogorov-Smirnov and Shapiro Wilks tests and it was determined that the parameters did not show normal distribution. While evaluating the study data, Kruskal Wallis test was used to compare the parameters between groups and Dunn's test was used to determine the group

that caused the difference. As a result of the evaluations, it was understood that the P11-4 material showed similar properties with fluoride varnish.

Conclusion: In the light of the data obtained, P11-4 peptide may be a material to be used in biomimetic healing of dentinal caries.

Key Words: FTIR, P11-4, SAXS, SDF, SEM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü yaygın enfeksiyöz multifaktöriyel bir hastalıktır. Diş çürüğünün kavitasyon oluşturduğu zaman restoratif yöntemlerle tedavi edilmesi gerekmektedir. Diş çürüğünün mekanik yollarla uzaklaştırılıp restore edilmesi diş dokularının geri dönüşümsüz ve yıkıcı bir şekilde kaybedilmesine neden olmaktadır. Ancak günümüzde geleneksel yöntemlerle çürüğün mekanik olarak uzaklaştırılması yerine non-invaziv yollarla durdurulması ve tedavi edilmesi amaçlanmaktadır (1,2). Koruyucu ve durdurucu tedavilerin öneminin artması ile birlikte diş hekimliğimde birçok materyal geliştirilmiştir.

Amerikan Pediatrik Diş Hekimliği Birliği (AAPD) tarafından çürüğün önlenmesi ve durdurulması için flor kullanımının etkili ve güvenli olduğu bildirilmiştir (3). Çürüğün ilerlemesine karşı kullanılan florun, sürme öncesi ve sonrasında lokal olarak etki gösterdiği ile ilgili fikir birliği mevcuttur (4). Çürüğün önlenmesi ve durdurulması için altın standart olarak kullanılan florür değişik formlarda kullanılmaktadır (5). Diş çürüklerinin durdurulması için florür ajanları arasında gümüş diamin florür (GDF) çürük üzerine doğrudan uygulanabilir. GDF, gümüş ve florür iyonlarını içeren alkalen bir çözeltidir. Gümüş içeren bileşikler antimikrobiyal özellikleri nedeniyle diş hekimliği ve tıpta kullanılmaktadır (6). Diş hekimliğinde ilk gümüş bileşiği olarak kullanılan gümüş nitrat 1840 ‘larda, süt dişlerinde çürük oluşumunu engellemek amacıyla kullanılmıştır(7). 1960 ‘larda gümüş nitrat ile florürün sinerjistik etki elde edebilmek için kullanımının gerekliliği savunulmuştur (8). 2014 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde kullanılmak üzere, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S Food and Drug Administration, FDA), ilk GDF ürününü onaylamıştır (9)

GDF içeriğindeki gümüş iyonları, DNA sarmalı yapısını bozarak ve hücre duvarı sentezini engelleyerek bakterisid etki göstermektedir (10). GDF içeriğindeki florür iyonları ise çürüğün remineralizasyonunu sağlamaktadır. Yapılan ex vivo bir çalışmada, tedavi amacıyla GDF uygulanmış dişte durmuş çürük diş yüzeyinde yüksek oranda remineralize bölge gözlenmiştir (11). Başka bir ex vivo çalışmada ise etkilenmiş dentine GDF uygulandıktan sonra, etkilenmiş ve sağlam dentin ile karşılaştırıldığında benzer mikrosertlik değerleri bulunmuştur (12). Gümüş iyonları sebebiyle ölen bakteriler, canlı bakteriler ile tekrar karşılaştığında gümüş iyonlarını tekrar aktive eder. Aktive olan gümüş iyonları canlı bakterileri öldürür. Buna ‘’zombi etkisi’’ denilmektedir. Bu durum

gümüş iyonunun uzun süreli etkisinin sebebi olarak belirtilmiştir(13). Ayrıca GDF 'nin dentindeki kollajenazları inhibe ederek dentin kollajen yıkımını engellediği bildirilmiştir (14). Amerikan Pediatrik Diş Hekimliği Birliği mevcut kanıtlar doğrultusunda çocuklarda, ergenlerde ve özel gereksinimli bireylerde dentin çürüğünün durdurulması için GDF kullanımını tavsiye etmektedir (9).

Minedeki başlangıç halindeki çürüklerin durdurulması için geleneksel remineralizasyon ajanlarından farklı olarak, iyonların çökelmesine yardımcı bir iskelet oluşturan kendiliğinden birleşen peptid [self assembling peptide scaffolds (SAP)] olan P11-4 kullanılmaktadır (15). SAP, belirli termodinamik koşullar altında peptidler arasında spontane şekilde yapısal olarak birleşen ve düzenlenen yapılar olarak tanımlanmaktadır (16). P11-4 peptidi (Ac-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH2) laboratuvar ortamında sentezlenebilmektedir. Kendiliğinden birleşen oligomerik β yaprak yapısındaki peptidler; tek boyutlu nanobantları, nanobantlar şeritleri, şeritler fibrilleri, fibril çiftlerini ve fiberleri oluşturmaktadır (17). Ağırlıklı olarak anyonik olarak oluşan peptid fiberler, hidroksiapatit kristallerinin çökelmesini kontrol edebilen ve memeli iskeletindeki biyolojik makromolekülleri taklit edebilecek uygun yüzeyi sağlamaktadır. P11-4 fibrillerinin yüzey kalsiyum bağlayan bölgeleri, hidroksiapatit kristallerindeki kalsiyum iyon boşlukları ile tam olarak bağlanmakta böylece kristal oluşum hızı ve remineralizasyon artmaktadır (15,18). Bununla birlikte çürük alt yüzeyinin mikrosertliğinin arttığı da bildirilmiştir (19). Peptid bazlı remineralizasyon çalışmalarında P11-4 sıkça kullanılmaktadır. P11-4'ün kullanıldığı çalışmalarda, başlangıç lezyonlarının iyileştiği, herhangi bir yan etki oluşmadığı, oluşan fiber yapısının yüksek biyouyumluluğa sahip olduğu belirtilmiştir (20).

Mine dokusundaki başlangıç lezyonlarında P11-4 sıkça kullanılmasına rağmen dentin dokularında uygulanabilirliği belirsizliğini korumaktadır. Çürükten etkilenmiş dentinin P11-4 ile tedavisinin yapıldığı bir çalışmada; kollejenazların proteolitik aktivitesine karşı Tip 1 kollejenlerin direncinin arttığı, hibrit tabakanın stabilitesinin iyileştiği ve bağlanma gücünün sağlam dentine yaklaştığı belirtilmiştir (21). Dentin çürüğüne P11-4 içeren Curodont Repair™ 'in uygulandığı başka bir in-vitro çalışmada; çürükten etkilenmiş dentini sağlıklı dentine dönüştürebilen, adeziv restorasyonların ömrünü uzatan umut verici bir tedavi metodu olduğu gösterilmiştir (22).

Demineralize veya çürük dentinin, inorganik mineral benzeri materyallerle minerallerin dentin dokusuna tekrar kazandırılmasına "biyomimetik remineralizasyon" denmektedir (23). Biyomimetik remineralizasyon ile dentinin kompleks yapısının taklit edilmesi, tekrar oluşturulması amaçlanmaktadır ve aşamaların daha detaylı anlaşılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (24).

Dentinin yapısı mineye göre daha karmaşıktır. Mine ve dentindeki yapısal farklılar nedeniyle de dentin remineralizasyonu ve iyileşmesi için yeni materyaller ile çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla ilgili literatürde farklı materyaller kullanılarak çalışmalar yapılmaktadır (25). Ancak konu ile ilgili yapılan çoğu çalışmada değerlendirme kriteri olarak sadece demineralize dentinin remineralizasyonu değerlendirilmiştir.

Tez çalışmamızda, diş sert dokularında çürük durdurmak için kullanılan GDF, P11-4 ve flor verniğin, dentindeki yapısal etkilerini; topografik, moleküler ve nano ölçekte üç boyutlu olarak SEM, FTIR ve SAXS yöntemlerini kullanarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DENTİN YAPISI

Diş yapısının büyük bir kısmını oluşturan dentin, sarımsı beyaz renkte olup ışığa yarı geçirgen ektomezenşim kökenli bir tabakadır. Dentin dokusu, odontoblastların sentezlediği kollajen lifler ve bu liflerin üzerine çökelen hidroksi apatit kristallerinden oluşmaktadır. Dentin, hacimsel olarak %45-50 inorganik, %30 organik ve %20-25 sudan oluşan biyolojik bir dokudur. Dentinin ağırlık olarak %70'i inorganik madde %20'si organik madde %10'u sudur. Organik maddenin %18'i kollajen; %2'si kollajen olmayan peptidler, proteoglikanlar, büyüme faktörleri, fosfolipidler ve enzimlerden oluşur (Şekil 2.1A) (26). Dentinin inoganik bileşeni, kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşan hidroksiapatit kristalleridir. Dentini oluşturan hidtoksiapatit kristallerinin boyutu; kemikte bulunanlara kıyasla daha büyük, minedekilere göre ise çok daha küçüktür (27).

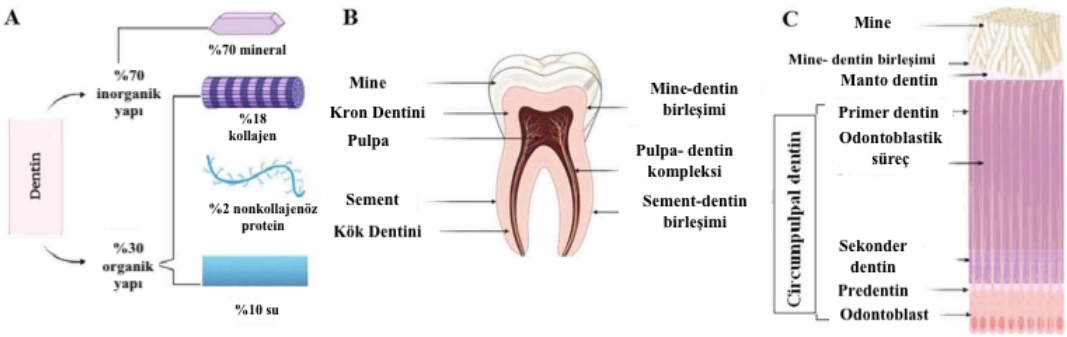
Dentin, dişin büyük bir kısmını oluşturan mineralize avasküler bağ dokusu olarak kabul edilmektedir. Kronda mine, kökte sement ile kaplıdır ve pulpa dokusunu tüm diş boyunca çevereler (Şekil 2.1.B) (26). Minenin altında oluşan ilk dentin tabakası manto dentin iken sementin altında oluşan ilk dentin tabakası Hopewell-Smith'in hiyalin tabakasıdır ve her ikisi de 15-30 µm kalınlığındadır. Sirkumpulpal dentin ise manto dentinin altındadır ve dentinin büyük kısmını kaplar. Sirkumpulpal dentin, intertübüler dentin ve peritübüler (intratübüler) dentinden oluşmaktadır ve pulpa boşluğuna doğru kalınlığı günde 4 µm artar. Peritübüler dentin, intertübüler dentin ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda sülfatlanmış proteoglikanlara ve daha az kollajen fibrilli minerallere sahiptir; bu nedenle intertübüler dentinden daha sert kabul edilmektedir (26,27).

Dentin, kronda pulpadan mine-dentin birleşimine, kökte pulpadan sement-dentin birleşimine kadar uzanan çok sayıda dentin tübülünü içerdiği için geçirgenliği fazladır. Dentin tübüllerinin yoğunluğu ve çapı değişkenlik göstermektedir. Tübüllerin çapı pulpaya yakın bölgelerde 2,5 µm iken mineye doğru gittikçe 0,9 µm'ye kadar daralmaktadır. Dentin kanallarının mm^2 'deki sayısı lokalizasyona göre 59.000-76.000 tübül arasında değişir. Dentin kanallarının yoğunluğu mine-dentin sınırında en düşük, predentin bölgesinde ise en yüksektir. Dentin tübülleri, intertübüler dentini çaprazlayarak

belirli açılarda genişledikçe üç boyutlu bir ağ oluşturan 1 µm çapında kollateral dallara sahiptir (28).

Dentin tübülü, odontoblast hücresinin uzantısı, proteoglikanlar, tenascin (Gelişme, hastalık veya yaralanma sırasında çeşitli dokuların hücre dışı matriksinde ve merkezi sinir sisteminin sınırlı nörojenik alanlarında eksprese edilir), transferrin ve albüminin birleşimini içeren serum benzeri bir sıvadan oluşmaktadır. Odontoblast uzantıları sadece pulpaya yakın olan dentin tübüllerinde mevcuttur. Ayrıca, odontoblastlar, dental papillanın ektomezenkimal hücrelerinden farklılaşır ve pulpanın çevresini hücresel bir çit gibi sarmaktadır. Dentin matriksi; kollajen tip I, III, V, integrin bağlayıcı sialoprotein, ekstrasellüler matriks fosfoglikoproteini, osteopontin, dentin matris protein 1 ve sialofosfo-protein gibi kolajen olmayan proteinlerden; dermatan sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve kondroitin sülfat gibi glikoproteinlerden oluşmaktadır (29).

Diş gelişimi ve organogenez sırasında, odontoblastlar, sirkumpulpal dentinin ana kısmını meydana getiren primer dentini oluşturur. Kök apeksinin kapanmasından sonra, daha yavaş bir tempoyla hayat boyu yapılan dentine sekonder dentin denilmektedir (Şekil 2.1.C) (26) . Sekonder dentin, primer dentinden daha az dentin tübülleri içerir ve genellikle ikisi arasındaki arayüzde bulanan dentin tübüllerinde bir bükülme vardır. Çevresel koşullara tepki olarak ve uyaranların şiddetine göre tersiyer dentin (reaksiyoner/onarıcı) denilmektedir. Çevresel etkenin sonucunda dontoblastlar reaksiyoner dentini, dental pulpa kök hücreleri ise onarıcı alanı oluşturmaktadır (30).



Şekil 2.1: Dentinin kimyasal bileşimi (A), dişi oluşturan dokular (B) ve dentinin histolojik yapısı (C) (30)

Mikron uzunluk ölçeğine göre krondaki dentin, kök dentinine benzer; kök dentininden farklı olarak, tübüler alanın oranı daha yüksektir ve tübüller kök bölgesinde düz iken kron kısmında hafif S-şeklinde bir eğri izler. Dentin tübülleri 2-6 µm genişliğinde peritübüler dentin ile çevrilidir. Bu da dentin mineral yoğunluğunun kronda kökten daha yüksek olduğunu ve predentinin kronda kökten önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermektedir (31).

Dentinin fiziksel ve biyolojik özellikleri dikkate alındığında kalınlığı yaklaşık 3-10 mm'dir. Ancak dentin kalınlığı, aynı dişin bölgesel kısımlarında, farklı dişler arasında ve yaşlanmaya bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Mine yarı saydam bir tabaka olduğu için dentinin rengi, diş rengini etkiler. Çünkü dentin, yaşlanmayla birlikte koyulaşan sarımsı renktedir. Radyografik görüntülerde dentin, düşük mineral içeriği nedeniyle mineden daha radyolusent iken sement ve kemikten daha radyoopaktır. Dentinin biyolojik döngüsünde replasman mekanizması yoktur. Ancak dentinde remodelasyon mekanizması; dişlerin aşınması, çürük, travma gibi iatrojenik etkenlerin sonucunda, odontoblastlar ve pulpadaki rezidüel kök hücreler tarafından sekonder ve tersiyer dentin üretilerek gerekleşmektedir (28).

Dentin; mekanik, termal, kimyasal ve ozmotik çevresel uyaranlara yanıt verebilen, canlı, hassas ve gözenekli bir doku olan kemik benzeri bir matristir (26). Dentin, kalınlığına, yaşına ve diğer değişkenlere bağlı olarak hem bariyer hem de geçirgen bir yapı olarak kabul edilebilir. Dentin tübüllerinden sıvı akışının gerçekleşmesi ve bu tübüllerin yönlü tasarımı, dentinin duyusal hidrodinamik bir işlevi olduğunu göstermektedir. 0,9–2,5 µm çapındaki mikro gözenekli dentin tübülleri, dentinin yüzey temas alanını %3,70–5,88 oranında artıran gözenekli mikro gözenekli boşluklar sağlar (32).

Dentinin mekanik özelliklerinden olan, elastik modülü ve sertlik pulpa tarafından mine-dentin ve sement-dentin birleşimine doğru kademeli olarak artar. Minenin aksine, dentin daha az kırılgandır ve bir viskoelastik özelliklere sahiptir. Bu elastikiyet, üzerini örten mineyi desteklemek ve kırılmasını önlemek için gerekli olan esnekliği sağlamak açısından önemlidir. Dentinin gerilme dayanımı kollajen tip I 'lerin fibröz dizilimlerinden, yüksek basınç dayanımı ve sertliği ise kollajen lifleri içinde biriken mineralize fazın kristalleri tarafından sağlanır (33).

Mine ve dentin, büyük oranda, kalsiyumdan fakir, karbonattan zengin hidroksi apatit (HAP) kristalitleri içermektedir. Minedeki HAP kristalitleri, dentine oranla daha büyüktür. Kristal boyutları dentinin hacimce % 50'sini, minenin ise hacimce %70'ini oluşturmaktadır. Dentin apatitin daha geniş yüzey alanı asitlere maruz kaldığında çözünme duyarlılığını arttırır ve dentin mineralinin yüksek karbonat içeriği nedeniyle bu duyarlılık daha da artar. Böylece dentin mineralleri mineden daha hızlı çözülür ve dentinde mineye göre daha az mineral bulunduğundan dentinde asit atağı daha hızlı ilerlemektedir (34).

2.2. DENTİN ÇÜRÜĞÜ

Diş çürüğü, kalsifiye dokuların yıkımı ve lokalize olarak çözünmesiyle sonuçlanan mikrobiyolojik infeksiyöz ve yaygın olarak gözlenen kronik bir hastalıktır. Çürüğün oluşabilmesi için uygun diş yüzeyi, karyojenik bakteriler ve bu bakterilerin gelişimini sağlayacak besinin mevcut olması gereklidir. Çürük, diş yapısındaki mineraller ile plak arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşur. Çürüğün oluşumuna sebep olan plaktaki bakteriler asidojenik özellikte olduğu için diş yapısını demineralize edebilmektedirler. Plak bakterileri, enerji sağlayabilmek için ortamda bulunan karbonhidratları metabolize edip yan ürün olarak organik asit meydana getirerek ortamın pH 'ının düşük olmasına sebep olur (35). Ortamda karbonhidrat olmadığında bakteri aktivitesi azalı, pH artar (36). Kritik pH değeri 5.5 olup bu değer yükseldikçe zarar görmüş diş yüzeyi remineralize olmaya başlar. Sağlıklı dişlerde dentin direkt olarak tükürük, plak ve mikroorganizmalarla temas halinde olmadığı için, dentin çürüğü mine çürüğünün ilerlemesi veya periodontal yıkım sonrasında dentinin açığa çıkması ile gözlenebilir. Dentinin yapısı mineden farklı olduğu için dentin çürüğü minedekine göre daha hızlı ilerler ve daha komplekstir. Dentinin organik içeriği % 30 'lara yakındır. Bu sebeple asidojenik bakteriler tarafından hem inorganik hem de orgonik yapı yıkıma uğramaktadır. Organik yapının yıkımında bakterilerin proteolitik enzimleri, dentin ve tükürükte bulunan matriks metalloproteinazlar (MMP) etkilidir (37). Ayrıca dentin, mineye göre daha porözlü olduğu için bakteri ve bakterilerin yıkıcı enzimleri dentin dokularına daha hızlı etki edebilmektedir (38).

Dentin çürüğü klinik olarak enfekte ve enfekte olmayan dentin çürüğü olarak gözlenmektedir. Enfekte dentin çürüğü, el aletleri ile kaviteden uzaklaştırılabilecek kadar yumuşak ve sarımsı renktedir. Bu tabakada asidürik, proteolitik bakteriler bulunmaktadır

(39). Dentin dokusunun organik ve inorganik yapısı irreversible bir şekilde bozulmuştur (40). Bu sebeple dentin dokusu remineralize olamaz ve restorasyondan önce tamamının uzaklaştırılması gereklidir. Enfekte olmayan dentin tabakası ise etkilenmiş dentin tabakası olarak da adlandırılmaktadır. Bu tabakadaki remineralize olmasına ragmen dentinin organik yapısında irreversible bir yıkım gözlenmez. Bu tabaka remineralize olabileceği için kaviteden uzaklaştılmasına gerek yoktur (40,41).

Dentin çürüğünün sebep olduğu yapısal değişimler sonucunda mikroskobik değişimlere göre 4 farklı tabaka gözlenebilmektedir. Bunlar; enfekte, bulanık, saydam ve subtransparent dentin tabakalarıdır. Enfekte dentin tabakası, yumuşak mantarımsı görünümde, bakterilerden zengin ve tamir edilemeyen çürüğün en dış tabakasıdır. Bulanık dentin tabakası bakteriyel invazyon tabakası olarak da adlandırılan bakterilerin dentin tübüllerine invaze olduğu tabakadır. Dentinin inorgonik yapısı irreversible bir şekilde deformasyona uğramıştır (40,41). Bu nedenle bulanık dentin tabakası da restorasyon yapılmadan önce mutlaka kaviteden uzaklaştırılmalıdır (40–42). Saydam dentin tabakasında, organik yapının bir kısmının yapısal olarak deformasyona uğramasına rağmen kollajen çapraz bağlar bozulmadığı için remineralize olabilmektedir. Dentin kanallarının lümenlerine büyük kristaller çökelmiştir (43). Hasta operatif işlemler esnasında bu tabakadayken hassasiyet hissedebilmektedir (38,43). Subtransparent dentin tabakasında ise intertübüler alanlarda demineralizasyon olmasına rağmen bakteriyel invazyon gözlenmemektedir. Dentin tübüllerinin lumen kısmında ise küçük kristaller çökelmiştir. Odontoblastların uzantları bazı bölglerde zarar görebilmiş olsada devamlılıklarını sürdürmektedirler. Bu nedenle bu tabakadayken de uyaranlara bağlı olarak ağrı hissedilebilmektedir. Bu tabaka da remineralize olabilir ve altında sağlam dentin dokusu bulunmaktadır (38,43).

2.3. KRİTİK pH

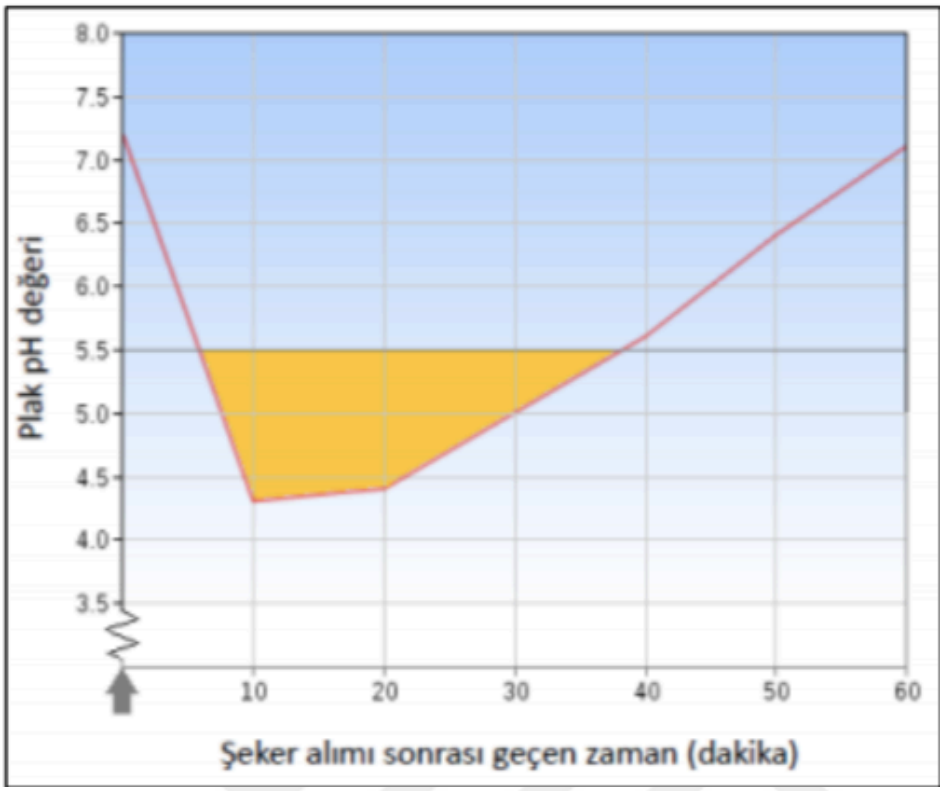
Bir solüsyonun, belirli bir mineralle doygun hale geldiği pH değeri kritik pH'tır. Çözeltinin pH değeri, kritik pH'ın üstündeyse, çözelti minerale aşırı doygundur ve mineral çökme eğilimindedir. Bu durumun tersine çözeltinin pH değeri, kritik pH'ın altındayse çözelti doygun halde değildir ve doygun hale gelene kadar daha fazla mineral çözebilecektir (44).

Mine dokusu gibi, belirli bir mineralle temas halinde olan çözeltiler için kritik pH değerinden bahsedilebilir. Örneğin tükürük ve plak sıvısı diş minesi ile tamas halindedir

ve diş minesine göre Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarına aşırı doygun haldedir. Bu nedenle diş minesi tükürükte çözünmeye uğramaz. Bununla birlikte bazı yazarlara göre, tükürük ve plak sıvısı Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarına aşırı doygun olamaz (45).

Diş minesi esas olarak hidroksi apatit ve kalsiyum hidroksi apatitten [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] oluşmuş olup karbonat ve florid gibi çözünürlüğü etkileyebilecek iyonları da içermektedir. Bu iyonların oranları dişten dişe farklılıklar gösterebilir ve HAP çözünürlüğünü etkileyecek tüm faktörler minenin çözünürlüğünü de etkilemektedir. Bu nedenle de minenin temas halinde olduğu sıvılardan bağımsız olarak, kritik pH değeri çözeltide bulunan Ca^{2+} ve PO_4^{3-} iyonlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (44). Plak pH 'ının, kritik pH değerinin altına düşmesi çürük oluşumunun başlangıcı olarak kabul edilmektedir (44,46,47).

Stephan adlı araştırmacı tarafından tanımlanmış olan "Stephan Eğrisi", ağzın sükroz solüsyonu ile çalkalanmasından sonra plak pH 'ında ortaya çıkan değişiklikleri göstermektedir (Şekil 2.2) (48). Gıda tüketimi olmadığı zamanlarda plak pH değeri nötral değere yakındır. Karbonhidrat tüketiminde ise karyojenik mikroorganizmaların fermantasyonu sonucunda ortaya çıkan asitlere bağlı olarak da pH değeri düşüşe geçer ve ortamın nötralizasyonu için yaklaşık 30-60 dk zaman gereklidir (48,49).



Şekil 2.2: Stephan eğrisi (52)

2.4. DEMİNERALİZASYON

Koruyucu ve patolojik faktörler arasındaki dengesizlik sebebiyle diş sert dokularından apatit kristalitlerinin çözünmesi ile birlikte kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların kaybı demineralizasyon olarak adlandırılmaktadır (50). Ağız içerisindeki pH değerinin kritik pH seviyesinin altına düşmesiyle birlikte diş sert dokularında demineralizasyon başlamaktadır (51). Kritik pH'ın düşmesiyle birlikte hidrojen iyonları plaktan diş yüzeyine, diş sert dokularından çözünen iyonlar ise hem tükürük hem de plağın içerisine geçmektedir (Şekil 2.3)(52). Diş sert dokularından mineral kaybının artmasıyla birlikte pörözite ve pürüzlülüğün de arttığı gözlemlenmektedir (53).

Demineralizasyon gözle görülür seviyeye ulaşmadan çok önce atomik seviyede başlamaktadır. Atomik seviyede demineralizasyonun gerçekleşebilmesi için öncelikle diş plağında bulunan asidojenik bakterilerin fermente olabilen karbonhidratları metabolize ederek organik asitleri üretmesi gerekmektedir. Asitler diş sert dokusundaki kristallerinin arasına diffuze olarak kalsiyum ve fosfatın çözünmesine sebep olmaktadır (54). Bu aşama, kavitasyonla sonuçlanabilecek diş çürüğü oluşumu sürecinin ilk aşaması olarak kabul edilmektedir (50,54).

Tekrarlayan asit atakları ve plak pH değerinin kritik pH değeri altına sık sık düşmesi mine dokusunda 20-50 μm derinliğinde mikrokanallar oluşmasına sebep olmaktadır. Bu derinlikte gerçekleşen mineral kayıpları sonucunda diş mine yüzeyinde meydana gelen optik değişimler ile opak görünüme neden olmaktadır. Bu opak görünüm demineralizayonun en erken klinik belirtisi olup beyaz nokta lezyonları olarak adlandırılmaktadır. Mine dokusunda demineralizasyon yüzey altından başlayıp lezyon gövdesinde pörözlü mineral yüzeyin oluşmasıyla devam ederken dentin dokusunda demineralizasyon yüzeyden başlamaktadır (55).

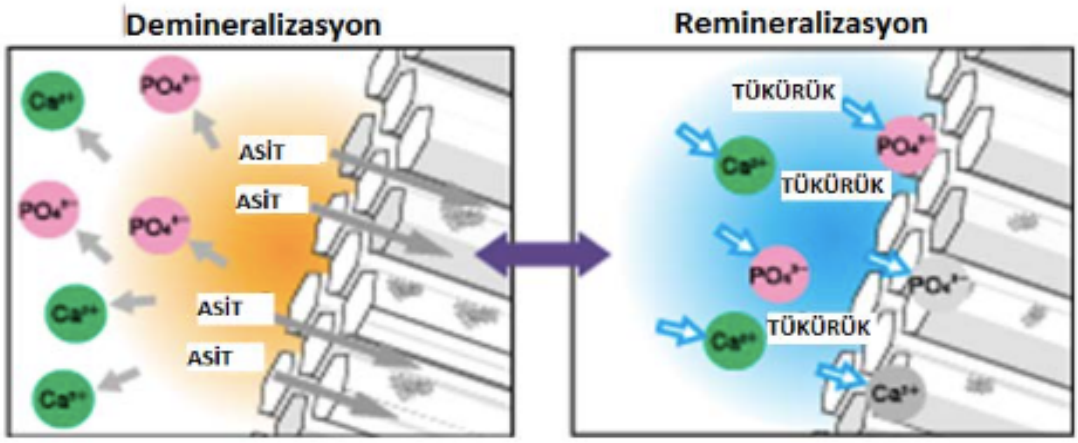
2.5. REMİNERALİZASYON

Mineral kazanımını tanımlamak için remineralizasyon terimi kullanılmaktadır (56). Remineralizasyon, plak pH değerinin 5,5'in üstüne çıktığı alkali ortamda, dışsal kaynaklardan sağlanan kalsiyum ve fosfat iyonlarının demineralize olmuş dental sert dokulara yeniden çökelmesidir (57,58). Karyojenik bakteriler, fermente olabilen karbonhidratlar ve tükürük gibi faktörler olduğu sürece ağız içerisinde demineralizasyon ve remineralizasyon döngüleri devam etmektedir (Şekil 2.3)(48,52). Patolojik ve koruyucu faktörler arasındaki dengenin değişimi demineralizasyon veya remineralizasyon olup olmadığını belirlemektedir (54). Ağız içerisindeki bu dengenin demineralizasyon lehine bozulması sonucunda çürük oluşmaktadır (54,57,58).

Remineralizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan kalsiyum ve fosfat öncelikle tükürükten, ancak muhtemelen topikal kaynaklardan sağlanıp, ortamda bulanan florür yardımıyla mevcut kristal yapıların üzerine diffüze olmaktadır (59). Ağız içerisinde bulunan florürler kalsiyum iyonlarına yüksek affinite gösterip bağlanarak, apatit kristallerine absorbe olmaktadırlar. Oluşan bu yapı sonrasında da fosfat iyonları diş sert dokularına yeniden çökelip florapatit benzeri bir yapı ortaya çıkarmaktadırlar. Yeniden yapılanan kristal, daha sonra gerçekleşek asit ataklarına karşı daha dirençli olup, orijinal karbonatlı hidroksi apatit mineralinden daha az çözünmektedir (54).

Başlangıç çürüklerinin remineralizasyonu için gereken florür miktarının, çürük oluşumunu engellemek için gerekenden daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (60,61). Yeniden yapılanmış kristallerin daha büyük ve daha fazla mineral içermesine rağmen dağınık ve rastgele dizilim göstermeleri sebebiyle sağlıklı diş yüzeyi kadar sağlam bir yüzey oluşturulamadığı belirtilmiştir (62) .

Remineralizasyonun mine dokusunda genellikle dış yüzeyden başladığı, iç yüzeylere doğru ilerledikçe azaldığı dentin dokusunda ise remineralizasyon hızının çok düşük olduğu bildirilmiştir (61).



Şekil 2.3: Demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsü (52)

2.6. İN-VİTRO DENTİN ÇÜRÜĞÜ MODELLERİ

Çürük lezyonlarının oluşması ve tedavi edilmesine yönelik aşamaların incelenmesi için yapılan çalışmalarda in-vitro olarak çürüğün oluşturulması büyük önem taşımaktadır. İn-vitro çürük oluşumunu sağlayabilmek için ağız ortamının benzerini oluşturmaya yönelik çeşitli sistemler bulunmaktadır. Çürük modellerini yapay olarak oluştururken, çürüğe sebep olabilecek faktörlerin çoğu bir araya getirilerek tüm bilgiler göz önünde bulundurulmalıdır (56,63).

Günümüzde yapılan çalışmalarda, restorasyon veya remineralizasyon amaçları ile uygulanan materyallerin antibakteriyel özellikleri, florid salınımı ve remineralizasyon gibi etkilerini değerlendirmek için in-vitro çürük modelleri kullanılmaktadır (64,65).

2.6.1. Biyofilm Modeli

Bakterilerin ürettiği asitlerin kullanımı ile oluşturulan in-vitro demineralizasyon yöntemi biyofilm modeli olarak tanımlanmaktadır. Bu model kullanılarak yapay çürük oluşturabilmek için, diş numuneleri mutans streptekoklar gibi asidojenik bakterilerin bulunduğu solüsyonlara konularak aside maruz bırakılmaktadır.

Biyofilm modelinde bakteri kültürleri ile birlikte bu bakterilerin canlı kalabilmelerini sağlayacak besinler bulunmaktadır. En çok kullanılan bakteri türü mutans streptokokları iken en sık kullanılan besleyici ajan sükroz ve yapay tükürükten oluşan Todd-Hewith bileşimidir (66–68). Bu yöntemin uygulanması ve hazırlık sürecinde; ortamda bulunan kalsiyum, fosfat, florid gibi iyonların kontrollü olmaması, besleyici ajanların sürekli taze olması gerekliliği ve pH değerindeki düşüşlerin kontrol edilememesi gibi zorlukların bulunduğu belirtilmiştir (69,70).

2.6.2. Kimyasal Olarak Oluşrulan İn-vitro Çürük Modeli

Kimyasal olarak oluşturulan in-vitro demineralizasyon çürük modelleri, hazırlanan numunelerde demineralizasyon ile remineralizasyon süreçlerinin oluşturulabilmesi için asit ve asit tamponlarının kullanıldığı yöntemlerdir. Bu yöntemin 2014 ve 2016 yılları arasında yapılan in-vitro çalışmalarda % 87 oranında kullanıldığı bildirilmiştir (71).

2.6.2.1. pH siklus modeli (demineralizasyon ve remineralizasyon döngü modeli): pH siklusu modeli ilk olarak 1982 yılında ten Cate ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (72). Bu modelde, pH değerinin düşük olduğu ortamda gerçekleşen demineralizasyon ve pH değerinin nötr olduğu ortamda gerçekleşen remineralizasyon aşamalarının in-vitro olarak taklit edilip tekrarlanması amaçlanmaktadır (63). Demineralizasyon ve remineralizasyonun gerçekleşebilmesi için farklı solüsyonların hazırlanması gerekmektedir. Demineralizasyon aşaması için pH değeri 4 ile 4,5 arasında olan asetik asit, kalsiyum-fosfat içeren çeşitli asidik solüsyonlar kullanılırken, remineralizasyonu gerçekleştirmek pH değerinin yaklaşık 7 olduğu tükürüktekine benzer seviyelerde kalsiyum-fosfat gibi iyonların eklendiği solüsyonlar uygulanmaktadır. Hazırlanan numunelerin belirli aralıklarla ve taze olarak hazırlanan demineralizasyon sonra remineralizasyon solüsyonunda bekletilmesi gerektiği belirtilmektedir (63,73).

2.6.2.2. Asit tamponlar kullanılarak oluşturulan in vitro demineralizasyon modeli (basit demineralizasyon modeli): Yapay çürük oluşumu sırasında kalsiyum ve fosfat iyonlarını içeren asit jellerin ve tamponların kullanıldığı en basit yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem sırasında demineralizasyonun oluşturulabilmesi için düşük pH değerinde olan tek bir solüsyon kullanılmaktadır. Bu solüsyonlar hazırlanırken içerisinde bulunan kalsiyum, fosfat, florid iyonlarının oranlarına ve pH değerinin 4,5-5 arasında olmasına dikkat edilmelidir. Diş numunelerinin hazırlanan

solüsyona maruz bırakılması sonucunda oluşan lezyonların histolojik açıdan doğal lezyonlara benzediği bildirilmiştir (71,74–76).

Basit demineralizasyon yönteminde lezyonları oluşturulabilmek için laktik asit, asetik asit gibi hafif organik asitler kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan organik asitlerin, inorganik asitlere göre histolojik olarak doğal çürüğe daha benzer özellikte çürük oluşturabildiği gözlenmiştir (77). Laktik asit, sitrik asit gibi organik asitlerin lezyon oluşumunda kullanılabileceği ancak hidroklorik asit gibi inorganik asitlerin yeterli lezyon derinliği oluşturulamadığı ve bu sebeple tercih edilmemesi gerekitiği bildirilmiştir (74).

Asit tamponlar kullanılarak yapay çürük oluşturulan çalışmalar olmasına rağmen kullanılan asit tamponlarının sürekli yenilenememesi, remineralizasyon ve tükürüğü taklit eden bir aşamanın bulunmayışı, numune örnekleri üzerinde jellerin kalıntılarının kalması gibi sebepler nedeniyle ortaya çıkan sonuçların güvenilirliğinin şüpheli olduğu bildirilmektedir (78,79).

2.7. ÇÜRÜK YÖNETİMİNDE KULLANILAN GÜNCEL MATERYALLER

Çürük oluşumu sürecinde meydana gelen demineralizasyon aşamasının engellenmesi ve tamir sürecinin başlaması için gereken remineralizasyonun sağlanabilmesi için altın standart olarak florid uygulamaları kullanılsa da farklı içerikte materyallerin kullanımı ile ilgili çalışmalar yaygınlaşmaktadır (84-90). Çürük yönetiminde kullanılabilecek olan materyaller genel olarak mineral teknolojileri, şeker alkolleri, bitkisel kaynaklı ürünler, biyoaktif-nanoteknolojik ürünler ile kalsiyum fosfat içerikli ürünler olarak sınıflandırılabilmektedirler (80).

Çürük yönetiminde; flor, gümüş ve demir gibi iyonlar kullanılmaktadır. Flor iyonu, plak içerisindeki mikroorfanizmalrın asit üretimini engelleme, florapatit kristalleri oluşturma, kalsiyum ile fosfat iyonlarına yüksek affinite gösterme ve bakterisid özellikte olmaları nedeniyle demineralizasyonu azaltıp remineralizasyonu arttırmaya yardımcı olmaktadırlar (81,82). Gümüş içerikli bileşiklerin, pH'ın düşük olduğu ortamda farklı bileşikler içerisinde kullanılarak uygulanması ile demineralizasyonu azalttığı ve remineralizasyonu arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (83–85). Demir iyonunun ise tek veya flor iyonu ile komnbine olarak kullanımında pH düştüğü zaman S. mutans bakterisinin glikoziltransferaz enzimine etki gösterek bakterisid ve bakteriyostatik etki

gösterdiği bilinmektedir. Bu şekilde demineralizasyonu azaltıcı etki gösterirken remineralizasyonu arttırıcı etki göstermediği belirtilmiştir (86,87).

Çürük yönetiminde şeker alkolleri olarak ksitilol, izomalt ve sorbitol kullanılabilmektedir. Ksilitol 5 karbonlu şeker alkolü olup etki mekanizması tam olarak açıklanamasa bile kariyojenik bakterilerin diş yüzeyine tutunmalarına engel olduğu, tükürük akış hızını arttırdığı, pH değerini alkaliye çevirdiğini, S. mutans miktarını azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (88–91). İzomalt, kalsiyuma bağlanma affinitesi yüksek olan bir şeker alkolü olduğu için remineralizasyonu arttırdığı belirtilmektedir (92). Yapılan bir çalışmada, ksilitol ile karşılaştırıldığında biyofilm tabakasını uzaklaştırmak için gerekli olan izomalt miktarının ksilitolden daha fazla olduğunun gözlenmesi bir dezavantaj olarak belirtilmiştir (93). Yapılan başka bir çalışmada ise izomaltın remineralizasyon etkinliği gösterebilmesi için ortamda flor iyonunun bulunması gerektiği belirtilmiştir (94). Ksilitol ile izomalt karyojenik bakteriler tarafından fermente edilemezken sorbitol fermente edilebilir ve çok az oranda asit ürettikleri için karyojenik olmayan şekerlerden kabul edilmektedir (95–97). Yapılan çalışmalar sorbitolün çürük önleme etkinliğinin ksilitolden daha az olduğu göstermiştir (98,99).

Kitosan, galla chinensis, üzüm çekirdeği ekstresi (polifenoller) ve teobramin çürük yönetiminde kullanılabilecek olan bitkisel kaynaklı ürünlerdendir. Doğada en sık bulunan polimerlerden olan kitosanın oral kavitede oluşan asitleri tamponlayabilme özelliği bulunmaktadır (100). Ayrıca yapılan çalışmalarda kitosanın asidojenik bakterilerin diş yüzeyine adezyonunu engellediği gösterilmiştir (101,102). Geleneksel bir Çin bitkisi olan G. chinensis içerisinde bulunan farklı bileşiklerin demineralizasyonu engelleyebildiği gösterilmiştir (103). Yapılan çalışmalarda G. chinensis bitkisinin demineralizasyonu azaltıp remineralizasyonu arttıcı etkisini, çürük lezyonunun üst tabakasındaki remineralizasyonu azaltıp yüzey altındaki lezyona iyonların geçisini hızlandırarak etki ettiği gözlemlenmiştir (104,105). Polifenollerden olan proantosiyanid üzüm çekirdeği ekstresinde yüksek oranda bulunmaktadır ve glikoziltransferaz enzimini inhide etmektedir. Bu enzimin inhibe olması ile karyojenik bakterilerin dental sert dokulara adezyonunu engellediği ve mineral birikimini arttırıp remineralizasyonu sağladığı yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (106–109). Kakao bitkisinden elde edilmekte olan teobramin ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmamış olmasına rağmen, plak

birikimini ve karyojenik bakterileri azaltıp apatit formasyonunu arttırarak demineralizasyonu inhibe ederek remineralizasyonu arttırdığı kanıtlanmıştır (110–112).

Kalsiyum sodyum fosfosilikat (biyoaktif cam / Novamin), trikalsiyum silikat, kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP), kazein fosfopeptid amorf kalsiyum florid fosfat (CPP-ACFP), trikalsiyum fosfat, kendiliğinden birleşen peptidler vb. gibi değişik içeriklerde bir çok biyoaktif, nanoteknolojik ve kalsiyum içeren bileşik de çürük yönetimi için kullanılmaktadır. Biyoaktif camlar tükürük ile temas ettikten sonra kısa süre içeresinde hızlı bir iyon salınımı gerçekleştirerek hidroksiapatit benzeri bir yapı meydana getirdiği böyleye remineralizasyonu da arttırdığı biyoaktif cam içeren macunlarla yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (113–115). Biyoaktif bileşiklerden olan trikalsiyum silikatın dental sert dokular üzerinde apatit oluşumunu desteklemesi özelliği sebebiyle demineralizasyonu azaltıp remineralizasyonu arttıran biyouyumlu bir materyaldir (116,117). CPP-ACP, kalsiyum ile fosfatı bağlama özelliği dolayısıyla rezervuar etki gösteren, bakteriyel adezyonu ve demineralizasyonu engelleyerek çürük durdurma etkisi bulunan bir bileşiktir(118–122) . CPP-ACP içeren materyallerin florid ile birlikte sinerjik etki yaratacağı bilinmesi sebebiyle de CPP-ACFP içeren materyallerin kullanımı ve yapılan araştırmalar hız kazanmıştır(123,124). Kendiliğinden birleşen peptidler ise biyomimetik bir iskele oluşturan ve bu iskele üzerinde remineralizasyonun gerçekleşmesine fırsat veren yapılardır (125). Başlangıç çürük lezyonlarının noninvaziv tedavilerinde kullanılabilecek basit bir tedavi yöntemi olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (20,55,126–128).

Bu materyaller dışında özellikle dentin dokusunun biyomineralizasyonunda; poliakrilik asit, polivinilfosfonik asit, sodyum trimetafosfat, fosforilize kitozan, poliamidoamin, poliamidoamin dendrimerleri, polidopamin, L-glutamik asit ve oligopeptid gibi biyomimetiklerin kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (129,130).

Çürükten korunma, çürüğün durdurulması ve tedavi edilebilmesi için güncel olarak kullanılan, araştırılan çok sayıda materyaller bulunmaktadır. Bu materyaller içerisinden tez çalışmamızda kullandıklarımız sodyum florür vernik, gümüş diamin florür ve kendiliğinden birleşen peptid olan P11-4'tür.

2.7.1. Sodyum Florür Vernik

Günümüzde çürükten korunma ve çürüğü durdurmada altın standart olarak florid gösterilmektedir (131). Yapılan çalışmalarda kullanılan floridin çürük lezyonunu engellemede demineralizasyon ve remineralizasyon aşamalarına topikal olarak etki ettiği gösterilmiştir (132,133). Bunun yanında çürüğün önlenmesinde sistemik flor kullanımının yerine topikal olarak kullanımının daha etkili olduğu belirtilmiştir (132–134). Topikal olarak kullanılacak florid içerikleri, konsantrasyonları ve uygulama yöntemlerine göre sınıflandırılabilmektedir. Vernik, jel, solüsyon cila gibi yüksek konsantrasyonlu florür uygulamaları diş hekimleri tarafndan belirli bir sıklıkta uygulanırken; diş macunu, diş ipi, gargara, sakız gibi düşük konstrasyonlu florür uygulamaları hasta tarafından sürekli olarak kullanılabilmektedir (135–139). Hastanın kullanabileceği veya hekim tarafından uygulanabilecek çeşitli flor içerikleri bulunmaktadır. Bunlar;

1. Organik florid bileşikleri (silan florid, amin florid vb)
2. İnorganik florid bileşikleri (sodium florür, stannöz florid, amonyum florid vb.):
3. Monoflorofasfat içerikli bileşikler

Bu bileşikler hidrolize olarak serbest flor iyonlarını ortaya çıkararak etki göstermektedirler (135).

Topikal florid uygulamalarının remineralizasyon ve antimikrobiyal etkinliği bulunmaktadır. Topikal florid uygulamaları, S. mutans ve laktobasiller gibi karyojenik bakterilerin metabolizmalarını bozarak antimikrobiyal etki gösterirken ortamın pH değerinin artmasına bu sebeple de remineralizasyona etki etmektedirler. Ayrıca florid iyonları hidroksiapatit molekülünde bulunan hidroksil iyonları ile reaksiyona girerek restoroatif materyallerin reşarj olmasına sebep olmaktadırlar (140).

Florid içerikli vernikler, yeterli miktarda flor içermesi ve yutma riskinin minimum olması sebebiyle güvenilirdir ve sıklıkla kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, Amerikan Pediatrik Dişhekimleri Birliği (AAPD-American Academy of Pediatric Dentistry) ve Avrupa Pediatrik Diş hekimleri Birliği (EAPD-European Academy of Paediatric Dentistry), Amerikan Diş Hekimleri Birliği (ADA), Türk Dişhekimleri Birliği (TDB) ve Türk Pedodonti Derneği (TPD), çocuklara fluoridli vernik uygulamalarının

profesyonel olarak diş hekimleri tarafından belirli sıklıklarla yapılmasının diş çürük riskini azaltacagı bildirilmektedirler (141–144).

Profesyonel olarak kullanılan topikal florid vernik uygulamalarında en yaygın olarak 22,600 ppm flor iyonu içeren % 5'lik sodyum floridli verniktir. Çürük riski bulunan çocuklarda altı ayda bir profesyonel olarak uygulanan florid uygulaması tavsiye edilmektedir. Ayrıca 6 yaşından küçük çocuklarda uygulanabilecek topikal florid uygulaması da florid verniktir (145).

Çocuklarda kullanılabilecek çeşitli içeriklerde florid vernik preperatları bulunmaktadır (146–154). Bu vernik preperatlarının piyasa formları ve içerikleri Tablo 2. 1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Florid vernik piyasa formları

Ürün İsmi	Florür Miktarı	Üretici Firma	Ülke
Duraphat	22.600 ppm	Colgate	ABD
Fluor Protector S	7.700 ppm	Ivoclar Vivadent	Liechtenstein
White Varnish	22.600 ppm	3M ESPE	ABD
Cervitec F	900 ppm	Ivoclar Vivadent	Liechtenstein
Enamelast	22.600 ppm	Ultradent	ABD
Proshield Varnish	22.600 ppm	President Dental	Almanya
Citrine Varnish	22.600 ppm	Dharma	ABD
Prevident Varnish	5.000 ppm	Colgate	ABD
Polimo Varnish	22.600 ppm	Imicryl	Türkiye
V-Varnish	22.600 ppm	Vericon	Kore

2.7.2. Gümüş Diamin Florür

Gümüş diamin florür (GDF), alkalen özellikte olup topikal olarak uygulanabilen gümüş ve flor iyonlarını içeren çözeltidir (155). Gümüş içeren bileşikler farklı seviyelerde antimikrobiyal özellikte oldukları için tıp ve diş hekimliğinde geniş kullanım alanları bulmaktadır (156). Gümüş iyonunun antimikrobiyal etkisi ile flor iyonunun çürük önleyici etkisi birleştirilerek 1969 yılında Japonya 'da GDF çözeltisi oluşturulmuştur (157). GDF, 2014 yılında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S Food and Drug Administration, FDA) tarafından dental hipersensitivite tedavisi için, 2021 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından çocuklar için

kullanılabilecek zorunlu ilaçlar listesinde çürük durdurucu olarak kabul edilmiştir (158,159). Amerikan Pediatrik Diş Hekimliği Birliği (The American Academy of Pediatric Dentistry, AAPD) de, özel gereksinimli çocuklar da dahil olmak üzere çocuk ve ergenlerde GDF kullanımını önermektedir (160). GDF solüsyonun %12, %30 ve %38 gibi değişik konsantrasyonda formları bulunmakla beraber en yaygın kullanılanı %38 'lik olan formlarıdır (161). Bu preperatların piyasa formları ve içerikleri Tablo 2. 2'de gösterilmiştir (162).

Tablo 2.2: GDF piyasa formları

Ürün Adı	GDF Konsantrasyonu	Florür Konsantrasyonu	Üretici Firma	Ülke
Advantage Arrest	%38	44.800 ppm	Elevate Oral Care	ABD
Cariestop	%12	14.000 ppm	Biodinamica	Brezilya
	%30	35.400 ppm		
fAgamin	%38	44.800 ppm	Tedequium S, R, L	Arjantin
Fluoroplat V	%38	44.800 ppm	Laboratorious Naf	Arjantin
Seforide	%38	44.800 ppm	J,Morita; Toyo Seiyaku Kasei Ltd.	Japonya
Rivastar	%35-40	44.800 ppm	SDI Dental Ltd.	Avustralya
Cariostasul	%10	11.800 ppm	Iodontosul	Brezilya
	%12			
	%30			
Ancarie	%12	14.100 ppm	Maquira	Brezilya
	%30	35.400 ppm		

GDF ‘nin etki mekanizması dört ana başlık altında toplanmıştır. Bunlar:

1. Antibakteriyel etki
2. Dental dokularda demineralizasyonu engelleyip remineralizasyonu indüklemek
3. Kollajen matriks yıkımını sağlayan kollejenaz enzimini inhibe ederek
4. Çürük durdurma ve önleme etkisi

GDF ‘nin antibakteriyel etkisi Ag iyonları aracılığıyla bakterilerin etkisiz hale getirilmesi ve biyasidal aktivite göstermesi ile açıklanmaktadır. Etkisiz hale gelen bakteriler tarafından zehirli katyonlar serbest hale geldiği için daimi bir rezervuar etkisi gözlenmektedir. Rezervuar etki bakteri ve dentin tübüllerinde biriken Ag iyonlarının antimikrobiyal etkisini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca tükürükte de Ag iyonlarının artışı ile oral kavitede yayılım sağlanabilmektedir (163).

Ag ve F iyonları mine ve dentin dokularına çeşitli derinliklerde etki etmektedirler. Bu derinlik mine dokusu için 25 mikron iken dentin dokusu için 50 ile 200 mikron arasında değişkenlik göstermektedir. GDF bileşiği ise yaklaşık olarak 150 mikron derinliğindeki çürüklere etki edebilmektedir (164). GDF uygulanan dental dokulardaki çürüklerde mineral yoğunluğunun artmasına bağlı olarak biyomineralizasyonun arttığı ve dokulardaki direncin sağlıklı dental dokulara göre daha çok arttığı gözlenmiştir (165,166).

Dental sert dokularda gözlenen çürük sonucunda tip I, II ve III kollajenleri matriks metalloproteinizlardan (MMP) olan MMP-8 ile sistein ve katepsin enzimleri sebebiyle degrade olmaktadırlar. GDF uygulamasının, MMP’ leri, sistein ve katepsini inhibe ettiği belirtilmiştir (167).

AAPD’nin uygulama rehberlerine göre GDF kullanımı; çürük riski yüksek olan, hem anterior hem de posterior süt dişlerinde dentin çürüğü olan, pulpanın etkilenmediği aktif çürük lezyonları bulunan, davranış problemleri olan, dental tedavi hizmetlerinin sınır olduğu bölgelerde yaşayan ve mikro fırça ile ulaşılabilecek lokasyonda çürük lezyonu bulunan çocuk hastalarda kullanımı endikedir. Ancak çürüğe bağlı olarak spontan ağrısı olan, klinik ve radyografik olarak pulpaya yakın çürük varlığında, gümüş alerjisi bulunan ve renkleşme ihtimalini kabul etmeyen hastalarda GDF kullanımı kontrendikedir (162).

GDF uygulaması ağrısız, basit uygulanabilen ve erken çocukluk çağı çürüklerinde uygulanabilecek alternatif bir tedavi yöntemidir. Ayrıca kooperasyonu zayıf olan, özel gereksinimli bireylerde minimum iş birliği gerektirdiği için geleneksel yöntemlere göre daha avantajlıdır (168). En önemli dezavantajı ise uygulama sonrası gerçekleşen siyah renkleşelerdir ve bu durum hastaları estetik olarak memnuniyetsiz hale getirebilir. Bununla birlikte %38'lik GDF içerisindeki florür miktarı 44.800 ppm olduğu için küçük çocuklarda florozise neden olma ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle çok sık uygulanmaması gereken bir material olduğu belirtilmiştir. GDF uygulaması sırasında ağızda metalik bir tat bırakabılir ve mukazada beyazlaşma görünebilir. Bu durumun birkaç gün içerisinde kendiliğinden geçeceği belirtilmiştir (166,168). GDF'nin en önemli dezavantajı olan siyah renklenmeyi engellenmek için uygulama sırasında GDF'den hemen sonra potasyum iyodür çözeltisinin (KI) uygulanmasının serbest Ag miktarını azaltarak estetik kaygıyı azalttığı belirtilmiştir. GDF ve KI bileşiklerinin birlikte kullanıldığı tek ticari form Rivastar (SDI, Avustralya) 'dır. Bu nedenle çalışmamızda Rivastar ürünü kullanımı tercih edildi (Resim 2.1).

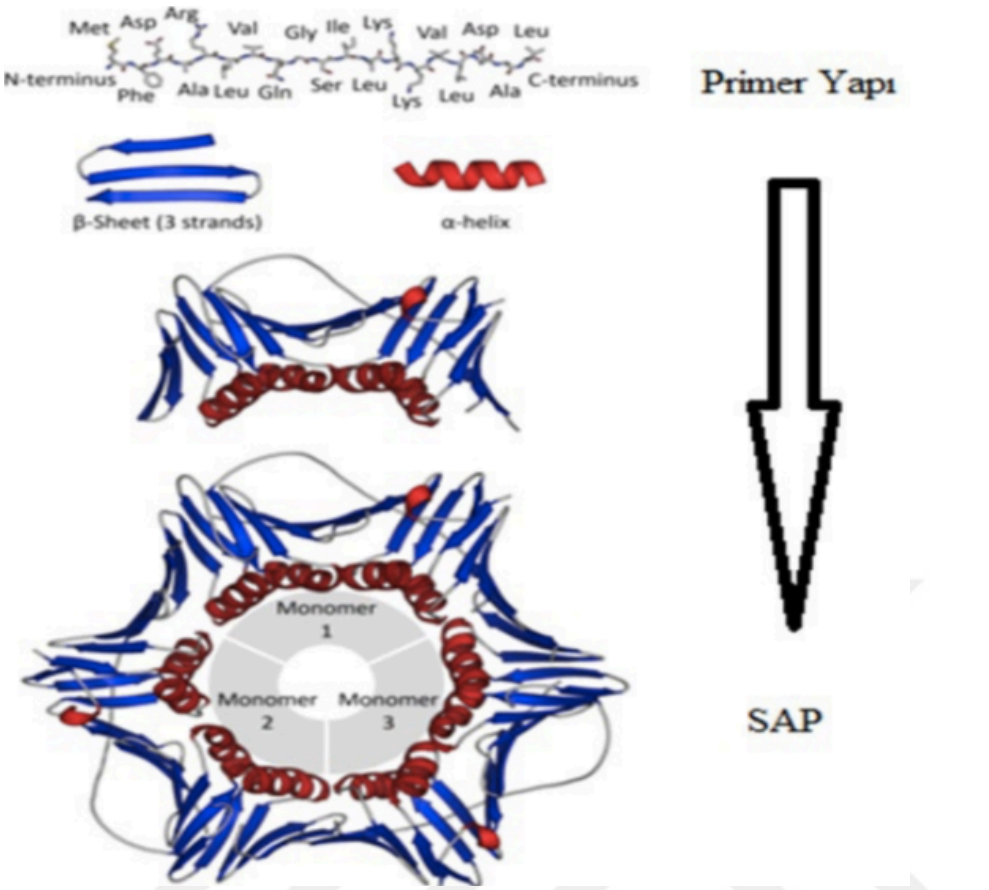


Resim 2.1: GDF ve KI içeren dental ürün

2.7.3. Kendiliğinden Birleşen Peptit P11-4

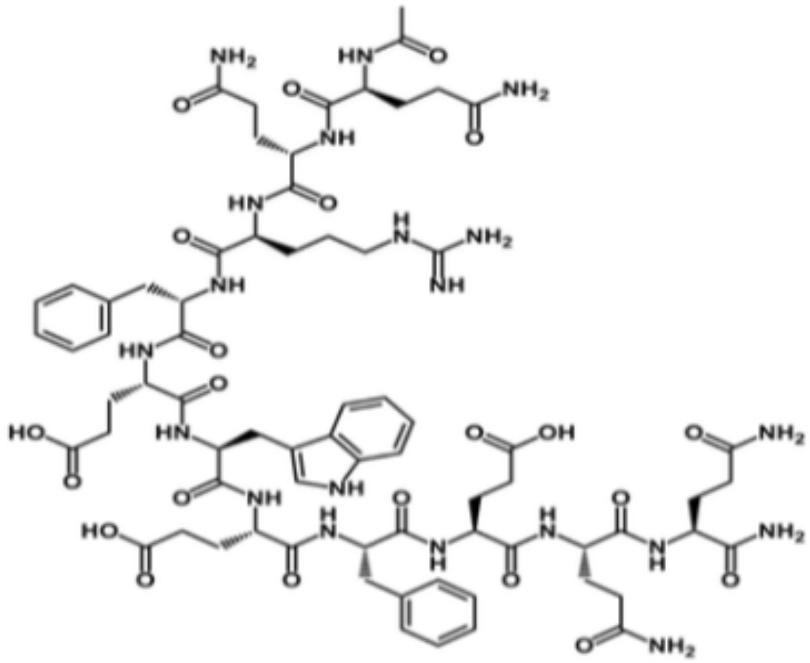
Kendiliğnden birleşen peptitler (SAP), biyomimetik olarak da ifade edilen filaman, tüp, kristal yapılar oluşturabilen sentetik birleşiklerdir. Biyomimetik ifadesi, doğayı taklit ederek oluşturulan maddeler için kullanılmaktadır (169,170).

Kendiliğinden birleşen peptitlerin birincil yapısı aminoasitlerden meydana gelen peptit zinciridir. Bu peptit zincirindeki aminositlere farklı fonksiyonel grupların ve farklı aminoasitlerin eklenmesiyle seconder yapı oluşturulmaktadır. Yapı içerisindeki beta yapraklar bir araya gelerek kompleks yapıda istenilen aminoasitleri içeren SAP ‘ları meydana getirmektedirler (Şekil 2.4) (171).

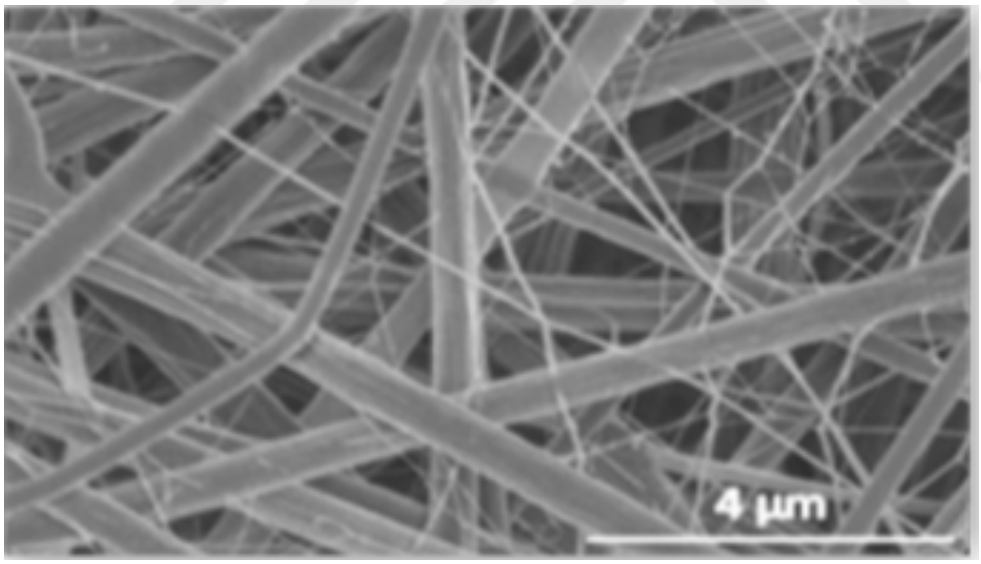


Şekil 2.4: Primer yapıdan SAP 'a dönüşüm (171)

Bu peptitler aracılığı ile yeni dokular oluşturulabilmesi ve medikal alanlarda kullanılmaya başlanması sebebiyle diş hekimliğinde de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Kendiliğinden birleşen peptitlerden olan P11-4 peptiti de amelogenine benzer proteinler elde edebilmek için üretilmiştir (172,173). Glutamin, glutamik asit, fenilalanin, triptofan ve arjininden oluşan (Ac-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln) 11 adet doğal amino asitten meydana gelir (Şekil 2.5). Ayrıca fibriller yapıda olduğu için diffüze olabilme yeteneği yüksek bir peptittir (Resim 2.2) (174).



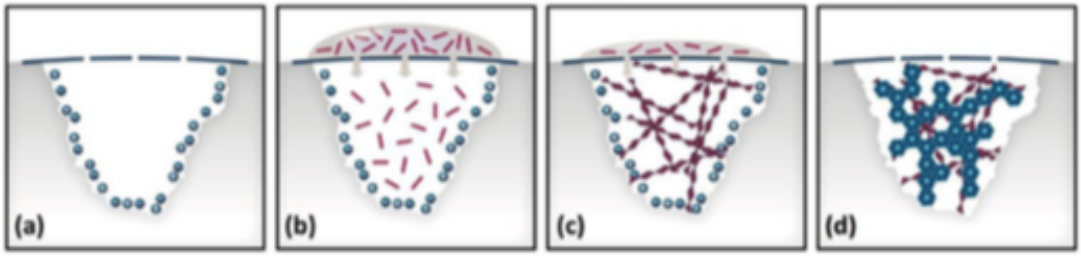
Şekil 2.5: P11-4'ün organik yapısı (174)



Resim 2.2: P11-4 peptidinin fibriller yapısının SEM görüntüsü (174)

P11-4 peptidi, çürük lezyonunun üzerine uygulandığında fibril yapısı sebebiyle iyi bir penetrasyon göstererek ve tükürükte bulunan kalsiyum iyonlarını çekerek hidroksi apatit yapısına benzer bir yapı oluştumuna neden olduğu gözlenmiştir. Nemli ortamda dental dokulara benzer yapılar oluşturabildikleri için diş hekimliği alanında yapılan çalışmalarda P11-4 kullanımı hızla artmaktadır (172,175–177).

Oligopeptit yapıdaki P11-4, düşük pH koşullarında hipomineralize olmuş dental sert dokularına infüze olarak yapı iskelesini taklit eden bir matriks oluşumuna neden olmaktadırlar. Oluşan bu matriksin ihtiyacı olan kalsiyum ve fosfat iyonları tükürükten karşılanır ve bu moleküllerle birlikte 24 saat içerisinde fibriller yapıyı meydana getirirler (Şekil 2.6) (177).



Şekil 2.6: (a) Çürük lezyonu (b) P11-4 uygulaması (c) Üç boyutlu iskelenin oluşumu (d) Mavi altıgen şekilde gösterilen HAP kristallerinin iskele etrafında kendiliğinden oluşması (177)

Yapılan çalışmalarda in-vitro olarak oluşturulan çürük lezyonlarında P11-4 uygulanması sonrasında oluşan dokunun mine dokusunu %90 oranında taklit ettiği, biyouyumlu olduğu ve hücresel tepkinin olumsuz olmadığı gözlenmiştir (172,177). Florür ile birlikte uygulanması halinde çürüğe ve ortam pH değerinin azalmasına karşı minenin daha dayanıklı olduğu belirtilmiştir (177). Ayrıca ratların kafatası kemiklerinde yapılan bir çalışmada da kemiklere P11-4 uygulanmasından 6 hafta sonra, uygulanmayan bölgeye göre iyileşmenin anlamlı derecede daha iyi olduğu tespit edilmiştir (178).

Diş hekimliğinde P11-4 içeren materyallerin uygulanması için firmalar tarafından değişik remineralizasyon ajanları üretilmekte olup bunlar içerisinde en sık kullanılanılanı Credentis firması tarafından üretilen Curodont Repair'dir (Credentis AG, İsviçre) (Resim 2.3).



Resim 2.3: P11-4 içeren dental ürünler

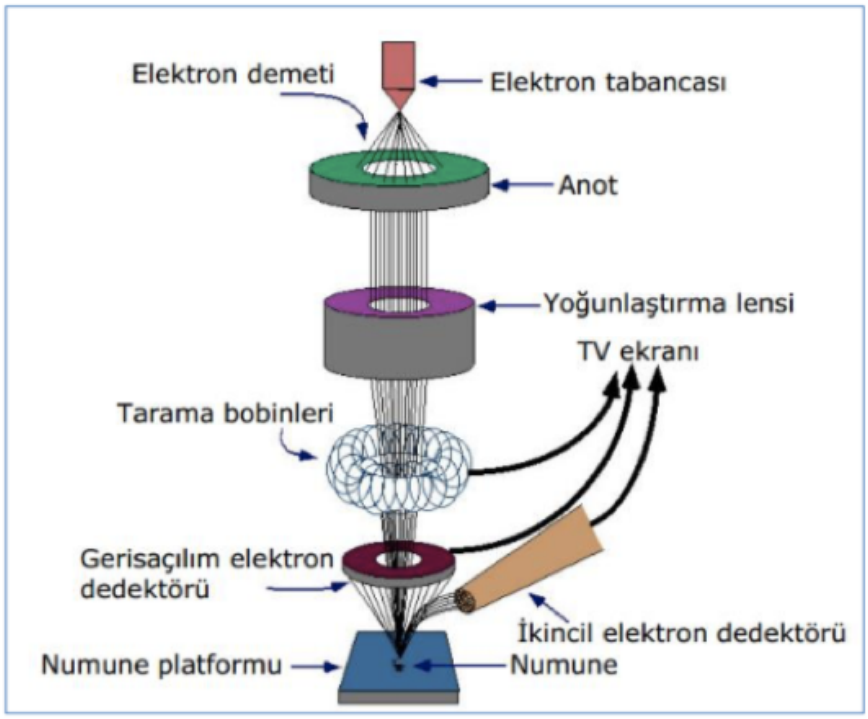
2.8. SEM, FTIR, SAXS ANALİZLERİ

2.8.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskobu veya SEM (scanning electron microscope), çalışılacak numune yüzeyini odaklanmış elektron demeti ile tarayan bir elektron mikroskobudur. Taramalı elektron mikroskobunda görüntünün oluşabilmesi için, numune yüzeyi ile elektron demetinin fiziksel etkileşimi gereklidir. SEM ile elde edilen görüntüler, incelenen numunenin yüzeyinin topografisi ve kompozisyonu hakkında bilgi verir. Standart SEM 'de incelenecek materyalin öncelikle katı ve iletken olması gereklidir. Yüksek vakumda, kuru ve iletken yüzeyleri incelemek için uygundur.

SEM 'de görüntü oluşması için, elektron demetleri tarafından uyarılan örneğin atomlarının yaydığı ikincil elektronlardan faydalanılır. İkincil elektronların sayısındaki değişim incelenen numunenin yüzey topografisine bağlı olarak değişkenlik gösterir. İkincil elektronlarla birlikte saçılan elektronlar, elektron demeti, X-ışınları, numune akımı ve numuneden elde edilen sinyallerle topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler elde edilir.

Tipik bir SEM 'in temel elemanları Şekil 2.7'de görülmektedir (67):



Şekil 2.7: SEM sisteminin temel elemanları (67)

2.8.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

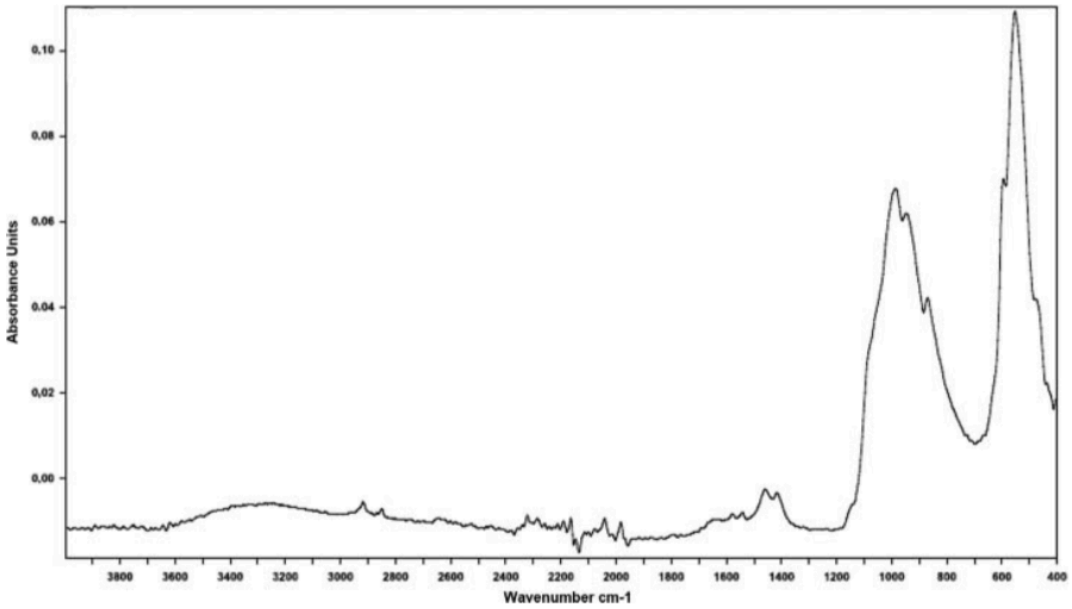
Tıp ve diş hekimliğinde mine, dentin, kemik gibi mineralize dokuların; mekanik özellikleri, morfolojik yapıları ve kimyasal bileşimleri ile ilgili çalışmalar sıklıkla yapılmaktadır. Mine, dentin ve kemik yapılarının kimyasal bileşimini belirleyen yöntemlerin EDX/EDS, raman spektroskopisi ve fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (179–189).

Biyomedikal numunelerdeki organik ve inorganik bileşenlerin çoğu dipol momente sahip olduğu için kızılötesi (IR) radyasyonda aktif hale gelmektedir. Bu nedenle fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, kimyasal analiz için yaygın olarak kullanılan bir titreşim spektroskopisi tekniğidir (190,191). IR radyasyonunun emilimi ile ilgili olan bu teknikte; düşük enerjili bir durumdan daha yüksek enerjili duruma geçişi gerçekleştiren bir fotondan enerji emilimi gerçekleşmektedir (192). Yüksek enerjili duruma geçiş sırasında, ışık spekturumunun IR bölgesinde moleküler bağların titreşimi meydana gelmektedir (190). Her IR absorbans pikinin dalga boyuna karşılık gelen numara belirli bir fonksiyonel grubun (C–H, O–H, C=O vb.) tespit edilmesini sağlamaktadır (193).

Mine, dentin ve kemik dokuları su, organik ve mineral fazdan oluşmaktadır. Bu sert dokuların mineral matriksi esas olarak kalsiyum ve fosfat iyonlarının oluşturduğu hidroksiapatit kristalleri ile az miktarda bikarbonat, magnezyum, potasyum, sodyum ve sitrat iyonlarından oluşmaktadır. Bu kristallerin boyut ve miktarı mineralize sert dokular için farklılık göstermektedir (194). Bu sert dokularda bulunan su, fosfat, karbonat ve kollajen bileşenleri IR bölgesinde güçlü bir absorbsiyona sebep olmaktadır. Kimyasal bileşenlerin kesin olarak belirlenebilmesi için numunelerin hazırlanması, numunelerin alındığı canlıya ait özellikler bağlı olarak değişse bile değerler birbirlerine çok yakın olarak elde edilmektedir (195).

FTIR ile yapılan analiz, dentinin hem kimyasal bileşimi hem de kristalliği hakkında bilgi vererek hem mineral hem de organik fazın durumunun hızlı bir şekilde gösterilmesini sağlar. Kollajenin kendine özgü Amid A, Amid B, Amid I, II ve III bantları prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerinin molekülde var olduğunu göstermektedir. Bu karakteristik bantlar örneklerin Tip I kollajen sınıfında bulunduğunu gösterir. Amid A bandı çoğunlukla N-H gerilmesinden kaynaklı 3400-3440 cm^{-1} aralığındadır. N-H grubu içeriğinde hidrojen bağı bulundurması durumunda belirlenen band aralığı, 3300 cm^{-1} gibi

daha düşük olan dalga boylarında görülmektedir (196). Sekonder kolajen yapısına en duyarlı olan Amid I bandı 1662 cm^{-1} değerinde alfa heliks yapısı göstermektedir. Kollajen yapılarda Amid I bandı C=O gerilmesini, Amid II bandı N-H bükülmesini, Amid III bandı ise C-N gerilmesini temsil etmektedir. Amid I bandı kendine özgü 1600-1700 cm^{-1} dalga boyu aralığında bulunmaktadır (197). Kollajenin Amid II bandı 1550-1600cm^{-1} dalga boyları aralığında görülürken, hidrojen bağlarının bulunduğu durumlarda daha düşük dalga boylarında görüldüğü bilinmektedir (198). Normal dentin dokusuna ait FTIR spekturumu Şekil 2.8'de gösterilmiştir (199).



Şekil 2.8: Normal dentin FTIR spektrumu (199)

2.8.3. Küçük Açılı X Işını Saçılması (SAXS) Analizi

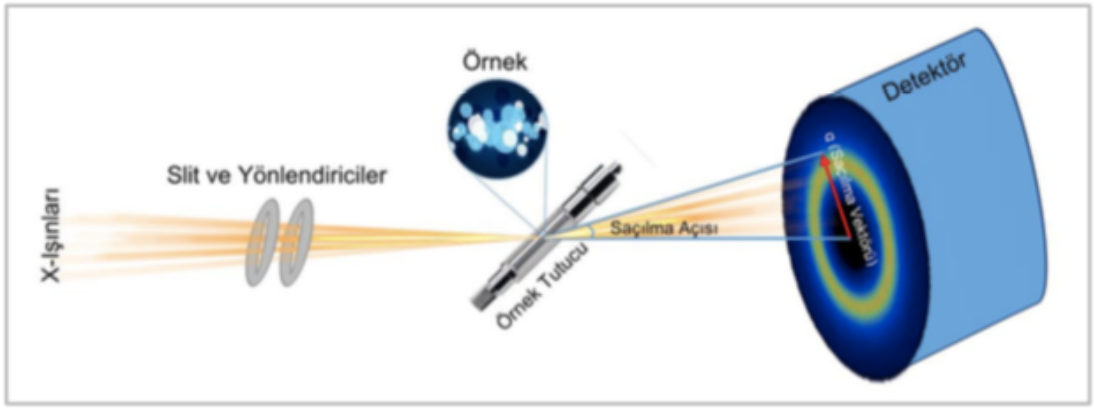
SAXS yöntemi, kalsifiye biyolojik sert dokuların ince ölçekli mekanik özellikleri ve bunların üç boyutlu düzenlemelerini gözlemek amacıyla kullanılmaktadır (200–202). Nano ölçekte elektron yoğunluğu farkı içeren nano oluşumların yapısal karakterizasyonları için SAXS yöntemi son 20 yıldır etkin biçimde kullanılmaktadır. Yapısal karakterizasyondan kastedilen, incelenecek malzeme içinde bulunan nano oluşumların boyut, şekil, uzaklık dağılım ve ara yüz gibi bilgilerine ulaşabilmektir (203).

SAXS yöntemin en büyük avantajı elektron mikroskopları ile gerçek uzayda malzemenin çok küçük bir bölümü ile ilgili, 2 boyutta görüntülenebilen nano oluşumları incelenebilirken, SAXS analizleri ile 2 mm çaplı 6 cm boyutlu kapiler tüpte mevcut olan

tüm malzemenin içeriğinde bulunan tüm nano oluşumları optimize ederek 3 boyutta yapı modelleri ile görüntülenebilir hale getirmektir. SAXS analizlerinde bu öncü bilgilerin yanında, genel yapı modeli kurularak ayrıntılı yapı analizleri de yapılabilmektedir. Örneğin bir malzemede nano oluşumların form faktörleri belirlenerek, nano oluşumların içerdikleri elektron yoğunluklarına, sayılarına, boyut ve uzaklık dağılımlarına ve iki fazlı yapılarda ara yüzey alanlarına kadar önemli nanoskopik bulgulara ulaşılabilmektedir. Farklı nano oluşum morfolojileri için çok çeşitli form faktörleri kullanılarak yapıyı ayrıntılı açıklayabilecek yapı modelleri ve ilgili yapısal parametrelerin arıtımları da yapılabilmektedir (203).

SAXS yöntemi, örnek içerisindeki homojen olmayan nanometre boyutundaki elektron yoğunluklarına duyarlıdır ve çok küçük açılarda ($2\theta<10°$) X- Işınlarının elastik saçılması olarak tanımlanır. Boyut ve saçılma açısı arasındaki ters orantılılık sebebiyle, büyük açılarda küçük boyutlu yapıların bilgisi, küçük açılarda ise daha büyük boyutlara sahip yapıların bilgisi algılanabilmektedir (204).

Küçük ve geniş açılı X ışını saçılma sisteminin temel elemanları Şekil 2.9'da şematize edilmiştir (205).

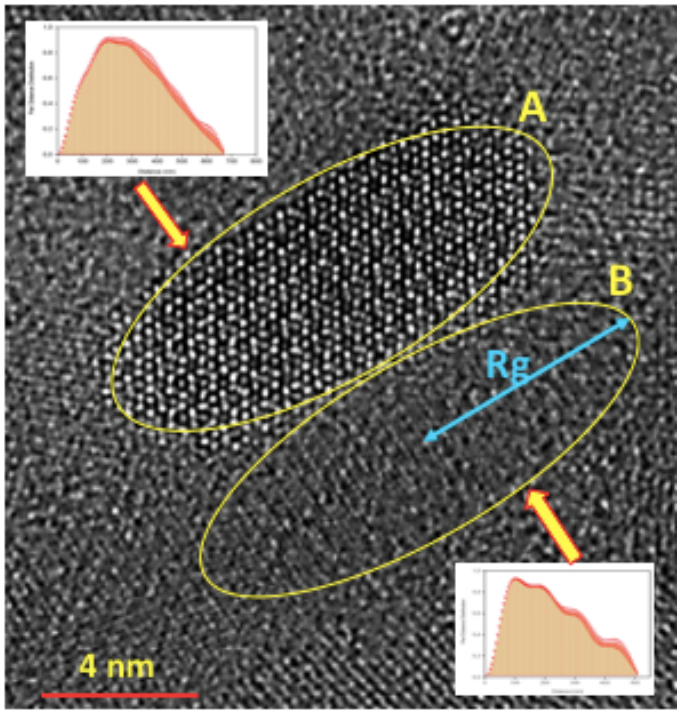


Şekil 2.9: Şematik olarak küçük ve geniş açılı X ışını saçılma sisteminin temel elemanları (205)

X ışınlarının, kaynaktan çıkması sonrasında slit ve yönlendiriciler tarafından ışın demeti olarak şekillendirilirek numuneye çarparlar. Bu demetin küçük bir kısmı gelme doğrultusundan farklı bir yöne saçılır. Bu durum gelen ışının θ açısı ile örnekten

yansımasına benzetilmektedir. Detektör, saçılma şiddetini saçılma açısına bağlı olarak incelenen numunenin fiziksel özellikleri hakkında bilgi vermektedir (205).

Nanoskopik oluşumlar, HAP (hidroksiapatit) kristalit yapıların hekzagonal kristal sistemine ait düzenlenimleri (A) ve aynı yapının tabakalı (lamellar) yığınlarını (B) göstermektedir (Şekil 2.10). Bu yapısal oluşumlar: hidroksiapatit hekzagonal (HAPH) ve hidroksiapatit lamellar (HAPL) olarak ifade edilmektedir. Aynı şekilde bu yığınların jirasyon yarıçap (Rg) bilgilerine ve genel morfolojilerine SAXS analizi ile ulaşılabilmektedir. Şekil 2.10 üzerinde 2 adet hekzagonal yapı ve lamellar yapı ile ilgili uzaklık dağılım fonksiyonları da yüksek çözünürlüklü elektron mikroskobu (HRTEM) görüntüsü üzerinde gösterilmiştir. Uzaklık dağılım histogramlarındaki girinti çıkıntılı yapı nanoskopik lamelar (tabakalı) yığın yapıyı, düzgün hörgüç şeklindeki dağılım ise nanoglobular hekzagon oluşumları ifade etmektedir. Gerçek dentin yapının HRTEM görüntülerinde çok küçük bölümlerde bu tür nanoskopik düzenli yapı grainlerine (bölgelerine) rastlanabilmesine rağmen, yapının 8x5x1 mm gibi makroskobik boyutlarda yapılan SAXS incelemelerinde bu grainlerin genel elektron yoğunluk farkı morfolojileri elde edilebilmektedir (206).



Şekil 2.10: HRTEM görüntüsü üzerinde farklı nanoskopik oluşumların ve nanoskopik dağılımlarının görselleştirilmesi (206).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız için gerekli olan etik kurul, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu ‘nun 04.06.2021 tarih ve 2021/19 sayılı toplantısında görüşülerek 46418926-050.01 sayı ile uygun bulunmuş (EK-1) ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Validebağ Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fizik Mühendisliği Bölümü ‘nde gerçekleştirilmiştir.

Doktora tez çalışması, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2022/027 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. DENEY ÖNCESİ HAZIRLIK SÜRECİ

3.1.1. Örnek Sayısının Belirlenmesi

Çalışmanın örnek sayısının belirlenmesinde, G*Power Programı (Software sürüm 3.1.9.2) kullanılarak güç analizi yapılmıştır. Buna göre α=0,05 anlamlılık düzeyinde her grup için örnek sayısı 10 olduğunda, testin gücü %95 olarak belirlenmiş, %20 kayıp oranı göz önünde bulundurularak, her grupta 10 dentin kesiti olacak şekilde toplam 40 dentin kesitinin çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir.

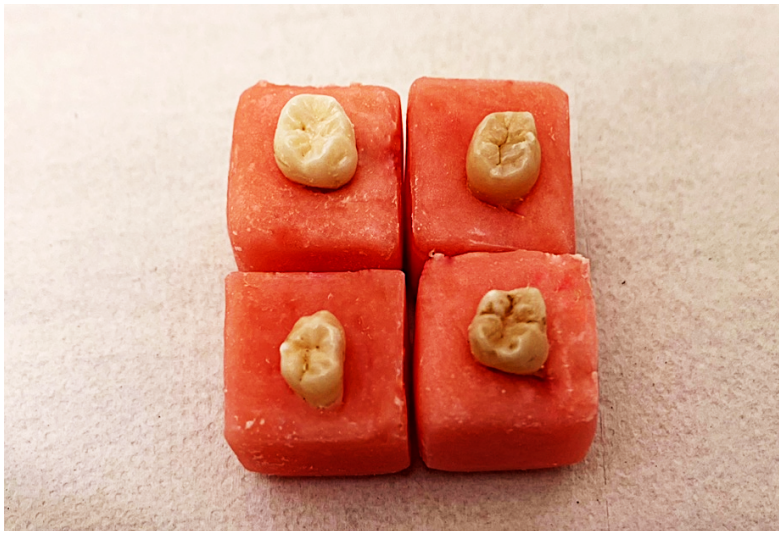
3.1.2. Diş Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada çürüksüz, dolgusuz, çekim sırasında zarar görmemiş ve yapısal bozukluğu olmayan; sağlam alt veya üst 3. büyük azı dişleri kullanılmıştır (Resim 3.1). Çekim işlemi öncesi gerekli bilgilendirmeler yapılarak onam formu (EK-2) imzalatılmış olan hastalardan elde edilen dişlerin üzerindeki yumuşak doku artıkları küret yardımıyla temizlenerek deney zamanına kadar %0,1’lik timol içeren salin solüsyonunda, +4°C’de bekletilmiştir.



Resim 3.1: Çalışmada kullanılan çekilmiş diş örnekleri

Dentin kesitlerini alabilmek için çeklmiş dişler, kökleri kaplanacak şekilde soğuk akrilden yapılmış kalıplara gömülmüştür (Resim 3.2). Akrilin sertleşmesi için 24 saat beklenilmiştir. Akrilik kalıplara gömülen dişler deney süresine kadar her gün değiştirilen distile su içerisinde bekletilmiştir. Akrilik kalıplarda bulunan çekilmiş dişler, düşük hızlı su soğutmalı mikro kesme cihazı (Mecatome T180, Fransa) (Resim 3.3) ile dişin uzun eksenine dik olacak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 3.4). Dentin kesitleri yaklaşı 1mm olacak şekilde hazırlanmıştır (Resim 3.5). Belirlenen örnek sayısında numuneler elde edilene kadar aynı işlemler tekrarlanmıştır (Resim 3.6). Tüm disklerdeki dentin yüzeyinin koronal tarafında 600, 800, 1200 gritlik alüminyum oksit zımpara kağıtlarıyla, her biri 5 saniye kullanılarak, aynı yönde dairesel hareketlerle distile su altında aşındırılmıştır (Minitech Z33, USA) (Resim 3.7). Aşındırma işlemi sonrasında örnekler distile su ile yıkanıp kurutulmuştur. Diğer tarafları ise aside dayanıklı oje ile kaplanmış ve kuruması için 24 saat beklenmiştir. Hazırlanan dentin kesitleri deney süresine kadar her gün değiştirilen distile su içerisinde bekletilmiştir.



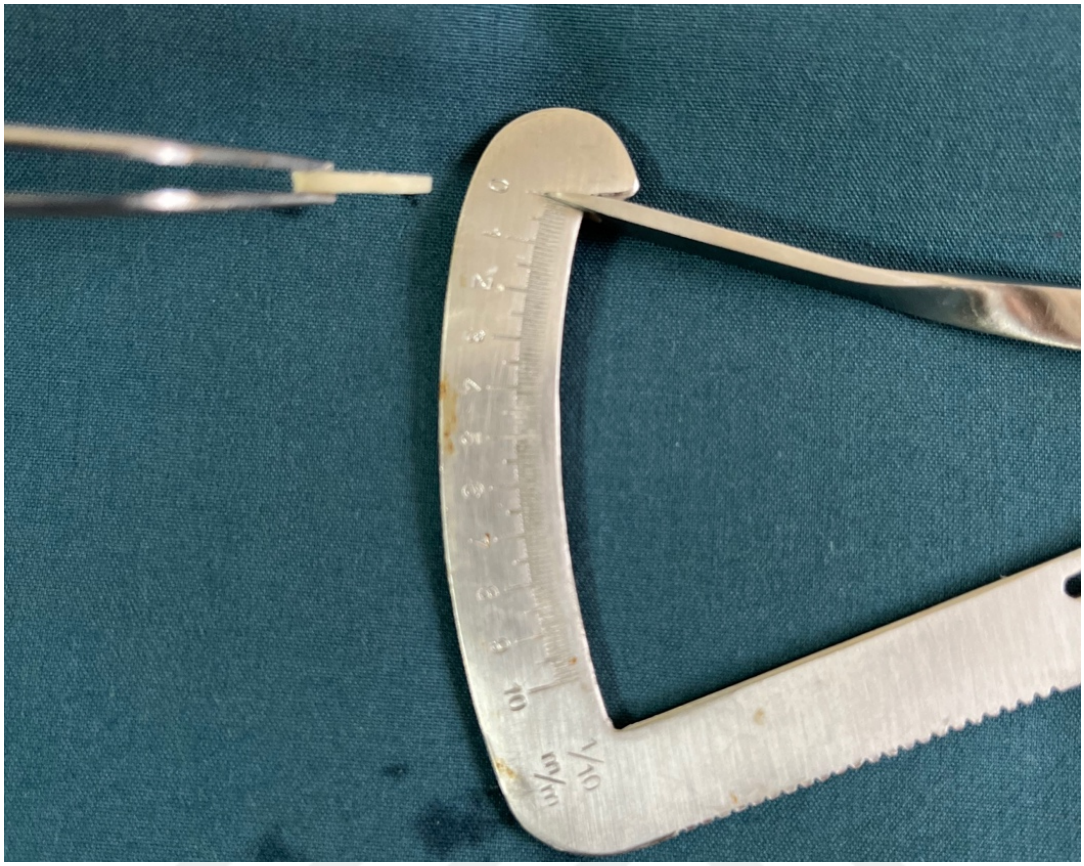
Resim 3.2: Çekilmiş dişlerin soğuk akrile gömülmüş hali



Resim 3.3: Çalışmada kullanılan mikro kesme cihazı



Resim 3.4: Dişlerin kesme cihazına yerleştirilmesi



Resim 3.5: Dentin kesitlerinin kalınlığının ayarlanması



Resim 3.6: Hazırlanan dentin kesitleri



Resim 3.7: Çalışmada kullanılan polisaj cihazı

3.1.3. Dentin Dokusunda İn-vitro Olarak Çürük Oluşturulması

Çalışmamızda dentin dokusunda in-vitro olarak çürük oluşturabilmek için 'BioRed Laboratuvarı' tarafından hazırlanmış demineralizasyon solüsyonu kullanılmıştır. 2,2 mM $CaCl_2$ (kalsiyum klorür); 2,2 mM NaH_2PO_4 (sodyum dihidrojen ortofosfat dehidrat); 0,05 M asetik asit içermekte olan solüsyonun pH'sı 4,4 olana kadar 1 M KOH (potasyum hidroksit) ilave edilmiştir (205). Yapay çürük oluşabilmesi için tüm dentin diskleri 72 saat boyunca demineralizasyon solüsyonunda bekletilmiş, bu süre boyunca solüsyon günde iki kere yenilenmiştir. 72 saat sonunda dentinde yapay çürük lezyonlarının oluştuğunu gözlemlemek için SAXS analizi yapılmıştır.

3.2. DENEY SÜRECİ

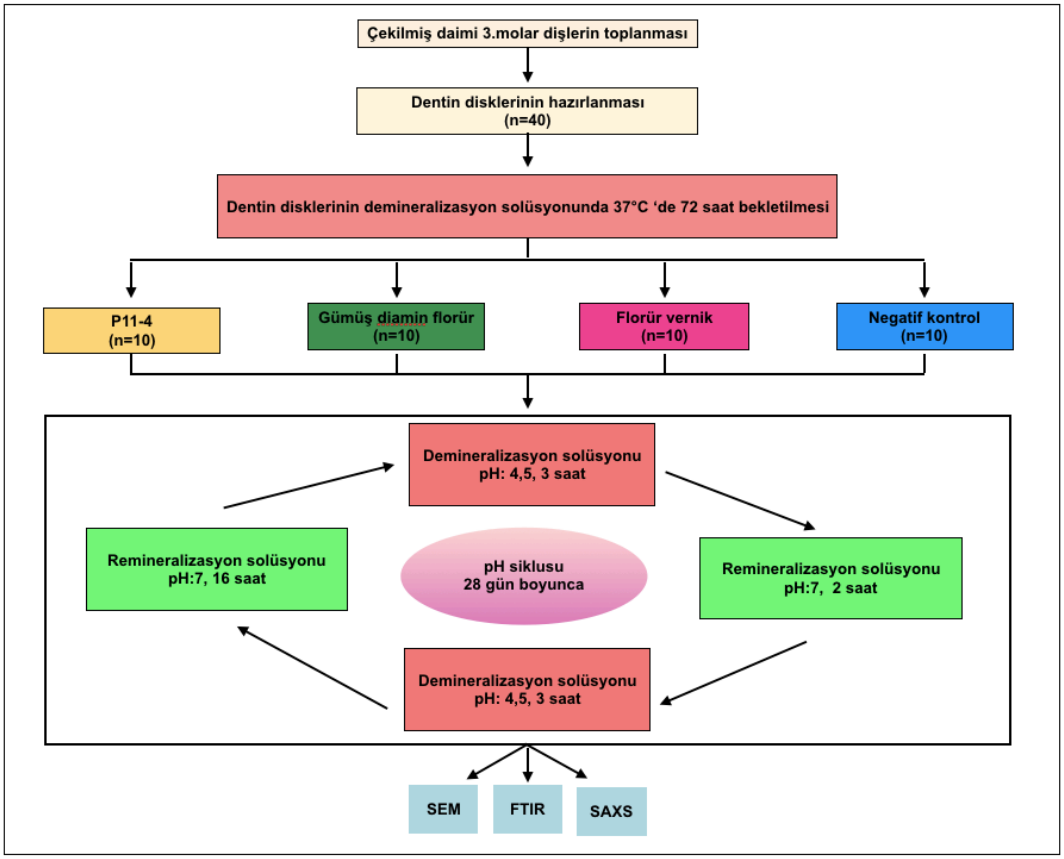
Çalışmamızda çekilmiş daimi 3. Molar dişlerin toplanmasından sonra dentin kesitleri hazırlanıp in-vitro olarak çürük oluşturulmuştur. Daha sonra randomize olarak 4 gruba ayırdığımız numunelere P11-4, gümüş diamin florür ve florür vernik uygulanmıştır. pH siklusu 28 gün boyunca devam ettmiştir. Demineralizasyon solüsyonu olarak "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan; 2,2 mM $CaCl_2$ (kalsiyum klorür); 2,2 mM NaH_2PO_4 (sodyum dihidrojen ortofosfat dehidrat); 0,05 M asetik asit içermekte olan solüsyonun pH'sı 4,4 olana kadar 1 M KOH (potasyum hidroksit) ilave edilen çözelti kullanılmıştır (205) (Resim 3. 8). Remineralizasyon solüsyonu olarak BioRed Laboratuvarı tarafından hazırlanan; 1,5 mM $CaCl_2$ (kalsiyum klorür), 0.9 mM NaH_2PO_4 (Sodyum dihidrojen ortofosfat dehidrat), 0.15 M KCL (potasyum klorid) içeren ve pH 7,0 seviyesinde olan solüsyon kullanılmıştır (71,205) (Resim 3.9). Daha sonra SEM, FTIR ve SAXS analizleri yapılmıştır. Çalışmaya ait deney akış şeması Şekil 3.1' de açıklanmıştır.



Resim 3.8: pH siklusunda kullanılan "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan demineralizasyon solüsyonu



Resim 3.9 : pH siklusunda kullanılan "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan remineralizasyon solüsyonu



Şekil 3.1: Deney akış şeması

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

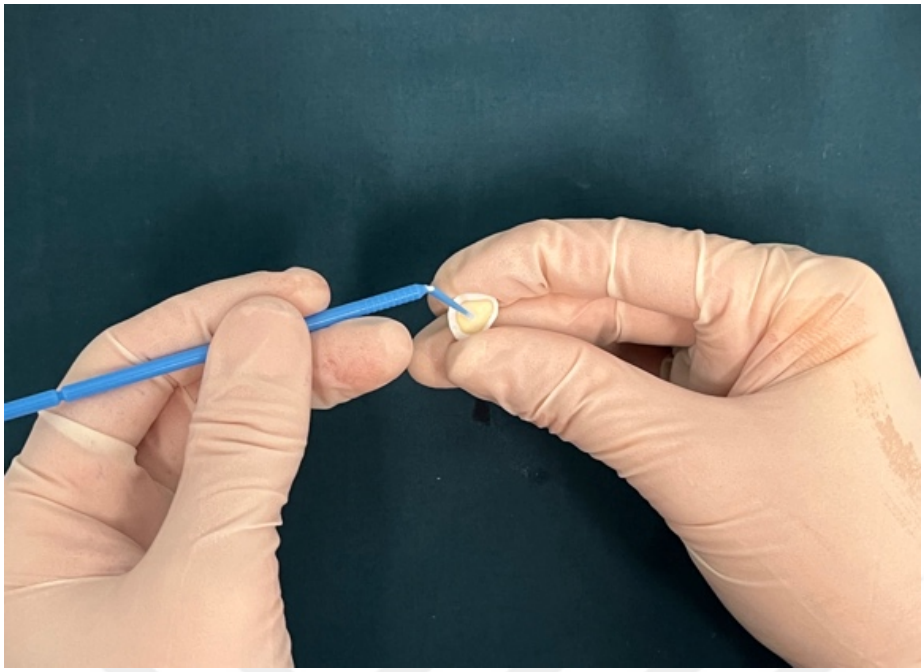
Çalışmamızda dentin çürüğüne uygulanan florür vernik (ProShield, Allershausen, Germany), GDF (Riva Star, SDI, Bayswater, Australia) ve P11-4 (Curodont Repair, [v]VARDIS, Switzerland)'ün etkilerini incelemek için pozitif ve negatif kontrol grubu dahil olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışma grupları ve kullanılan materyaller

Grup Numarası	Uygulanan Materyaller
1.Grup	**P11-4 (self assembling peptid-kendiliğinden birleşen peptid)**
2.Grup	**GDF (gümüş diamin florür)**
3.Grup	**Florür vernik**
4.Grup	**Negatif kontrol**

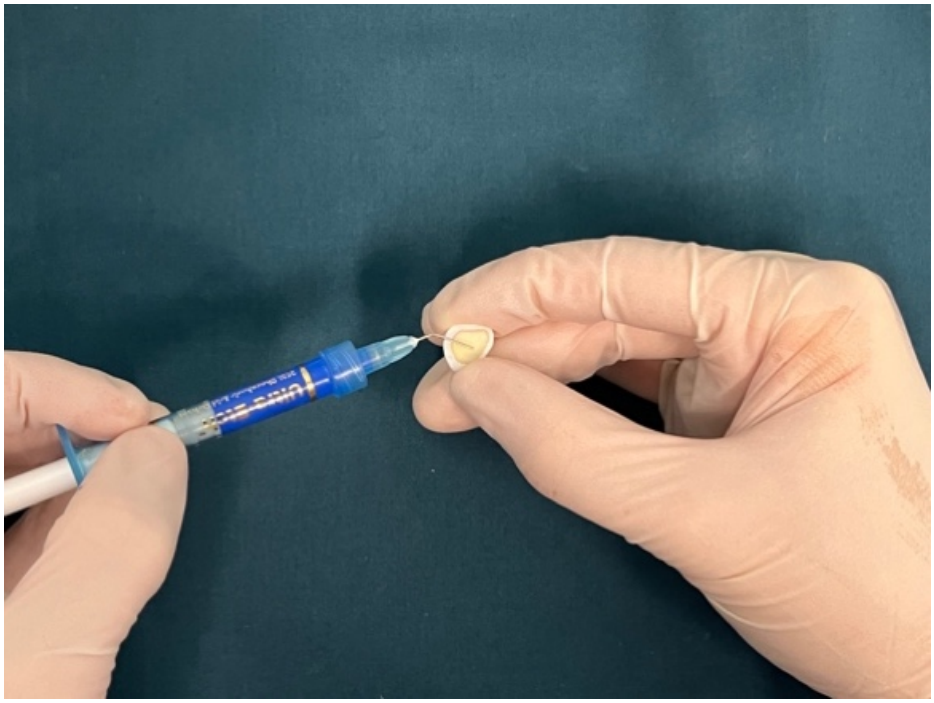
3.2.2. P11-4 (Self Assembling Peptid) (Kendiliğinden Birleşen Peptid) (1. Grup)

P11-4 uygulanan grupta, üretici firmanın talimatları doğrultusunda öncelikle dentin kesitlerine % 2'lik sodyum hipoklorit uygulandı (Resim 3.10).



Resim 3.10: %2’ lik sodyum hipoklorit uygulaması

Daha sonra pürüzlendirmek amacıyla 20 saniye %35’lik fosforik asit (Ultra- Etch, Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, USA) uygulaması yapıldı (Resim 3.11). Dişler su ile durulandı ve ardından kurutuldu.



Resim 3.11: %35' lik fosforik asit uygulaması

P11-4 uygulama talimatlarında belirtilen şekilde güvenlik klipsi çıkarılarak iki silindir birbirine doğru itilerek aplikatör aktifleştirildi. Silindirlerin içerisinden çıkan sünger ile uygulama yapıldı (Resim 3.12). Solüsyonun yayılması için 5 dakika beklendi. Ardından örnekler pH siklusu için belli aralıklarla değiştirilen demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarında 28 gün boyunca bekletilmiştir.



Resim 3.12: P11-4 peptit uygulaması

3.2.3. GDF (Gümüş Diamin Florür) (2. Grup)

GDF uygulanan grupta üretici firmanın talimatları doğrultusunda önce dentin diskleri kurutuldu. Daha sonra 1 damla solüsyon aplikatör fırça yardımıyla 1. aşama uygulandı (Resim 3.13). Solüsyonun yayılması için 5 dakika beklendi. Daha sonra 2. Aşama olan solüsyon talimatlar doğrultusunda uygulandu (Resim 3.14). Ardından örnekler pH siklusu için belli aralıklarla değiştirilen demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarında 28 gün boyunca bekletilmiştir.



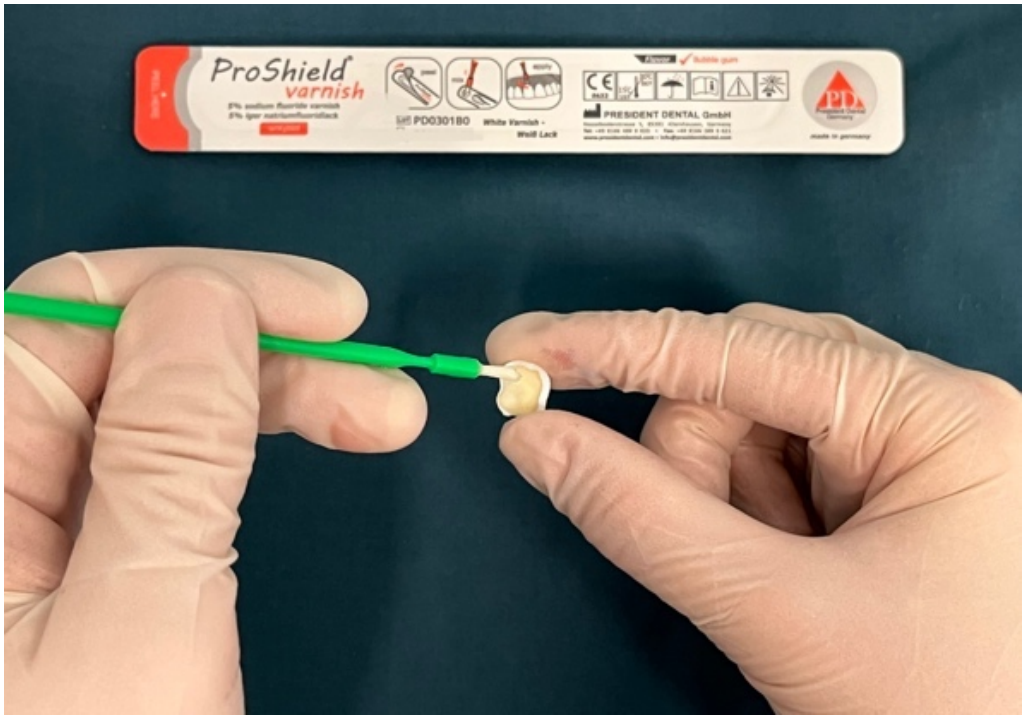
Resim 3.13: GDF uygulaması 1. aşama



Resim 3.14: GDF uygulaması 2. aşama

3.2.4. Florür Vernik (3. Grup)

Fluorür vernik uygulanan grupta, üretici firmanın talimatıyla aplikatör fırça yardımıyla yüzeylere sürüldü, 5 dakika beklendi (Resim 3.15). Ardından keskin bir cerrahi bıçak yardımıyla nazikçe yüzeyden kaldırıldı. Ardından örnekler pH siklusu için belli aralıklarla değiştirilen demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarında 28 gün boyunca bekletilmiştir.



Resim 3.15: Florür vernik uygulaması

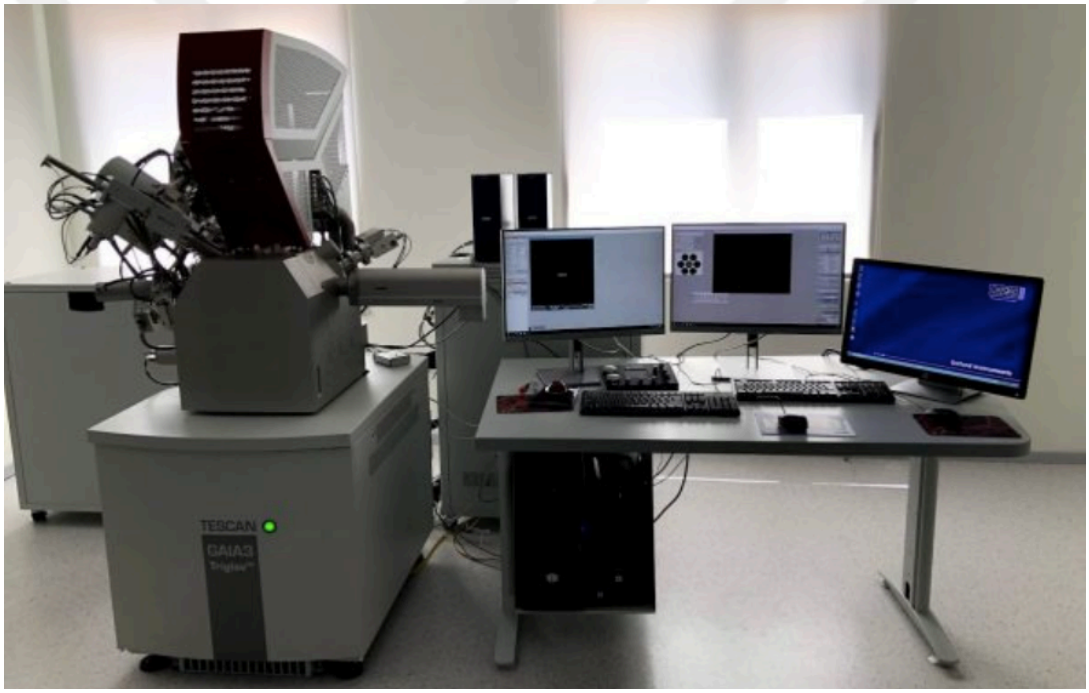
3.2.5. Negatif Kontrol Grubu (4. Grup)

Yapay dentin çürüğü oluşturulmuş negative control grubuna herhangi bir ajan uygulamadan pH siklusu için belli aralıklarla değiştirilen demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarında 28 gün boyunca bekletilmiştir.

3.2.6. Örneklerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile İncelenmesi

Çalışmada kullanılan diş örnekleri, pH siklusunun sonunda yapay çürük lezyonu oluşturulan dentin yüzeyi ile kendiliğinden birleşen peptid P11-4, GDF ve florür vernik uygulanan gruplar taramalı elektron mikroskobunda (SEM) (Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS) incelenmiştir (Resim 3.16).

Dentinde oluşan morfolojik değişimler incelenerek kayıtları alınmıştır. Yüzey kaplama işlemi öncesinde dentin kesitlerinin tamamen kurutulması için etanol serisi protokolü gerçekleştirilmiştir. Her bir dentin kesiti 5'er dakika sürecek şekilde sırasıyla %80 etanol + %90 etanol + %100 etanol + %100 etanol + %100 aseton + %100 aseton ile muamele edilerek yüzey temizliği tamamlanmış olup 37 C° ısıda 24 saat boyunca inkübatörde bekletilerek tamamen kurutulması sağlanmış. Daha sonrasında da 5nm kalınlığında platin ile yüzey kaplaması yapılmıştır. Kaplama işlemi tamamlanan dentin kesitleri SEM cihazında yerleştirilerek vakumlandıktan sonra X1000 ve X5000 büyütme altında görüntüleri incelenip kayıt alımı tamamlanmıştır.

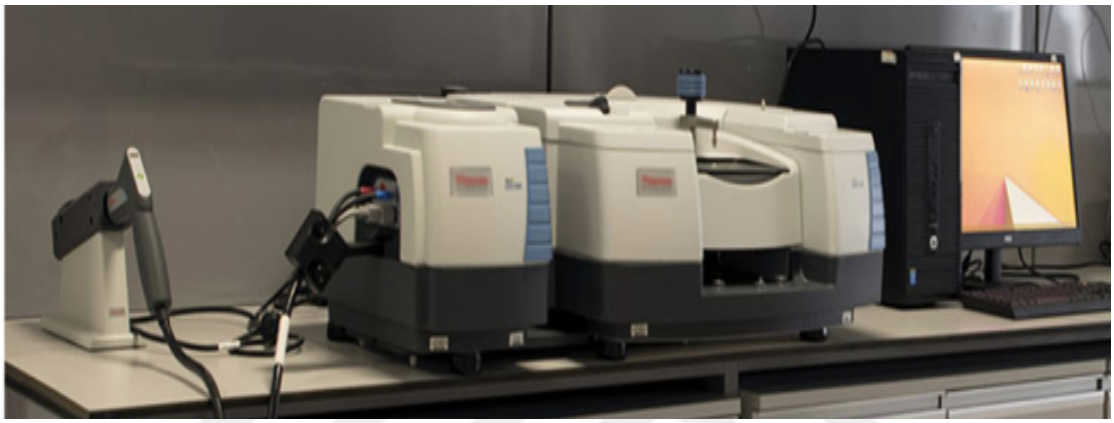


Resim 3.16: Çalışmada kullanılan taramalı elektron mikroskobu (SEM)

3.2.7. Örneklerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) İle İncelenmesi

Çalışmada kullanılan 1 mm kalınlığındaki dentin kesitleri, yapay çürük lezyonu oluşturulan dentin yüzeyi ile kendiliğinden birleşen peptid P11-4, GDF ve florür vernik uygulanan gruplar fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi cihazı (FTIR) (Thermo Fisher, Nicolet is50) ile incelenmiştir (Resim 3.17).

Dentinde oluşan moleküler değişimlerin incelenerek kayıtlarının alınması amaçlanmıştır. Dentin kesitlerinin orta naktasının tam olarak elmas okuyucuya denk gelecek şekilde yerleştirilmesine ve incelenecek dentin yüzeyinin okuyucuya bakacak şekilde konumlandırılmasına dikkat edilmiştir. Ölçüm metodu olarak absorbsiyon seçildikten sonra numuneler vakum altında 4000-450 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte 5 dakika sürelerle 350 tarama olacak şekilde incelenerek kayıtları alınmıştır.



Resim 3.17: Çalışmada kullanılan FTIR cihazı

3.2.8. Örneklerin Küçük Açılı X-Işını (Small-angle X-ray scattering (SAXS) ile İncelenmesi

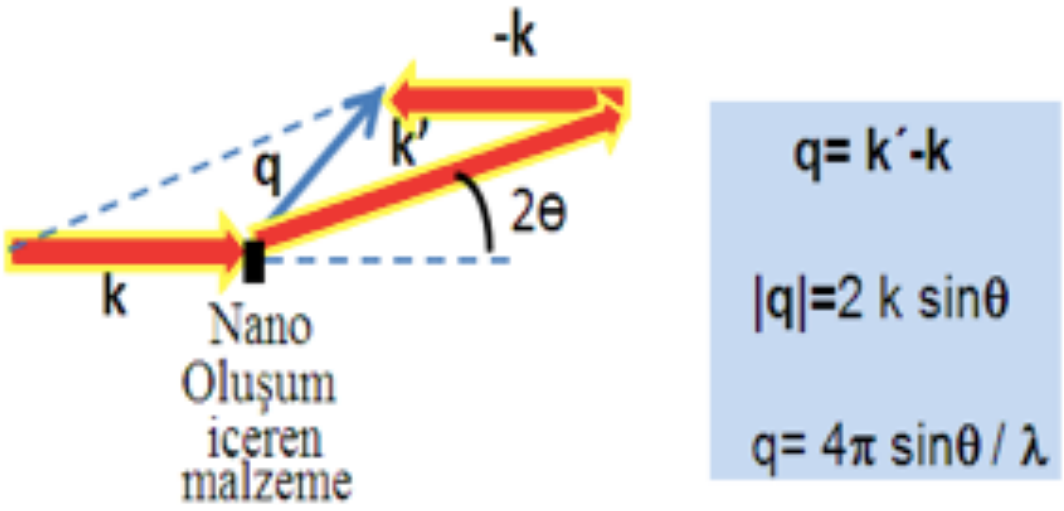
5x3x1 mm boyutlarındaki diş kesitleri bakır K alfa X-ışınları ile ışınlanarak, bu örneklere ait koherent saçılma verileri 1024 kanallı çizgisel detektörler ile toplanacaktır. Oda sıcaklığında yapılacak ölçümlerde X-Işını tüpü 2kW güç ile çalıştırılacak ve ölçüm süresi örneklerde soğurulmanın önüne geçecek şekilde ve olabildiğince fazla saçılma şiddeti elde edecek şekilde optimize edilecektir. Kullanılacak SAXS (HECUS SWAXS) deney düzeneği Resim 3.18'de görülmektedir.

Dentin yapısındaki boyut, şekil, uzaklık gibi nano oluşumlardaki değişiklikler incelenerek kayıtlarının alınması amaçlanmıştır. Şekil 3.2'de; k, incelenecek örnek üzerine düşürülen gelen X-ışınının dalga vektörü, k' ise örnekten saçılan X-ışınının dalga vektörü nü ifade etmektedir. Bu iki vektörün büyüklükleri koherent saçılmada aynı olup, bu iki vektörün vektör farkı (Δk), q saçılma vektörünü oluşturmaktadır. Dolayısı ile Bragg yansıma açısı olarak bilinen 2θ açısı ve kullanılan X-ışınının dalga boyu olan λ değeri cinsinden, q saçılma vektörü büyüklüğü kolayca ifade edilebilmektedir. Öncü SAXS veri

analizleri küçük q bölgesinde yapılabildiği gibi, elde edilen Rg değerleri kullanılarak, toplanan tüm veriyi fit edecek şekilde, *ab-initio* yapı modelleri de doğrudan elde edilebilmektedir. Bu yapı modelleri elektron yoğunluğu farkının en büyük olduğu nano oluşumların en olası (en baskın) morfolojilerini göstermektedir. Ayrıca, bu nano oluşumların dağılımı malzeme içinde homojen dağılım olup olmadığının da bir delili olmaktadır**.**



Resim 3.18: SAXS deney sisteminin genel görünümü



Şekil 3.2: Saçılma geometrisi ve saçılma vektörü ifadesinin elde edilişi

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunn's test kullanıldı. Ayrıca spektrum değerlerinin normal değerden farklarının saptanmasında Tek örneklem t testi (One sample t test) kullanıldı. Anlamlılık $p< 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

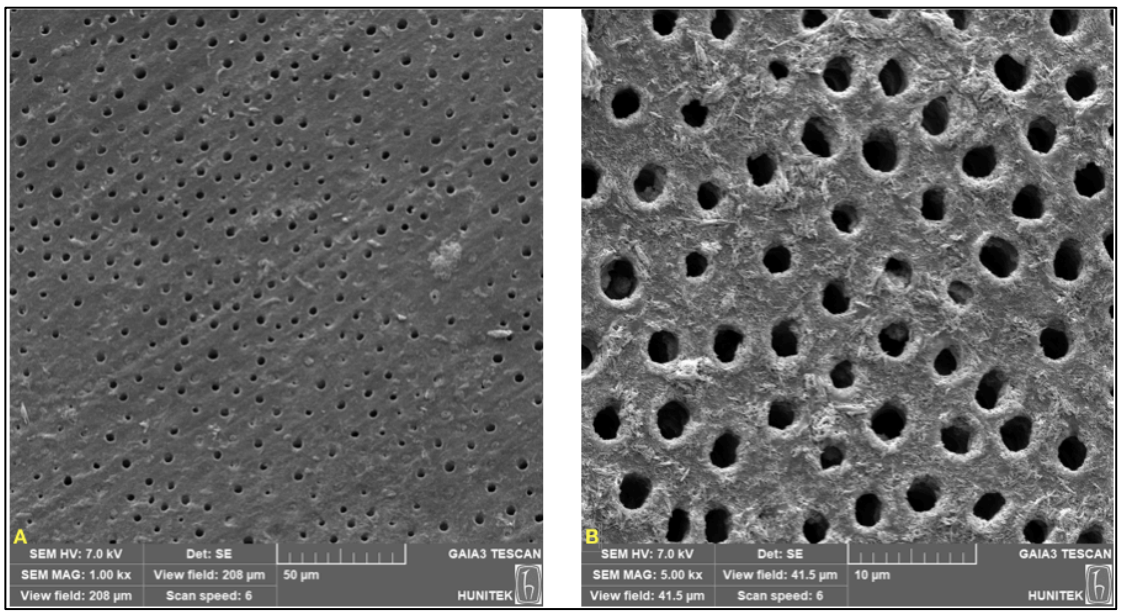
4. BULGULAR

Çalışmamızda 3 farklı remineralizasyon ajanının, in-vitro koşullar altında oluşturulan dentin çürüğü üzerindeki etkinlikleri; Scanning Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Küçük Açılı X-Işını (Small-angle X-ray scattering, SAXS) kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar negatif kontrol grubu olan yapay tükürüğün etkinlikleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda sunulmaktadır.

4.1. SEM Görüntülerinin Analiz Sonuçları

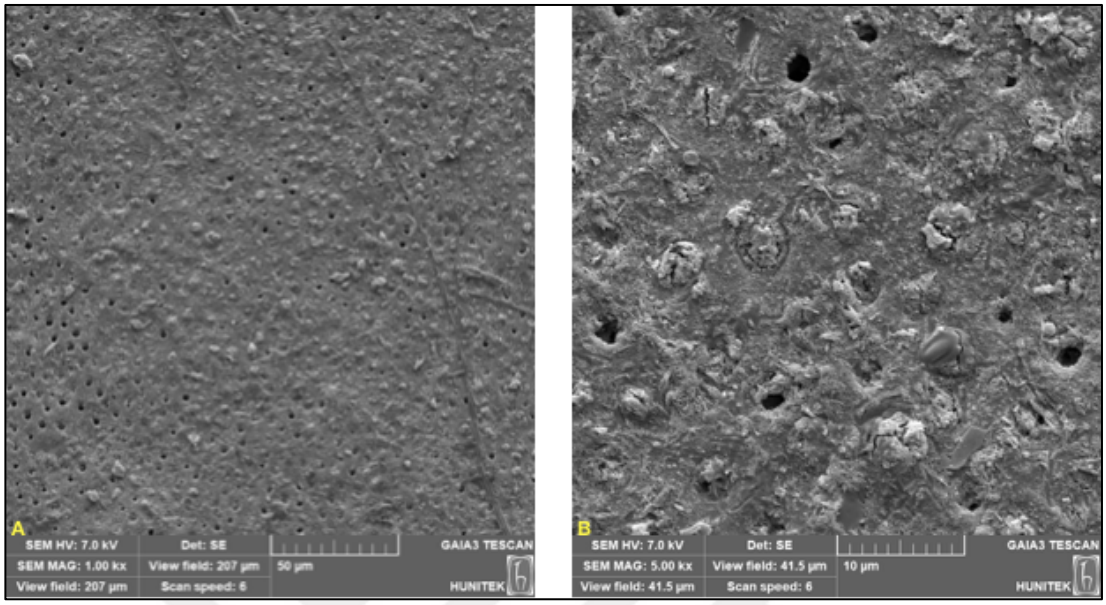
SEM analizinde, yapay çürük lezyonları oluşturulduktan sonra P11-4, SDF ve florür vernik uygulamaları yapılarak 28 günlük pH siklusu ardından dentin dokusunun yüzey topagrafyası ve morfolojisi incelenmiştir. Görüntüler X1000 ve X5000 büyütmede alınmıştır.

P11-4 materyalinin uygulandığı grupta (1. Grup); inter tübüler dentinin daralmaya başladığı, remineralizasyon alanları üzerinde fibriler ve lifler halinde iskeletsel yapının oluşmaya başladığı gözlenmiştir (Resim 4. 1).



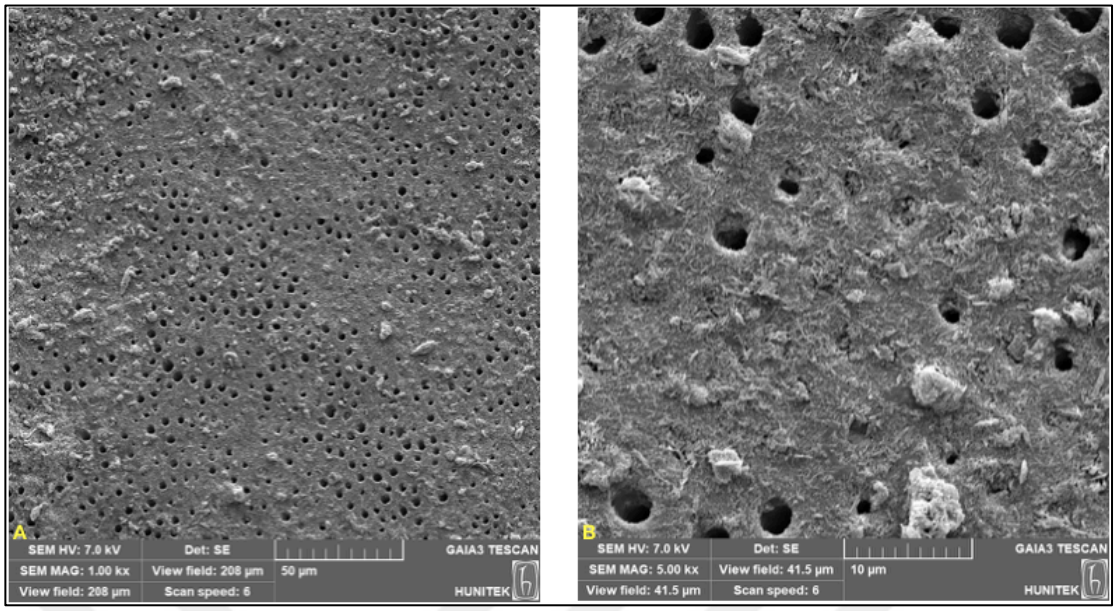
Resim 4.1: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine P11-4 (1.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

GDF materyalinin uygulandığı grupta (2. Grup); dentinal tübüllerin çoğunun ağızlarının tıkalı olduğu ve yoğun granüler yapı gözlenmiştir (Resim 4. 2).



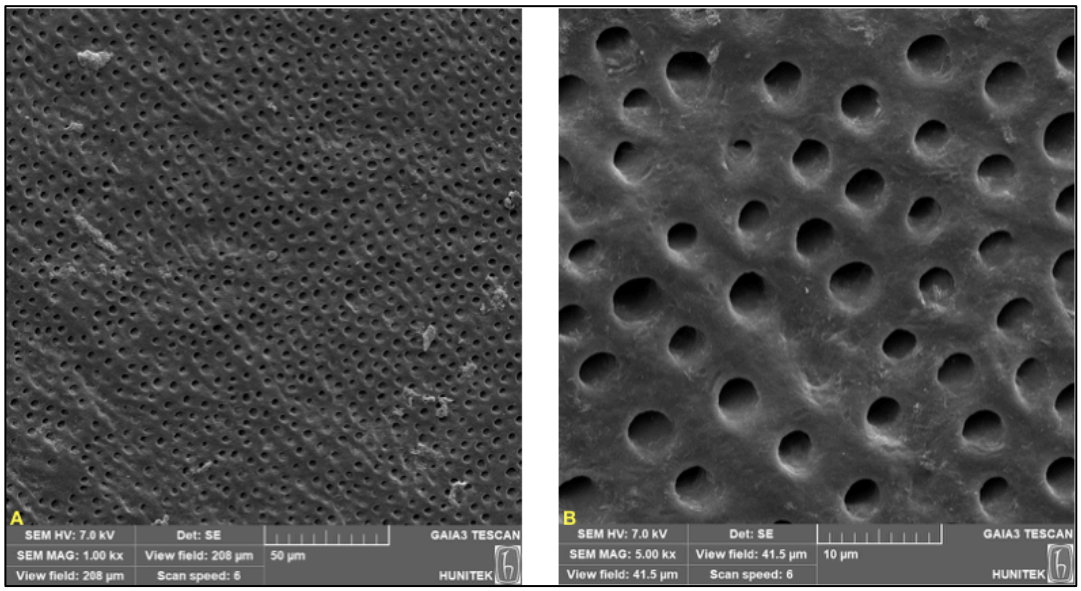
Resim 4.2: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine GDF (2.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

Florür vernik materyalinin uygulandığı grupta (3. Grup); demineralizasyon sonrası açığa çıkan dentin tübüllerinin kısmen tıkalı olduğu ve dentin tübüllerinin çapının azaldığı gözlenmiştir (Resim 4. 3).



Resim 4.3: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerine florür vernik (3.Grup) remineralizasyon ajanının uygulanmasından sonraki; X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

Negatif kontrol grubunda (4. Grup) in-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin dokusunun, dentin tübüllerinde mineral kayıplarına bağlı olarak lümenlerin deforme olduğu gözlenmiştir (Resim 4. 4).



Resim 4.4: İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş dentin yüzeylerinin pH sikusu sonundaki (4.Grup); X1000 (A) ve X5000 (B) büyütmedeki SEM görüntüleri

4.2. FTIR Görüntülerinin Analiz Sonuçları

Belirlenen spektrum aralığındaki bantlara ait normal dentin ve çalışma gruplarımıza ait değerler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda Amid A bandına ait gerilim titreşimi ortalama değerleri 1., 2. ve 3. Gruplar için sırasıyla 3294, 3296 ve 3301 cm^{-1} iken negatif kontrol gurubunda 3361 cm^{-1} olarak gözlenmiştir.

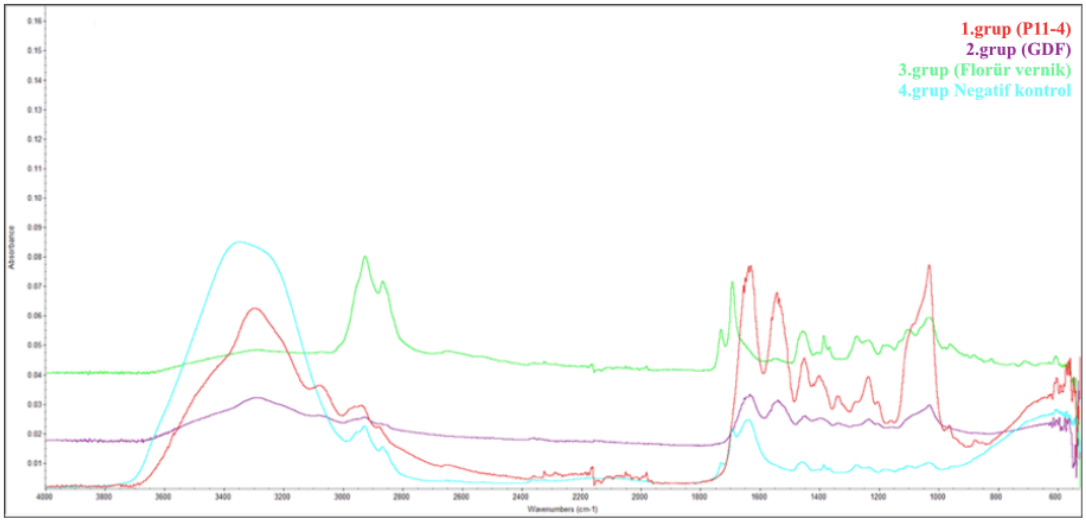
Sekonder kollajen yapısına en duyarlı olan ve C=O gerilimi temsil eden Amid I bandınaa ait ortalama değerler çalışma gruplarımız için sırasıyla; 1635, 1640, 1691 ve kontrol grubu için 1691 cm^{-1} olarak gözlenmiştir.

N-H bükülümünü temsil eden Amid II bandına ait ortalama değerler çalışma gruplarımız için sırasıyla; 1543, 1540 ve 1552 ve negatif kontrol grubu için 1640 cm^{-1} olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1: Normal dentin ve deney gruplarımıza ait FTIR spektrum değerleri (cm^{-1})

Normal Dentin	1.Grup (P11-4)	2.Grup (GDF)	3.Grup (Florür vernik)	4.Grup (Negatif Kontrol Grubu)	Spektrumun Tanımı
3309 (3260-3309)	3294,25	3296,06	3301,10	3361.21	N-H grubunun gerilim titreşimi (Amid A)
1662 (1600-1700)	1635,07	1639,72	1690,94	1691.26	Amid I (protein C=O bağı)
1550	1542,95	1539,7	1552,1	1640.30	Amid II (protein N-H bükme titreşimi, C-N gerilim titreşimi)
1458	1458,01	1451,52	1453,4	1465.85	Organik + ν_3 CO_3^{-2} (mineral)
1200-900	1200-900	1200-900	1200-900	1200-900	$\gamma 1 \gamma 3$ PO_4 gerilim titreşimi(mineral)
890–850	890–850	890–850	890–850	890–850	ν_2 CO_3^{-2} (mineral) Tip B
700–450	700–450	700–450	700–450	700–450	γ_4 PO_4 bükme titreşimi

Çalışma gruplarımıza ait FTIR analiz sonuçları grafiksel gösterimi Şekil 4.1'de ve grupların spektrum değerleri açısından değerlendirilmesi Tablo 4.2'de belirtilmektedir.



Şekil 4.1: Çalışma gruplarına ait FTIR analizi grafiklerinin kıyaslanması

Tablo 4.2: Grupların spektrum değerleri açısından değerlendirilmesi

Spektrum Değeri	Grup 1 Ort±SS (medyan)	Grup 2 Ort±SS (medyan)	Grup 3 Ort±SS (medyan)	Grup 4 Ort±SS (medyan)	p
Amid A	3294,25±5,91 (3293,61)^{a}	3296,06±6,03 (3297,38)^{a}	3301,1±9,87 (3302,41)^{a}	3361,21±0 (3361,21)^{a}	0,060
Amid I	1635,07±6,3 (1632,46)^{a}	1639,72±4,11 (1641,04)^{ab}	1690,94±1,51 (1691,26)^{b}	1691,26±0 (1691,26)^{b}	0,030 *
Amid II	1542,95±4,08 (1544,26)^{a}	1539,7±1,14 (1540,36)^{a}	1552,1±9,8 (1552,1)^{ab}	1640,3±0 (1640,3)^{ab}	0,033 *
Organik + ν_3 CO_3^{-2}	1458,01±5,19 (1459,97)^{ab}	1451,52±0 (1451,52)^{a}	1453,44±1,13 (1454,09)^{ab}	1465,85±0 (1465,85)^{b}	0,019 *

Kruskal Wallis Test *$p<0,05$

Satırlardaki farklı harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir.

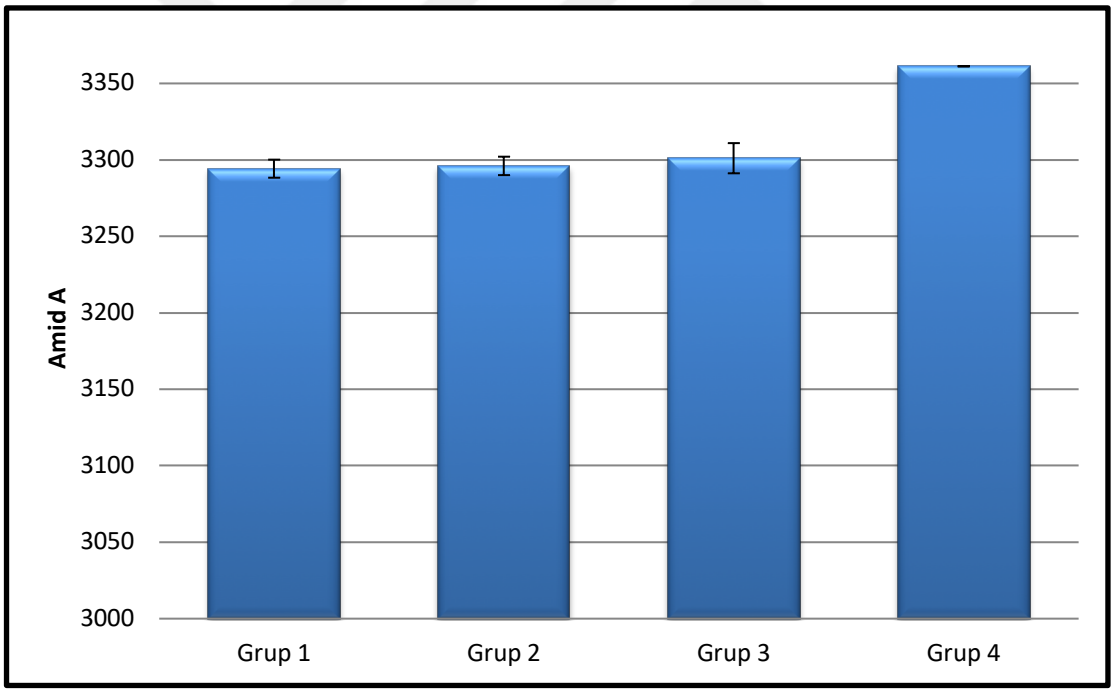
Amid I, Amid II ve Organik + ν_3 CO_3^{-2} bantlarına ait Post Hoc değerlendirme sonuçları Tablo 4. 3' te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Post Hoc değerlendirme sonuçları

Spektrum Değeri	Amid I	Amid II	Organik + ν_3 CO_3^{-2}
	p	p	p
Grup 1-Grup 2	0,564	0,492	0,074
Grup 1-Grup 3	0,018*	0,391	0,645
Grup 1-Grup 4	0,018*	0,034*	0,185
Grup 2-Grup 3	0,074	0,122	0,185
Grup 2-Grup 4	0,074	0,005*	0,002*
Grup 3-Grup 4	1,000	0,208	0,074

Dunn's Test *$p<0,05$

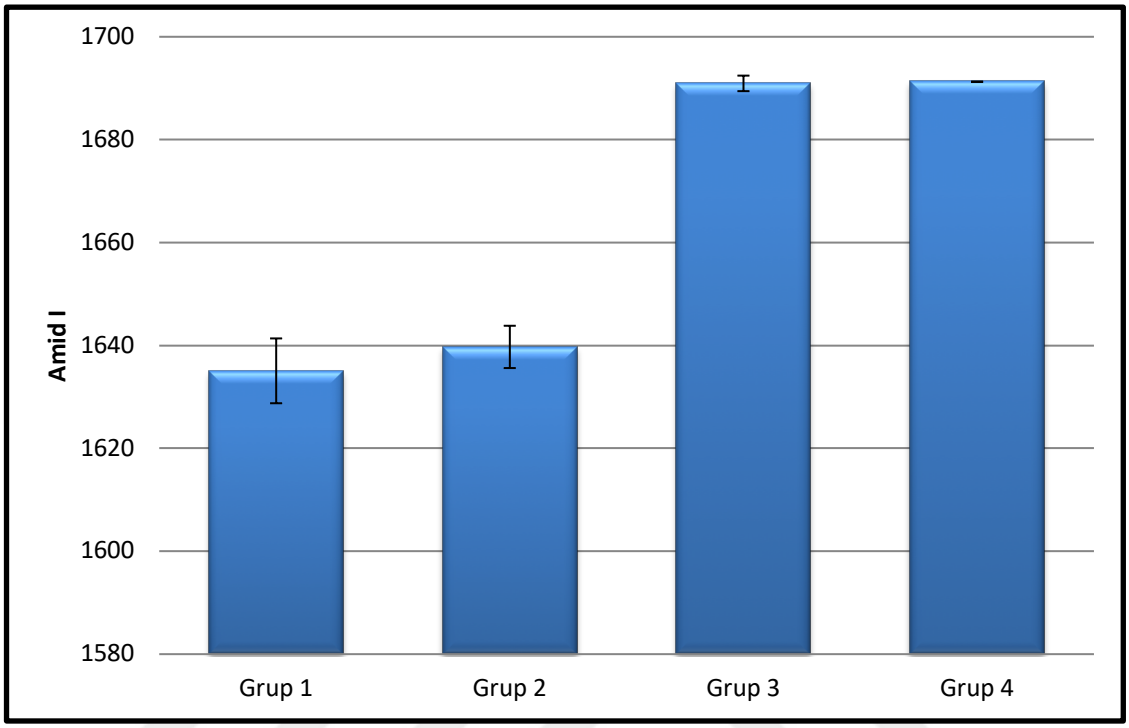
Gruplar arasında Amid A spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p:0,060; p>0,05) (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Grupların Amid A bantlarına ait spektrum değerleri

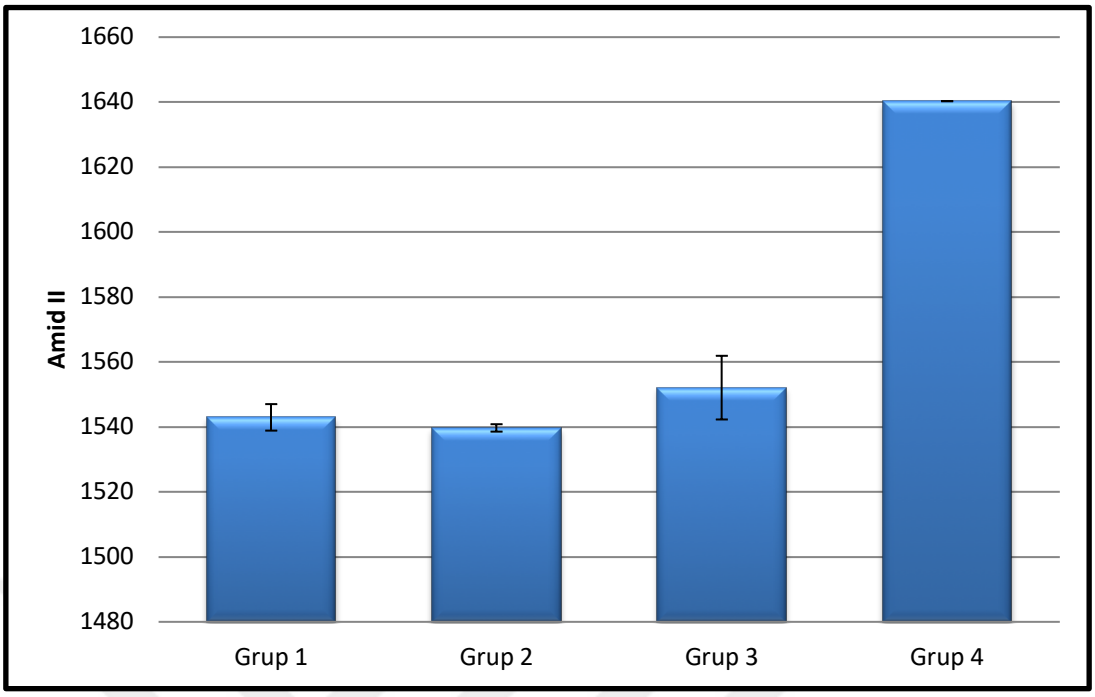
Gruplar arasında Amid I spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0,030; p<0,05) (Tablo 4.2) (Şekil 4.3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan Dunn's test sonucunda; Grup 1'in Amid I spektrum değerleri, Grup 3 (p:0,018) ve Grup 4'ten (p:0,018) anlamlı şekilde düşük

bulunmuştur (p<0,05). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05) (Tablo 4.3).



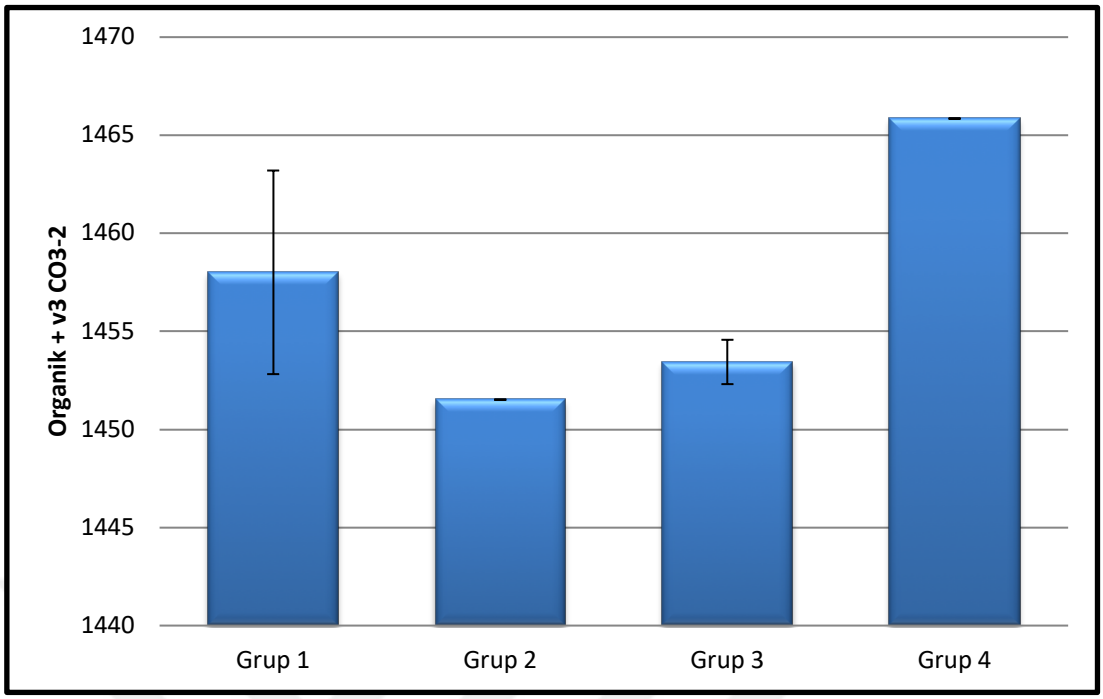
Şekil 4.3: Grupların Amid I bantlarına ait spektrum değerleri

Gruplar arasında Amid II spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0,033; p<0,05) (Tablo 4.2) (Şekil 4.4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan Dunn's test sonucunda; Grup 4'ün Amid II spektrum değerleri, Grup 1 (p:0,034) ve Grup 2'den (p:0,005) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05) (Tablo 4.3).



Şekil 4.4: Grupların Amid II bantlarına ait spektrum değerleri

Gruplar arasında Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0,019; p<0,05) (Tablo 4.2) (Şekil 4.5). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan Dunn's test sonucunda; Grup 4'ün Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum değerleri, Grup 2'den (p:0,002) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05) (Tablo 4.3).



Şekil 4.5: Grupların organik + ν_3 CO_3^{-2} bantlarına ait spektrum değerleri

Tablo 4.4: Gruplarda Amid A spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları

	Amid A (Normal değer:3309)	
	Ort±SS (medyan)	**p**
Grup 1	3294,25±5,91 (3293,61)	0,045*
Grup 2	3296,06±6,03 (3297,38)	0,065
Grup 3	3301,1±9,87 (3302,41)	0,300
Grup 4	3361,21±0 (3361,21)	0,001*

One sample t test **p<0,05*

Grup I'in Amid A spektrum ortalaması, normal değer olan 3309 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,045; p<0,05)(Tablo 4.4).

Grup II'in Amid A spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (p:0,065; p>0,05)(Tablo 4.4).

Grup III'ün Amid A spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (p:0,300; p>0,05)(Tablo 4.4).

Grup IV'ün Amid A spektrum ortalaması, normal değer olan 3309 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0,001; p<0,05)(Tablo 4.4).

Tablo 4.5: Gruplarda Amid I spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları

	Amid I (Normal değer:1662) Ort±SS (medyan)	**p**
Grup 1	1635,07±6,3 (1632,46)	0,018*
Grup 2	1639,72±4,11 (1641,04)	0,011*
Grup 3	1690,94±1,51 (1691,26)	0,001*
Grup 4	1691,26±0 (1691,26)	0,001*

One sample t test *$p<0,05$

Grup I'in Amid I spektrum ortalaması, normal değer olan 1662 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,018; p<0,05)(Tablo 4.5).

Grup II'nin Amid I spektrum ortalaması, normal değer olan 1662 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,011; p<0,05)(Tablo 4.5).

Grup III'ün Amid I spektrum ortalaması, normal değer olan 1662 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0,001; p<0,05)(Tablo 4.5).

Grup IV'ün Amid I spektrum ortalaması, normal değer olan 1662 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0,001; p<0,05)(Tablo 4.5).

Tablo 4.6: Gruplarda Amid II spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları

	Amid II (Normal değer:1550) Ort±SS (medyan)	**p**
Grup 1	1542,95±4,08 (1544,26)	0,096
Grup 2	1539,7±1,14 (1540,36)	0,004*
Grup 3	1552,1±9,8 (1552,1)	0,746
Grup 4	1640,3±0 (1640,3)	0,001*

One sample t test *$p<0,05$

Grup I'in Amid II spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (p:0,096; p>0,05)(Tablo 4.6).

Grup II'nin Amid II spektrum ortalaması, normal değer olan 1550 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,004; p<0,05)(Tablo 4.6).

Grup III'ün Amid II spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (p:0,746; p>0,05))(Tablo 4.6).

Grup IV'ün Amid II spektrum ortalaması, normal değer olan 1550 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0,001; p<0,05))(Tablo 4.6).

Tablo 4.7: Gruplarda Organik + v3 $CO3^{-2}$ spektrum değerlerinin normal değer ile karşılaştırma sonuçları

	Organik + v3 $CO3^{-2}$ (Normal değer:1458) Ort±SS (medyan)	**p**
Grup 1	1458,01±5,19 (1459,97)	0,998
Grup 2	1451,52±0 (1451,52)	0,001*
Grup 3	1453,44±1,13 (1454,09)	0,020*
Grup 4	1465,85±0 (1465,85)	0,001*

One sample t test **p<0,05*

Grup I'in Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmamıştır (p:0,998; p>0,05))(Tablo 4.7).

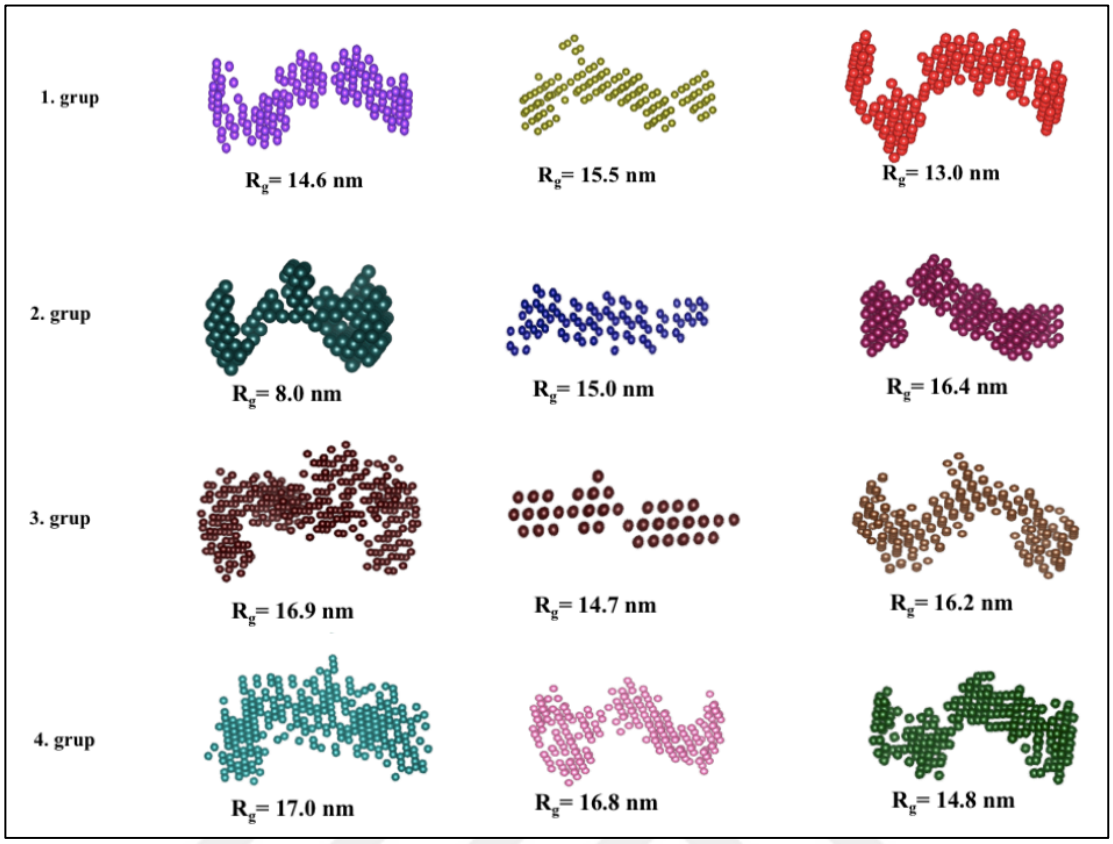
Grup II'nin Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum ortalaması, normal değer olan 1458 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,001; p<0,05)(Tablo 4.7).

Grup III'ün Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum ortalaması, normal değer olan 1458 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p:0,020; p<0,05)(Tablo 4.7).

Grup IV'ün Organik + ν_3 CO_3^{-2} spektrum ortalaması, normal değer olan 1458 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0,001; p<0,05) (Tablo 4.7).

4.3. SAXS Görüntülerinin Analiz Sonuçları

Dentin kesitlerine ait nanomorfolojiler ve boyutlar (jirasyon yarı çap değerleri) Şekil 4.6'da kıyaslamalı biçimde verilmiştir.



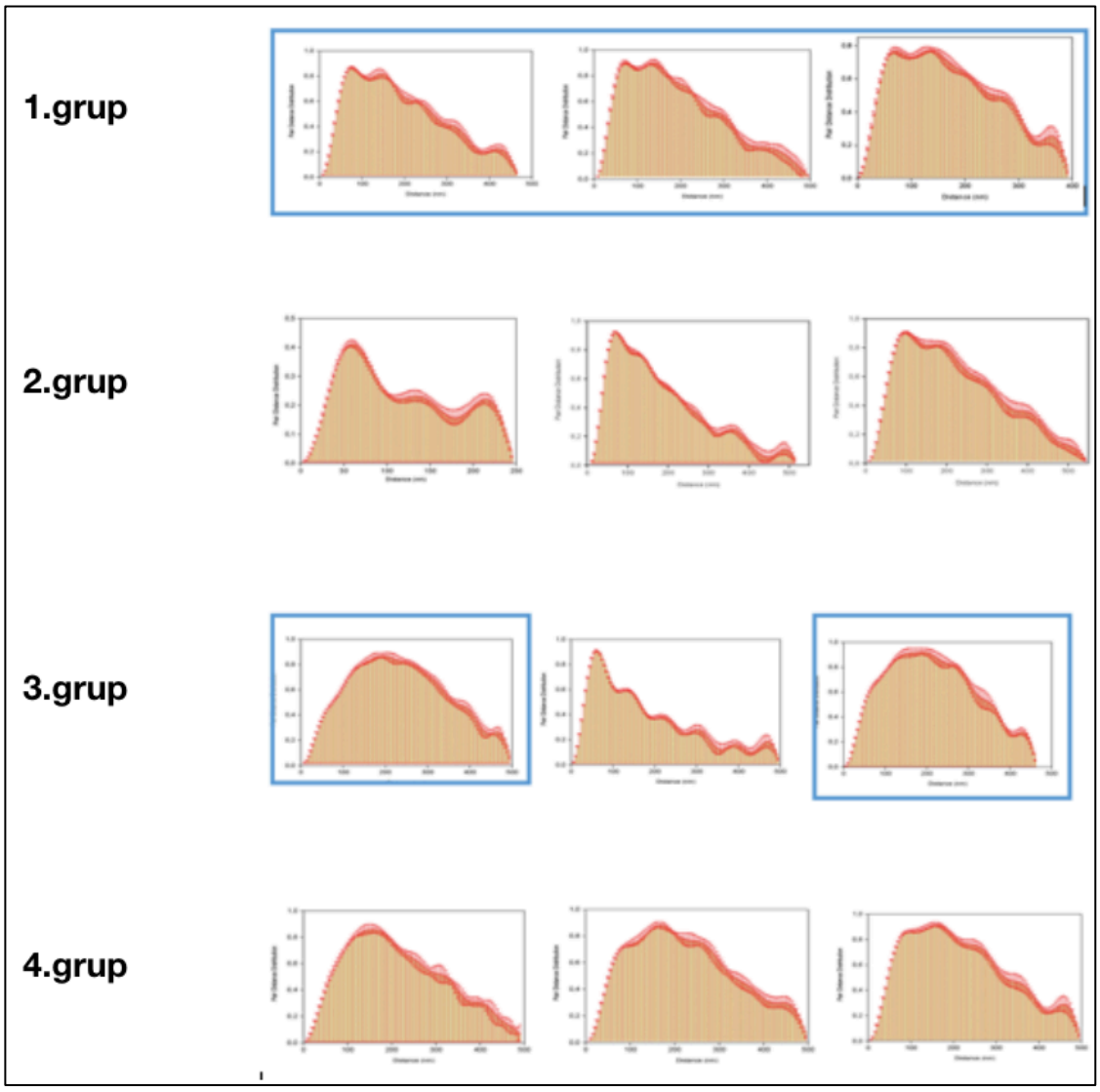
Şekil 4.6: Çalışmamızda elde edilen nanomorfolojiler ve boyutlar

Biyomimetik ajan olan P11-4 uygulanan 1. grupta, iyileşme tüm örneklerde gözlenmiştir. En iyi iyileşme R_g=14,6 nm olan kesitte gözlenmiştir. İyileşme normal dentine benzer yapıda meydana gelirken, HAPH ve HAPL oluşumlarının boyutlarının küçüldüğü gözlenmiştir. En fazla küçülme %20,7 oranı ile R_g=13,0 nm olan örnekte gözlenmiştir.

GDF uygulanan 2. grup örnekte, yani gümüş içerikli malzeme uygulandığında yine iyileşmeler mevcuttur ancak biyomimetik açıdan en kötü iyileşme bu grupta gözlenmiştir. Yapay çürük oluşturulan negatif kontrol grubuna en yakın örnek R_g=16,4 nm olan kesitte gözlenmiştir.

Sağlıklı yapıya en yakın oluşum boyutu R_g=16,2 nm olan kesitte elde edilmiştir.

HAPL ve HAPH nano oluşumlarının uzaklık dağılımları incelendiğinde; özellikle P11-4 ve florür vernik uygulamalarında, mavi çerçeve içindeki uzaklık dağılımları kıyaslandığında 1. ve 3. grupların her ikisinde de çok iyi uyum olduğu yani biyomimetik malzeme olan peptid P11-4 (1. grup) uygulamasının, standart tedavi malzemesi olan florür vernik (3. grup) ile çok benzer doku onarımı yaptığı söylenebilir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Çalışmamızda elde edilen nano oluşum uzaklık dağılımları

5. TARTIŞMA

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin geliştirilmesi, tanı yöntemlerinin iyileştirilmesi ve doku mühendisliği çalışmalarının yapılmaya başlanması ile tedavi protokollerinde değişiklikler gözlenmektedir. Ağız içerisinde en sık karşılaşılan sorun olan çürüklerin tedavisinde çürüğün tamamen uzaklaştırılması, dolgu, kanal tedavisi gibi invaziv yöntemler yerine minimal invaziv tedavi yöntemler, çürüğün durdurulması, biyomimetik iyileşme ve doku mühendisliği uygulamaları tercih edilmektedir (208,209). Çürük diş dokularının tamiri için geliştirilmek istenen biyomateryaller ile özellikle dentin dokusunun biyomimetik iyileşmesini sağlayabilmek amaçlanmaktadır (208).

Diş çürüğünün doğal iyileşme periyodu olarak tanımlanan remineralizasyon, demineralize olmuş hidroksiapatit kristallerine, florid yardımıyla Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının tekrar çökelmesi ve asit ataklarına daha dirençli florapatit kristallerinin oluşmasıdır (216). Yapılan güncel çalışmalarda florid içerikli ürünlerinin kullanımının diş çürüğünü engellemek için altın standart olduğu belirtilmiştir (217–220). Floridin etkinliğinin artan konsantrasyon ile arttığını belirtilmiştir. Ancak florid mikarının artması ile nörotoksik etkilerinin ve çocuklarda florozis riskininin artacağı ileri sürülmüştür (210,211). Bu sebeplerden dolayı güncel remineralizasyon teknolojileri ile ilgili çalışmaların yapılması gerekmektedir (212).

Dentin dokusundaki remineralizasyon mine dokusuna göre daha karmaşık ve zordur. Dentinin remineralize olması sırasında mineraller ekstrafibriller olarak kollajen fibrillerin etrafına çökelmektedirler. Yapılan bir çalışmada aynı remineralizasyon koşullarında bulunan aynı asitle pürüzlendirilmiş mine ve dentin dokularından; minede remineralizasyon gözlenirken dentinde remineralizasyon gözlenmediği belirtilmiştir (213). Geleneksel flor tedavileri ve mine remineralizasyonunda kullanılan materyallerin dentinde daha az etkili olduğu bildirilmiştir (214).

GDF, hem kollajenaz enzimini inhibe etme hem de dentinin demineralizasyonunu engelleme özelliklerine sahip bir birleşiktir (215). Dentin kesitlerinde yapay dentin çürüğü oluşturulan bir çalışmada tek başına GDF ve sodyum florür (NaF) ile birlikte GDF kullanımının demineralizasyonu ve kollajenin matriks yıkımını önleme etkinliğinin benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sadece GDF uygulanan grupta biyofilm tabakasının inhibisyonun NaF+GDF uygulanan gruba göre daha etkili olduğu

belirtilmiştir. Ayrıca NaF'nin GDF'nin antibakteriyel etkinliğini azalttığı gözlenmiştir (216). Çekilmiş insan dişlerinden hazırlanan dentin kesitlerinde yapay çürük oluşturularak %12'lik GDF (14,150 ppm florür), poletilen glikol ile kaplanmış gümüş partiküllerle (PEG-AgNP) %2,5'luk NaF (11,310 ppm florür) topikal olarak uygulanmış ve kontrol grubu oluşturulmuş. Tüm gruplar 8 gün boyunca pH siklusunda bekletilerek SEM, X-ışını kırınımı analizi (XRD) ve mikro bilgisayarlı tomografi ile incelenmiştir. GDF ve PEG-AgNP+NaF kullanılan gruplarda kollajen matriks yıkımının engellenmesi ve remineralizasyonun sağlanmasının benzer etki gösterdiği belirtilmiştir (217).

GDF'nin topikal olarak sürülmesinin ardından ışık ile polimerize edilmesinin dentinin mikrosertliğinin arttıracağı düşünelerek 16 süt keser dişin kullanıldığı ex-vivo bir çalışmada GDF uygulanan dişler iki gruba ayrılmıştır. İlk gruba GDF uygulanması yapıldıktan sonra 40 saniye LED ışıkla polimerizasyon yapılmıştır. LED ışık uygulanan grupta gümüş iyonlarının çökelmesinin ve dentin sertliğinin diğer gruba göre %26 oranında daha fazla arttığı gözlenmiştir (218). Süt azı dişlerinin kullanıldığı başka bir in-vitro çalışmada ise karbür frez, seramik frez ve erbiyum lazer ile hazırlanan dentin yüzeylerine GDF uygulanarak yarısı LED ışıkla polimerize edilmiştir. Işıkla polimerize edilen ve edilmeyen gruplar arasında gümüş penetrasyon derinliğinde anlamlı bir fark gözlenmezken, yüzey hazırlama yöntemleri içinden erbiyum lazer uygulanmasının diğer gruplara göre smear tabakasını azaltarak gümüş penetrasyonu derinliğini daha çok arttırdığı gözlenmiştir (219).

Kendiliğinden birleşen peptidlerden olan 11 aminoasitten meydana gelen P11-4 molekülü düşük pH değerlerinde üç boyutlu olarak fibriller dokuyu meydana getirebilen oligopeptidlerdendir (176,177). Diş hekimliğinde kullanımının ön önemli sebebi de kalsiyum iyonlarına affinitesi sonucunda fibriller yapıyı ve matriks iskelet yapsını biyomimetik olarak taklit edebilmesidir (177,220).

Diş hekimliğinde P11-4 kullanılarak dental sert dokulardaki remineralizasyon etkinliği, antimikrobiyal özelliği veya çürük engellemek potansiyelinin incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır (18,20,170,176,177). P11-4 kullanılarak mine dokusunda yapılan çalışmalarda remineralizasyonun ve yüzey altındaki sertliğin arttığı gözlendiği için başlangıç mine lezyonlarının tedavisinde kullanımı günden güne artmaktadır (19,221).

Yapılan çalışmalarda çürüğün durdurulmasında, önlenmesinde sıklıkla kullanılan bileşiklerden florid içerikli ürünler altın standart olarak kullanılmakta olup GDF içerikli ürünlerin demineralizasyonu engellediği bilinmektedir (215). Bu sebeple çalışmamızda P11-4'ün dentin dokusu üzerindeki çürük durdurma etkinliği ve tamir mekanizmasını florür vernik ve GDF ile kıyaslanması planlanmıştır.

Literatürde çürük lezyonlarının tedavi etkinliğinin araştırıldığı in-vivo, in-situ ve in-vitro çalışmalar bulunmaktadır. Klinik ve in-situ olarak yapılan çalışmalar sonucunda ağız içerisindeki doğal mekanizma sebebiyle gerçeğe en benzer şekilde sonuçlar elde edilmektedir (222). Ancak in-situ olarak yapılan çalışmalarda hasta ağzına apareyler yerleştirilebilir ve bu durum hastanın kooperasyonunu gerektirdiğinden genellikle sorun yaşanabilmektedir. Ayrıca in-vivo ve in-situ çalışmalarda, ağız içerisindeki kimyasal, mekanik etkenler veya hastaya bağlı sebepler nedeniyle başarısızlıklarla karşılaşılabilmektedir (223,224) . İn-vitro çalışmalarda ise ağız ortamına en yakın olacak şekilde bir ortam oluşturulması ve çalışmayı olumsuz etkileyebilecek etkenlerin minimuma indirlmesi hedeflenmektedir. Aynı zamanda in-vitro çalışmalarda araştırılmak istenen bir değişkenin kolay değerlendirilebilmesi, hızlı, kolay ve ucuz olması gibi avantajları da bulunmaktadır (223). Çürükle ilgili özellikle demineralizasyon ve remineralizasyon aşamalarının incelendiği literatürdeki çalışmaların çoğunlukla in-vitro şartlar altında planlandığı görülmüştür (61,84,113,133,217,225). Ayrıca tedavide klinik olarak kullanılacak materyallere ait önemli faktörlerin de değerlendirilebilmesi için in-vitro koşullarda yapılan testlerin sonuçlarının klinik kullanım açısından etkili olduğu da vurgulanmaktadır (226). Bu sebeplerle kullanacağımız materyallerin dentin üzerine etkilerini inceleyebilmek için çalışmamızın in-vitro şartlar altında yapılması planlanmıştır.

İn-vitro şartlar altında yapılan çalışmalarda insan ve hayvan dişleri kullanılabilmektedir. Hayvan dişleri arasında da boyutlarının büyük olması sebebiyle sığır dişleri kullanılımı yaygındır (19,227). Ancak insan dişleri ile sığır dişlerinin histolojik, biyokimsal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle demineralizasyon ve remineralizasyon aşamalarındaki etkiler benzer şekilde gerçekleşmemektedir (228–230). Bu nedenle çalışmamızın çekilmiş insan dişleri üzerinde yapılması planlanmıştır.

İn-vitro çalışmalarda kullanılan çekilmiş dişlerin saklama koşulları ve süresi büyük önem taşımaktadır. Diş çekimi sonrası %100 nemli ortam gerekmektedir ve bu

ortam; deiyonize su, Hanks' ın dengeli tuz çözeltisi (HBSS) ve timol gibi solüsyonlar kullanılarak sağlanabilmektedir. Bu solüsyonlara alternatif olarak kullanılabilecek sodyum hipoklorit, etanol, formol, gluteraldehit gibi solüsyonların antimikrobiyal etkinlikleri bulunmaktadır. Ancak saklama süresince kullanılan bu antimikrobiyal solüsyonların diş dokularının mekanik özelliklerini değiştirebileceği belirtilmiştir. Çekilmiş dişlerin saklama süresi boyunca yapısının değişmeden kalmasının deney sonuçlarının doğruluğu açısından çok önemli olduğu belirtilmiştir (231,232). Saklama solüsyonları olarak %2 'lik formaldehit ile %0.01' lik timolün kullanıldığı ve mine demineralizasyona etkisinin araştırıldığı bir çalışmada formaldehitin mine demineralizasyon direncini arttırdığı, timolün ise mine demineralizasyon direncini etkilemediği sonucu elde edilmiştir (233). Mine ve dentin mikrosertliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise 2 ve 12 ay boyunca saklama solüsyonları olarak; deiyonize su, %0,2' lik gluteraldehit, HBSS, % 0,1' lik sodyum hipoklorit (NaOCl) ve %0,1' lik timol kullanılmıştır. Bu solüsyonlarda bekletilen dişlerin 2 aylık saklama süresi sonunda dentin ve mine dokularının mikrosertliğinin normal aralıklarda olduğu ancak 12 aylık saklama süresi sonucunda mikrosertlik değerinin anlamlı sevilerde azaldığı gözlenmiştir. Bu nedenle de bu solüsyonlarda en fazla 2 ay süre boyunca saklanabileceği belirtilmiştir (231) . Literatürdeki in-vitro çalışmaların çoğunda saklama solüsyonu olarak %0,1'lik timol solüsyonu tercih edilmektedir (85,234). Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızda çekimin ardından %0,1' lik timol solüsyonunda en fazla 2 ay beklettiğimiz çürüksüz dişler kullanılmıştır.

Demineralizasyon modellerinde çoğunlukla sağlıklı diş yüzeyleri tercih edilmektedir. İn-vitro çürük modelinin kimyasal olarak oluşturulduğu çalışmalarda demineralizasyonu sağlayabilmek için pH değeri düşük olan asitler kullanılmaktadır. Bu asitler içerisinde sıklıkla organik asit olan laktik asit ve asetik en fazla tercih edilen asit-tampon solüsyonlarıdır. Yapay çürük oluşumunda kullanılan inorganik asitlere kıyasla daha başarılı olunmasına rağmen karmaşık intraoral durumunun taklit edilememesi, normalde 100-250 μm derinlikte lezyon oluşumu aylarca sürerken bu modelde bikaç gün içerisinde hazırlanmasının dezavantaj olduğu bildirilmiştir (71,73,235). Ancak deney süresinin rahatça takip edilebilmesi, kullanılan malzemelerin rahat temin edilebilmesi, solüsyon sıcaklığının ayarlanabilir ve hızlı olması gibi nedenlerden ötürü birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Hazırlanan numuneler, pH değeri 4,5-5,0 arasında olan asit tampon solüsyonlarında 16 saat ile 28 gün arasında değişkenlik

gösterebilen sürelerde bekletilebilmektedir (71,73). Remineralizasyon modelinde ise in-vitro olarak oluşturulmuş yapay çürük lezyonlara ilgili ajanlar uygulanarak deney sonucunda mineral içeriğindeki değişimler incelenmektedir (73). Demineralizasyon ve remineralizasyon modelleri ile; demineralizasyon solüsyonları ile yapay çürük oluşturup materyaller uygulandıktan sonra remineralizasyon solüsyonunda tutulması şeklindedir. Bu modelleme ile dental dokuların aside dayanıklılığı, iyon değişimleri araştırılabilmektedir (236) .

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde kullanılan demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarının içeriği, pH değerlerinin sabit kalması, solüsyonlarda bekletilme süresi gibi faktörlerin önemli olduğu belirtilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda in-vitro olarak çürük oluşturulmuş numunelere remineralizasyon ajanı uygulanması sonrasında deney süresince remineralizasyon solüsyonunda bekletildiği ve değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır (55,237–239). Bununla birlikte demineralizasyon ve remineralizasyon döngülerini takip edebilmek için kullanılan en sık yöntemin pH siklusu modeli olduğu; asit atakları ile tükürüğün tamponlayıcı etkisinin değerlendirilmesi gereken durumlarda kullanılabileceği belirtilmiştir. Basit demineralizasyon metodundaki gibi, in-vitro olarak yapay çürük oluşturulmuş numunelere çözeltilerin dönüşümlü olarak uygulandığı bir yöntemdir. pH siklusunda kullanılan demineralizasyon solüsyonları yapay çürük oluşturmak için kullanılan solüsyonların içeriği ile benzer olup laktik asit, asetik asit gibi organik asitleri içermektedir. Demineralizasyon solüsyonları ise tükürüğü taklit eder bir içerikte olup Ca^{+2}, PO_4^{-3} ve bazen flor iyonlarının içerebilmektedir. Diş numuneleri hem demineralizasyon hem remineralizasyon solüsyonlarında gün içerisinde 3, 6 ve 17 saat gibi belirli periyotlarda değiştirilmektedir. Yaygın olarak kullanılan pH siklusu modeli çürük riskinin yüksek olduğu, başlangıç çürük lezyonlarının değerlendirildiği, demineralizasyon-remineralizasyon sürecinin araştırıldığı ve değerlendirildiği kariyoloji çalışmalarında kullanılabilmektedir (73).

Yapılan araştırmalar doğrultusunda çalışmamızda, hazırladığımız dentin kesitleri yapay çürük oluşturabilmek için 2,2 mM $CaCl_2$; 2,2 mM NaH_2PO_4 ;0,05 M asetik asit ile pH'sı 4,4 olana kadar 1 M KOH (potasyum hidroksit) ilave edilen ve "BioRed Laboratuvarı" tarafından hazırlanan demineralizasyon solüsyonunda 72 saat boyunca bekletilmiştir (240). Yapay dentin çürüklerinin oluşturulmasından sonra

demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonları ile 28 gün boyunca pH siklusu uygulandı. Remineralizasyon solüsyonu olarak BioRed Laboratuvarı tarafından hazırlanan; 1,5 mM $CaCl_2$ (kalsiyum klorür), 0.9 mM NaH_2PO_4 (Sodyum dihidrojen ortofosfat dehidrat), 0.15 M KCL (potasyum klorid) içeren ve pH 7,0 seviyesinde olan solüsyon kullanılmıştır (72,207).

İn-vitro olarak hazırlanmış sağlıklı ve yapay dentin çürüğü oluşturulmuş dentin numunelerine, pH döngüsü koşulları altında standart ve yüksek oranda florür içeren macunlar uygulanmış remineralizasyona etki etme kapasitesinin farklı olmadığı gözlenmiştir (241) Sağlıklı ve yapay dentin çürüğü in-vitro olarak oluşturulmuş dentin numunelerine; NaF, NaF+TCP (trikalsiyum fosfat), CPP-ACP ve GDF vernikleri pH döngüsü koşulları atında uygulanıp çürük önleyici etkisi incelenmiştir (242). Literatürdeki 2014-2016 yılları arasında yapılmış remineralizasyon ve demineralizasyonun incelendiği bir derlemede kariyoloji çalışmalarının çoğunun (%84) in-vitro çalışma olduğu ve bu çalışmalar içerisinden de %87'sinde kimyasal olarak oluşturulan in-vitro çürük modellerinin (pH siklusu ve basit demineralizasyon yöntemi), geri kalan %13 'ünde ise biyofilm modelinin kullanıldığı belirtilmiştir (243). Tüm bu incelemeler sonucunda çalışmamızda in-vitro çürük oluşumu modellerinden pH siklusu modeli koşullarının sağlanması tercih edilmiştir.

SEM analizi, dental dokuların morfolojilerinin incelenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir (244). FTIR analizi, organik ve inorganik maddelerin moleküler yapısının incelenen yapıya zarar vermeden incelenmesini sağlayan bir yöntemdir (245–247). SAXS analizi ise incelenecek numunelerin boyut, şekil gibi özelliklerinin nano boyutlarda incelenmesi için kullanılan yöntemdir. Dentin kesitlerinde yapay çürük oluşturularan gruplara GDF, PEG-AgNP ve NaF uygulandıktan sonra 8 gün boyunca pH siklusunda bekletilen bir çalışmada dentin morfolojisindeki değişiklikler SEM analizi ile gösterilmiştir (217). Dört ticari GDF ajanının dentinin kimyasal bileşimi ve mikroyapısal özellikleri üzerindeki etkilerini araştırıldığı bir çalışmada; numunelerin bileşimsel, kristalli ve mikroyapısal özelliklerini karakterize etmek için ATR-FTIR, X-ışını kırınımı ve SEM teknikleri kullanılmıştır (248). %38' lik GDF solüsyonu ve %5 sodyum florür (NaF) verniğin yapay dentin çürüğü lezyonları üzerindeki remineralize edici etkisini ve bakteriyel büyümeyi önleme etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, lezyon derinliği, çökeltilerin özellikleri ve matris (kollajen)-mineral oranı; mikro-CT, XRD

FTIR ve SEM ile değerlendirilmiştir (216). Kazein fosfopeptit amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP) ve remineralize edici ağız bakım sistemi (ROCS®) etkinliğinin, demineralize ve remineralize edilmiş mine yüzeyleri karşılanarak araştırıldığı in-vitro bir çalışmada da mineralizasyon derecesinin değerlendirilmesi FTIR, nanoyapılardaki değişim ise SAXS analizleri ile incelenmiştir (249). Çalışmamızda peptid P11-4, GDF ve florür vernik uygulanan gurupların FTIR analizlerinde N-H grubu içeriğinde hidrojen bağı bulunduğunu gösteren Amid A spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p:0,060; p>0,05). Sekonder kolajen yapısına en duyarlı olan Amid I bandı spektrum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0,030; p<0,05). P11-4 uygulanan grubun Amid I spektrum değerleri, florür vernik uygulanan grup (p:0,018) ve negatif kontrol grubundan (p:0,018) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0,05).

Dentin dokusunda yapılan çalışmaların incelenmesi sonucunda dentinin morfolojik incelemeleri için SEM, moleküler yapının incelenmesi için FTIR ve nano boyutlardaki ultrastrüktürel incelemelerin yapılabilmesi için SAXS analizlerinin yapılmasının yeterli ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda SEM analizi ile yapılan incelemelerde X1000 büyütme ile dentin yüzey morfolojisinin genel değişimi, X5000 büyütme ile Ca^{2+} ve PO_4^{3-} çökelmesi, dentin tübüllerinin yapısı, kapanması, iskeletsel (scalfold) yapı oluşumu, homojen yapı oluşumu değerlendirilmiştir. Numunelerin FTIR analizi, vakum altında 4000-400 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte 5 dakika süreyle 350 tarama sayısıyla taranarak, su buharı ve karbon dioksitin sonuçlara olumsuz etkisi de elimine edilerek fosfat, karbonat-fosfat, amid A, amid I, amid II bantlarına ait değerler incelenmiştir.

Dentin disklerinde, silika/kalsiyum(stronsiyum) karbonat nanoparçacıkları kullanılarak biyomimetik mineralizasyonunun incelendiği in-vitro bir çalışmada ise SEM ve FTIR analizleri ile fizikokimyasal karakterizasyon yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda kullanılan nanoparçacıkların biyomimetik mineralizasyon etkinliğine ait sonuçlar SEM ve FTIR analizlerinden elde edilen sonuçlar ile gösterilmiştir (250). İki farklı biyoaktif camın neden olduğu dentin remineralizasyonunun incelenmesi için yapılan başka bir çalışmada da dentin yüzey morfolojisi SEM, kimyasal içeriği ise FTIR analizileri ile incelenmiştir (251). Çekilmiş, çürüksüz diş ve meziodenslerin moleküler ve nanoyapılarının kıyaslamasının yapıldığı başka bir çalışmada FTIR analizi ile fosfat-amid

I, karbonat-fosfat ve karbonat-amid I bant alanı oranları ve kristallik indeksleri; SAXS analizi ile de dentin fibrillerinin boyutları, dağılımları incelenmiştir (252). Laktat ve asetat asitleri ile farklı derinliklerde oluşturulan dentin çürüklerinin mekanik özellikleri, mineral yoğunluk profilleri ve ultrastrüktürel varyasyonlarındaki farklılıkların incelenmesi planlanan in-vitro çalışmada transmisyon electron mikroskobu (TEM), mikro bilgisayarlı tomografi (Micro-CT) ve SAXS analizleri kullanılmıştır. TEM analizi, laktatın kollajen matriksten mineralleri uzaklaştırmada daha etkili olduğunu; Micro-CT laktatın daha düzensiz bir matriks yapısı meydana getirdiğini ve bulunan sonuçların SAXS analizi ile de doğruladığını belirtmişlerdir (253).

P11-4'ün yumuşak dokudaki etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Rat bağ dokularına uygulanan P11-4 peptidinin, MTA (mineral trioksit agregat) ve Biodentine ile karşılaştırılmalı olarak incelendiği bir çalışmada Fibroblast Büyüme Faktörü 2 (FGF2) ve Kemik Morfogenetik Protein 2 (BMP2) ekspresyonu miktarı incelenmiştir. Ortalama 250-280 gr ağırlığında olan 21 adet erkek Sprague Dawley rat kullanılarak yapılan çalışmada, ratlar sakrifiye edilecekleri zamana göre 3 ayrı gruba (14 gün–28 gün–60 gün) ayrılmıştır. Protein ekspresyonuna bakılacak örnekler ise ependorf tüplere alınarak kuru buza konulmuş ve incelemeleri hemen yapılmıştır. Çalışmanın sonunda; günler arttıkça tüm materyallerde doku toleransının arttığı ve eksprese edilen FGF 2 ile BMP 2 seviyelerinin, P11-4 peptitinde, Angelus MTA ve Biodentine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir (254). Periodontal ligament modeli oluşturularak yapılan hücre kültürü çalışmasında P11-4 kullanılarak rejeneratif kapasitesi incelenmiştir. Bu çalışma neticesinde de P11- 4'ün periodontal ligament fibroblastlarını arttırdığını, bu hücreleri polimerik matriks içine göçe teşvik ettiklerini ve yapılacak hayvan deneylerinin faydalı olabileceği vurgulanmıştır (255).

Diş hekimliğinde P11-4 peptidi ile ilgili sınırlı sayıda yapılmış olan çalışmalar, diş sert dokularındaki remineralizasyon etkinliği, antimikrobiyal özellikleri veya çürük engelleme, durdurma kapasitesini değerlendirilmiştir (18,20,170,176,177). İn-vitro olarak yapılan çalışmalarda P11-4 peptidinin mine remineralizasyonunu sağladığı ve yüzey altı çürük lezyonlarına etki ettiği gösterilmiştir (19,221).

Başlangıç proksimal çürük lezyonlarının tedavisinde P11-4'ün kullanıldığı bir klinik çalışmada 18-65 yaş aralığında 26 hasta dahil edilerek 28 olgu radyograflarla değerlendirilmiştir. 28 olgunun 17'sinde çürük lezyonlarında gerileme olduğu

gözlenmiştir (127). Ortodontik tedavilerde kullanılan braketlerin desimantasyon sorununu engellemek amacıyla yapılan in-vitro bir çalışmada çekilmiş 20 yaş dişlerine P11-4 uygulanarak metal braketler simante edilmiş ve P11-4 uygulamasının bağlanma gücüne etki etmediği ifade edilmiştir (176).

İn-vitro olarak yapay mine çürüğü oluşturularak P11-4'ün yüzey altı lezyonlara etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, P11-4 uygulanmasının ardından örnekler 14 gün yapay tükürük solüsyonunda bekletilmiştir. Çürük oluşumu ve P11-4 uygulamasının sonunda histolojik kesitler TEM (geçirimli electron mikroskobu) ve lazer floresans yöntemleri ile incelenip μCT (bilgisayarlı mikro tomografi) cihazı ile lezyon derinliği ölçülmüştür. Çalışma sonucunda P11-4 liflerinin lezyon gövdesi boyunca oluştuğu ve hidroksiapaptit kristallerinin çekirdek oluşumuna katkıda bulunduğu gözlenmştir. Elde edilen veriler sonucunda da P11-4'ün yüzey altı lezyonlarında rejenerasyonu sağlama etkinliği olduğu belirtilmiştir (55).

P11-4 peptidi, 2013 yılında "Curodont Repair" ismiyle ticari bir preparat olarak üretilmiştir. Bu ticari form genelde in-vitro çalışmalarda kendisi veya distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır. Çekilmiş 40 adet dişin demineralize edilen bukkal mine yüzeylerine, Curadont Repair^{TM}'in uygulanarak remineralizasyon etkinliği DIAGNOdent, VistaProof floresans yöntemleri ve SEM kullanılarak araştırılmıştır. Demineralize edilmiş bukkal yüzeylere 0,05 ml distile su ile sulandırılmış P11-4 materyali uygulanarak; 1., 8. ve 12. Haftalardaki değişim değerlendirilmiştir. Deney ve kontrol gruplari arasindaki incelemede 1. hafta sonunda remineralizasyon ile ilgili anlamlı bir fark gözlenmezken 8. Ve 12. haftaların sonunda elde edilen sonuçlarda anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. SEM analizi ile yüzey morfolojisi incelendiğinde demineralize alanların çok büyük oranda remineralize olduğu ve sağlıklı mine yapısına çok benzer olduğu gözlenmiştir. Çalışma sonucunda in-vitro olarak oluşturulmuş mine çürüklerinde Curadont Repair^{TM} ile remineralizasyonun gerçekleşebileceği belirtilmiştir (238).

P11-4 peptidinin klinik etkinliğinin incelendiği çalışmalar oldukça azdır. 18-65 yaş arasındaki sınıf V mine lezyonu bulunan başlangıç çürüklerine P11-4 peptidi uygulanarak materyalin etkinliği ve güvenilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada lezyonlar üzerine seyreltilmiş P11-4 30 saniye boyunca uygulanmıştır. Klinik kontrollerde çekilen fotoğraflarla 4., 8., 30. Ve 180. Günlerde lezyon renk, boyut ve ilerleme kritelerlerine

göre değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda tek sefer uygulamanın 1. Ay so nunda anlamlı etkilerinin olduğu ve bu etkilerin 6 ay boyunca devam ettiği belirtilmiştir.1. ve 6. Ay sonunda etkiler kıyaslandığında P11-4'ün esas etkisinin 1. Ay sonunda gözlendiği bildirilmiştir. İyileşmenini 8. gün başladığı ama 30 güne kadarki bu iyileşmenin anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Tek bir sefer uygulanan P11-4'ün 6 aya kadar etkisini sürdürebildiği tespit edilmiştir (256).

Ara yüz çürükleri bulunan 18-65 yaş arası 26 hastanın, çürük bulunan 35 diş yüzeylerine Curadont Repair™ uygulanarak 1 yıl boyunca görsel ve radyografik tekniklerle çürüklerin remineralize olma durumları takip edilmiştir. Talimatlara uygun olarak sodyum hipoklorit ve %35'lik ortofosforik asit ile kimyasal yüzey hazırlığı Yapılan dişlere Curadont Repair™ uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre 6 ay sonunda çürük lezyonların %31'lik kısmında ICDAS II (Uluslararası Çürük Tespit ve Değerlendirme Sistemi)'de daha düşük değerler elde edebilecek kadar remineralize alanların oluştuğu gözlenmiştir. 1 yılın sonundaki incelemede de çürük lezyonlarının %72'sinin gerilediği, %14'ünün ise ilerleme olmaksızın durduğu bildirilmiştir (127). Çalışmamızda P11-4 uygulanan grupta, normal dentin dokusuna en benzer nano boyutta iyileşmenin gerçekleştiği grup olduğu SAXS analizi ile gözlenmiştir. P11-4 grubundan sonraki en iyi nanoyapıda iyileşmenin ise florür vernik uygulanan grupta olduğu tespit edilmiştir.

P11-4 peptidinin dentin dokusundaki etkinliği ile ilgili yapılmış olan çalışmalar kısıtlı sayıda olduğu için kullanılabilirliği belirsizliğini korumaktadır. Dentin hipersensitivitesinin tedavisi için P11-4 peptidinin kullanıldığı iki çalışma bulunmuştur (257,258). Bu çalışmalardan birinde P11-4 peptidinin içerdiği hidroksiapatit bölgeleri nedeniyle dentin yüzeyine yüksek affinite gösterdiği ve yüksek affinite sonucunda oluşan elektrostatik etkileşimler nedeniyle dentin aşırı duyarlılığı azaldığı bildirilmiştir (257). Dentin hipersensitivitesinin araştırıldığı diğer çalışmada ise, kalsiyum fosfat içeren yeni bir kendiliğinden birleşen peptit matriks jelinin, seçilen desensitize edici diş macunlarına kıyasla dentin tübüllerini etkili bir şekilde tıkama yeteneğini araştırılmıştır. Desensitize edici jel ve diş macunlarının dentin tübüllerini tıkama kabiliyeti, hem pürüzlendirilmiş hem de kırık dentin yüzeylerinde SEM kullanılarak fırçalamadan önce ve sonra değerlendirilmiştir. Kendiliğinden birleşen peptit matriks jeli, diğer desensitize edici diş macunlarına kıyasla açık tübüllerin sayısında daha belirgin bir azalma göstermiştir.

Hidrolik iletkenlik ölçümlerindeki azalmaların %12,5 olduğu bildirilmiştir (258). Çalışmamızda elde edilen SEM verilerine göre dentin tübüllerinin P11-4 ve florür vernik uygulanan grupta daraldığı, GDF uygulanan grupta ise büyük oranda tıkandıkları tespit edilmiştir.

18-30 yaş arasındaki hastalardan çekilmiş çürüksüz 3. molar dişlerin kullanıldığı in-vitro olarak yapay dentin çürüğünün oluşturulduğu ve P11-4 peptidinin uygulandığı bir çalışmada, dentinin organik bileşenleri, proteolitik aktivite, bağlanma arayüzünün mekanik özellikleri ve yapay çürükten etkilenen dentine nanosızıntı kriterleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, atomik kuvvet mikroskobu ile P11-4'ün, kollajen tip I liflerine bağlandığı ve genişliklerini 214 ± 4 nm'den 308 ± 5 nm'ye yükselttiği ($p < 0,0001$) ve kolajenazların proteolitik aktivitesine karşı kolajen tip I liflerinin direncini arttırdığı bildirilmiştir. Çürükten etkilenmiş dentine P11-4 uygulanması sonrasında bağlanma ara yüzünün mikro gerilimli bağlanma gücünü arttırdığı ($p< 0,0001$), sağlam dentine yakın değerlere ulaştığı ve hibrit tabakadaki proteolitik aktiviteyi düşürdüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak da P11-4'ün, kollajen tip I ile etkileşime girerek kollajen liflerinin proteolize karşı direncini arttırdığı ve yapay çürükten etkilenen dentinin oluşturduğu hibrit tabakanın stabilitesini geliştirdiği belirtilmiştir (21).

Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda P11-4 materyalinin, dental tedavilerde daha sık kullanılabileceği öngörülmektedir. P11-4 peptidi kullanılarak Yapılan çalışmaların çoğu başlangıç mine çürükleri ve mine yüzey altı lezyonları ile ilgili olmasına rağmen dentin dokusuna ilgilendiren, dentin çürüğünü etkisini inceleyen çalışmalar yetersizdir. Bu sebeple çalışmamızda yapay olarak dentin çürüğü oluşturduktan sonra P11-4 peptidinin iyileştirme etkisi GDF ve florür vernik ile kıyaslanmıştır.

Elde edilen bulgular eşliğinde; P11-4, GDF ve florür vernik uygulanan grupların biyomimetik iyileşmelerinin değerlendirildiği SAXS analizinde tüm gruplarda iyileşme gerçekleşmiş olup yapısal olarak en az iyileşme GDF uygulanan grupta gözlenmiştir. Bu durumun sebebi olarak gümüş iyonlarının dentin tübüllerine çökelmesi gösterilebilir. Ayrıca SEM görüntüleri de bu bulgumuzu desteklemektedir. Yıllardır altın standart olarak kullanılan florür verniğin uygulandığı 3.grupta dentin tübüllerinin küçüldüğü gözlenmiştir. P11-4 uygulanan grupta da SEM görüntülerinde morfolojik olarak dentin

tübüllerin daraldığının gözlenmesine rağmen nanobyutlarla ilgili farklılıkları değerlendirmemizde yeterli olmamıştır. Ancak SAXS analizinde en iyi biyomimetik iyileşmenin P11-4 grubunda olduğu gözlenmiştir. Ayrıca FTIR analizine göre Amid A bandı N-H grubu içeriği 3400-3440 cm^{-1} aralığında iken, hidrojen bağı bulundurması durumunda belirlenen bant aralığı 3300 cm^{-1} daha düşük olan dalga boylarında görülmektedir ve tüm gruplarımızda Amid A bandı bu değerin altında gözlenmiştir. Sekonder kollajen yapıya en duyarlı olan Amid I bandı alfa heliks yapısı 1662 cm^{-1} değerinde gözlenirken, P11-4 ve GDF uygulanan gruplarda bu değerin altında değerler elde edilmiştir. Hem Amid A hem de Amid I bandında en düşük değerin P11-4 uygulanan grupta gözlenmesi, SAXS analizinde elde ettiğimiz en iyi biyomimetik iyileşmenin P11-4 grubunda olduğu sonucunu desteklemektedir.

İn-vitro olarak çürük oluşturulmuş lezyonlarda remineralizasyon ajanlarının etkinliğine ilişkin bu çalışmada saptanan sonuçlar biyomimetik peptid esaslı remineralizasyon ajanı olan Curodont Repair'in dentin çürüğünün biyomimetik remineralizasyonunda kullanılabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda P11-4 tek bir sefer uygulanmıştır. Biyomimetik iyileşmenin ve dentin tübüllerindeki daralmanın tekrarlayan P11-4 uygulamalarında artabileceğini düşünmekteyiz. Ancak remineralizasyon etkinliğinin kısıtlı sayıdaki çalışmalarda incelendiği gözlenen P11-4 içerikli remineralizasyon ajanının, dentin lezyonlarının tedavisinde başarı ile uygulanabilmesi için, etkinliğinin uzun dönemde ve güncel tanı yöntemleri kullanılarak değerlendirileceği in-vivo çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İn-vitro koşullarda oluşturulmuş dentin çürüklerinin tedavisinde peptid P11-4, GDF ve florür verniğin etkinliğinin SEM, FTIR ve SAXS analizleri ile değerlendirildiği çalışmamızda ortaya çıkan veriler neticesinde elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmektedir:

1. Yüzey morfolojisinin değerlendirildiği SEM analizinde negatif kontrol grubunda, dentin tübüllerindeki mineral kayıplarına bağlı olarak lümenlerin deforme olduğu gözlenmiştir.

2. Peptid P11-4 materyalinin uygulandığı grupta, inter tübüler dentinin daralmış, fibriller ve lifler halinde iskeletsel yapılar oluşmuştur.

3. GDF materyalinin uygulandığı grupta, dentinal tübüllerin tıkalı olduğu ve granüler yapının oluşmaya başladığı görülmüştür.

4. Florür vernik uygulanan grupta dentin tübüllerinin çaplarının azaldığı ve kısmen tıkalı olduğu tespit edilmiştir.

5. FTIR analizi sonucunda peptid P11-4 uygulanan grubunun Amid A spektrum ortalaması, normal değer olan 3309 cm^{-1} değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, negatif kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

6. Peptid P11-4 ve GDF uygulanan gruplarda Amid I spektrum ortalaması, normal değer olan 1662 değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük iken; florür vernik uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

7. Florür vernik ve peptid P11-4 uygulanan gruplarda Amid II spektrum ortalaması, normal değerden istatistiksel olarak anlamlı farklı değilken, GDF uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

8. SAXS analizi sonucunda, P11-4, GDF ve florür vernik uygulanan gruplar arasında normal dentin dokusuna en çok benzeyen iyileşmenin P11-4 grubunda, en az benzeyen iyileşmenin ise GDF uygulanan grupta gerçekleştiği tespit edilmiştir.

9. Tüm gruplara ait SAXS analizi kıyaslandığında incelenen nano oluşum uzaklık dağılımlarına göre P11-4 ve florür vernik gruplarının her ikisinde de çok iyi uyum olduğu gözlenmiştir.

10. P11-4 grubunda yapılan SAXS analizinde tüm örneklerde iyileşme olduğu gözlenmiştir.

11. Tüm veriler, yakın gelecekte P11-4 içeren başarı ile kullanılabilecek yeni materyallerin ticari ürün haline gelebileceği düşüncesini güçlendirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Parnell, C., Gugnani, N., Sherriff, A., James, P., & Beirne, P. V. (2012). Non-fluoride topical remineralising agents containing calcium and/or phosphate for controlling dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *3*. https://doi.org/10.1002/14651858.cd009732

2. Tsang, P. W. Y., Fengxia, Q. i., Huwig, A. K., Anderson, M. H., Wesley, D., & Shi, W. (2006). A medical approach to the diagnosis and treatment of dental caries. *AHIP Cover.*, *47(2):*, 38–42.

3. AAPD. (2014). *Guideline on Fluoride Therapy*. https://www.aapd.org/globalassets/assets/1/7/g_fluoridetherapy1.pdf

4. Cury, J. A., & Tenuta, L. M. (2008). How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Advances in Dental Research*, *20*(1), 13–16. https://doi.org/10.1177/154407370802000104

5. Chu, C. H., Mei, M. L., & lo E.C.M. (2010). Use of fluorides in dental caries management - PubMed. *Gen Dent.*, *58*(1), 37–43.

6. Knight, G. M., McIntyre, J. M., Craig, G. G., Mulyani, Zilm, P. S., & Gully, N. J. (2005). An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to Streptococcus mutans. *Australian Dental Journal*, *50*(4), 242–245. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2005.tb00367.x

7. Stebbins, E. A. (1891). What value has argenti nitras as a therapeutic agent in dentistry? *Int Dent J.*, *12*(6), 61–270.

8. Nishino, M. (1969). [Studies on the topical application of ammoniacal silver fluoride for the arrest of dental caries] - PubMed. *Osaka Daigaku Shigaku Zasshi*, *14*(1), 1–14.

9.AAPD. (2018). *The Reference Manual Of Pedıatrıc Dentıstry*. https://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/P_SilverDiamine.pdf

10. Wu, M. Y., Suryanarayanan, K., van Ooij, W. J., & Oerther, D. B. (2007). Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Science and Technology*, *55*(8–9), 413–419. https://doi.org/10.2166/wst.2007.285

11. Mei, M. L., Ito, L., Cao, Y., Lo, E. C. M., Li, Q. L., & Chu, C. H. (2014). An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy. *Journal of Dentistry*, *42*(4), 395–402. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.007

12. Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C.-H. (2018). Arresting Dentine Caries with Silver Diamine Fluoride: What's Behind It? Arresting dentine caries with different concentration and periodicity of silver diamine fluoride View project Arginine-based prebiotic measures for caries prevention View project. *Article in Journal of Dental Research*. https://doi.org/10.1177/0022034518774783

13. Horst, J. A., Ellenikiotis, H., & Milgrom, P. M. (2017). UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent. *Pennsylvania Dental Journal*, *84*(1), 14, 16–26.

14. Zhao, I. S., Gao, S. S., Hiraishi, N., Burrow, M. F., Duangthip, D., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2018). Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. In *International Dental Journal* (Vol. 68, Issue 2, pp. 67–76). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/idj.12320

15. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides-A clinical safety trial. *British Dental Journal*, *215*(4). https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.741

16. Whitesides, G. M., Mathias, J. P., & Seto, C. T. (1991). Molecular self-assembly and nanochemistry: A chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science*, *254*(5036), 1312–1319. https://doi.org/10.1126/science.1962191

17. Aggeli, A., Fytas, G., Vlassopoulos, D., McLeish, T. C. B., Mawer, P. J., & Boden, N. (2001). Structure and dynamics of self-assembling β-sheet peptide tapes by dynamic light scattering. *Biomacromolecules*, *2*(2), 378–388. https://doi.org/10.1021/bm000080z

18. Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., & Aggeli, A. (2007). Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *Journal of Dental Research*, *86*(5), 426–430. https://doi.org/10.1177/154405910708600507

19. Schmidlin, P., Zobrist, K., Attin, T., & Wegehaupt, F. (2016). In vitro re-hardening of artificial enamel caries lesions using enamel matrix proteins or selfassembling peptides. *Journal of Applied Oral Science*, *24*(1), 31–36. https://doi.org/10.1590/1678-775720150352

20. Alkilzy, M., Santamaria, R. M., Schmoeckel, J., & Splieth, C. H. (2018). Treatment of Carious Lesions Using Self-Assembling Peptides. In *Advances in dental research* (Vol. 29, Issue 1, pp. 42–47). Adv Dent Res. https://doi.org/10.1177/0022034517737025

21. de Sousa, J. P., Carvalho, R. G., Barbosa-Martins, L. F., Torquato, R. J. S., Mugnol, K. C. U., Nascimento, F. D., Tersariol, I. L. S., & Puppin-Rontani, R. M. (2019). The Self-Assembling Peptide P 11 -4 Prevents Collagen Proteolysis in Dentin. *Journal of Dental Research*, *98*(3), 347–354. https://doi.org/10.1177/0022034518817351
22. Moreira, K. M., Bertassoni, L. E., Davies, R. P., Joia, F., Höfling, J. F., Nascimento, F. D., & Puppin-Rontani, R. M. (2021). Impact of biomineralization on resin/biomineralized dentin bond longevity in a minimally invasive approach: An "in vitro" 18-month follow-up. *Dental Materials*, *37*(5), 276–289. https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.01.021
23. Bertassoni, L. E., Habelitz, S., Kinney, J. H., Marshall, S. J., & Marshall, G. W. (2009). Biomechanical Perspective on the Remineralization of Dentin. *Res*, *43*, 70–77. https://doi.org/10.1159/000201593
24. Xu, Z., Neoh, K. G., Lin, C. C., & Kishen, A. (2011). Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *98B*(1), 150–159. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31844
25. Güçlü Özkaya, Z. A., & Hidayet, Z. (2019). Dentinin Biyomimetik Remineralizasyonu. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 156–166. https://doi.org/10.17567/ataunidfd.428925
26. Grawish, M. E., Lamyaa, •, Grawish, M., Hala, •, Grawish, M. M., Holiel, A. A., Nessma, •, Salwa, •, & El-Negoly, A. (2022). Demineralized Dentin Matrix for Dental and Alveolar Bone Tissues Regeneration: An Innovative Scope Review. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. https://doi.org/10.1007/s13770-022-00438-4
27. Pajor, K., Pajchel, L., & Kolmas, J. (2019). Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology-A Review. *Materials (Basel)*. https://doi.org/10.3390/ma12172683
28. Kontakiotis, E. G., Tsatsoulis, I. N., Filippatos, C. G., & Agrafioti, A. (2015). A quantitative and diametral analysis of human dentinal tubules at pulp chamber ceiling and floor under scanning electron microscopy. *Australian Endodontic Journal*, *41*(1), 29–34. https://doi.org/10.1111/AEJ.12068
29. Kawashima, N., & Okiji, T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenital Anomalies*, *56*(4), 144–153. https://doi.org/10.1111/CGA.12169
30. Almushayt, A., Narayanan, K., Zaki, A. E., & George, A. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*, *13*(7), 611–620. https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302687
31. Ponce, E. H., Sahli, C. C., & Fernandez, J. A. V. (2001). Study Of Dentinal Tubule Architecture Of Permanent Upper Premolars: Evaluation By SEM. *Australian Endodontic Journal*, *27*(2), 66–72. https://doi.org/10.1111/J.1747-4477.2001.TB00343.X
32. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Frontiers in Bioscience*, *3*, 711–735.
33. Almushayt, A., Narayanan, K., Zaki, A. E., & George, A. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*, *13*(7), 611–620. https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302687
34. Gandolfi, M. G., Taddei, P., Pondrelli, A., Zamparini, F., Prati, C., & Spagnuolo, G. (2019). Demineralization, Collagen Modification and Remineralization Degree of Human Dentin after EDTA and Citric Acid Treatments. *Materials*, *12*, 25. https://doi.org/10.3390/ma12010025
35. Yalcın Cakır, F., Gürgan, S., & Attar, N. (2010). Çürük Mikrobiyolojisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, *34*(3–4), 78–91.
36. Roberson, T.M., Heymann, H.O., Swift, E.J. (2010). Karyoloji: Lezyon, Etyoloji, Önleme ve Kontrol (Cariology: The Lesion, Etiology, Prevention and Control). In Y. C. F. Gürgan, S. (Ed.), *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry* (pp. 67–134). Güneş Tıp Kitabevleri.
37. Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F.R., Pashley, D.H. & Breschi, L. (2015). Critical Reviews in Oral Biology & Medicine Evidence of MMPs in Dentin. *Journal of Dental Research*, *94(2)*, 241–251. https://doi.org/10.1177/0022034514562833
38. Roberson, T., Heyman, H., & Swift, E. (2011). *Introduction to art and science of operative dentistry* (5th ed.). Mosby Co.
39. Vieira Bracks, I., R, I. N., Lima, K. C., Assunç, I. v, ıcia Gomes, P. N., Bracks, I. v, & Siqueira, J. F. (2015). Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis. *Article in Journal of Endodontics*. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.013
40. Frank, R. M. (1990). Structural events in the caries process in enamel, cementum, and dentin. *Journal of Dental Research*, *69*(SPEC. ISS. FEB.), 559–566. https://doi.org/10.1177/00220345900690s112
41. Bjørndal, L., & Mjör, I. A. (2001). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, *32*(9), 717–736.

42. Schwendicke, F., Paris, S., & Tu, Y.-K. (2014). Effects of using different criteria and methods for caries removal: A Systematic Review and Network Meta-Analysis Dental filling materials for managing carious lesions in the primary dentition (review) View project cardiac dysfunction in chronic kidney disease View project. *Article in Journal of Dentistry*. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.10.004
43. Kidd, E. A. M., & Fejerskov, O. (2016). What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms: *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/154405910408301s07*, *83*(SPEC. ISS. C). https://doi.org/10.1177/154405910408301S07
44. Dawes, C. (2003). What Is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid. *Journal of the Canadian Dental Association*, *69*(11), 722–724. http://www.cda-adc.ca/jcda/vol-69/issue-11/vol69_issue11.pdf#page=22
45. Barron, R. P., Carmichael, R. P., Marcon, M. A., & Sàndor, G. K. B. (2003). Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *Journal (Canadian Dental Association)*, *69*(2), 84–89. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12559056/
46. Sütlaş, E. (2011). *Başlangıç Mine Lezyonlarının Tedavisinde Fluorid İlave Edilmiş Kazein Fosfopeptit Amorfoz Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP) İle Fluoridli Sütün Etkinliğinin Araştırılması*. Ankara Üniversitesi.
47. Zero, D. T. (1999). DENTAL CARIES PROCESS. *Dental Clinics of North America*, *43*(4), 635–664. https://doi.org/10.1016/S0011-8532(22)00818-7
48. Mete, S. (2014). *Teobromin içeren diş macununun remineralizasyon potansiyelinin değerlendirilmesi, Yayımlanmamış Doktora Tezi*. Marmara Üniversitesi.
49. Stephan, R. M. (1940). t. *Undefined*, *27*(5), 718–723. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.1940.0178
50. 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 and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, *11*(4), 481–495. https://doi.org/10.1177/10454411000110040601
51. Zero, D. T. (1999). Dental caries process. *Dental Clinics of North America*, *43*(4), 635–664. https://doi.org/10.1016/s0011-8532(22)00818-7
52. CHOW, L. C. , & VOGEL, G. L. (2001). *Enhancing Remineralization.Operative Dentistry*. *6*(6), 27–38.
53. González-Cabezas, C. (2010). The Chemistry of Caries: Remineralization and Demineralization Events with Direct Clinical Relevance. *Dental Clinics of North America*, *54*(3), 469–478. https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2010.03.004
54. Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: A dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, *53*(3), 286–291. https://doi.org/10.1111/J.1834-7819.2008.00064.X
55. Kind, L., Stevanovic, S., Wuttig, S., Wimberger, S., Hofer, J., Müller, B., & Pieles, U. (2017). Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. *Https://Doi.Org/10.1177/0022034517698419*, *96*(7), 790–797. https://doi.org/10.1177/0022034517698419
56. ten Cate, J. M., & Featherstone, J. D. B. (1991). Mechanistic Aspects of the Interactions Between Fluoride and Dental Enamel. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 2, Issue 2).
57. Cury, J. A., & Tenuta, L. M. A. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Brazilian Oral Research*, *23 Suppl 1*(SUPPLE. 1), 23–30. https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000500005
58. Tschoppe, P., Zandim, D. L., Martus, P., & Kielbassa, A. M. (2011). Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, *39*(6), 430–437. https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2011.03.008
59. Featherstone, J. D. B. (2000). THE SCIENCE AND PRACTICE OF CARIES PREVENTION. *The Journal of the American Dental Association*, *131*(7), 887–899. https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.2000.0307
60. *Early detection of secondary caries using quantitative, light-induced fluorescence. - Wikidata*. (n.d.). Retrieved November 10, 2022, from https://www.wikidata.org/wiki/Q47741336
61. ten Cate, J. M. (2016). Remineralization of Caries Lesions Extending into Dentin. *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/00220345010800050401*, *80*(5), 1407–1411. https://doi.org/10.1177/00220345010800050401
62. Schroeder H.E., Luder H.U., & Bosshardt D.D. (1992). Morphological and labeling evidence supporting and extending a modern theory of tooth eruption. . *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* , *102*(1), 20–31.
63. Featherstone, J. D. B. (1996). Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dental Materials*, *12*(3), 194–197. https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80021-2

64. Schemehorn, B. R., Orban, J. C., Wood, G. D., Fischer, G. M., & Winston, A. E. (1999). Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *The Journal of Clinical Dentistry*, *10*(1 Spec No), 13–16.
65. Erickson, R. L., & Glasspoole, E. A. (1995). Model Investigations of Caries Inhibition by Fluoride-Releasing Dental Materials. *Advances in Dental Research*, *9*(3), 315–323. https://doi.org/10.1177/08959374950090031801
66. Noorda, W. D., van Montfort, A. M. A. P., Purdell-Lewis, D. J., & Weerkamp, A. H. (1986). Developmental and Metabolic Aspects of a Monobacterial Plaque of Streptococcus mutans C 67–1 Grown on Human Enamel Slabs in an Artificial Mouth Model. *Caries Research*, *20*(4), 300–307. https://doi.org/10.1159/000260949
67. Katz, S., Park, K. K., Stookey, G. K., & Schemehorn, B. R. (1986). Development and Initial Testing of a Model for in vitro Formation of Pit and Fissure Caries (Short Communication). *Caries Research*, *20*(5), 424–428. https://doi.org/10.1159/000260968
68. Gilmour, A. S. M., Edmunds, D. H., & Newcombe, R. G. (1997). Prevalence and Depth of Artificial Caries-like Lesions Adjacent to Cavities Prepared in Roots and Restored with a Glass Ionomer or a Dentin-bonded Composite Material. *Journal of Dental Research*, *76*(12), 1854–1861. https://doi.org/10.1177/00220345970760120801
69. Clarkson, B. H., Wefel, J. S., & Miller, I. (1984). A Model for Producing Caries-like Lesions in Enamel and Dentin Using Oral Bacteria in vitro. *Journal of Dental Research*, *63*(10), 1186–1189. https://doi.org/10.1177/00220345840630100201
70. Staninec, M., Giles, W. S., Saiku, J. M., & Hattori, M. (1988). Caries penetration and cement thickness of three luting agents. *The International Journal of Prosthodontics*, *1*(3), 259–263.
71. Yu, O. Y., Mei, M. L., Zhao, I. S., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2017). Effects of fluoride on two chemical models of enamel demineralization. *Materials*, *10*(11). https://doi.org/10.3390/ma10111245
72. ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. E. (1982). Alternating Demineralization and Remineralization of Artificial Enamel Lesions. *Caries Research*, *16*(3), 201–210. https://doi.org/10.1159/000260599
73. 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), 316–334. https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000400002
74. Featherstone, J. D. B., & Rodgers, B. E. (1981). Effect of Acetic, Lactic and other Organic Acids on the Formation of Artificial Carious Lesions. *Caries Research*, *15*(5), 377–385. https://doi.org/10.1159/000260541
75. ten Cate, J. M. (1994). In Situ Models, Physico-Chemical Aspects. *Advances in Dental Research*, *8*(2), 125–133. https://doi.org/10.1177/08959374940080020201
76. 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), 109–114. https://doi.org/10.1159/000260508
77. ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. E. (1983). Influence of Fluoride in Solution on Tooth Demineralization. *Caries Research*, *17*(3), 193–199. https://doi.org/10.1159/000260667
78. Donly, K. J. (1994). Enamel and dentin demineralization inhibition of fluoride-releasing materials. *American Journal of Dentistry*, *7*(5), 275–278.
79. Tsanidis, V., & Koulourides, T. (1992). An in vitro Model for Assessment of Fluoride Uptake from Glass-ionomer Cements by Dentin and its Effect on Acid Resistance. *Journal of Dental Research*, *71*(1), 7–12. https://doi.org/10.1177/00220345920710011201
80. Sezer, B., Kargül, B. (2020). Current Remineralizing Agents in Caries Management. *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences*, *26*(3), 472–486. https://doi.org/10.5336/dentalsci.2019-71685
81. Moi, G. P., Tenuta, L. M. A., & Cury, J. A. (2008). Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated in vitro by validated protocols. *Brazilian Dental Journal*, *19*(2), 91–96. https://doi.org/10.1590/S0103-64402008000200001
82. Groeneveld, A., van Eck, A. A. M. J., & Dirks, O. B. (1990). Fluoride in Caries Prevention: Is the Effect Pre- or Post-eruptive? *Journal of Dental Research*, *69*(2_suppl), 751–755. https://doi.org/10.1177/00220345900690S145
83. Peng, J. J.-Y., Botelho, M. G., & Matinlinna, J. P. (2012). Silver compounds used in dentistry for caries management: A review. *Journal of Dentistry*, *40*(7), 531–541. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.03.009
84. Scarpelli, B. B., Punhagui, M. F., Hoeppner, M. G., Almeida, R. S. C. de, Juliani, F. A., Guiraldo, R. D., & Berger, S. B. (2017). In Vitro Evaluation of the Remineralizing Potential and Antimicrobial Activity of a Cariostatic Agent with Silver Nanoparticles. *Brazilian Dental Journal*, *28*(6), 738–743. https://doi.org/10.1590/0103-6440201701365

85. Nozari, A. (2017). Impact of Nano Hydroxyapatite, Nano Silver Fluoride and Sodium Fluoride Varnish on Primary Enamel Remineralization: An In Vitro Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/30108.10694
86. Alves, K. M. R. P., Franco, K. S., Sassaki, K. T., Buzalaf, M. A. R., & Delbem, A. C. B. (2011). Effect of iron on enamel demineralization and remineralization in vitro. *Archives of Oral Biology*, *56*(11), 1192–1198. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.04.011
87. Ribeiro, C. C. C., Ccahuana-Vásquez, R. A., Carmo, C. D. S. do, Alves, C. M. C., Leitão, T. J., Vidotti, L. R., & Cury, J. A. (2012). The effect of iron on Streptococcus mutans biofilm and on enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, *26*(4), 300–305. https://doi.org/10.1590/S1806-83242012000400003
88. Tuncer, D., Onen, A., & Yazici, A. R. (2014). Effect of chewing gums with xylitol, sorbitol and xylitol-sorbitol on the remineralization and hardness of initial enamel lesions in situ. *Dental Research Journal*, *11*(5), 537–543.
89. Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-e-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., Caldana, M. L., Bastos, J. R. M., & Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, *50*, 74–78. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011
90. Balakrishnan, M., Simmonds, R. S., & Tagg, J. R. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, *45*(4), 235–245. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2000.tb00257.x
91. Mäkinen, K. K., Saag, M., Isotupa, K. P., Olak, J., Nõmmela, R., Söderling, E., & Mäkinen, P.-L. (2005). Similarity of the Effects ofErythritol and Xylitol on SomeRisk Factors of Dental Caries. *Caries Research*, *39*(3), 207–215. https://doi.org/10.1159/000084800
92. Featherstone, J. D. B., Rodgers, B. E., & Smith, M. W. (1981). Physicochemical Requirements for Rapid Remineralization of Early Carious Lesions. *Caries Research*, *15*(3), 221–235. https://doi.org/10.1159/000260518
93. Gargouri, W., Zmantar, T., Kammoun, R., Kechaou, N., & Ghoul-Mazgar, S. (2018). Coupling xylitol with remineralizing agents improves tooth protection against demineralization but reduces antibiofilm effect. *Microbial Pathogenesis*, *123*, 177–182. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.038
94. Takatsuka, T., Exterkate, R. A. M., & ten Cate, J. M. (2008). Effects of Isomalt on enamel de- and remineralization, a combined in vitro pH-cycling model and in situ study. *Clinical Oral Investigations*, *12*(2), 173–177. https://doi.org/10.1007/s00784-007-0155-7
95. Birkhed, D., Edwardsson, S., Kalfas, S., & Svensäter, G. (1984). Cariogenicity of sorbitol. *Swedish Dental Journal*, *8*(3), 147–154.
96. Hayes, C. (2001). The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *Journal of Dental Education*, *65*(10), 1106–1109.
97. Hayes, M. L., & Roberts, K. R. (1978). The breakdown of glucose, xylitol and other sugar alcohols by human dental plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, *23*(6), 445–451. https://doi.org/10.1016/0003-9969(78)90075-4
98. Gonçalves, N. C. L. A. V., del Bel Cury, A. A., Simões, G. S., Hara, A. T., Rosalen, P. L., & Cury, J. A. (2006). Effect of xylitol:sorbitol on fluoride enamel demineralization reduction in situ. *Journal of Dentistry*, *34*(9), 662–667. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2005.12.008
99. Splieth, C. H., Alkilzy, M., Schmitt, J., Berndt, C., & Welk, A. (2009). Effect of xylitol and sorbitol on plaque acidogenesis. *Quintessence International (Berlin, Germany : 1985)*, *40*(4), 279–285.
100. Sahariah, P., & Másson, M. (2017). Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules*, *18*(11), 3846–3868. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058
101. Costa, E. M., Silva, S., Tavaria, F. K., & Pintado, M. M. (2013). Study of the effects of chitosan upon Streptococcus mutans adherence and biofilm formation. *Anaerobe*, *20*, 27–31. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.002
102. Costa, E. M., Silva, S., Pina, C., Tavaria, F. K., & Pintado, M. M. (2012). Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe*, *18*(3), 305–309. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.009
103. Zou, L., Zhang, L., Li, J., Hao, Y., Cheng, L., Li, W., & Zhou, X. (2008). Effect of Galla chinensis extract and chemical fractions on demineralization of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*, *36*(12), 999–1004. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.08.008
104. Cheng, L., Li, J., Hao, Y., & Zhou, X. (2008). Effect of compounds of Galla chinensis and their combined effects with fluoride on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Journal of Dentistry*, *36*(5), 369–373. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.01.011

105. Xie, Q., Li, J., Zuo, Y., & Zhou, X. (2005). [The effect of galla chinensis on the growth of cariogenic bacteria in vitro]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of Stomatology*, *23*(1), 82–84.
106. Wu, C. D. (2009). Grape Products and Oral Health. *The Journal of Nutrition*, *139*(9), 1818S-1823S. https://doi.org/10.3945/jn.109.107854
107. Cheng, L., Li, J., He, L., & Zhou, X. (2015). Natural Products and Caries Prevention. *Caries Research*, *49*(Suppl. 1), 38–45. https://doi.org/10.1159/000377734
108. Jawale, K., Kamat, S., Patil, J., Nanjannawar, G., & Chopade, R. (2017). Grape seed extract: An innovation in remineralization. *Journal of Conservative Dentistry*, *20*(6), 415. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_287_16
109. Tang, C., Fang, M., Liu, R., Dou, Q., Chai, Z., Xiao, Y., & Chen, J. (2013). The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: Micromorphological and physical analyses. *Archives of Oral Biology*, *58*(12), 1769–1776. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.007
110. Amaechi, B. T., Porteous, N., Ramalingam, K., Mensinkai, P. K., Ccahuana Vasquez, R. A., Sadeghpour, A., & Nakamoto, T. (2013). Remineralization of Artificial Enamel Lesions by Theobromine. *Caries Research*, *47*(5), 399–405. https://doi.org/10.1159/000348589
111. Shashikiran, N., Subba Reddy, V., & Srikanth, R. (2008). Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, *26*(2), 67. https://doi.org/10.4103/0970-4388.41619
112. George, D., Bhat, S. S., & Antony, B. (2009). Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes: an in vitro study. *General Dentistry*, *57*(3), 238–241.
113. Guram, G., Jagga, U., Paul, U., Kashyap, A., Padmanabhan, V., & Keswani, K. (2018). Comparative Evaluation of Remineralizing Effect of Novamin and Tricalcium Phosphate on Artificial Caries: An in vitro Study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *19*(1), 109–112. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2221
114. Job, T. v, Narayana, G. T., Venkappa, K. K., Nathan, K. B., Ahsan, S., & Harikaran, J. (2018). Remineralization Potential of Three Different Dentifrices using Raman Spectroscopy and Confocal Laser Scanning Microscope. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *19*(4), 420–425.
115. Gokce, G., Savas, S., Kucukyilmaz, E., & Veli, I. (2017). Effects of toothpastes on white spot lesions around orthodontic brackets using quantitative light-induced fluorescence (QLF). *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie*, *78*(6), 480–486. https://doi.org/10.1007/s00056-017-0106-0
116. Dong, Z., Chang, J., Deng, Y., & Joiner, A. (2011). Tricalcium silicate induced mineralization for occlusion of dentinal tubules. *Australian Dental Journal*, *56*(2), 175–180. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01321.x
117. Wang, Y., Li, X., Chang, J., Wu, C., & Deng, Y. (2012). Effect of tricalcium silicate (Ca3SiO5) bioactive material on reducing enamel demineralization: An in vitro pH-cycling study. *Journal of Dentistry*, *40*(12), 1119–1126. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.09.006
118. Pithon, M. M., Baião, F. S., Sant'Anna, L. I. D., Tanaka, O. M., & Cople-Maia, L. (2019). Effectiveness of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate-containing products in the prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients: A systematic review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, *10*(2), e12391. https://doi.org/10.1111/jicd.12391
119. Sandhu, M., Rai, N., & Sharma, R. (2018). Evaluation of Remineralization Potential of Beverages modified with Casein Phosphopeptide–Amorphous Calcium Phosphate on Primary and Permanent Enamel: A Laser Profiler Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *11*(1), 7–12. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1475
120. Indrapriyadharshini, K., Madan Kumar, P., Sharma, K., & Iyer, K. (2018). Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions – A systematic review. *Indian Journal of Dental Research*, *29*(4), 487. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_364_17
121. Zhou, C., Zhang, D., Bai, Y., & Li, S. (2014). Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. *Journal of Dentistry*, *42*(1), 21–29. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.005
122. Memarpour, M., Soltanimehr, E., & Sattarahmady, N. (2015). Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion. *Microscopy Research and Technique*, *78*(9), 801–806. https://doi.org/10.1002/jemt.22543
123. Yazicioglu, O., Yaman, B., Güler, A., & Koray, F. (2017). Quantitative evaluation of the enamel caries which were treated with casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, *20*(6), 686. https://doi.org/10.4103/1119-3077.180073

124. Llena, C., Leyda, A. M., & Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP versus fluoride varnish in remineralisation of early caries lesions. A prospective study. *European Journal of Paediatric Dentistry*, *16*(3), 181–186.
125. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides – a clinical safety trial. *British Dental Journal*, *215*(4), E6–E6. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.741
126. Silvertown, J. D., Wong, B. P. Y., Sivagurunathan, K. S., Abrams, S. H., Kirkham, J., & Amaechi, B. T. (2017). Remineralization of natural early caries lesions in vitro by P11-4 monitored with photothermal radiometry and luminescence. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, *8*(4), e12257. https://doi.org/10.1111/jicd.12257
127. Schlee, M., Schad, T., Koch, J. H., Cattin, P. C., & Rathe, F. (2018). Clinical performance of self-assembling peptide P11-4 in the treatment of initial proximal carious lesions: A practice-based case series. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, *9*(1). https://doi.org/10.1111/jicd.12286
128. Üstün, N., & Aktören, O. (2019). Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microscopy Research and Technique*, *82*(7), 1065–1072. https://doi.org/10.1002/jemt.23254
129. Basheer, N., Madhubala, M. M., & Mahalaxmi, S. (2020). Future Perspectives of Biomimetics in Restorative Dentistry. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 19–28. https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i2530820
130. Cao, C., Mei, M., Li, Q.-L., Lo, E., & Chu, C. (2015). Methods for Biomimetic Remineralization of Human Dentine: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 4615–4627. https://doi.org/10.3390/ijms16034615
131. Bratthall, D., Hänsel-Petersson, G., & Sundberg, H. (1996). Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *European Journal of Oral Sciences*, *104*(4), 416–422. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00104.x
132. Fejerskov, O. (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research*, *38*(3), 182–191. https://doi.org/10.1159/000077753
133. Cate, J. M. ten. (1990). In vitro Studies on the Effects of Fluoride on De- and Remineralization. *Journal of Dental Research*, *69*(2_suppl), 614–619. https://doi.org/10.1177/00220345900690S120
134. Pamir, T. (2014). Başlangıç Çürüklerinin Durdurulması ve Ozon ve Sealantların Kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences Special Topics*, *5*(3), 43–60.
135. Axelsson, P. (1999). *An introduction to risk prediction and preventive dentistry*. Quintessence Publishing Co.
136. Toumba, K. J., & Curzon, M. E. J. (1993). Slow-Release Fluoride. *Caries Research*, *27*(1), 43–46. https://doi.org/10.1159/000261601
137. König, K. G. (1993). Role of Fluoride Toothpastes in a Caries-Preventive Strategy. *Caries Research*, *27*(1), 23–28. https://doi.org/10.1159/000261598
138. Newbrun, E. (1992). Preventing Dental Caries: Breaking the Chain of Transmission. *The Journal of the American Dental Association*, *123*(6), 55–59. https://doi.org/10.14219/jada.archive.1992.0183
139. Ripa, L. W. (1989). Clinical studies of high-potency fluoride dentifrices: a review. *The Journal of the American Dental Association*, *118*(1), 85–91. https://doi.org/10.14219/jada.archive.1989.0002
140. Hicks, J., Garcia-Godoy, F., & Flaitz, C. (2004). Biological factors in dental caries: role of remineralization and fluoride in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 3). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *28*(3), 203–214. https://doi.org/10.17796/jcpd.28.3.w0610427l746j34n
141. Fabien, V., Obry-Musset, A. M., Hedelin, G., & Cahen, P. M. (1996). Caries prevalence and salt fluoridation among 9-year-old schoolchildren in Strasbourg, France. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *24*(6), 408–411. https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1996.tb00889.x
142. Cury, J. A., & Tenuta, L. M. A. (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Brazilian Oral Research*, *23*(suppl 1), 23–30. https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000500005
143. Seppä, L., Kärkkäinen, S., & Hausen, H. (2000). Caries Trends 1992–1998 in Two Low–Fluoride Finnish Towns Formerly with and without Fluoridation. *Caries Research*, *34*(6), 462–468. https://doi.org/10.1159/000016624
144. Arends, J., Loading, A., & Petersson, L. G. (1980). Fluoride Uptake in Enamel. *Caries Research*, *14*(6), 403–413. https://doi.org/10.1159/000260483
145. AAPD. (2018). *Oral Health Policies and Recommendations*. https://www.aapd.org/research/oral-health-policies--recommendations/

146. Yu, O. Y., Mei, M. L., Zhao, I. S., Li, Q.-L., Lo, E. C.-M., & Chu, C.-H. (2018). Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dental Materials*, *34*(12), e344–e352. https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.10.007
147. Hargreaves, J. A. (1992). The Level and Timing of Systemic Exposure to Fluoride with Respect to Caries Resistance. *Journal of Dental Research*, *71*(5), 1244–1248. https://doi.org/10.1177/00220345920710051801
148. Craig, G. C. (2000). Fluorides and the prevention of dental decay: a statement from the Representative Board of the British Dental Association*. *British Dental Journal*, *188*(12), 654–654. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800567
149. Hamilton J.R., & Bowden G.H.W. (1996). Fluoride effects on oral bacteria- . In *Fluoride in dentistry* (2nd Edition, Vol. 13, pp. 230–251).
150. Murray, J. J., & Naylor, M. N. (1996). Fluorides and dental caries. *Oxford University Press, Oxford*, 32–67.
151. Petersson, L. G., Arvidsson, I., Lynch, E., Engström, K., & Twetman, S. (2002). Fluoride Concentrations in Saliva and Dental Plaque in Young Children after Intake of Fluoridated Milk. *Caries Research*, *36*(1), 40–43. https://doi.org/10.1159/000057589
152. Fabien, V., Obry-Musset, A. M., Hedelin, G., & Cahen, P. M. (1996). Caries prevalence and salt fluoridation among 9-year-old schoolchildren in Strasbourg, France. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *24*(6), 408–411. https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1996.tb00889.x
153. Seppä, L., Kärkkäinen, S., & Hausen, H. (2000). Caries Trends 1992–1998 in Two Low–Fluoride Finnish Towns Formerly with and without Fluoridation. *Caries Research*, *34*(6), 462–468. https://doi.org/10.1159/000016624
154. Suarez-Almazor, M. E., Flowerdew, G., Saunders, L. D., Soskolne, C. L., & Russell, A. S. (1993). The fluoridation of drinking water and hip fracture hospitalization rates in two Canadian communities. *American Journal of Public Health*, *83*(5), 689–693. https://doi.org/10.2105/AJPH.83.5.689
155. Timms, L., Sumner, O., Deery, C., & Rogers, H. J. (2020). Everyone else is using it, so why isn't the UK? Silver diamine fluoride for children and young people. *Community Dental Health*, *37*(2), 143–149. https://doi.org/10.1922/CDH_00008Timms07
156. Knight, G., McIntyre, J., Craig, G., Mulyani, Zilm, P., & Gully, N. (2005). An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to Streptococcus mutans. *Australian Dental Journal*, *50*(4), 242–245. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2005.tb00367.x
157. Hu, S., Meyer, B., & Duggal, M. (2018). A silver renaissance in dentistry. *European Archives of Paediatric Dentistry*, *19*(4), 221–227. https://doi.org/10.1007/s40368-018-0363-7
158. Horst, J. A., Tanzer, J. M., & Milgrom, P. M. (2018). Fluorides and Other Preventive Strategies for Tooth Decay. *Dental Clinics of North America*, *62*(2), 207–234. https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.11.003
159. *WHO Model List of Essential Medicines for Children - 8th list, 2021*. (n.d.). Retrieved January 4, 2023, from https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.03
160. Crystal, Y. O., Marghalani, A. A., Ureles, S. D., Wright, J. T., Sulyanto, R., Divaris, K., Fontana, M., & Graham, L. (2017). Use of Silver Diamine Fluoride for Dental Caries Management in Children and Adolescents, Including Those with Special Health Care Needs. *Pediatric Dentistry*, *39*(5), 135–145.
161. Gao, S. S., Zhao, I. S., Hiraishi, N., Duangthip, D., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2016). Clinical Trials of Silver Diamine Fluoride in Arresting Caries among Children. *JDR Clinical & Translational Research*, *1*(3), 201–210. https://doi.org/10.1177/2380084416661474
162. UÇAR, Z., & AKYILDIZ, B. M. (2022). ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİNDE GÜMÜŞ DİAMİN FLORÜR KULLANIMI. *Selcuk Dental Journal*. https://doi.org/10.15311/selcukdentj.980001
163. Wakshlak, R. B.-K., Pedahzur, R., & Avnir, D. (2015). Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. *Scientific Reports*, *5*(1), 9555. https://doi.org/10.1038/srep09555
164. Chu, C. H., & Lo, E. C. M. (2008). Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *Journal of Dentistry*, *36*(6), 387–391. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.02.013
165. Sulyanto, R. M., Kang, M., Srirangapatanam, S., Berger, M., Candamo, F., Wang, Y., Dickson, J. R., Ng, M. W., & Ho, S. P. (2021). Biomineralization of Dental Tissues Treated with Silver Diamine Fluoride. *Journal of Dental Research*, *100*(10), 1099–1108. https://doi.org/10.1177/00220345211026838
166. Chu, C. H., & Lo, E. C. M. (2008). Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, *6*(4), 315–321.
167. Mei, M. L., Ito, L., Cao, Y., Li, Q. L., Chu, C. H., & Lo, E. C. M. (2014). The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *Journal of Dentistry*, *42*(3), 329–335. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.018

168. Crystal, Y. O., & Niederman, R. (2019). Evidence-Based Dentistry Update on Silver Diamine Fluoride. *Dental Clinics of North America*, *63*(1), 45–68. https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.011
169. Reches, M., & Gazit, E. (2006). Molecular Self-Assembly of Peptide Nanostructures: Mechanism of Association and Potential Uses. *Current Nanoscience*, *2*(2), 105–111. https://doi.org/10.2174/157341306776875802
170. Levin, A., Hakala, T. A., Schnaider, L., Bernardes, G. J. L., Gazit, E., & Knowles, T. P. J. (2020). Biomimetic peptide self-assembly for functional materials. *Nature Reviews Chemistry*, *4*(11), 615–634. https://doi.org/10.1038/s41570-020-0215-y
171. Zhao, X., & Zhang, S. (2007). Designer Self-Assembling Peptide Materials. *Macromolecular Bioscience*, *7*(1), 13–22. https://doi.org/10.1002/mabi.200600230
172. Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., & Aggeli, A. (2007). Self-assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. *Journal of Dental Research*, *86*(5), 426–430. https://doi.org/10.1177/154405910708600507
173. Kyle, S., Aggeli, A., Ingham, E., & McPherson, M. J. (2010). Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*, *31*(36), 9395–9405. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.051
174. Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., & Aggeli, A. (2007). Self-assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. *Journal of Dental Research*, *86*(5), 426–430. https://doi.org/10.1177/154405910708600507
175. Dawasaz, A. A., Togoo, R. A., Mahmood, Z., Azlina, A., & Thirumulu Ponnuraj, K. (2022). Effectiveness of Self-Assembling Peptide (P11-4) in Dental Hard Tissue Conditions: A Comprehensive Review. *Polymers*, *14*(4), 792. https://doi.org/10.3390/polym14040792
176. Knaup, T., Korbmacher-Steiner, H., & Jablonski-Momeni, A. (2021). Effect of the caries-protective self-assembling peptide P11-4 on shear bond strength of metal brackets. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie*, *82*(5), 329–336. https://doi.org/10.1007/s00056-020-00247-1
177. Alkilzy, M., Tarabaih, A., Santamaria, R. M., & Splieth, C. H. (2018). Self-assembling Peptide P11-4 and Fluoride for Regenerating Enamel. *Journal of Dental Research*, *97*(2), 148–154. https://doi.org/10.1177/0022034517730531
178. Xia, K., Chen, Z., Chen, J., Xu, H., Xu, Y., Yang, T., & Zhang, Q. (2020). RGD and VEGF -Mimetic Peptide Epitope- Functionalized Self-Assembling Peptide Hydrogels Promote Dentin-Pulp Complex Regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 6631–6647. https://doi.org/10.2147/IJN.S253576
179. Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñeiro, E. L., Rodríguez-Álvarez, G., Tiznado-Orozco, G. E., García-García, R., & Brès, E. F. (2013). XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(8), 4568–4574. https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014
180. Paschalis, E. P., Gamsjaeger, S., & Klaushofer, K. (2017). Vibrational spectroscopic techniques to assess bone quality. *Osteoporosis International*, *28*(8), 2275–2291. https://doi.org/10.1007/s00198-017-4019-y
181. Júnior, Z. S. S., Botta, S. B., Ana, P. A., França, C. M., Fernandes, K. P. S., Mesquita-Ferrari, R. A., Deana, A., & Bussadori, S. K. (2015). Effect of papain-based gel on type I collagen - spectroscopy applied for microstructural analysis. *Scientific Reports*, *5*(1), 11448. https://doi.org/10.1038/srep11448
182. Rodrigues, R. B., Soares, C. J., Junior, P. C. S., Lara, V. C., Arana-Chavez, V. E., & Novais, V. R. (2018). Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. *Clinical Oral Investigations*, *22*(2), 875–883. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2165-4
183. Neelakantan, P., Sharma, S., Shemesh, H., & Wesselink, P. R. (2015). Influence of Irrigation Sequence on the Adhesion of Root Canal Sealers to Dentin: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Push-out Bond Strength Analysis. *Journal of Endodontics*, *41*(7), 1108–1111. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.001
184. Gan, J., Liu, S., Zhou, L., Wang, Y., Guo, J., & Huang, C. (2017). Effect of Nd:YAG Laser Irradiation Pretreatment on the Long-Term Bond Strength of Etch-and-Rinse Adhesive to Dentin. *Operative Dentistry*, *42*(1), 62–72. https://doi.org/10.2341/15-268-L
185. Kim, I.-H., Son, J. S., Min, B. K., Kim, Y. K., Kim, K.-H., & Kwon, T.-Y. (2016). A simple, sensitive and non-destructive technique for characterizing bovine dental enamel erosion: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Oral Science*, *8*(1), 54–60. https://doi.org/10.1038/ijos.2015.58
186. González-López, S., Torres-Rodríguez, C., Bolaños-Carmona, V., Sanchez-Sanchez, P., Rodríguez-Navarro, A., Álvarez-Lloret, P., & Domingo Garcia, M. (2016). Effect of 30 % hydrogen peroxide on

mineral chemical composition and surface morphology of bovine enamel. *Odontology*, *104*(1), 44–52. https://doi.org/10.1007/s10266-014-0189-7
187. Chung, H.-Y., & Li, C. C. (2013). Microstructure and nanomechanical properties of enamel remineralized with asparagine–serine–serine peptide. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(2), 969–973. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.031
188. Antunes, A., de Rossi, W., & Zezell, D. M. (2006). Spectroscopic alterations on enamel and dentin after nanosecond Nd:YAG laser irradiation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *64*(5), 1142–1146. https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.11.036
189. Sun, L., Liang, S., Sa, Y., Wang, Z., Ma, X., Jiang, T., & Wang, Y. (2011). Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *Journal of Dentistry*, *39*(10), 686–692. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.07.011
190. Andrew Chan, K. L., & Kazarian, S. G. (2016). Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. *Chemical Society Reviews*, *45*(7), 1850–1864. https://doi.org/10.1039/C5CS00515A
191. Griffiths, P. R., & deHaseth, J. A. (2007). *FourierTransformInfraredSpectrometry* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
192. Parikh, S. J., & Chorover, J. (2005). FTIR Spectroscopic Study of Biogenic Mn-Oxide Formation by *Pseudomonas putida* GB-1. *Geomicrobiology Journal*, *22*(5), 207–218. https://doi.org/10.1080/01490450590947724
193. Chen, Y., Zou, C., Mastalerz, M., Hu, S., Gasaway, C., & Tao, X. (2015). Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 30223–30250. https://doi.org/10.3390/ijms161226227
194. Bachmann, L., Diebolder, R., Hibst, R., & Zezell, D. M. (2003). Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. *Applied Spectroscopy Reviews*, *38*, 1–14.
195. Khanarian, N. T., Boushell, M. K., Spalazzi, J. P., Pleshko, N., Boskey, A. L., & Lu, H. H. (2014). FTIR-I Compositional Mapping of the Cartilage-to-Bone Interface as a Function of Tissue Region and Age. *Journal of Bone and Mineral Research*, *29*(12), 2643–2652. https://doi.org/10.1002/jbmr.2284
196. Doyle, B. B., Bendit, E. G., & Blout, E. R. (1975). Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, *14*(5), 937–957. https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140505
197. Teze, Ö. (2019). *Has Kefal Balığı (Mugil cephalus) Atıklarından Kollajen Eldesi ve Karakterizasyonu.* .Yüksek Lisans Tezi,Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,.
198. Woo, J.-W., Yu, S.-J., Cho, S.-M., Lee, Y.-B., & Kim, S.-B. (2008). Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (Thunnus albacares) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*, *22*(5), 879–887. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.015
199. Lopes, C. de C. A., Limirio, P. H. J. O., Novais, V. R., & Dechichi, P. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews*, *53*(9), 747–769. https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1431923
200. Tesch, W., Eidelman, N., Roschger, P., Goldenberg, F., Klaushofer, K., & Fratzl, P. (2001). Graded Microstructure and Mechanical Properties of Human Crown Dentin. *Calcified Tissue International*, *69*(3), 147–157. https://doi.org/10.1007/s00223-001-2012-z
201. Kinney, J. H., Pople, J. A., Marshall, G. W., & Marshall, S. J. (2001). Collagen Orientation and Crystallite Size in Human Dentin: A Small Angle X-ray Scattering Study. *Calcified Tissue International*, *69*(1), 31–37. https://doi.org/10.1007/s00223-001-0006-5
202. Fratzl, P., Groschner, M., Vogl, G., Plenk, H., Eschberger, J., Fratzl-Zelman, N., Koller, K., & Klaushofer, K. (2009). Mineral crystals in calcified tissues: A comparative study by SAXS. *Journal of Bone and Mineral Research*, *7*(3), 329–334. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070313
203. Londoño, O. M., Tancredi, P., Rivas, P., Muraca, D., Socolovsky, L. M., & Knobel, M. (2018). Small-Angle X-Ray Scattering to Analyze the Morphological Properties of Nanoparticulated Systems. In *Handbook of Materials Characterization* (pp. 37–75). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_2
204. Ihee, H., Lorenc, M., Kim, T. K., Kong, Q. Y., Cammarata, M., Lee, J. H., Bratos, S., & Wulff, M. (2005). Ultrafast X-ray Diffraction of Transient Molecular Structures in Solution. *Science*, *309*(5738), 1223–1227. https://doi.org/10.1126/science.1114782
205. Orujalipoor, I., & İde, S. (2016). *Farklı Hayvan Gözleri, Retina Çubuklarında Bulunan Rodopsin Yapılarının ve Nano Disk Oluşumlarının X-Işını Saçılma Yöntemleri (SAXS/WAXS) İle İncelenmesi* [Doktora Tezi]. Hacettepe Üniversitesi.
206. Tiznado-Orozco, G. E., García-García, R., & Reyes-Gasga, J. (2009). Structural and thermal behaviour of carious and sound powders of human tooth enamel and dentine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *42*(23), 235408. https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/23/235408

207. Kamal, D., Hassanein, H., Elkassas, D., & Hamza, H. (2020). Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, e161–e168. https://doi.org/10.4317/jced.56295
208. Deb, S., & Chana, S. (2015). *Biomaterials in Relation to Dentistry* (pp. 1–12). https://doi.org/10.1159/000381686
209. Kim, S. G., Malek, M., Sigurdsson, A., Lin, L. M., & Kahler, B. (2018). Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International Endodontic Journal*, *51*(12), 1367–1388. https://doi.org/10.1111/iej.12954
210. Zohoori, F. v., & Maguire, A. (2018). Are there good reasons for fluoride labelling of food and drink? *British Dental Journal*, *224*(4), 215–217. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.123
211. Grandjean, P., & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, *13*(3), 330–338. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3
212. Lynch, R. J. M., & Smith, S. R. (2012). Remineralization Agents – New and Effective or Just Marketing Hype? *Advances in Dental Research*, *24*(2), 63–67. https://doi.org/10.1177/0022034512454295
213. Fan, Y., Sun, Z., & Moradian-Oldak, J. (2009). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*, *30*(4), 478–483. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.019
214. ten Cate, J. M., & Buzalaf, M. A. R. (2019). Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist . . . *Journal of Dental Research*, *98*(7), 725–730. https://doi.org/10.1177/0022034519831604
215. Mei, M. L., Li, Q. L., Chu, C. H., Yiu, C. K. Y., & Lo, E. C. M. (2012). The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dental Materials*, *28*(8), 903–908. https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.011
216. Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2018). Caries-arresting effects of silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *Journal of Dentistry*, *78*, 65–71. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.007
217. Zhao, I. S., Yin, I. X., Mei, M. L., Lo, E. C. M., Tang, J., Li, Q., So, L. Y., & Chu, C. H. (2020). Remineralising Dentine Caries Using Sodium Fluoride with Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 2829–2839. https://doi.org/10.2147/IJN.S247550
218. Toopchi, S., Bakhurji, E., Loo, C. Y., & Hassan, M. (2021). Effect of Light Curing on Silver Diamine Fluoride in Primary Incisors: A Microscopic Ex Vivo Study. *Pediatric Dentistry*, *43*(1), 44–49.
219. Lau, L., Quock, R. L., Wu, D. I., Harrington, D. A., Patel, S. A., & Barros, J. A. (2021). Effect of surface preparation and light curing on penetration of silver particles from 38% silver diamine fluoride in dentin of primary teeth: An in vitro evaluation. *American Journal of Dentistry*, *34*(1), 44–48.
220. Alkilzy, M., & Splieth, C. H. (2020). Self-assembling peptides for caries prevention and treatment of initial carious lesions , a review. *Dtsch Zahnärztl Z Int*, *2*(1), 21–25.
221. Takahashi, F., Kurokawa, H., Shibasaki, S., Kawamoto, R., Murayama, R., & Miyazaki, M. (2016). Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization. *Acta Odontologica Scandinavica*, *74*(2), 142–147. https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1066850
222. Yazici, A. R., Kiremitçi, A., çelik, çigdem, özgünaltay, G., & Dayangaç, B. (2006). A two-year clinical evaluation of pit and fissure sealants placed with and without air abrasion pretreatment in teenagers. *The Journal of the American Dental Association*, *137*(10), 1401–1405. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0052
223. van Meerbeek, B., de Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative Dentistry*, *28*(3), 215–235.
224. Pollard, M. A. (1995). Potential Cariogenicity of Starches and Fruits as Assessed by the Plaque-Sampling Method and an Intraoral Cariogenicity Test. *Caries Research*, *29*(1), 68–74. https://doi.org/10.1159/000262043
225. Rahiotis, C., & Vougiouklakis, G. (2007). Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *Journal of Dentistry*, *35*, 695–698. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.05.008
226. Hatibović-Kofman, Š., El-Kassem, M., Inocencio, F., Selimovic, M., & Raimundo, L. (2008). Evidence Based Effectiveness of Pit and Fissure Sealants Applied by Students and Paediatric Dentists After Five Years. In *Acta Stomatol Croat* (Vol. 42, Issue 3). www.ascro.hr
227. Tschoppe, P., Zandim, D. L., Martus, P., & Kielbassa, A. M. (2011). Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *Journal of Dentistry*, *39*(6), 430–437. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.008

228. Yassen, G. H., Platt, J. A., & Hara, A. T. (2011). Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of Oral Science*, *53*(3), 273–282. https://doi.org/10.2334/josnusd.53.273
229. Karlinsey, R. L., Mackey, A. C., Walker, T. J., Frederick, K. E., Blanken, D. D., Flaig, S. M., & Walker, E. R. (2011). In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*, *3*(2), 22–29.
230. Lynch, R. J. M., & ten Cate, J. M. (2006). The Effect of Lesion Characteristics at Baseline on Subsequent De- and Remineralisation Behaviour. *Caries Research*, *40*(6), 530–535. https://doi.org/10.1159/000095653
231. Aydın, 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*, *09*(02), 262–266. https://doi.org/10.4103/1305-7456.156848
232. Tosun, G., Şener, Y., & Şengün, A. (2005). Kompozit rezinin mineye bağlanma dayanımı üzerine farklı saklama solüsyonlarının etkisi. . *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, *29*(3), 2–6.
233. Moura, J. S., Rodrigues, L. K. A., del Bel Cury, A. A., Lima, E. M. C. X., & Garcia, R. M. C. R. (2004). Influence of storage solution on enamel demineralization submitted to pH cycling. *Journal of Applied Oral Science*, *12*(3), 205–208. https://doi.org/10.1590/S1678-77572004000300008
234. Oliveira, G. M. S., Ritter, A. v., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, *42*(12), 1592–1602. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.004
235. Advani, S., Sogi, S., Hugar, S., Indushekar, K., Kiran, K., & Hallikerimath, S. (2014). Remineralization effects of two pediatric dentifrices and one regular dentifrice on artificial carious lesion in primary teeth: An in vitro study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, *4*(2), 96. https://doi.org/10.4103/2231-0762.137627
236. White, D. J. (1995). The Application of in Vitro Models to Research on Demineralization and Remineralization of the Teeth. *Advances in Dental Research*, *9*(3), 175–193. https://doi.org/10.1177/08959374950090030101
237. Savas, S., Kavrik, F., & Kucukyilmaz, E. (2016). Evaluation of the remineralization capacity of CPP-ACP containing fluoride varnish by different quantitative methods. *Journal of Applied Oral Science*, *24*(3), 198–203. https://doi.org/10.1590/1678-775720150583
238. Jablonski-Momeni, A., & Heinzel-Gutenbrunner, M. (2014). Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in constructing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie*, *75*(3), 175–190. https://doi.org/10.1007/s00056-014-0211-2
239. Jayarajan, J., Janardhanam, P., Jayakumar, P., & Deepika. (2011). Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization - An in vitro study using scanning electron microscope and DIAGNOdent ®. *Indian Journal of Dental Research*, *22*(1), 77. https://doi.org/10.4103/0970-9290.80001
240. Wu, Q., Mei, M. L., Wu, X., Shi, S., Xu, Y., Chu, C. H., & Chen, Y. (2020). Remineralising effect of 45S5 bioactive glass on artificial caries in dentine. *BMC Oral Health*, *20*(1), 49. https://doi.org/10.1186/s12903-020-1038-4
241. Erdwey, D., Meyer-Lueckel, H., Esteves-Oliveira, M., Apel, C., & Wierichs, R. J. (2021). Demineralization Inhibitory Effects of Highly Concentrated Fluoride Dentifrice and Fluoride Gels/Solutions on Sound Dentin and Artificial Dentin Caries Lesions in vitro. *Caries Research*, *55*(1), 41–54. https://doi.org/10.1159/000509931
242. Wierichs, R. J., Stausberg, S., Lausch, J., Meyer-Lueckel, H., & Esteves-Oliveira, M. (2018). Caries-Preventive Effect of NaF, NaF plus TCP, NaF plus CPP-ACP, and SDF Varnishes on Sound Dentin and Artificial Dentin Caries in vitro. *Caries Research*, *52*(3), 199–211. https://doi.org/10.1159/000484483
243. Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C.-M., & Chu, C.-H. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dentistry Journal*, *5*(2), 20. https://doi.org/10.3390/dj5020020
244. Milly, H., Festy, F., Watson, T. F., Thompson, I., & Banerjee, A. (2014). Enamel white spot lesions can remineralise using bio-active glass and polyacrylic acid-modified bio-active glass powders. *Journal of Dentistry*, *42*(2), 158–166. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.012
245. Lis, G. P., Mastalerz, M., Schimmelmann, A., Lewan, M. D., & Stankiewicz, B. A. (2005). FTIR absorption indices for thermal maturity in comparison with vitrinite reflectance R0 in type-II kerogens from Devonian black shales. *Organic Geochemistry*, *36*(11), 1533–1552. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2005.07.001
246. Rossman, G. R. (2006). Analytical Methods for Measuring Water in Nominally Anhydrous Minerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *62*(1), 1–28. https://doi.org/10.2138/rmg.2006.62.1

247. von Aulock, F. W., Kennedy, B. M., Schipper, C. I., Castro, J. M., E. Martin, D., Oze, C., Watkins, J. M., Wallace, P. J., Puskar, L., Bégué, F., Nichols, A. R. L., & Tuffen, H. (2014). Advances in Fourier transform infrared spectroscopy of natural glasses: From sample preparation to data analysis. *Lithos*, *206–207*, 52–64. https://doi.org/10.1016/j.lithos.2014.07.017
248. Cifuentes-Jimenez, C., Alvarez-Lloret, P., Benavides-Reyes, C., Gonzalez-Lopez, S., Rodriguez-Navarro, A. B., & Bolaños-Carmona, M. V. (2021). Physicochemical and Mechanical Effects of Commercial Silver Diamine Fluoride (SDF) Agents on Demineralized Dentin. *The Journal of Adhesive Dentistry*, *23*(6), 557–567. https://doi.org/10.3290/j.jad.b2288097
249. Akgun, O. M., Haman Bayari, S., Ide, S., Guven Polat, G., Yildirim, C., & Orujalipoor, I. (2021). Evaluation of the protective effect on enamel demineralization of CPP-ACP paste and ROCS by vibrational spectroscopy andSAXS : An in vitro study. *Microscopy Research and Technique*, *84*(12), 2977–2987. https://doi.org/10.1002/jemt.23857
250. Liu, C., Hao, Z., Yang, T., Wang, F., Sun, F., & Teng, W. (2021). Anti-Acid Biomimetic Dentine Remineralization Using Inorganic Silica Stabilized Nanoparticles Distributed Electronspun Nanofibrous Mats. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 16*, 8251–8264. https://doi.org/10.2147/IJN.S331321
251. Wang, Z., Jiang, T., Sauro, S., Wang, Y., Thompson, I., Watson, T. F., Sa, Y., Xing, W., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2011). Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *Journal of Dentistry*, *39*(11), 746–756. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.08.006
252. Akgun, O. M., Haman Bayari, S., Ide, S., Guven Polat, G., & Orujalipoor Kalkhoran, I. (2015). Micro- and nanoscale structures of mesiodens dentin: Combined study of FTIR and SAXS/WAXS techniques. *Microscopy Research and Technique*, *78*(1), 52–58. https://doi.org/10.1002/jemt.22444
253. Chien, Y.-C., Burwell, A. K., Saeki, K., Fernandez-Martinez, A., Pugach, M. K., Nonomura, G., Habelitz, S., Ho, S. P., Rapozo-Hilo, M., Featherstone, J. D., Marshall, S. J., & Marshall, G. W. (2016). Distinct decalcification process of dentin by different cariogenic organic acids: Kinetics, ultrastructure and mechanical properties. *Archives of Oral Biology*, *63*, 93–105. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.10.001
254. Ataş, C. (2022). *Mineral Trioksit Agregat, Biodentine Ve P11-4 Materyallerinin Rat Bağ Dokusu Üzerinde Fibroblast Büyüme Faktörü 2 Ve Kemik Morfogenetik Protein 2 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi.* Health Sciences University .
255. Koch, F., Meyer, N., Valdec, S., Jung, R. E., & Mathes, S. H. (2020). Development and application of a 3D periodontal in vitro model for the evaluation of fibrillar biomaterials. *BMC Oral Health*, *20*(1), 148. https://doi.org/10.1186/s12903-020-01124-4
256. Brunton, P. A., Davies, R. P. W., Burke, J. L., Smith, A., Aggeli, A., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2013). Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides-A clinical safety trial. *British Dental Journal*, *215*(4). https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.741
257. Schlee, M., Rathe, F., Bommer, C., Bröseler, F., & Kind, L. (2018). Self-assembling peptide matrix for treatment of dentin hypersensitivity: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, *89*(6), 653–660. https://doi.org/10.1002/JPER.17-0429
258. Hill R., Chen X., Lysek D.A., & Gillam D. (2020). An In Vitro Comparison of A Novel Self-Assembling Peptide Matrix Gel and Selected Desensitizing Toothpastes in Reducing Fluid Flow by Dentine Tubular Occlusion. *Journal of Dental and Maxillofacial Research*, *3*(1). https://doi.org/10.31038/JDMR.2020311

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.06.2021-40273

15.06.2021-40273

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

Sayı : E-46418926-050.01.04--40273 15.06.2021
Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu
(21/431)

Sayın Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, 21/431 kayıt numaralı, ***"İn-vitro Dentin Çürüğü Modelinde Florür Vernik, Gümüş Diamin Florür ve Peptid P11-4 Uygulamasının Dentin Nano Yapısı Üzerine Etkilerinin SEM, FTIR ve SAXS Yöntemleri Kullanılarak İncelenmesi"*** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 04.06.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur. İlgili kurul kararı Ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Ek:Kurul Kararı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :*BS94PZP28C* Pin Kodu :97262 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys

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

Bilgi için: Ronayı COŞKUN
Unvanı: Araştırma Görevlisi

EK-2. Bilgilendirilmiş Onam Formu

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

Sayın hasta,

Çekim endikasyonu konularak çekilmiş dişinizin *''*İn-vitro Dentin Çürüğü Modelinde Florür Vernik, Gümüş Diamin Florür ve Peptid P11-4 Uygulamasının Dentin Nano Yapısı Üzerine Etkilerinin SEM, FTIR ve SAXS Yöntemleri Kullanılarak İncelenmesi*''* isimli bilimsel araştırma çalışmasında kullanılabilmesi için izin istenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Çekilmiş dişlerin, "İn-vitro Dentin Çürüğü Modelinde Florür Vernik, Gümüş Diamin Florür ve Peptid P11-4 Uygulamasının Dentin Nano Yapısı Üzerine Etkilerinin SEM, FTIR ve SAXS Yöntemleri Kullanılarak İncelenmesi'' isimli çalışmada değerlendirilmesi ile diş çürüğünün durdurulması için kullanılabilecek materyallerin etkinliği, klinikte kullanımı sonucunda avantaj sağlanıp sağlanamayacağı bu deneysel çalışma sayesinde araştırılmış olacaktır. Bu çalışma sonucunda amacımız diş çürüklerinin durdurulması için kullanılabilecek materyaller hakkında daha detaylı bilgiler elde etmektir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI RİSKLERİ NELERDİR?

Çalışmaya katılmanın herhangi bir olası riski bulunmamaktadır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

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

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİ:

Adı Soyadı: Gizem YOĞURUCU DEĞERLİ, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği AD
Telefon: 0(216) 418 96 16

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

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

Gönüllü Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	

Araştırmacı Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	