



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PEPTİTLE MİNERALİZASYONU DESTEKLENMİŞ FLOR
JELİN SÜT DİŞİ MİNESİNDE REMİNERALİZASYONA
ETKİSİNİN MICRO CT, SEM, PLM KULLANILARAK
İN VİTRO ANALİZİ**

Dt. Merve YAŞAR ÜNÜVAR

**DANIŞMANLAR
Dr. Öğretim Üyesi CENKHAN BAL
Prof. Dr. Kaan Orhan**

DİŞ HEKİMLİĞİNDE DOKTORA TEZİ

**ANKARA
2022**



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PEPTİTLE MİNERALİZASYONU DESTEKLENMİŞ FLOR
JELİN SÜT DİŞ MİNESİNDE REMİNERALİZASYONA
ETKİSİNİN MICRO CT, SEM, PLM KULLANILARAK İN
VİTRO ANALİZİ**

Dt. Merve YAŞAR ÜNÜVAR

**DANIŞMAN
Dr. ÖĞretim yesi CENKHAN BAL
Prof. Dr. Kaan Orhan**

DİŞ HEKİMLİĞİNDE DOKTORA TEZİ

ANKARA

2022

KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalında/Programında
Merve Yaşar Ünüvar tarafından hazırlanan
“Peptide Mineralizasyonu Desteklenmiş Flor Jelin Süt Dişi Minesinde Remineralizasyona
Etkisinin Micro-CT, SEM, PLM Kullanılarak İn Vitro Analizi”
Başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan Ünvanı:Dr.Öğr.Üyesi Cenkhan BALIMZA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane, Çocuk Diş Hekimliği AD.....
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Ünvanı Adı SOYADI İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Ünvanı Adı SOYADI İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Ünvanı Adı SOYADI İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Ünvanı Adı SOYADI İMZA
Üniversite Adı, Ana Bilim Dalı Adı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Tez Savunma Sınavı Tarihi:...../...../.....

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

Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tezin Teslim Edildiği Tarih:/...../.....

BEYAN

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

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

Merve Yaşar Ünüvar

28.02.2022

ÖZET

PEPTİTLE MİNERALİZASYONU DESTEKLENMİŞ FLOR JELİN SÜT DİŞİ MİNESİNDE REMİNERALİZASYONA ETKİSİNİN MICRO CT, SEM, PLM KULLANILARAK İN VİTRO ANALİZİ

Amaç: Bu çalışma karyojenik pH döngüsünün taklit edildiği bir ortamda, flor jele katılan mineralizan peptit olan MPP3'ün, süt dişi minesindeki remineralizasyon etkinliğini arttırmayı amaçlamaktadır. Mineralizan peptidin gerek tek başına kullanımı ile gerekse de flor jel ile kombine kullanımı sonrasında sağlam minede demineralizasyona olan direncinin artırılması hedeflenmektedir. Bunun yanı sıra flor jele mineralizan peptit eklenerek florun geleneksel kullanımına göre daha üstün remineralizasyon yeteneğine sahip bir formülasyon oluşturulmak istenmiştir.

Gereç ve Yöntem: 40 adet süt molar diş kronu, suyla soğutma altında hassas kesici kullanılarak mine-sement birleşim noktasından kesilmiş ve bukkal yüzeyleri açıkta olacak şekilde akrilik bloklara gömülmüştür. Örnekler rastgele 4 gruba ayrılıp numaralandırılmıştır. Gruplar; Grup 1: kontrol, Grup 2: ticari flor jel (12,500 ppm F), Grup 3: %10 MPP3 jel, Grup 4: ticari flor jel (12,500 ppm F)+MPP3 şeklindedir. Başlangıç mikrosertlik ve micro-CT analizi ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ilk ölçümlerin ardından örneklerin bukkal yüzeyinde çalışma için ayrılmış 3mm×3mm'lik alana 4dk remineralizasyon ajanları uygulanmış olup, kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmamıştır. Örnekler 37°C 'de 4 hafta süren pH döngüsünde kalmıştır. 4 hafta sonunda sırasıyla mikrosertlik, micro-CT, PLM, SEM analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Bu tez çalışmasında ticari flor jele eklenmiş MPP3'ün ticari flor jelin tek başına kullanımına kıyasla demineralizasyona olan direncini artırmada başarılı olduğu saptanmıştır. Mikrosertlik analizi sonuçlarına göre MPP3'in tek başına ve flor jele eklenerek kullanımının minenin mikrosertliğini artırdığı tespit edilmiştir. Micro-CT sonuçlarına göre MPP3'ün karyojenik pH döngüsüne rağmen minede mineral yoğunluğunu korumada başarılı olduğu bulunmuştur. MPP3 ilave edilen grupta anlamlı derecede lezyon derinliğinin düşük olduğu PLM sonuçlarında görülmüştür. SEM görüntülerinde morfolojik bir fark tespit edilememiştir.

Sonuç: MPP3’ün flor jele ilavesinin, flor jelin çürükten koruyucu etkinliğini ve remineralizasyon kapasitesini artırdığı tespit edilmiştir. Minenin fiziksel özelliklerini geliştirebilecek potansiyel bir ajan olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: MPP3, flor jel, remineralizasyon, micro-CT



ABSTRACT

IN VITRO ANALYSIS OF THE EFFECT OF PEPTIDE-SUPPORTED FLUOR GEL ON REMINERALIZATION IN DAIRY ENAMEL USING MICRO CT, SEM, PLM

Objective: This study aims to increase the remineralization efficiency of MPP3, mineralizing peptides added to fluorine gel and fluoride gel in primary tooth enamel in an environment where a cariogenic pH cycle is mimicked. It is aimed to increase the resistance of mineralizing peptide to demineralization in intact enamel, either alone or in combination with fluoride gel. In addition, by adding a mineralizing peptide to the fluorine gel, it was desired to create a formulation with a superior remineralization ability compared to the traditional use of fluoride.

Materials and Methods: 40 primary molar crowns were cut from the enamel-cementum junction using a precision cutter under water cooling and embedded in the acrylic block with their buccal surfaces exposed. The samples were randomly divided into 4 groups and numbered. The groups were; Group1: control, Group2: commercial fluoride gel (12,500 ppm F), Group3: 10% MPP3 gel, Group4: commercial fluoride gel (12,500 ppm F)+MPP3. Initial microhardness and micro-CT analysis measurements were made. Remineralization agents were applied to the 3mm×3mm area on the buccal surface of the samples, as indicated in the groups, for 4 minutes, respectively, and no application was made to the control group. Samples remained in a pH cycle at 37°C for 4 weeks. After 4 weeks, microhardness, micro-CT, PLM, and SEM analyzes were performed, respectively.

Results: In this thesis, it was determined that MPP3 added to commercial fluoride gel was successful in increasing the resistance to demineralization compared to the use of commercial fluoride gel alone. According to the results of microhardness analysis, it was determined that the use of MPP3 alone and added to fluorine gel increased the microhardness of the enamel. According to micro-CT results, MPP3 was found to be successful in maintaining mineral density in enamel despite the cariogenic pH cycle. It was observed in the PLM results that the lesion depth was significantly

lower in the MPP3 added group. No morphological difference could be detected in SEM images.

Conclusions: The addition of MPP3 to fluoride gel has been shown to increase the caries protective efficacy and remineralization capacity of fluorine gel. Also MPP3 seems to be a potential agent that can improve the physical properties of enamel.

Key Words: MPP3, fluoride gel, remineralization, micro-CT



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana destek olan, bilgi ve deneyimini paylaşarak bana yol gösteren doktora tez danışmanım ve anabilim dalı başkanım Dr. Öğr. Üyesi Cenkhan BAL'a

Doktora eğitimim süresince büyük ilgi ve desteğini gördüğüm Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'nda görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Merve AKSOY'a

Doktora eğitim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım Arş. Gör. Zeynep ÖZTÜRK, Arş. Gör. Demet ATAK değerli ablam Uzm. Dt. Başak Doğan UÇAR'a

Tez süresince kimyasal solüsyonların hazırlanmasına olan katkısından ve çalışmamın istatistiksel sonuçlarını değerlendirmedeki yardımlarından dolayı Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği'nde görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ'e

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen, micro-CT çekimlerinde bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Ağız Diş Çene Radyolojisi Anabilim Dalında öğretim üyesi kıymetli hocam Prof. Dr. Kaan ORHAN'a

Tez çalışmalarım sırasında yardım eden ve sabırla beni destekleyen, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan babam Ömer Yaşar, annem Baransel Yaşar'a, bir tanecik kızım Ayşe Beyruha, canım aileme sonsuz teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MİNESİNİN YAPISI.....	3
2.2. MİNE MATRİKS PROTEİNLERİ VE MİNE FORMASYONUNDAKİ ROLÜ	3
2.3. MİNE BİYOMİMETİĞİ	5
2.4. MİNE ÇÜRÜĞÜ.....	7
2.5. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN YÖNTEMLER.....	9
2.5.1.Oral Hijyen Sağlanması	10
2.5.2.Diyetin Düzenlenmesi	10
2.5.3. Antibakteriyel Önlemler	11
2.5.4. Lazer uygulamaları	11
2.6. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN REMİNERALİZASYON AJANLARI.....	12
2.6.1. Mineral Doygunluğunu Artıran Ajanlar	12
2.6.1.1. Flor	12
2.6.1.2.CPP-ACP	15
2.6.1.3. Biyoaktif Cam	16
2.6.1.4.İşlevselleştirilmiş β -Tri-Kalsiyum Fosfat (f-TCP)	16
2.6.2.Doğal Ürünler	17
2.6.2.1. Kitosan	17
2.6.2.2.Galla Chinensis	17
2.6.3. Biyofilm Modifiye Ediciler.....	18
2.6.3.1. Ksilitol	18

2.6.3.2.Arjinin.....	18
2.7. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN BİYOMİMETİK AJANLAR	19
2.7.1.Amelogenin	19
2.7.2. Poly Amido Amin (PAMAM) Dendrimerler	20
2.7.3.Dentin Fosfoprotein Türevi 8DSS Peptitler (8 tekrarlı aspartat-serin-serin dizisi)	21
2.7.4. Nano HAP	21
2.7.5. Elektrikle Hızlandırılmış ve Geliştirilmiş Remineralizasyon.....	22
2.7.6.P11-4.....	22
2.7.7.MPP3 (Mineralizasyonu indükleyici (promoting) peptit 3)	23
2.8.ANALİZLER.....	25
2.8.1.Mikrosertlik Analizi.....	25
2.8.2.Mikro Bilgisayarlı Tomografi	25
2.8.3. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS).....	27
2.8.4.Polarize Işık Mikroskobu Analizi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. GEREÇ	29
3.1.1. Sağlam Süt Dişi Minesinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Materyaller	29
3.1.2. Süt Dişlerinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin PH Döngüsünde Kullanılacak Solüsyonlar	
30	
3.1.3. Süt Dişlerinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Cihazlar	30
3.2. YÖNTEM.....	34
3.2.3.Çalışma Gruplarının Oluşturulması	36
3.2.4. Mikro Sertlik Ölçümleri	37
3.2.5. pH Döngüsünün Çalışması	38
3.2.6. Örneklerin Micro-CT’de Değerlendirilmesi.....	39
3.2.6.1. Örneklerin Taranması, Rekonstrüksiyonu ve Analize Hazırlanması.....	40
3.2.6.2. Mikro-BT’de Taranmış Örneklerin Mineral Yoğunluk Ölçümleri.....	42

3.2.7. Polarize ışık mikroskobu analizi	45
3.2.8. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) Analizi	47
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMİ	48
4. BULGULAR	49
4.1. MİKROSERTLİK ANALİZİNE AİT BULGULAR	49
4.2. MİKRO BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ ANALİZİNE AİT BULGULAR	51
4.3. POLARİZE IŞIK MİKROSKOBUNA AİT BULGULAR	54
4.4. ALAN EMİSYONLU TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (FESEM) VE ENERJİ DAĞILIM SPEKTROSKOPİSİ (EDS)'NE AİT BULGULAR	59
4.4.1. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) görüntülemesine ait bulgular	59
4.4.2. Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisine ait bulgular	62
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	78
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER	97
EK 1. ETİK KURUL ONAYI	97
EK 2. DOĞA İLAÇ FİRMASINDAN ELDE EDİLEN YENİLEBİLİR SIĞIR JELATİNİNİN SERTİFİKASI	98
EK 3. SBÜ GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU	99
9. ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

3NSS	: 3 asparajin-serin-serin peptit
8DSS	: 8 tekrarlı Dentin fosfoprotein türevli aspartat serin-serin dizisi
AAPD	: American Academy of Pediatric Dentistry
ACP	: Amorf kalsiyum fosfat
ADP5	: Amelogenin Derived Peptide 5
AgF	: Gümüş florür
APF	: Asidüle Fosfat Florür
Ark	: Arkadaşları
Bk	: Bakınız
BMP	: Bit Map Picture
BMP-7	: Bone morphogenetic protein 7
Ca⁺²	: Kalsiyum
CaF₂	: Kalsiyum florür
CCD	: Charge-Coupled Device
CPP	: Kazein Fosfopeptid
Ctan	: Computer Tomography Analyse
DICOM	: Digital Imaging and Communications in Medicine
DPP	: Dentine phosphoprotein
EDS	: Enerji Dağılım Spektroskopisi
F	: Flor
FA	: Florapatit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FESEM	: Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
FHA	: Florhidroksiapatit
ftTCP	: İşlevselleştirilmiş tri kalsiyum fosfat
GDF	: Gümüş diamin florür

x

H⁺	: Hidrojen iyonu
HAP	: Hidroksiapatit
KLK4	: Kallikrein 4
Micro-CT	: Mikro Bilgisayarlı Tomografi
Mm	: milimetre
MMP20	: Matriks Metaloproteaz 20
MPP3	: Mineralization Promoting Peptide
Na⁺	: Sodyum iyonu
NaF	: Sodyum florür
nHAP	: Nano hidroksiapatit
nm	: nanometre
OH	: Hidroksil
P	: Fosfor
P11-4	: 11 aminoasitli kendiliğinden birleşen oligopeptit
PAMAM	: Poly Amido Amin
pH	: Power of hydrogen
PLM	: Polarized Light Microscope
PO₄⁻³	: Fosfat
ppm	: Milyonda bir birim
ROI	: Region of Interest
rP172	: Rekombinant domuz amelogeninin
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SnF	: Kalay florid
β-TCP	: β Tri Kalsiyum Fosfat
μm	: mikometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Grupların ‘Uygulama Sonrası’ ve ‘Ph Döngüsü Süresince’ mikrosertlik değerlerinin yüzde olarak değişimi.....	50
Şekil 4.2.	Başlangıç ve 4 hafta sonra gruplarda mineral yoğunluk değişimi	53
Şekil 4.3.	4 hafta sonra gruplarda mineral yoğunluk değişimi yüzdesi	53
Şekil 4.4.	PLM görüntülerine dayalı ortalama lezyon derinlikleri.....	58
Şekil 4.5.	PLM ölçümü yapan araştırmacılar arası uyum ölçümü	59
Şekil 4.6.	4. Hafta sonunda gruplardaki F iyonu yüzdeleri	62
Şekil 4.7.	4 hafta sonra gruplardaki Ca/P oranları	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. MPP3'ün fizikokimyasal özellikleri	24
Çizelge 3.1. Koruyucu Remineralizasyon kapasiteleri değerlendirilen materyaller	30
Çizelge 3.2. Remineralizasyon ajanlarının koruyucu kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihazlar.....	31
Çizelge 3.3. Analizlerde kullanılmış olan numune sayıları	37
Çizelge 4.1. Vickers mikrosertlik analizi sonucu elde edilen bulgular	49
Çizelge 4.2. Grupların başlangıç ve 4.haftada mineral yoğunluklarının (gr/cm ³) (Ort±St.sapma) karşılaştırması ve yüzdelik değişim değerleri	51
Çizelge 4.3. Grupların 4.haftada PLM analizi ile ölçülen lezyon derinlikleri ölçümleri (µm)	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1.	Araştırmada kullanılan mikrosertlik test cihazı	31
Resim 3.2.	Taramalı elektron mikroskobu, EDS dedektörü	32
Resim 3.3.	Araştırmada kullanılan hassas kesme cihazı.....	32
Resim 3.4.	Etüv	33
Resim 3.5.	Skyscan 11275 mikro bilgisayarlı tomografi cihazının görüntüsü ...	33
Resim 3.6.	Polarize ışık mikroskobu	33
Resim 3.7.	Vakumlu kaplama cihazı	34
Resim 3.8.	Mine-sement sınırından kesilmiş süt dişi.....	35
Resim 3.9.	Akrilik bloklara gömülmüş dişler	36
Resim 3.10.	3x3 mm lik çalışma yüzeyinin elde edilmesi.....	36
Resim 3.11.	Akrile gömülen diş bloklarının numaralandırılması	37
Resim 3.12.	Örneklerin mikrosertlik testi yapılırken görüntüsü.....	38
Resim 3.13.	Ph döngüsünün başlaması ve 28 gün boyunca örneklerin 37 °C derecede tutulması	39
Resim 3.14.	Konik Hidroksiapatit fantomların yerleştirilmesi- Hidroksiapatit fantomların taranması	40
Resim 3.15.	Diş örneklerinin taranması sonrası elde edilen iki boyutlu aksiyel projeksiyonları	41
Resim 3.16.	Çalışmamızda kullanılan CTan programının ekran görüntüsü	42
Resim 3.17.	Örneklerle ait kesitlerin analizlerinin yapılması için hazırlanması....	43
Resim 3.18.	CTan Programı kullanılarak diş örneğinin ROI'sinin seçilmesi.....	43
Resim 3.19.	CTan Programı kullanılarak diş örneğinin demineralazyon alanın gösterilmesi	44
Resim 3.20.	CTan Programı kullanılarak diş örneğinin BMD hesaplamaları gösterilmektedir.	44
Resim 3.21.	Micro cutta 1 örnekten elde edilen 2 farklı kesit	46
Resim 3.22.	200 µm' na kadar inceltilen ve parlatılan kesit örneği.....	46
Resim 3.23.	Polarize ışık mikroskobu analizi.....	47
Resim 4.1.	Örneklerin başlangıç ve 4 hafta sonraki micro-CT kesitleri.....	51

Resim 4.2.	4 haftanın sonunda gruplardan rastgele seçilen 8 numunenin PLM görüntüleri.....	55
Resim 4.3.	Kontrol grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü	56
Resim 4.4.	Ticari flor jel grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü	56
Resim 4.5.	MPP3 grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü	57
Resim 4.6.	Ticari flor jel+MPP3 grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü	57
Resim 4.7.	4. Haftanın sonunda örneklerin mine yüzeylerinden alınan FE-SEM görüntüleri.....	60
Resim 4.8.	Kontrol grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü	60
Resim 4.9.	Ticari flor jel grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü.....	61
Resim 4.10.	MPP3 grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü	61
Resim 4.11.	Ticari flor jel+MPP3 grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü	61

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde modern diş hekimliğinde gelişen koruyucu yaklaşımlar ile diş yapısının doğal halde korunması ve çürük oluşumunun azaltılması hedeflenmektedir. Böylece çürüklerin preperasyonu, dolgu ile geleneksel tedavisi gibi pahalı sağlık maliyetlerine ve sağlam diş dokusu kaybına neden olan invaziv restoratif tedavilerin önüne geçilebilmektedir (1).

Koruyucu yaklaşımlar çerçevesinde kavitasyon oluşmamış demineralize minerde remineralizasyonun sağlanması amaçlanır. Remineralizasyonun sağlanması için bir çok koruyucu yöntem ve ürün geliştirilmiştir. Florür aracılı remineralizasyon hala çürükten korunmanın altın standardı olsa da, pit ve fissür çürüklerinde sınırlı etki gösterebileceği, yüksek florid uygulamalarının florozis gibi yan etkiler göstermesi, remineralizasyon etkinliğinin minenin dış yüzeyi ile sınırlı olması gibi dezavantajları vardır (2). İdeal olarak, iyi bir remineralizasyon sağlanabilmesi için yüzeyaltı bölgede de kalsiyum (Ca^{+}), fosfat (PO_4^{-3}) ve flor (F) iyonlarının yeterli yoğunluğa ulaşması sağlanmalıdır (3). Lezyonların yüzeyaltı bölgede derin remineralizasyonunu teşvik edebilen ve yüksek düzeyde florürün potansiyel toksisite risklerini azaltacağı düşünülen yeni remineralizasyon stratejileri geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlarla florür aracılı remineralizasyonun ötesine geçmek hedeflenmiştir. Remineralize edici sistemler iki ana yol kullanırlar. Biri florür içermeyen çoğunu biyomimetik mine rejenerasyonu teknolojilerinin oluşturduğu ajanlar ve diğeri ise florür etkinliğini artırarak çürük lezyonlarını onaran yaklaşımlar olarak kategorize edilebilmektedir (4). Son yıllarda geliştirilen biyomimetik ajanlar mine rejenerasyonu konusunda umut vaat etmektedir.

Mine, dentin gibi çürük atağına cevap verebilen canlı bir doku değildir. Rejeneratif olmayan yapısı nedeniyle mine demineralizasyon sonrası kendini onaramaz (5). Başlangıç çürüklerinde yüzeyaltı lezyonunun rejenerasyonu ve remineralizasyonu için hidroksiapatit oluşumunu sağlamak ve hidroksiapatit kristallerinin sıralanmasına yardımcı olmak için bir iskeleyle ihtiyaç vardır. Bu nedenle demineralize dokuda ve lezyon gövdesi içinde ilerleyebilen bir remineralizasyon ajanına ihtiyaç duyulmaktadır (6). Böylece biyomimetik remineralizasyon ile minede

kaybedilen hidroksiapatit (HAP) kristallerinin doğal oluşum süreci taklit edilerek yeniden oluşturulması hedeflenmektedir (7).

Son çıkan biyomimetik ajanlardan biri olan mineralizasyonu indükleyici peptit (mineralization promoting peptide-MPP3)'in minede biyomimetik remineralizasyon potansiyeli olduğu bilinmektedir. MPP3 amelogenin ve amelogenin türevi peptitler model alınarak üretilmiş 14 aminoasit uzunluğunda sentetik bir peptit ajanıdır (8,9).

Bu tez çalışmasının amacı sağlam süt dişi minesinde yeni bir biomimetik ajan olan MPP3'n tek başına ve ticari flor jel ile kombine kullanımının mine remineralizasyonu üzerine etkinliğinin araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİNESİNİN YAPISI

Diş minesi insan vücudundaki en sert dokudur. Matür mine, ağırlıkça % 96'ya kadar HAP ($\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$) içeren kristal bir yapıdır. Minenin geri kalanı, proteinler ve lipidler dahil olmak üzere ağırlıkça yaklaşık %1 organik maddelerden ve %3 sudan oluşur. Organik yapısı proteinler (enamelin, amelogenin, metiyonin, histidin, lösin gibi birçok aminoasit), yağlar ve karbonhidratlardan oluşur. Enamelin ve amelogenin minenin organik bölümünün organizasyonunu sağlayan önemli proteinler olmakla birlikte, lösin diş minesinin organik yapısına katılan proteinlerdendir. Minenin minör inorganik bileşenleri ise; florid, demir, çinko, altın, gümüş, stronsiyum, rubidyum, brom, vanadyum, bakır, mangan, krom, kobalt gibi elementlerdir (10,11). Mine daimi dişlerde yaklaşık 1-2 mm, süt dişlerinde 0,5-1 mm kalınlığındadır ve birbirine paralel dizilmiş apatit kristallerinden oluşan karmaşık bir mineralize yapıdır. 1000 HAP kristali bir araya gelir ve 1 mine prizması oluşur. Mine prizmaları, mine dentin sınırından mine yüzeyine kadar dikey ve yatay doğrultularda ilerleyen kıvrımlı bir yapıdadır. Kristallerin ortalama boyutu, yüzeyden uzaklığına göre değişebilmekle birlikte, yaklaşık 50 nm genişliğinde ve 25 nm kalınlığında ve birkaç mikron uzunluğundadır (11-13).

2.2. MİNE MATRİKS PROTEİNLERİ VE MİNE FORMASYONUNDAKİ ROLÜ

Mine, dentin ve kemik dokusundan çok farklı bir yapıya sahiptir. Mine oluşumuna amelogenesis adı verilmektedir. Amelogenesis, mine kristallerinin oluşumunu, büyümesini ve organizasyonunu düzenleyen özel hücre dışı süreçlerin bütünüdür. Ameloblastlar amelogenesisin gerçekleşmesinde ve mine dokusu oluşumunda görevli özel epitel hücreleridir. İç mine epitel hücrelerinden farklılaşan ameloblast hücreleri amelogenin ve diğer mine proteinlerini sentezlemek, kalsiyum ve fosfat iyonlarını mine matriksine taşımak için uzun prizmatik hücrelere dönüşür (14,15). Ameloblastlar mine oluşuktan sonra apoptoza uğrarlar (16).

Amelogenezisin erken evrelerinde ameloblastlar tarafından ekstraselüler mine matriks proteinleri salgılanır. Mine protein matriksi, ağırlıklı olarak amelogenin ve onun parçalanma ürünlerinden oluşur (17). Amelogenin dışında diğer iki önemli mine matriks proteini, enamelin ve ameloblastindir. Enamelin ve ameloblastin mine matriksinde az miktarda bulunmalarına rağmen, mine oluşumunda çok önemli roller oynayabildikleri düşünülmektedir. Enamelin de amelogenin gibi enzimatik olaylarla kademeli olarak bozulmaya uğrar. Sıçan ve domuzlarda tanımlanmış olan ameloblastinin, mine kristallerinin büyümesinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (18). Bir hayvan deneyinde, ameloblastinleri çıkarılmış farelerde minenin oluşmadığı bulunmuştur (19). Bazı yazarlar ameloblastinin, ameloblastların mine matriksine bağlanmasını kolaylaştıran bir hücre adezyon molekülü olduğunu öne sürmüşlerdir (15).

Mine matriks proteinlerinin mine gelişimi sırasında mine kristallerinin düzenlenmesinde, mineral fazların oluşumu ve organizasyonunda rol aldığı öne sürülmüştür. Mine kristallerinde büyümenin düzenlenmesinde hidrofobik (kollojen yapı vb.) ve hidrofilik moleküller arasında bir etkileşim olduğu çeşitli çalışmalarda iddia edilmektedir (20-22).

Mine matriksinde proteinlere ek olarak iki proteinaz tanımlanmıştır. Bunlar; matriks metaloproteaz 20 (MMP-20) ve enamelin'dir. Bu proteinazlar mine matriks proteinlerinin işlenmesinden sorumludur, aynı zamanda mine oluşumu için gerekli olan hücre sinyallerinin oluşumunda da yer almaktadırlar. Ameloblastlar mine mineralizasyonu sürecinde ekstraselüler matriks proteinlerini salgırlar. Daha sonra proteazlar aracılığıyla ortamdaki ekstraselüler matriks proteinlerinin neredeyse tamamen uzaklaştırılmasıyla mine matürasyon süreci devam eder. Özetle matürasyon devam ettikçe bu yapıdan ekstraselüler mine matriksi uzaklaşır ve mineralizasyon tamamlanır. Matürasyonun son aşamasında mine matriks proteinleri neredeyse tamamen bozulur (15,23).

Mine dokusu oluşumunda mine matriks proteinlerinin birbiriyle veya minerallerle etkileşiminin çok önemli rolü olduğu bilimektedir. Bu etkileşim sonucunda temel görevi ameloblastların üstlendiği mine prizmaları oluşur. HAP ise, mine prizmasının özel bir kristal modelidir. Matür minede %95 oranında yüksek

düzeyde organize olmuş HAP kristalleri bulunur. Mineyi oluşturan organik ve inorganik yapıların mine oluşum mekanizmasındaki ana rolleri hakkında hala araştırılmayı bekleyen noktalar vardır (15,16).

2.3.MİNE BİYOMİMETİĞİ

Biyolojik organizmalarda mine, diş sürmeden önce yalnızca bir kez üretilir ve diş tamamen çıktıktan sonra her bir diş organında yeni mine oluşturma kapasitesi mümkün olmaz. Bu nedenle doku mühendisliğindeki gelişmeler ve mine oluşumundaki aktif protein ajanların tespit edilmesiyle mine biyomimetliği araştırılmaları hız kazanmıştır. Amelogenezin ilk evrelerinde yer alan yüksek iyon konsantrasyonları ve çarpıcı pH değişiklikleri, diş minesi rejenerasyonuna yönelik hücre çalışmalarında zorlu bir engel teşkil eder. Her ne kadar HAP sentezi üretimi basit görünse de, paralel hizalanmış apatit kristalleri ve çapraz prizma demetleri ile minenin aslına uygun üretimi şimdiye kadar nadiren gerçekleştirilmiştir (24-26).

Son yıllarda mine dokusu rejenerasyonu için doku mühendisliğinde farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Pandya ve Diekwisch'in (14) belirttikleri üzere bu yaklaşımlar şu şekilde maddelenebilmektedir:

1-Fiziksel sentez yaklaşımı: Yüksek sıcaklık, yüksek basınç ve olağandışı pH gibi koşullarda doğadaki inorganik kalsiyum fosfatların kristalli apatitlere dönüştürülmesi sağlanır. Apatit biyomineralizasyonu için gerekli biyolojik koşullar taklit edilmeye çalışılmıştır.

2-Protein matriks rehberliğinde mine kristal büyümesi: Doğal diş minesi oluşumunu taklit etmek amacıyla amelogeninden zengin bir protein matriksinin üretilmesini ve bu matriksin Ca^{+2} , PO_4^{-3} iyonları ile zenginleştirilmesini içerir. İlk apatit kristal oluşumunun ardından, MMP20 ve kallikrein 4 (KLK4) gibi mine matriks proteazları kullanılarak enzimatik işlemeye sonucunda farklı eksenlerde kristal büyümesi yönlendirilir. Yapılan çalışmalar kristal büyümeyi gerçekleştirmek için bir mine proteini rehberliğinde amelogenin fragmanlarının ve diğer çekirdekleştirici kalsiyum fosfat kristallerinin, apatit yüzeyi ile etkileşiminin mine kristali büyümesi

için önemli olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda amelogenin fragmanı olan hidrofilik amelogenin C- terminali, lösinden zengin amelogenin peptiti ve amelogenini yönlendirmeyi sağlamak için MMP20 kullanımına odaklanılmıştır.

3-Mine yüzeyi remineralizasyonu: Dişler sürdükten sonra mine oluşumunu sağlayan doğal mekanizma durur ve mine kendini yenileyemez. Bu durum diş minesini apatitin mekanik ve kimyasal yüzey özelliklerini değiştiren ya da mine proteini benzeri substratlar kullanılarak diş minesinin yüzeyinde mine benzeri apatit materyali katmanları oluşturan doğal mekanizmaların kullanımına yol açmıştır. Flor kullanımında mine yüzeyinde florapatit (FA) oluşumu veya farklı biyomimetik yaklaşımlarla mine yüzeyinde remineralizasyonun sağlanması buna örnektir. Bu alanda emdogain, lösinden zengin amelogenin, tirozinden zengin amelogenin gibi doğal mine proteinlerine ek olarak kendiliğinden birleşen peptitler (P11-4), 3 asparajin-serin-serin peptit (3NSS), poli amido amin (PAMAM) dendrimerler gibi sentetik peptitler de geliştirilmiştir.

4-Mine hücre kültürü ve mine doku mühendisliği: Kaybedilen mine dokusunun *de novo* (yeniden oluşma) mekanizmasını başlatmak için mine doku mühendisliğinde dokuya özgü hücre popülasyonları, yapı iskeleleri ve indüktif faktörler organize edilir. Geleneksel doku mühendisliği yaklaşımları birkaç organda başarılı olmuştur. Fakat mineyi oluşturan ameloblast hücreleri oldukça özelleşmiş olduğu için ameloblast hücre kültürü elde etmek çok zordur. Ayrıca, mine kristallerinin oluşumu, mine kristallerinin prizmalar halinde düzenlenmesi ve çapraz prizma modellerinin oluşumu, hala keşfedilmeyi bekleyen mekanizmaların rol aldığı özelleşmiş ameloblast hareketlerine bağlıdır. Sonuç olarak, bugüne kadar hücre bazlı in vitro mine doku mühendisliğinde sonuçları başarılı olan bir rapor bulunmamaktadır.

5-Diş morfogenezinin *de novo* indüksiyonuna dayalı mine rejenerasyonu: Dişin yeniden oluşumu rejeneratif tıbbın ulaşılması en güç hedeflerindendir. Diş oluşumu sırasında farklılaşmış bir çok doku ve bu dokuların birbiriyle etkileşimi sonucu oluşan olaylar dizisini taklit etmek için tamamlanması gereken bir çok aşama bulunmaktadır.

Sonuç olarak mine biyomühendisliğindeki ilerleme mine oluşumunda yer alan hücrelerin yüksek düzeyde özelleşmesi ve minenin oldukça gelişmiş doku özellikleri nedeniyle sınırlıdır (14).

2.4.MİNE ÇÜRÜĞÜ

Diş minesinin yüzeyi tükürük ve plak ile yakın temas halindedir ve bu yapılarla dinamik bir denge içindedir. Bu dengenin demineralizasyon lehine kayması minede minerallerin çözünmesi ile sonuçlanacaktır. Çözünme hızı ve miktarı sadece pH'a değil, aynı zamanda çözeltideki Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Demineralizasyon basit bir açıklamayla, $\text{pH} < 5,5$ 'te HAP'in çözülmesidir. En yaygın olarak, mine demineralizasyonu, karyojenik bakterilerin (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* ve *Lactobacilli*) karbonhidrat metabolizmalarının bir ürünü olarak salgıladıkları asitlerden veya asidik gıdaların yenmesinden kaynaklanır. Karyojenik bakterilerin karbonhidratları fermente etmesi sonucu ürettikleri asit pH'ın kritik bir seviyenin altına düşmesine neden olur. Düşen pH ile mine yüzeyinden Ca^{+2} ve PO_4^{-3} mineral kaybı başlar (27,28).

Minede mineral kaybıyla başlayan demineralizasyon ilk interprizmatik alanda gözlenir. Sonuç olarak mine dokusu ile sınırlı beyaz nokta lezyonu olarak da bilinen başlangıç çürükleri oluşur. Başlangıç çürüklerinin yüzeyi sert ve remineralize olmasına rağmen, yüzey altı bölgede demineralize alanlar bulunmaktadır. Bu nedenle mine opak görünmeye başlar ve translusentliğini kaybeder. Başlangıç çürükleri hava ile kurutulduğunda beyaz, opak, tebeşirimsi şekilde izlenir. Bu görüntüsü sağlam mineden farklı kırılma indeksinin ve buna bağlı optik özelliklerinin değişmesine dayanır (29-31).

Başlangıç çürükleri ilk haftada klinik olarak gözlemlenemezken, ikinci haftada dişlerin hava ile kurutulmasıyla beyaz, opak noktalar şeklinde izlenir. Mine yüzeyi ıslandığında demineralizasyon alanları su ile dolarak saydamlaşır ve klinik olarak tespit edilemez. Bu seviyede olay sadece mine ile sınırlıdır. Mine yüzeyinde herhangi bir kaviteye rastlanmaz, ancak etrafındaki sağlam dokulara göre ışık kırılma direnci azalmıştır. Demineralizasyonu önleyici herhangi bir tedbir alınmadığı durumlarda ise üçüncü ve dördüncü haftalarda lezyonun derinlere doğru ilerlemesiyle ıslak mine

yüzeyinde klinik olarak net bir biçimde görülebilen beyaz nokta lezyonlarına rastlanır. Demineralizasyonun ilerlemesi ile minede mine-dentin birleşimine ulaşmış kavitasyonlar görülebilir. Bu seviyede ise remineralizasyon ile tedaviden söz edilememektedir (32).

Mine çürükleri lezyonun yüzeyinden en derin bölgesine doğru dört tabakadan oluşur.

1. **Yüzeyel tabaka:** Bu tabakanın yüzey sertliği sağlam mine yüzey sertliğine benzerlik gösterir. Yüzeyel mine tabakasında minerallerin geçişine izin veren difüzyon alanı bulunur. Bu difüzyon alanı sayesinde alt katmanda çözünen Ca^{+2} ve PO_4^{-3} minerallerinin yüzeye taşınması ve oral ortamda bulunan F iyonlarının çökmesi mümkün olmaktadır. Bu nedenle asit ataklarına karşı dirençli, çözünmesi zor bir tabakadır. Mineral kaybı % 5-10 aralığındadır. Ayrıca diğer tabakalara kıyasla en az mineral kaybı bu tabakada gözlenmektedir. Araştırmalar poröz ve mineralce zengin olan yüzeyel tabakanın lezyonu örttüğünü ve morfolojisinin sağlam mine yapısından biraz farklı olduğunu göstermiştir (31,33).
2. **Çürük gövdesi:** Yüzeyel tabakanın altında yer alır. Mineral kaybı yaklaşık % 30-60 aralığındadır. Mikroradyografide radyolüsent görünür. Mine çürüğünün büyük bir kısmını bu tabaka oluşturur (33).
3. **Karanlık tabaka:** Karanlık bölge olarak adlandırılması polarize ışık mikroskopundaki (PLM) görüntüsünden kaynaklanır. Yapısında çok sayıda mikropor bulundurur. Toplam por hacmi % 2-4 arasındadır. Yaklaşık % 6 oranında mineral kaybı gösterir. Lezyon gövdesine göre daha az demineralizasyon, translusent tabakaya göre daha fazla demineralizasyon gözlenir. Daimi diş mine lezyonlarının % 95'inde, süt dişlerinin % 85'inde gözlenmiştir (33).
4. **Translusent tabaka:** Çürük mineyi sağlam mineden ayırır. Mine çürüğünün en derin tabakasıdır. Normal mineden 10 kat daha fazla pöröz yapıdadır. Geniş porlar ve mikroporlara rastlanır. Mineral kaybı yaklaşık %5-10 aralığındadır (33).

Başlangıç çürüklerinin remineralizasyon ajanları ile durdurulabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (34-37). Mine F , Ca^{+2} , PO_4^{-3} gibi iyonları yapısına katabilecek özellikte olmasından dolayı remineralizasyon kapasitesi olan bir dokudur. Diş demineralizasyonunun neden olduğu problemlerin klinik yönetiminin, restoratif bir yaklaşım uygulamadan önce diş remineralizasyonu ile yapılması önerilmiştir. Diş remineralizasyonu süreci, uzun yıllar süren araştırmalar boyunca incelenmiştir. Yapılan incelemelerin sonucunda mine remineralizasyonunu teşvik edebilen veya mine demineralizasyonunu azaltabilen, böylece potansiyel ağız sağlığına katkıda bulunan teknolojilerin geliştirilmesi sağlanmıştır (28).

Çocuklarda erken yaşta görülen çürükler ağrıya, diş apsesine, yeme güçlüğüne, yaşa göre ağırlık ve vücut kitle indeksinin azalmasına, diş ağrısı nedeniyle uyku problemlerine, okul performansının aksamaması, okula gidememe, yaşam kalitesinin düşmesine neden olur (28). Bu olumsuzlukların oluşmaması, çürük lezyonların şiddetinin artmaması için koruyucu diş hekimliği uygulamaları oldukça önemlidir. Çocuk diş hekimliğinin en önemli hedeflerinden biri çürük lezyonu hiç oluşmadan veya durdurulmasının mümkün olduğu başlangıç lezyonu aşamasındayken gerekli önlemlerin alınmasıdır.

2.5. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN YÖNTEMLER

Çürük oluşumunu önlemede ilk yapılması gerekenler hastanın diyet alışkanlıklarının düzeltilmesi, gerek mekanik gerekse kimyasal plak kontrolü ile oral hijyeninin sağlanması olmalıdır. Diyetin düzenlenmesi ve plağın uzaklaştırılması, tükürükteki Ca^{+2} ile çürük lezyonların doğal olarak remineralizasyonunu destekler (38).

2.5.1.Oral Hijyen Sağlanması

Oral hijyenin sağlanmasında mekanik plak kontrolü için diş fırçaları, diş ipi, dil temizleyicisi ve ağızdaki yiyecek artıklarını uzaklaştırmak için basınçlı su püskürten cihazlar kullanılmaktadır. Daha az travmatik olması, ara yüz temizleme yeteneğinin daha iyi olması nedeniyle çocuk diş hekimliğinde daha çok yumuşak fırçalar tercih edilir (39). Çürükten korunmada dişler çıkar çıkmaz yumuşak bir fırça ve florlu diş macunu ile fırçalama tavsiye edilir. Diş fırçalama biyofilmi bozar ve bakteri sayısını azaltır (40). Oral hijyenin sağlanmasında florlu diş macunlarının da önemli bir rolü vardır. Her gün florür içeren bir diş macunu ile fırçalama yapılmasının çürüklerin önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (41).

2.5.2.Diyetin Düzenlenmesi

Fermente olabilen karbonhidratlar çürüklerin gelişiminde başroldedir ve içlerinde en karyojenik olanı sükrozdur. Çünkü oral bakterilerin, hücre dışı ve hücre içi polisakkarit sentezinde kullanılır. Sükrozun dental biyofilm tabakasına olumsuz etkileri vardır. Sükroz varlığında, remineralizasyonda anahtar rol oynayan Ca^{+2} , PO_4^{-3} ve F gibi iyonların biyofilmde düşük konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir (42). Sükroz içeren besinlerin sık tüketilmesinin diş çürüğü görülme riskini arttırdığı bildirilmiştir (43).

Çürükten korunmada şekerli gıda, atıştırmalık ve içeceklerin sıklığı azaltılmalıdır. Yatmadan önce atıştırmak, gece boyunca yemek yemek ile erken çocukluk çağı çürükleri arasında güçlü bir ilişki olduğu da daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (40). American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD) tavsiyesine göre 1 yaşından küçük çocuklara meyve suyu verilmemesi, 1 ile 3 yaş arası 120 ml, 4 ile 6 yaşındakiler için 120 ml ile 180 ml arasında meyve suyunun sınırlandırılması gerektiği bildirilmiştir (44). Özellikle uyurken şekerli içecek ve meyve sularının bir şişe veya alıştırma bardağından sık sık yudumlanmasının tehlikeleri ebeveyn ve bakıcılara vurgulanmalıdır.

Dünya genelindeki diyetlerin daha fazla işlenmiş ve şeker yüklü gıdaları içerecek şekilde değişmesi çürüğe yatkınlığı artırmakta ve remineralizasyon ajanı

olarak kullanılan florürün etkinliğini sınırlandırmaktadır. Ayrıca kronik hastalıklarda sürekli kullanılan şeker içerikli ilaçların da çürük riskini artıracak göz önünde bulundurulmalıdır (40).

2.5.3. Antibakteriyel Önlemler

Mekanik temizliğin yetersiz kaldığı aktif çürük lezyonu olan hastalarda, fırçalama yapılamayan durumlarda (immün sistemin baskılandığı durumlar), temizlenmesi zor alanlarda plak kontrolünün sağlanması amacıyla klorheksidin gargara, jel, vernikler kullanılabilir (43).

Klorheksidin gargara, diş hekimliğinde en sık kullanılan gargara. Diş çürüğünün neden olan *S. mutans*'ı ve çoğu bakteriyi hücre duvarlarını bozarak hızla inhibe eder. Supragingival plak kontrolünde etkili bir ajandır. Klorheksidin ağız mukozasına, mikroorganizmaya, pelikula elektrostatik kuvvetlerle bağlanır. *Candida albicans*'lara karşı antifungal etkilidir. Son yapılan çalışmalar klorheksidin sadece bakteriyel proteolitik enzimlerin aktivitesini inhibe etmediği aynı zamanda demineralize dişlerde proteazları inhibe ederek kolajen bozulmasını etkili bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Klorheksidin uzun süreli kullanımı sonucu bir takım yan etkiler oluşur. Bu yan etkiler; dişlerde ve protezlerde renklenme, oral mukozada yanma hissi oluşturmaları, aşırı kullanımla toksisite, tat duyusunun bozulması, oral bakteri florasında değişiklik gibi durumları içermektedir (45-47).

Diğer bir antimikrobiyal ajan olan ozonun da, gram negatif, gram pozitif bakteri, virüs ve mantarlara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (48). Çalışmalarda ozonun antimikrobiyal ve okside edici özellikleri sayesinde, kavite dezenfeksiyonu, çürük tedavisi, diş plağındaki çürük ilişkili mikroorganizmaların seviyelerinin azaltılmasında başarılı olduğu görülmüştür (49,50).

2.5.4. Lazer uygulamaları

Lazerler diş hekimliğinde kanama kontrolü, pulpatomi, pulpa kaplaması (51), rezin polimerizasyonunda (52), dişlerde beyazlatma tedavilerinde (53), insizyon,

frenektomi, gingivektomi (54), çürük tespiti, çürüğün uzaklaştırılması, çürüğün önlenmesi (55,56), kavitenin sterilizasyonu, kök kanallarının sterilizasyonu (57), ağrı kontrolünde ve yara iyileşmesi (58) gibi bir çok alanda kullanılır.

Lazer ışınının minede çürüğü önleme mekanizmasını açıklamak için asit direnci ve demineralizasyona etkisi araştırılmıştır. Lazer ışını mine rodlarında (çubuklarında) erime ve yeniden kristalleştirme oluşturarak mine üzerinde morfolojik değişikliklere neden olur. Böylece yüzeyde daha büyük HAP kristallerinin oluşması ve bu yapının asitlere karşı daha az geçirgen olması sağlanır (59-61). Lazerin aynı zamanda mineralizasyonu hızlandırdığı ve remineralizasyon ajanlarının etkinliğini artırabileceği bir takım çalışmalarda gösterilmiştir (62,63).

2.6. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN REMİNERALİZASYON AJANLARI

2.6.1. Mineral Doygunluğunu Artıran Ajanlar

2.6.1.1. Flor

Flor çürük önleyici stratejilerin temel taşıdır. Florürün çürükleri önlemedeki esas etki mekanizması topikal olup, başlangıç çürük lezyonlarının remineralizasyonunu sağlayıp sağlam diş minesinin demineralizasyonunu azaltmasıdır (64). F minede mineral yapının çözünürlüğünü düşürür. Böylece bakteriyel asitler tarafından mineyi çözmekten korur, remineralizasyon demineralizasyon dengesini olumlu yönde etkiler. Florürün koruyucu etkisi en çok sağlam mine içindir, belirgin çürük lezyonlar için daha az etkilidir (1).

Topikal uygulamada florün etkilerini şu şekilde özetleyebiliriz:

- Anyonik F elementi ve negatif yüklü bakteriler diş yüzeyindeki pozitif yüklü ligantlar için yarışır. F yüksek elektronegatifliğe sahip bir eser element olduğu için bu yarışı kazanır. Böylece proteinlerin ve bakterilerin mine yüzeyinde birikimini, pelikül ve plak oluşumunu engeller.
- Florün *streptococcus mutans*'a direk toksik etkisi olduğu bilinmektedir (46).

- Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının diş yüzeyine çökmesini hızlandırmaktadır (65). Florür, kalsiyum florür (CaF_2) benzeri bir mineralin oluşumuyla diş yüzeyinde birikebilir. Bu çökelti, alttaki minerali sonraki asit tehditlerinden korumaya hizmet eden bir florür rezervuarı görevi görür. Düşük pH'da, CaF_2 benzeri çökeltiden serbest florür salınarak ardından demineralizasyonu baskılar. pH yükseldikçe, serbest florür varlığı artar ve bu olayda mineral oluşumunu yönlendirmeye hizmet eder (27).
- Florür, doğrudan HAP ile reaksiyon yoluyla HAP yapısındaki hidroksil (OH^-) iyonları ile yer değiştirerek FA veya florürlü hidroksiapatit (FHA) oluşturur. Oluşturduğu FA veya FHA asit ataklarına karşı HAP'dan daha dayanıklı olan bir yapıdır (27,66).

Çeşitli topikal florür uygulamaları;

Flor vernik: İlk florür vernikleri, florür ve diş minesi arasındaki temas süresini uzatmak için geliştirildi ve 1960'larda piyasaya sürüldü (Duraphat® %15 sodyum florür cılası). İçeriğindeki aktif F miktarı %2,26 veya 22600 ppm florür iyonuna eşdeğerdi. Florür verniklerin mineye uygulamasından sonra oluşan CaF_2 , uzun süreli bir florür rezervuarı görevi görmektedir. Mevcut rezervuardaki F iyonları tükürük ile etkileşip mine üzerine çöker. 1980'lerde yürütülen bir dizi çalışmanın gösterdiği gibi, CaF_2 , nötr pH'da pelikül proteinleri ve sekonder fosfatlar tarafından stabilize edilir. Plak pH'ı düştüğünde, CaF_2 çözünmeye ve florür iyonlarını salmaya başlar, böylece uygulamadan sonra uzun süreli bir florür kaynağı görevi görür (67).

Altı yaşından küçük çocuklar için önerilen tek profesyonel topikal florür ajanıdır (68). Florür verniklerin uygulanması kolaydır ve iyi tolere edilir. Verniğin uygulanması için gereken süre, mevcut diş sayısına bağlı olarak hasta başına 1 ila 4 dakika arasında değişir ve uygulamadan hemen sonra çocuk ağzını kapatabilir çünkü vernik tükürük ile temas ettiğinde sertleşir ve dişe yapışan bir film oluşturur. Hastaların vernik uygulamasından sonra iki saat yemek yememeleri ve aynı gün dişlerini fırçalamamaları önerilir. Bu olay verniğin diş minesi ile birkaç saat temas halinde kalmasını sağlar (67).

Florür vernikler, uygulamalar durdurulduğunda etkileri giderek kaybolduğu için düzenli olarak tekrar uygulanmalıdır ve çürük aktivitesi olan çocuklar için altı

ayda bir tekrar eden uygulamalar yapılır. AAPD, orta ila yüksek diş çürüğü riski olan çocuklarda diş minesinin demineralizasyonunu önlemek veya tersine çevirmek için florür verniğinin profesyonel kullanımını önerir. Etkinliği, uygulama kolaylığı ve göreceli güvenliği, jeller ve gargaralar gibi diğer topikal florür tedavilerine göre önemli avantajlar sunar. Yılda iki veya daha fazla florür vernik uygulaması, yüksek riskli popülasyonlarda çürük prevalansını azaltmada etkilidir (67).

Flor jel: Florür jeller uygulama kaşıkları ile uygulanır. Uygulama yaklaşık dört dakika sürer ve uygulamadan sonra hastalar en az 30 dakika boyunca herhangi bir şey yememeli ve içmemelidir (67). Kaşık başına önerilen maksimum doz klinikte 5 mililitredir (69). Genellikle 12300 ppm florür (veya %1,23) konsantrasyonundaki asidüle fosfat florür (APF) jelleri profesyonel olarak yılda iki kez 4 dakika süreyle uygulanır (67).

%1,23 lük APF jelinin pH'ı 3-4 aralığındadır (69). APF jelinin remineralizasyon kapasitesi, içerdiği yüksek florür ve malzemenin asidik yapısından kaynaklanmaktadır. APF jelinin düşük pH'ı, uygulamadan hemen sonra yüzey minesinin aşındırılmasına ve yüzey pürüzlülüğünün artmasına neden olabilir. Daha sonra Ca^{+2} tarafından oluşturulan CaF_2 , bu aşınmış dokuyu ve APF çözeltisinden kaynaklanan F'yi kullanarak minenin sertliğinde hızlı bir artışa neden olur (70).

Gümüş diamin florür (GDF): Son zamanlarda çürük kontrolü için daha yüksek florür konsantrasyonlu ürünler piyasaya sürülmüştür. Bu anlamda kullanımı artan GDF, florürün remineralize edici etkisini, gümüşün antimikrobiyal özelliği ile birleştiren ve aktif çürük lezyonlarının stabilize edilmesinde kullanılan bir ajandır (71). Minenin asit direncini önemli ölçüde artırabildiği bildirilmiştir. GDF, hem amonyak hem de gümüş florür içeren renksiz çözeltidir. Amonyak, kimyasal formülü $(\text{Ag}(\text{NH}_3)_2)^+$ çift taraflı reaksiyon yoluyla kompleks ve kararlı bir iyon oluşturarak çözeltideki gümüş florürün (AgF) stabilize edilmesine yardımcı olur (72). En yaygın kullanılan konsantrasyonu 44800 ppm florür içeren % 38 lik GDF 'dir (73). GDF'nin en temel dezavantajı uygulama sonrası çürük lezyonlarını siyaha boyamasıdır. Fakat çürükten korunmak amaçlı sağlam mine yüzeyine uygulandığında dışı boyamadığı bilinmektedir (71). Ollie Yiru ve ark. (73) yaptığı çalışmada

GDF'den gelen gümüşün HAP yapısına katıldığını ispatlamışlardır. Gümüş içeren HAP'ın bakteri adezyonunu ve karyojenik biyofilm oluşumunu engellediği literatürde geçmektedir (74).

Kalay florid: Diş çürüğü tedavisinde ilgi duyulan F ile metal bileşiklerinin bir başka örneği, biyofilm oluşumuna müdahale eden ve aynı zamanda demineralizasyon/remineralizasyon sürecini etkileme potansiyeline sahip olan kalay floriddir (SnF_2). Çok sayıda laboratuvar çalışması, kalay iyonlarının antimikrobiyal özelliklerini göstermiştir. Son laboratuvar verileri, mevcut SnF_2 formülasyonlarının karyojenitesi yüksek ağız ortamında, mine demineralizasyonunu önleyerek, üstün bir çürük önleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (75).

2.6.1.2.CPP-ACP

Kazein sütte yüksek miktarda bulunan, süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturan bir fosfoproteindir. Seçici çökelme yöntemi kullanılarak sütteki kazeinin tripsin enzimi ile parçalanıp kazein fosfopeptid (CPP) elde edilir. CPP molekülleri fosfoseril içerir ve fosfoseril amorf kalsiyum fosfatı (ACP) nötral ve alkali koşullarda stabilize eder (76).

CPP-ACP farklı mekanizmalarla çürük önleyici etkinlik göstermektedir. Dental plağın yapısına katılarak plaktaki kalsiyum, fosfat iyon miktarını artırır. Ayrıca plakta bulunan CPP-ACP serbest PO_4^{3-} ve Ca^{+2} bağlayarak, diş yüzeyini aşırı doymuş hale getirmekte ve böylece demineralizasyonu önleyip remineralizasyonu arttırmaktadır. Caruana PC ve ark.'nın (77) yaptıkları bir çalışmada CPP-ACP'nin plakta pH değişikliklerini etkileyebileceği gösterilmiştir. CPP-ACP plakta bakteriyel hücrelerinin yüzeylerine bağlanarak, çürük yapıcı bakterilerin diş üzerinde kolonize olmalarını engeller (78).

CPP-ACP'nin florüre ilavesinin florürün çürüğü önlemedeki etkisini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca CPP-ACP'nin floridle birlikte kullanılması florid kullanım oranını azaltır ve bu da florozis görülme sıklığının düşmesini sağlayabilir (79).

CPP-ACP diş hekimliğinde erken çocukluk çağı çürüklerinin tedavisinde ve travmatik restoratif tedavide (80), erozyonun önlenmesinde (81), diş hassasiyet

tedavisinde, hipomineralizasyonlu dişlerin tedavisinde (82), başlangıç lezyonlarının tedavisinde (83), beyazlatma tedavileri sonrasında (84), ortodontik tedavi gören hastaların braketlerinin çevresinde oluşmuş lezyonların remineralizasyonun sağlanmasında (85) kullanım alanlarına sahiptir.

2.6.1.3. Biyoaktif Cam

Biyoaktif cam, esas olarak kalsiyum, sodyum, fosfat ve silikattan oluşan bir biyoaktif malzeme sınıfıdır. Vücut sıvılarına maruz kaldıklarında aktifleşerek ortamda kalsiyum fosfat biriktirirler. Tükürük gibi sıvı ortamlarda biyoaktif cam partiküllerindeki sodyum iyonları (Na^+) hidrojen iyonları (H^+) ile yer değiştirir ve ardından çözeltinin pH'sı yükselir. Bu iyon değişimi, partikül yapısından Ca^{+2} ve PO_4^{-3} 'ün salınmasına izin vererek silanol (Si-OH) oluşumuna ve biyoaktif cam yüzeyinde silika açısından zengin bir tabakanın oluşmasına yol açar. Çözeltideki Ca^{+2} ve PO_4^{-3} konsantrasyonunun ve pH değerinin artması, silikadan zengin bu tabaka aracılığıyla biyocam yüzeyine Ca^{+2} ve PO_4^{-3} çökmesini kolaylaştırır (27).

Biyoaktif camın bir diğer etki mekanizması da dokuların yenilenmesi ve işlevlerinin yeniden yapılandırılmasını başlatacak hücre sinyallerini etkilemektir. Bu etki sayesinde in vivo olarak meydana gelen doğal mineralizasyon mekanizmalarını taklit eden bir biyomimetik mineralize edici olarak rol oynar (46).

Biyoaktif camın dentin tübüllerini tıkadığı gösterilmiştir (86). Dental mine demineralizasyon ve remineralizasyon uygulamalarında kullanılan biyoaktif camın potansiyeli hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (27). Burwell (87), in vitro mine başlangıç lezyonlarının onarımında biyoaktif camın etkisini araştırmıştır. Sonuçlar, biocamın 5000 ppm F ile kombinasyonunun, 10 gün sonra önemli ölçüde 5000 ppm F dan daha fazla remineralizasyon sağladığını göstermiştir.

2.6.1.4. İşlevselleştirilmiş β -Tri-Kalsiyum Fosfat (f-TCP)

fTCP, β trikalsiyum fosfatın (β -TCP) karboksilik asitler ve yüzey aktif maddeler gibi organik ve inorganik yapılarının birleştirilmesi yoluyla elde edilen materyaldir. β -TCP'nin organik ve inorganik moleküllerle işlevselleştirilmesinin

amacı iki yönlüdür: Birincisi, erken florür-kalsiyum etkileşimlerini önleyen bariyerler oluşturur. İkincisi, dişlere ulaşması hedeflenen kalsiyum-fosfat iletiminde düşük dozlu etkili bir dağıtım sistemi görevi görmesidir. Laboratuvar ve klinik çalışmalar, florür ve fTCP kombinasyonunun florür, β -TCP veya tek başına fTCP'ye göre daha güçlü, aside daha dirençli mineral ürettiğini göstermiştir. Florürün fTCP ile kombine edilmesinin remineralizasyon için umut verici bir yaklaşım olduğu görülmektedir (88,89).

2.6.2.Doğal Ürünler

2.6.2.1. Kitosan

Kitosan kabukluların, böceklerin ve mantarların hücre duvarının dış iskeletinin ana bileşenini oluşturan doğal bir polimer olan kitinin N-deasetilasyonu ile elde edilir. Biyoyumlu bir materyaldir, biyolojik yüzeylere yapışma eğilimindedir. Ayrıca gram-negatif, gram-pozitif bakteri ve mantarlara karşı geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etki gösterir (90). Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi pH derecesine bağlıdır, düşük pH değerlerinde kuvvetli antimikrobiyal aktivite gösterir. Memeli hücrelerine toksik özelliği olmayan biyoyumlu bir maddedir (91). Tarsi ve ark.'nın (92) yaptıkları bir çalışmada kitosanın *S.mutans* adezyonunu % 47 - % 66 arasında bir oran ile azalttığı gösterilmiştir.

2.6.2.2.Galla Chinensis

Galla chinensis geleneksel bir Çin ilacıdır ve *Rhus chinensis* mill'in yapraklarının çin sumak biti tarafından parazitlenmesi sonucu ortaya çıkar. *Galla chinensis* antibakteriyel, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik, hepatokoruyucu, anti-trombin, anti-enflamatuar ve anti-tümör aktivitesi sergiler ayrıca çözünmeyen bileşikler oluşturmak için çeşitli metalik iyonlar, glikozitler veya alkolsüz maddeler ile birleştiklerinden detoksifikasyon özelliklerine sahiptir (46,93).

Diş hekimliğinde kullanımı ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmış, mine ve dentinde çeşitli mekanizmalarla demineralizasyonu önleyebileceği düşünülmüştür. *Galla Chinensis* antibakteriyel etkinliği sayesinde *S. mutans* büyümesini inhibe eder

ve çürük önleyici ajan olarak etkinlik gösterir. *Galla Chinensis*'in organik matris ile etkileşime girdiği, asit atakları altında bile matrisin ayrışmasını engellediği ve kolajen bozulmasını önlediği gösterilmiştir (46). Chu ve ark.'ı (94) *Galla chinensis*'in yapay çürük lezyonu üzerinde remineralizasyon sağladığını göstermişlerdir.

2.6.3. Biyofilm Modifiye Ediciler

Bu tedaviler, çürük lezyonları etrafındaki dental biyofilmin miktarını, bileşimini ve metabolik aktivitesini etkileyerek F'nin remineralize edici etkisini arttırmak için tasarlanmıştır.

2.6.3.1. Ksilitol

Ksilitol, tatlandırıcı olarak kullanılan beş karbonlu bir şeker alkolüdür. Ksilitol plak ve tükürükte bulunan *S. mutans* seviyelerini metabolizmalarını bozarak azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların diş yüzeylerine adezyonunu engeller ve asit üretim potansiyellerini de düşürür. Ksilitol sakız ya da pastil olarak kullanıldığında tükürük akışını artırır. Sialojenik etki göstererek ağız kuruluğu olan hastalara fayda sağlar (95).

Hem antibakteriyel etkinliği hem de lezzeti artırması nedeniyle birçok ilaç ve diş ürününde bulunur. Ksilitol en sıklıkla sakızlarda kullanılmakla beraber, çiğnenebilir veya çözünür tabletlerde, şuruplarda, nane şekerlerinde, diş macunlarında, gargaralarda ve mendillerde de kullanılmaktadır. AAPD, orta ve yüksek çürük riski olan kişilerde, karyojenik patojenlerin uzun süreli baskılanmasını ve çürük gelişiminin azaltılmasını amaçlayan önleyici bir stratejinin parçası olarak ksilitol kullanımını önermektedir (96-98).

2.6.3.2. Arjinin

Arjinin, diş macunu ve diğer florür içeren diş bakım ürünlerine kullanılan katkı maddesi olarak gündeme gelmiştir. Başlangıçta diş hassasiyetinin tedavisi için pazarlanan arjinin, günümüzde çürümeyi önleyici bir madde olarak tanıtılmaktadır. Arjinin, çeşitli gıda ürünlerinde ve tükürükte doğal olarak bulunan bir amino asittir. Amonyak benzeri maddeler üreten bakteriler tarafından

metabolize edilir ve bu da oral biyofilmde pH artışına neden olur. Böylece, aside dirençli bakterilerin büyümesine yardımcı olan asidik ortamı etkisiz hale getirir (99). % 1,5 arjinin, kalsiyum karbonat ve florür içeren diş macunu kullanımına ilişkin 200 ila 6000 katılımcı arasında değişen çeşitli klinik çalışmalarda, florürlü diş macununa kıyasla 2 yıl sonra çürük lezyonlarında, benzer şekilde, %20'lik azalma tespit edilmiştir (47,100).

2.7. MİNE ÇÜRÜĞÜ OLUŞUMUNU ÖNLEMeye YÖNELİK UYGULANAN BİYOMİMETİK AJANLAR

Doku mühendisliğindeki ilerlemeler, mine mikroyapısını yenilemek için güçlü bir potansiyel sergileyen biyomimetik yöntemleri ortaya çıkarmıştır. Biyomimetik yöntemler mine oluşumunun doğal sürecini taklit edip, diş dokularının biyolojik olarak benzer dokularla değiştirilmesini, onarıcı tedavilerden rejeneratif biyomineralizasyon tedavilerine geçişi sağlar. Matür mine aselüler olduğundan, dentinden farklı olarak kendini rezorbe etmediği veya yenilenmeyi sağlamada remodel oluşturulamadığı için mine rejenerasyonu gerçekleşmesi güç bir olaydır. Florür içeren ağız bakım ürünleri, minenin remineralizasyonunda etkilidir ancak organize apatit kristallerinin oluşumunu teşvik etme potansiyeline sahip değildir (4,101). Bu yüzden mine remineralizasyonunda yeni bir anlayış sunan biyomimetik ajanlar gündeme gelmiştir.

2.7.1.Amelogenin

Amelogeninden zengin mine organik matriksi, mine mineralizasyonu sırasında HAP kristallerinin büyümesini, şeklini ve düzenlenmesini sağlar. Bununla birlikte, matür mine, matriks proteinlerinden yoksundur ve diş çürüğü veya erozyonun neden olduğu mineral kaybını yeniden oluşturamaz. Amelogeninin in vitro olarak apatit çekirdeklenmesini desteklediği görülürken, benzer biyomineralizasyonun in vivo gerçekleştiğine dair doğrudan bir kanıt yoktur. Amelogenin elde edilmesi, depolanması zor, maliyetli, remineralizasyon sağlaması için zaman gerektirmesi gibi dezavantajlar barındırır. Bu dezavantajlar klinik açıdan kullanımda zorluk teşkil eder. Bu yüzden amelogenini temel alan, sentetik ve ona benzer bir işleve sahip biyoyumlu

çeşitli alternatifler üretilmiştir. Bunlardan biri olan rekombinant domuz amelogeninin (rP172) kalsiyum fosfat kümelerini stabilize ettiği ve asit kaynaklı oluşmuş lezyonlar üzerinde mine kristallerinin büyümesini desteklediği, bu sayede minenin sertliğini ve elastik modülünü önemli ölçüde iyileştirdiği bulunmuştur.

HAP kristallerinin yeniden büyümesi, aynı zamanda yeni oluşturulan katman ile doğal mine arasında sağlam bir arayüz oluşturmuştur (4,46). Bir diğer alternatif Amelogenin peptitidir. Lösin bakımından zengindir ve 56 aminoasitten oluşur. Amelogeninin N- ve C-terminal alanlarını içerir, bu alanların mineral büyümesinin ve bağlanmasının yönlendirilmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. N-Amelogenin hidroksiapatit büyümesinde rol alırken, C-Amelogenin fragmanı kristallerin paralel hizalanmasına aracılık eder (4,102).

Amelogeninden türetilen küçük peptitlerin de in vitro olarak insan minesinde mineral tabakası oluşturmak için kullanılabileceği gösterilmiştir. Yeni oluşan mine tabakası alttaki mine tabakasıyla bütünlük sergilemiştir (5). Amelogenin türevi bir peptit olan ADP5 (Amelogenin derived peptide 5) 22 aminoasit uzunluğundadır. Demineralize insan kök dentininde hücresiz ve hızlı mineral tabakası oluşumunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (103). ADP5, amelogeninin apatit oluşumunda rol oynayan iyonlarını yakalama, mineral sentezleme ve yüzey morfolojisini kontrol etme gibi benzersiz özelliklerini sergiler.

2.7.2. Poly Amido Amin (PAMAM) Dendrimerler

Amelogeninden ilham alan diş minesinin biyomineralizasyonunu sağlamada organik matriks fonksiyonlarını taklit edebilen sentetik proteinlerdir. Sentetik olması, doğal proteinin elde edilmesi, saflaştırılması ve depolanması ile ilgili zorlukların aşılmasını sağlamıştır. PAMAM dendrimerler ile ilgili sadece hayvan deneyleriyle sınırlı olan in vivo çalışmalar ve in vitro çalışmalar vardır (104,105). Bu yüzden klinik uygulamadan uzaktırlar. Ayrıca, amelogenin gibi, PAMAM aracılı mine remineralizasyonu da zaman alıcı bir süreçtir ve bu durum çözülmediği sürece klinik uygulamaları pratik gözükmemektedir. Son zamanlarda, biyomineralizasyon sürecini hızlandırmak ve tam olarak kristal büyümesini sağlamak için lazerlerin kullanılabileceğine dair öneriler olmuştur (4,106).

2.7.3.Dentin Fosfoprotein Türevi 8DSS Peptitler (8 tekrarlı aspartat-serin-serin dizisi)

Dentin fosfoproteini (DPP), dentinde en bol bulunan kollajen olmayan ekstraselüler matriks bileşenidir. HAP oluşumunu desteklediğine inanılan çok sayıda tekrarlayan aspartat-serin-serin nükleotit dizisi içerir. DPP'nin kalsiyum fosfat çözeltilerinde HAP kristalleri oluşturabildiğini gösteren çalışmalar vardır (107,108). DPP'den türetilen kısa fonksiyonel peptitler de vardır. Bu kısa fonksiyonel peptitler tam uzunluktaki DPP'ye göre daha yüksek saflık ve mineye daha iyi yapısal uyum gibi bir dizi avantajlar sunar. DPP'den türetilen peptitler arasında, aspartat serin-serin (8DSS) sekizli tekrarları, biyomineralizasyonu teşvik etmede en aktif olanlardır. 8DSS peptitleri esas olarak iki mineral bağlama yüzeyine sahiptir ve sadece serbest Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarına değil, aynı zamanda HAP yüzeyine de güçlü bir şekilde bağlanabilir (109).

Bu peptitlerin mineye uygulanması Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının çevredeki ortama çözünmesini engelleyebilir ve bu iyonların çözülden yakalanmasını teşvik edebilir. 8DSS peptitleri bu nedenle biyolojik olarak yönlendirilmiş mineral birikimine aracılık etmede ikili bir mekanizmaya sahip gibi görünmektedir. Birincisi, demineralize dentinden Ca^{+2} ve PO_4^{-3} iyonlarının çözünmesini sınırlar. İkincisi, demineralize mine üzerinde yeni mineral birikintileri oluşturmak için bu iyonların yakalanmasını teşvik ederler. Yeni mineral yapı, azaltılmış yüzey pürüzlülüğü ve daha yüksek sertlik ve elastik modül gibi önemli ölçüde geliştirilmiş özelliklere sahip küçük apatit kristallerinin düzgün bir şekilde birikmesinden oluşur (4).

2.7.4. Nano HAP

Sentetik nanohidroksiapatit (nHAP), mine içindeki apatit kristaline benzer morfoloji, yapı ve kristalliğe sahip en biyoyumlu ve biyoaktif malzemelerden biri olarak kabul edilir. Nano boyutlu parçacıklar mine yüzeylerine, plak ve bakterilere güçlü bir şekilde bağlanabilir. nHAP'i oluşturan parçacıkların küçük boyutu, bağlanma için yüzey alanını önemli ölçüde artırır ve mine yüzeyindeki defektleri onarır (4).

nHAP kullanımı mine remineralizasyon potansiyelleri açısından yakın zamanda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Elde edilen in vitro verilere göre, mevcut remineralizasyonun başlangıç mine çürüğünün daha derin kısmında değil yalnızca dış yüzey bölgesinde görülebildiği sonucuna varılmıştır. nHAP'ın asidik çözeltiler altında mine yüzeyinde birikip, yüzeyden mineral kaybını önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (110). Ayrıca homojen bir apatit yüzey tabakası oluşturduğu görülmüştür (111).

2.7.5. Elektrikle Hızlandırılmış ve Geliştirilmiş Remineralizasyon

Elektriksel olarak hızlandırılmış ve güçlendirilmiş remineralizasyon tedavisinin amacı, tüm sağlıklı dokuyu korumak ve tedavi edilen minenin mekanik özelliklerini iyileştirmektir. Bu yöntem başlangıç ve orta dereceli mine lezyonları için geliştirilmiş bir remineralizasyon teknolojisidir. Yüzeyaltı çürük lezyonunun en derin kısmına remineralize edici iyonların akışını hızlandırmak için iyontoforez kullanır. İyontoforezin amacı lezyonun remineralizasyonunu desteklemek ve daha sonra onarılan lezyona optimal sertlik ve mineral yoğunluğunu sağlamak için ortam yaratmaktır. Elektriksel hızlandırılmış ve gelişmiş remineralizasyon ile tedavi edilen lezyonlar, taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesinde sağlıklı diş minesine çok benzer bir görünüme sahiptir. Bu teknolojiyi kullanan in vitro çalışmaların sonuçları umut vericidir fakat kapsamlı değerlendirilmesi için in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır (4,46).

2.7.6.P11-4

P11-4 11 aminoasitten oluşan yan gruplarında negatif yüklü uçlar barındıran sentetik monomerik bir peptittir (4,112). Tükürükten gelen veya tedaviler tarafından sağlanan mineraller, çökmek ve remineralizasyon oluşturmak için çekirdeklenme bölgelerine ihtiyaç duyarlar. P11-4, başlangıç çürük lezyonunun alt tabakasına iyi bir şekilde yayılır (6,112). Bu özelliği sayesinde lezyon gövdesinde çekirdeklenmeyi destekler (mineralizasyon oluşumunu başlatır) ve 3 boyutlu bir matriks görevi görür. Böylece daha hızlı hidroksiapatit oluşturup, başlangıç çürük lezyonun alt tabasında

mikrosertlik artışı sağladığı, burada fibriller yapı iskelelerine kendiliğinden bağlanabildiği gösterilmiştir (1,112,113).

Literatürde P11-4 matriksinin Ca^{+2} 'a yüksek afiniteye sahip olduğunu ve hidroksiapatit oluşumu için çekirdek görevi gördüğünü söyleyen birçok çalışma mevcuttur (112,114-116). Böylece vücudun tükürükle sağladığı doğal remineralizasyonu geliştirir.

P11-4 etkinliği, tükürük tarafından yönlendirilen doğal remineralizasyona dayandığı için kişinin tükürük kalitesine, salgılanan tükürüğün mineral içeriğine, pH'ına ve akış hızına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu durum, ağız kuruluğu olan hastalarda etkinliğini azaltabilir (4).

Üstün ve ark'nın (117) yapay çürük lezyonu oluşturularak yaptıkları bir in vitro çalışmada P11-4 peptit, CPP-ACFP ve NaF'ün remineralize edici etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın verileri, P11-4'ün en iyi remineralizasyon etkinliği gösterdiğini ve bunu sırasıyla CPP-ACFP ve sodyumflorürün (NaF) izlediğini göstermiştir. Alkilzy ve ark (1) yaptıkları bir çalışmada P11-4 tedavisinin insan kullanımı için güvenli olduğunu göstermişlerdir. Bu tek kör 6 aylık çalışmanın sonuçları, F verniği (22,600 ppm F) ile kombinasyon halinde P11-4'ün, erken çürük lezyonlarının remineralizasyonunu teşvik etmede tek başına altın standart olarak kabul edilen F verniğinden daha üstün olduğunu göstermektedir. Bunun yanında P11-4'ün, florürün remineralize etme gücüne direnç gösteren çürük lezyonları remineralize etmede başarılı olduğu yapılan bazı çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (118,119).

2.7.7.MPP3 (Mineralizasyonu indükleyici (promoting) peptit 3)

Mineralizan peptitler, çürük remineralizasyonu ve osteointegrasyon gibi dental ve ortopedik uygulamalar için özel bir öneme sahiptir. FDA tarafından onaylanmış olan ve ortopedik uygulamalarda kullanıma giren kemik morfogenetik protein 7 (bone morphogenetic protein-BMP-7) gibi büyük proteinlerin aksine maliyetleri ve toksisite oluşturma riskleri çok daha düşüktür (120). Son zamanlarda 'zıt yüklü aminoasit çifti' motiflerinin, katyon bağlama, inorganik yüzeye bağlanma

gibi işlevlerinin olduğu ve biyomineralize edici proteinlerde bol miktarda bulunup biyomineralizasyon olaylarında anahtar rol oynayabileceği bildirilmiştir. Mineralizasyon kinetiği peptit yapısında artan zıt yüklü aminoasitlerin sayısı ile orantılı artış gösterir.

MPP3 Güngörmüş ve ark. (9) tarafından tasarlanmış aralarında alanin kalıntıları bulunan 4 zıt yüklü aminoasit çifti içeren, 14 aminoasit uzunluğunda ve kararsız yapıda sentetik bir peptittir. Belirli bir aminoasit dizisine sahip olan MPP3'ün aminoasit dizisi ve diğer fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. MPP3 amelogenin ve amelogenin türevi peptitler model alınarak bu peptitlerde en fazla mineralizasyon özelliği gösteren alanlar optimize edilip *de novo* olarak sentezlenmiştir. Kalsiyum fosfat mineralizasyon hızını yaklaşık 13 kat artırdığı gösterilmiştir. Güngörmüş ve ark.'ı MPP3'ün sitotoksikite, sensitizasyon veya irritasyona neden olmadığını akredite laboratuvar çalışmaları sonucu göstermişlerdir (103). Bu nedenle remineralizasyon tedavileri için potansiyel vadeden bir ajan olarak değerlendirilmiştir. Zıt yüklü aminoasitlere sahip peptitlerin kalsiyum fosfat remineralizasyonunun araştırıldığı çalışmada görülmüştür ki MPP3, plaka benzeri partiküllerden ziyade mineralizasyon kinetiğinde ve iğne benzeri HAP parçacıkları oluşumunda önemli bir artışa neden olmuştur. Bitişik zıt yüklü aminoasitlerin iyonlar üzerinde bir çekim oluşturarak HAP çekirdeklenmesi sağladığı öne sürülmektedir.

Çizelge 2.1. MPP3'ün fizikokimyasal özellikleri

Amino asit dizisi	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlığı	pI	GRAVY	Yük
PGKADRAEKADRA	14	1513,63	6,63	-1,829	0 (+4, -4)

(**pI**: izoelektrik nokta, **GRAVY**: Ortalama hidrofobisite, **mavi**: negatif yük, **kırmızı**: pozitif yük) (**P**: Prolin, **G**: Glisin, **E**: Glutamik asit, **K**: Lizin, **A**: Alanin, **D**: Aspartik asit, **R**: Arjinin)

Süt dişlerindeki yapay çürüklere F vernik ile uygulanan MPP3'ün remineralizasyon üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada, MPP3'ün F verniğin etkileri üzerinde avantajlar sağladığı görülmüştür. MPP3 tek başına kullanıldığında, florür ve biyoaktif partiküller içeren ticari bir vernik ile

karşılaştırılabilir performans göstermiştir. Yapılan çalışmada ticari F vernik uygulanan gruba kıyasla daha iyi performans sergilemiştir (8).

2.8.ANALİZLER

2.8.1.Mikrosertlik Analizi

Yüzey mikrosertlik analizi, minede meydana gelen demineralizasyon ve remineralizasyon değişikliklerini değerlendirmek için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Aynı numunenin belirli bir süre boyunca tekrarlanan ölçümlerine izin vererek, deneysel varyasyonunu azaltır. Mikrosertlik analizi mineral değişikliklerini tahmin etmek için uygun bir yöntemdir (101).

Mikrosertlik, sırasıyla eşkenar dörtgen ve tetra-piramidal olan bir Knoop veya bir Vickers elmas uç ile ölçülür. Mikrosertlik testi elmas ucun numune yüzeyine uygulanması sonucu yüzeyin gösterdiği direncin ölçülmesi ile yapılmaktadır. Mine sertliğinin en doğru şekilde değerlendirilmesi için düzleştirilmiş cilalı yüzeyler gereklidir ve test yüzeyi elmas ucun uzun eksenine dik olarak yerleştirilmelidir. Işık mikroskobu altında test edilecek yüzeye belirli bir süre belirli bir kuvvet uygulanarak bir iz oluşturulur. Knoop ya da Vickers ucun oluşturduğu izin köşegenleri ölçülür ve sertlik değeri μm birimiyle ifade edilir. Knoop elmas ucu, sağlam mineye yaklaşık 1,5 μm nüfuz ederken, Vickers'ınki sırasıyla 50 ve 200 gr'lık olağan yükler göz önüne alındığında yaklaşık 5 μm 'ye kadar nüfuz ettiği gözlenmektedir. Knoop uç tepe açısı 172° iken, Vickers uç tepe açısı 136° dir (121-123).

2.8.2.Mikro Bilgisayarlı Tomografi

Mikro bilgisayarlı tomografi (Micro-CT) X ışını kaynağına sahip mikro odaklı bir tomografi yöntemidir (72). Mikro odaklı X ışını in vitro olarak daha küçük numunelerde daha yüksek çözünürlük sağlar (124). Micro-CT cihazları biyomedikal alanda özellikle kemik olmak üzere sert dokuların incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (72). Diş Hekimliği alanında ise diş sert dokularında meydana gelen süreçleri araştırmak için kullanımı son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. Klinik olarak kullanılamasa da, özellikle endodontide kök kanalının

şekillendirilmesi, kök kanal morfolojisi, kök kanal dolgusunun değerlendirilmesinde kullanılır. Ayrıca diş hekimliği pratiğinde restorasyonların marjinal uyumu, dişlerin mineral konsantrasyonu, dental implantların değerlendirilmesi, mine kalınlığının ölçülmesi gibi alanlarda klinik çalışmaları destekleyen laboratuvar bulguları sağlar (125-127).

Micro-CT diş gibi kalsifiye dokuların mineral yoğunluğunun doğru bir şekilde değerlendirilmesinde önemli bilgiler sağlar. Üreticiler tarafından sunulan ve mineral yoğunluğu bilinen hidroksiapatit-rezin fantomların mineral yoğunluğu ölçülerek cihazın kalibrasyonu sağlanır. Literatürde micro-CT'nin deksüktiv olmayan özelliklerini kullanarak, bir diş minesinde demineralizasyon sonrası ne kadar mineral kaybedildiği ve remineralizasyondan sonra ne kadar mineral kazanıldığı nicel olarak gösterilmiştir (128). Mineral yoğunluğunun yanı sıra mine kalınlığı, yüzey alan ve hacim hesaplanmasında, dişlerde histolojik yapıların değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (129,130).

Micro-CT numunelere zarar vermediği için aynı numunelerin çeşitli biyolojik ve mekanik testler için kullanılmasına izin verir. Elde edilen görüntüler saklanabilir ve farklı zamanlarda yeniden değerlendirilebilir (131,132). Ayrıca Micro-CT taramanın kesit kalınlığının sabit olması, fiziksel kesimden kaynaklanan düzensizliklerin önüne geçer. Mikro-CT çok hassas bir in vitro tekniktir (128).

Micro-CT'de tarayıcı hazırlanan objenin etrafında belirli bir dar açıyla döner (133). Elde edilen veriler CCD kamera ile bilgisayara transfer edilir. Özel yazılımlarla çok sayıda 2 boyutlu kesitler yeniden yapılandırılır ve 3 boyutlu görüntüler elde edilir (126).

Micro-CT'nin, konik ışınlı bilgisayarlı tomografi ile bazı prensipleri aynıdır. Konik ışınlı bilgisayarlı tomografi voksel boyutu 76 µm ila 400 µm arasında değişirken micro-CT voksel boyutu genellikle 10 µm'den daha küçüktür. Çözünürlük, voksel ile ifade edilir. Micro-CT konik ışınlı bilgisayarlı tomografiden çok daha yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlar. Yüksek çözünürlüklü görüntü elde etme, uzun tarama sürelerine ve büyük dosya boyutlarına yol açar. Bu da, araştırma zamanını artırır ve cihazlarda depolama için geniş bellek alanı gerektirir (131,133).

2.8.3. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS)

Taramalı elektron mikroskopları, 20–130000X büyötmeye ulaşmamızı, detaylı ayrıntılarla topografik görüntülerin analizini yapmamızı sağlar. Görüntüler numune yüzeyine odaklanmış yüksek enerjili elektronların gönderilmesiyle oluşturulur. Elektronlar, pozitif yüklü dedektörler kullanılarak tespit edilir (134). FESEM, yapıların 3 boyutlu görüntülenmesine ve topografik olarak görselleştirilmesine izin verir. Farklı remineralize edici ajanlar tarafından indüklenen mine yüzeylerinde detaylı morfolojik değişikliklerini göstermeye yardımcı olan bir araçtır (101). Numunelerin başarılı bir şekilde incelenmesi için hazırlama ve görüntüleme teknikleri dikkatle yapılmalıdır. Numunelerin dehidrasyonuna dikkat edilmesi, büzülmeyi en aza indirmek için esastır. FESEM'lerin rutin çalışması için gerekli olan yüksek vakumlu ortamda kaplanmaları gereklidir (135). Uygun kalınlıkta Altın ve Palladyum ile kaplanır.

Enerji Dağılım Spektroskopi Analizi, numunelerin incelenen yüzeyinde bulunan elementlerin analizini yapan bir yöntemdir. İncelenmek istenen örneğin üzerine elektron demeti gönderilmesi ve gönderilen elektron demeti ile örnek yüzey etkileşimi sonucu ortaya çıkan X ışınlarının ölçümü ile EDS analizi yapılır. Yüzeyden saçılan ikincil elektronlar ise örnek yüzey morfolojisi hakkında bilgi vermektedir (136,137).

2.8.4.Polarize Işık Mikroskobu Analizi

Polarize ışık mikroskobu analizi, sert dokulardaki değişiklikleri göstermek için çok hassas bir tekniktir. Polarize ışınların yansıtıldığı yüzeyde kırılma indekslerindeki farklılık temel alınarak çalışır. Işık gözenekli ve organik yapıdan geçerken pozitif, kristal ve inorganik yapıdan geçerken ise negatif olarak kırılır. Görüntü, mikroskoba bağlı bir dijital kamera kullanılarak çekilir. Bu görüntüler daha sonra bir bilgisayar yazılımından faydalanılarak lezyon derinliğini ölçmek için kullanılır (6,138,139).

PLM gibi histolojik inceleme, demineralizasyonun laboratuvarında tanımlanması için altın standart olarak kabul edilir. PLM, minenin prizmatik-

aprizmatik olması veya sağlam-demineralize mine olması durumlarında ayırım yapmamızı sağlar. Ancak PLM lezyonun kalsiyum içeriğini ve mineral yoğunluğunu değerlendiremez (6,8,138).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma yeni bir biyomimetik peptit olarak tanıtılan MPP3'ün, ticari flor jel ile karyojenik pH siklusunda sağlam süt dişi minesinde koruyucu remineralizasyon etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla in vitro koşullarda gerçekleştirildi. Araştırma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu 'undan 2021/198 numaralı etik kurul onayı alındı (EK 1).

3.1. GEREÇ

3.1.1. Sağlam Süt Dişi Minesinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Materyaller

Araştırmada sağlam süt dişi minesinde koruyucu remineralizasyon etkisi değerlendirilen materyaller Çizelge 3.1.'de gösterildi. Çalışmada kullanılan peptit (PGEKADRAEKADRA) yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle ticari olarak >%98 saflıkta sentezlenmiştir. Mineralizan peptid solüsyonunun jel kıvamına getirilebilmesi için Doğa İlaç firmasından temin edilen %100 organik sığır jelatini (Yenilebilir toz jelatin, Doğa İlaç, İstanbul, Türkiye) kullanıldı (EK 2). Jelin kıvamının tespiti amacıyla %1, %2, %3, %4, %5 ve %6'lık jel solüsyonları hazırlandı. Hazırlanan jellerin 24 saat süresince kıvamını bulması beklenmiş jelin çalışmada kıyaslama amacı ile kullanılacak flor jel malzemesine en yakın kıvamda olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle %3'lük jel kıvamının çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir. Materyalin ikinci aşamasında Tulumbacı ve ark.'nın (8) yaptıkları flor vernik çalışması baz alınarak 4mM MPP3 ağırlık/hacim oranı olarak %10'luk konsantrasyonda hazırlandı.

Flor jel+MPP3 karışımı hazırlanırken yine ağırlık/hacim oranı olarak 4mM'lık MPP3 tozu %10 oranında flor jele katılarak 5 dakika süresince vorteks cihazında yüksek hızda toz çözülene kadar karıştırıldı.

Çalışmada kullanılan F ajanının jel olması nedeniyle kıyaslama için kullanılacak MPP3 ajanının da yavaş salım preperatı şeklinde jel olarak elde edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Koruyucu Remineralizasyon kapasiteleri değerlendirilen materyaller

Materyal	İçerik	Üretici firma
Polimo APF Fuid Effect	% 1,23 lük Asidüle fosfor florid (APF) (Ph=3,5)	Karatay Konya TÜRKİYE
Peptit jel	%10 luk MPP3 jel	GenScript Biotech Corp. NJ, USA

3.1.2. Süt Dişlerinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin PH Döngüsünde Kullanılacak Solüsyonlar

Araştırmada pH döngüsü için kullanacağımız demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonu Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda hazırlandı. Her hafta yeniden hazırlanan solüsyonlar +4 derecede buzdolabında depolandı. Demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarının etkinliğinin sabit kalması amacıyla, solüsyonlar her gün yenilenmiştir.

3.1.2.1.Demineralizasyon solüsyonu

Kullandığımız demineralizasyon solüsyonunun içeriği şu şekildedir: 2,20 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Merck & Co., NJ, USA); 2,20 mM KH_2PO_4 (Merck & Co., NJ, USA); 0,10 ppm NaF (Merck & Co., NJ, USA); ve 50 mM acetic acid (Merck & Co., NJ, USA) (pH 4,5) (8).

3.1.2.2.Remineralizasyon solüsyonu

Kullandığımız remineralizasyon solüsyonunun içeriği şu şekildedir: 1,50 mM CaCl_2 (Merck & Co., NJ, USA); 0,90 mM KH_2PO_4 (Merck & Co., NJ, USA); 130 mM KCl (Merck & Co., NJ, USA), ve 20 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, MO, USA) (pH 7,0) (8).

3.1.3. Süt Dişlerinde Koruyucu Remineralizasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Cihazlar

Remineralizasyon ajanlarının koruyucu kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihazlar Çizelge 3.2'de ve Resim 3.1- 3.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Remineralizasyon ajanlarının koruyucu kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka - Model	Firma
Mikrosertlik test cihazı	Shimadzu Micro Vickers Hardness Tester HMV-G	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya
Taramalı elektron mikroskobu, EDS dedektörü	Hitachi SU5000 FE-SEM	Hitachi High Technologies, Tokyo, Japonya
Hassas kesme cihazı	Micracut 201	Metkon, Bursa, Türkiye
Etüv	NÜVE-EN 400	Nüve A.Ş, İzmir, Türkiye
Mikro bilgisayarlı tomografi	Bruker, Skyscan 1275	Bruker, Belgium
Polarize ışık mikroskonu	Motic BA310 POL	Motic, Kowloon, Hong Kong
Vakum kaplama aygıtı	Leica EM ACE200	Leica, İstanbul, Türkiye



Resim 3.1. Araştırmada kullanılan mikrosertlik test cihazı



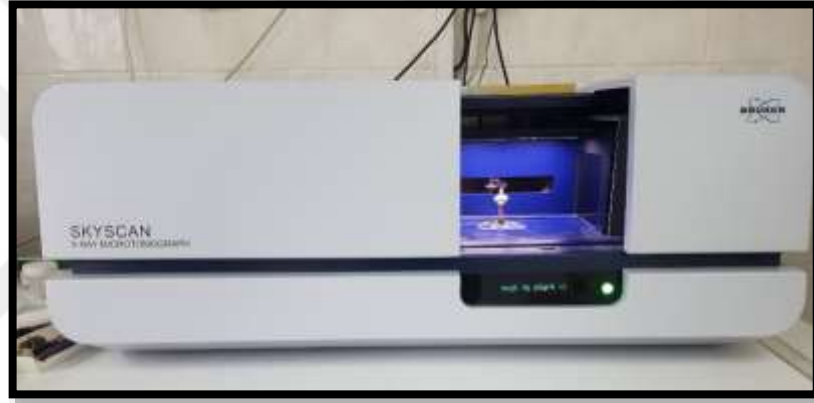
Resim 3.2. Taramalı elektron mikroskobu, EDS dedektörü



Resim 3.3. Araştırmada kullanılan hassas kesme cihazı



Resim 3.4. Etüv



Resim 3.5. Skyscan 11275 mikro bilgisayarlı tomografi cihazının görüntüsü



Resim 3.6. Polarize ışık mikroskobu



Resim 3.7. Vakumlu kaplama cihazı

3.2.YÖNTEM

Bu araştırmada, remineralizasyon ajanlarının koruyucu kapasitelerini değerlendirmek amacıyla 4 farklı test yöntemi kullanıldı. İlk etapta akril bloklar içerisinde hazırlanan numunelerin hiçbir işleme tabi tutulmaksızın başlangıç mikrosertlik ve micro-CT ölçümleri yapıldı. Daha sonra örnekler rastgele 4 gruba ayrılıp remineralizasyon ajanları uygulandı ve 4 hafta sürecek olan pH döngüsünde kaldı. pH döngüsü bittikten sonra süt dişi mine dokusunda meydana gelen değişimler tekrardan ‘Vickers Mikrosertlik’ test metoduyla ve micro-CT ile analiz edildi. Mine dokusunda farklı grublardan seçilen 2 adet örneğin mineral dağılımları mine yüzey görüntüleri FE-SEM ile görüntülenip EDS ile nicel olarak analiz edildi. En son olarak PLM analizi yapıldı.

3.2.1.Dişlerin Toplanması

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındıktan sonra Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı’na gelen 6-12 yaş arası çocuklardan kuru ve sağlıklı olan eksfoliasyon veya

ortodontik nedenlerle çekilmiş toplam 60 adet süt molar diş toplandı. Kullanılacak olan süt molar dişler için hastaların ebeveynlerine, çalışmanın yazılı açıklamasının yer aldığı bir onam formu imzalatıldı (EK 3). Dişler çalışma başlayana kadar +4°C'de % 0,1 timol solüsyonunda saklandı. Saklanan dişler çalışmaya başlamadan önce yumuşak doku kalıntılarından arındırıldı, pomza karışımı ve elektrikli diş fırçası ile fırçalandı. Yeterli ışık kaynağı altında dişler incelendi. Çatlak, hipoplazi, beyaz nokta lezyonları olan dişler elenerek toplam 40 adet diş çalışmaya dahil edildi.

3.2.2.Diş Örneklerinin Hazırlanması

Seçilmiş olan 40 adet süt molar dişin mine yüzeyleri yeni mineyi açığa çıkarmak amacıyla 5 µm alümina / su süspansiyonlu mikro-cila kullanılarak 30 saniye süreyle polisaj işlemine tabi tutuldu. Daha sonra suyla soğutma altında Microcut 201 hassas kesici kullanılarak mine-sement birleşim noktasından kesildi (Resim 3.8.). Dişleri standart bir şekilde akrile gömmek için plastik ilaç kutuları kullanıldı. Daha sonra dişler akrilik bloğa bukkal mine yüzeyi açıkta kalacak şekilde gömüldü (Resim 3.9). Bukkal mine yüzeylerinde 3 mm x 3 mm lik bir etiket yapıştırıldı. Geriye kalan mine yüzeyleri iki kat aside dayanıklı oje ile boyandı. Ojenin kuruması beklendi ve etiket çıkarıldı. Mine yüzeyindeki çalışma alanı bu şekilde elde edildi (Resim 3.10.).



Resim 3.8. Mine-sement sınırından kesilmiş süt dişi



Resim 3.9. Akrilik bloklara gömülmüş dişler



Resim 3.10. 3mm x 3mm lik çalışma yüzeyinin elde edilmesi

3.2.3.Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Akrile gömülen dişler rastgele 4 gruba ayrıldı ve dişler numaralandırıldı (Resim 3.11.). Her çalışma grubunda 10 adet diş incelendi. Tez çalışmasında yapılmış olan analizlerde kullanılan numune sayısı Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: Ticari flor jel (% 1,23 APF)

Grup 3: % 10 MPP3 jel

Grup 4: Ticari flor jel (% 1,23 APF) +% 10 MPP3

Gruplar oluştuktan sonra örnekler mikro sertlik testine kadar +4°C'de % 0,1 timol solüsyonunda bekletilmiştir.



Resim 3.11. Akrile gömülen diş bloklarının numaralandırılması

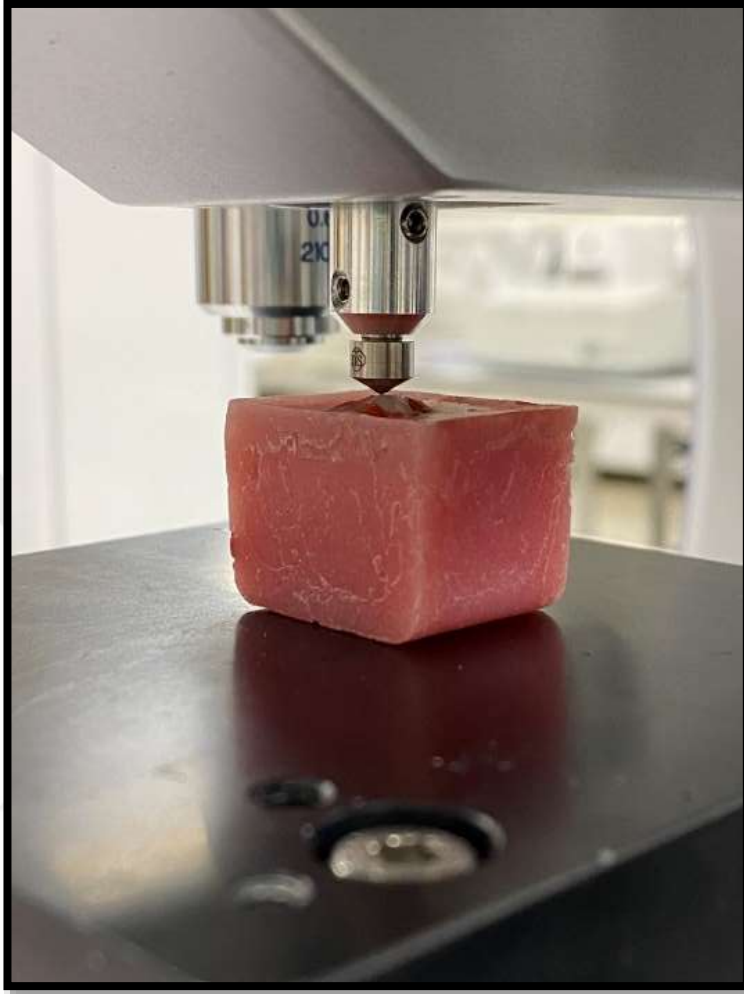
Çizelge 3.3. Analizlerde kullanılmış olan numune sayıları

Çalışma Türü Gruplar	Mikrosertlik analizi	Micro-CT Analizi	PLM Analizi	FE-SEM Analizi	EDS Analizi
Grup 1: Kontrol	10	10	8	2	2
Grup 2: Flor jel	10	10	8	2	2
Grup 3: MPP3 jel	10	10	8	2	2
Grup 4:Flor jel+MPP3	10	10	8	2	2

3.2.4.Mikro Sertlik Ölçümleri

40 adet örnek diş bir Vickers ucu bulunan mikrosertlik cihazındaki (Shimadzu, Kyoto Japan) tablaya paralel, bukkal mine yüzeyi yukarı bakacak şekilde tek tek yerleştirildi (Resim 3.12.). Ölçüm yapılacak alan cihazın mikroskobunda belirlendi. Bukkal mine yüzeyinde çalışma için ayrılan 3 mm x 3 mm'lik alanın, üç farklı yerinden 10 saniye süre ile 100 g yük uygulayarak Vickers ölçüm ucu ile ölçümler

yapıldı. Her örnekte 3 farklı ölçüm uygulanıp, elde edilen 3 değerin ortalaması alındı. Vickers sertlik değeri, cihazda otomatik olarak hesaplandı.



Resim 3.12. Örneklerin mikrosertlik testi yapılırken görüntüsü

3.2.5.pH Döngüsünün Çalışması

Örneklere gruplarda belirlendiği gibi sırasıyla Grup 2: ticari flor jel (% 1,23 APF), Grup 3: % 10 MPP3 jel, Grup 4: flor jel (% 1,23 APF)+MPP3 dişlerin mine yüzeylerine 4 dakika süreyle uygulanmıştır. Kontrol grubuna (Grup 1) hiçbir uygulama yapılmamıştır. Pencere yüzeyindeki jel, pamuk rulo ile uzaklaştırılmıştır. Sonra numuneler için 37°C 'de 4 hafta sürecek pH döngüsü başlatılmıştır (140) (Resim 3.13.). Her döngüde (24 saat) 6 saat demineralizasyon, 18 saat remineralizasyonun uygulandığı pH döngüsü modeli tercih edilmiştir (141). Her döngü için taze demineralize ve remineralize edici solüsyonlar kullanılmış ve deney

dönemi boyunca her grup için ayrı kaplar hazırlanmıştır. Demineralizasyon ve remineralizasyon aşamaları arasında bir önceki solüsyonu uzaklaştırmak amacıyla örnekler 10 sn boyunca deiyonize su ile yıkanmıştır.



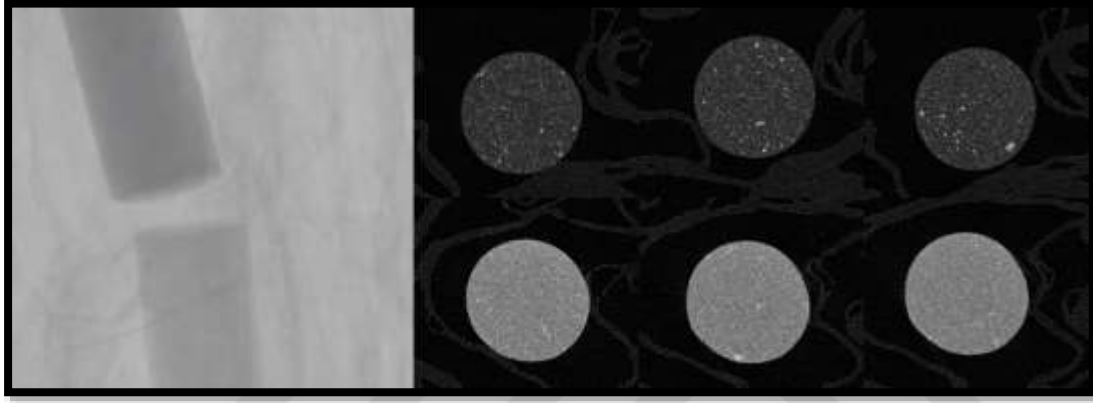
Resim 3.13. Ph döngüsünün başlaması ve 28 gün boyunca örneklerin 37 °C derecede tutulması

3.2.6. Örneklerin Micro-CT’de Değerlendirilmesi

Deneyisel olarak pH döngüsüne giren örneklerin mineral yoğunluğunun ölçülmesi için micro-CT yöntemi kullanıldı. Örneklerin mikro tomografi çekimleri Ankara Üniversitesi Bilimsel ve Teknik Araştırma Merkezindeki Micro-CT laboratuvarında bulunan cihazla (Skyscan, Bruker Inc,) 1275 model yüksek çözünürlükte sonuçlar elde edildi. Bu cihaz, yüksek voltajla desteklenen bir mikro odaklanma tüpü, hassas manipulatöre sahip bir numune taşıyıcı, görüntü yakalayıcıya bağlı bir X-ray CCD (Charge-Coupled Device) kamera (Hamamatsu, Kyoto, Japan) ve Dual Intel Xenon (Intel, LosAngeles, USA) işlemciye sahip bir bilgisayardan oluşmaktadır (Resim 3.5).

0,25 gr/cm³ ve 0,75 gr/cm³’lük iki farklı mineral yoğunluğuna sahip 4 mm çaplı iki konik kalsiyum hidroksiapatit kristalinden elde edilmiş hidroksiapatit fantomları (Skyscan, Kontich, Belçika) cihazın tarayıcı bölmesine yerleştirilmiştir (Resim 3.14.).

HAP fantomları 100 kvp (kilovolt doruğu), 100 miliamper (mA) ve 11,00 μm piksel boyutla taranmıştır. Tarama esnasında dedektörün önünde 0,5 mm alüminyum/bakır filtre, micro-CT'nin kalibrasyonu ve X-ışınının sertleşme artifaktını elimine etmek için kullanılmıştır (Resim 3.14.). Rotasyonel tarama sırasında dişin ekspoz alanının dışına çıkmasına neden olabilecek aksiyel konumlardaki sapmaları önlemek için sabitleme işlemi sırasında numunenin vertikal olarak olabildiğince merkezi, açılanma yapmadan yerleştirilmesine dikkat edildi. X ışın tüpü ve diş arasındaki vertikal mesafe değiştirilerek görüntü netliği sağlandı. Daha sonra tarama işlemine geçildi.



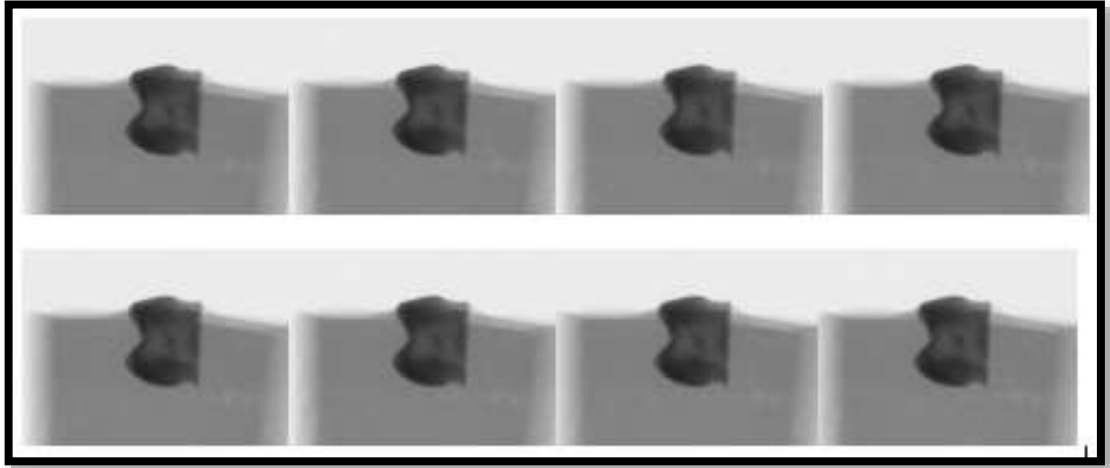
Resim 3.14. Konik Hidroksiapatit fantomların yerleştirilmesi- Hidroksiapatit fantomların taranması

3.2.6.1. Örneklerin Taranması, Rekonstrüksiyonu ve Analize Hazırlanması

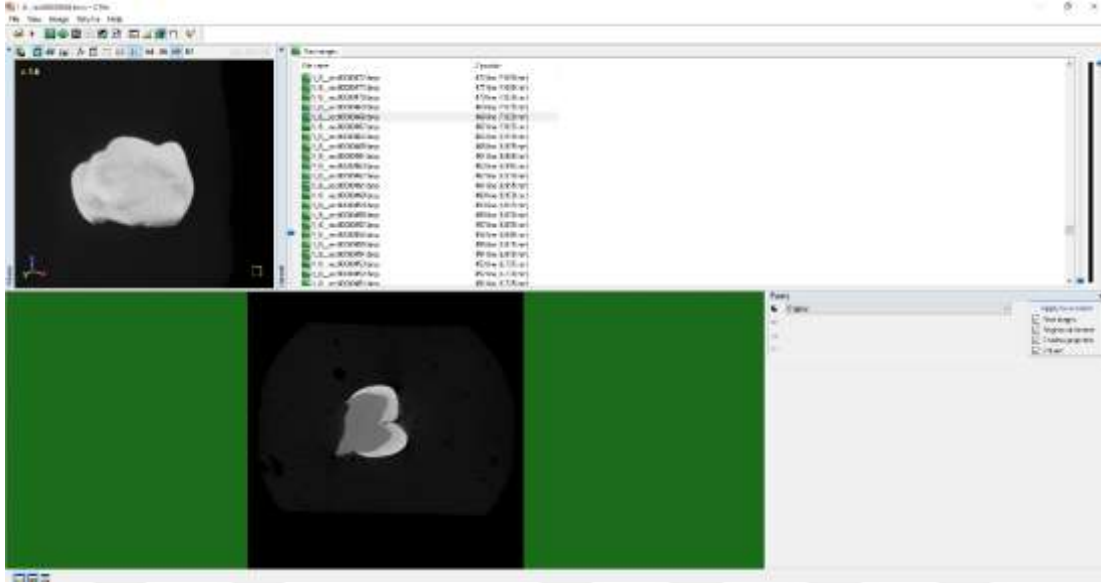
Hazırlanan numuneleri tarama için micro-CT cihazına yerleştirilerek HAP fantomların taranması ile aynı olacak şekilde 100 kV güç, 100 mA akımla, 0,5 mm alüminyum ve bakır filtre kullanılarak 11,00 μm piksel boyut yardımıyla, her bir örnekten yaklaşık olarak 445 iki boyutlu aksiyel projeksiyonlar alınarak parametreler elde edildi. Çekimler sırasındaki exposür zamanı 1800 ms olarak ayarlanmıştır. Dişlerin taranmasında 360° rotasyon kullanılırken, rotasyon adımı 0,50° olarak belirlenmiştir. Bu ayarlarda tarama süresi yaklaşık olarak her bir numune için 50 dakika sürmüştür. Numunelerin bukkal yüzeylerindeki mineral yoğunluğunun hesaplanması için 0,25 ve 0,75 gr/cm^3 yoğunluğunda iki adet fantom HAP ile görüntülenerek ölçümler yapılmıştır. Kesitlerden alınan DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) uyumlu görüntüler BMP (Bit Map Picture) formatına

dönüştürülmüştür. Her bir kesit görüntünün çözünürlüğü 2000x2000 piksel ve piksel boyutu 11,00 µm olarak elde edilmiştir.

Daha sonra NRecon (NRecon versiyon 1.6.10, Skyscan, Kontich, Belgium) yazılımı kullanılarak taranmış her bir dişin ayrı ayrı rekonstrüksiyonu yapılmıştır. Toplamda her bir görüntü grubu için 586 adet 2 boyutlu aksiyel projeksiyonlar elde edilmiştir (Resim 3.15.). Daha sonra bu iki boyutlu aksiyel projeksiyonlar üreticinin sağladığı yazılım Computer Tomography Analyse (CTan) (versiyon 1,14,4,1 Skyscan, Kontich, Belgium) ile analiz edilmek için hazırlanmıştır (Resim 3.16.). Örneklerin bu tarama aşamasından sonraki rekonstrüksiyonları üreticinin sağladığı NRecon (NRecon versiyon 1.6.10, Skyscan, Kontich, Belgium) yazılımı ile yapılmıştır. Micro-CT taraması sonrası elde edilen ham radyolojik görüntüler NRecon 1.6.10.6 (SkyScan, Kontich, Belgium) programında 5 birim görüntü yumuşatma (Smoothing), 3 birim halkasal görüntü hatalarının düzeltimi (Ring Artifact Correction) ve X ışını sertleştirme (Beam Hardening Correction) için %73 düzeltme oranı kullanılarak görüntü kirlilikleri ve radyolojik artefaktlar elimine edilmiş ve görüntü matematiksel analiz için hazır hale getirilmiştir.



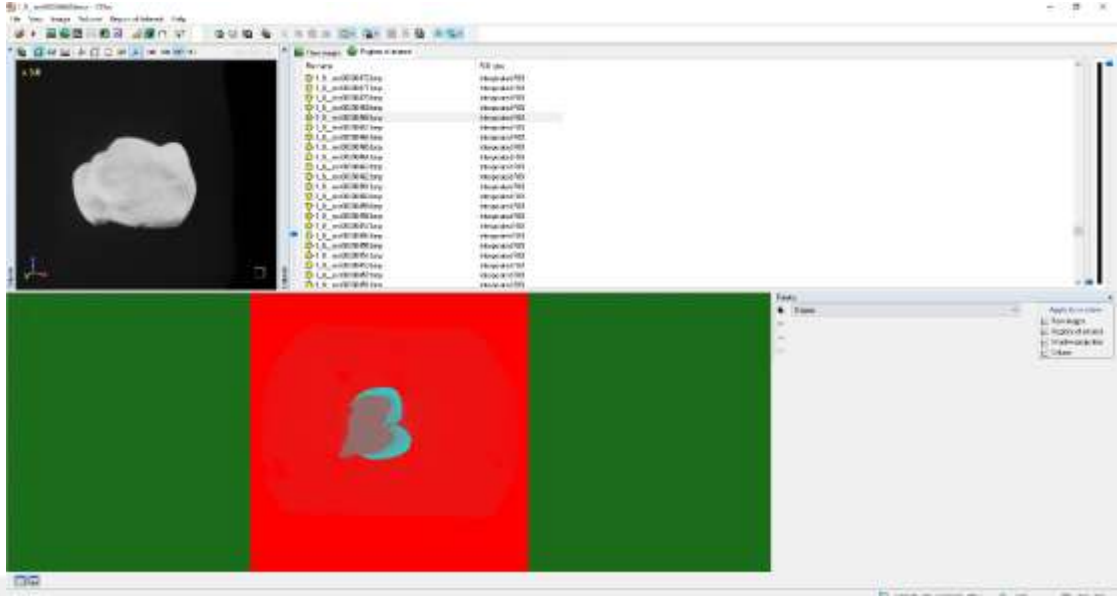
Resim 3.15. Diş örneklerinin taraması sonrası elde edilen iki boyutlu aksiyel projeksiyonları



Resim 3.16. Çalışmamızda kullanılan CTan programının ekran görüntüsü

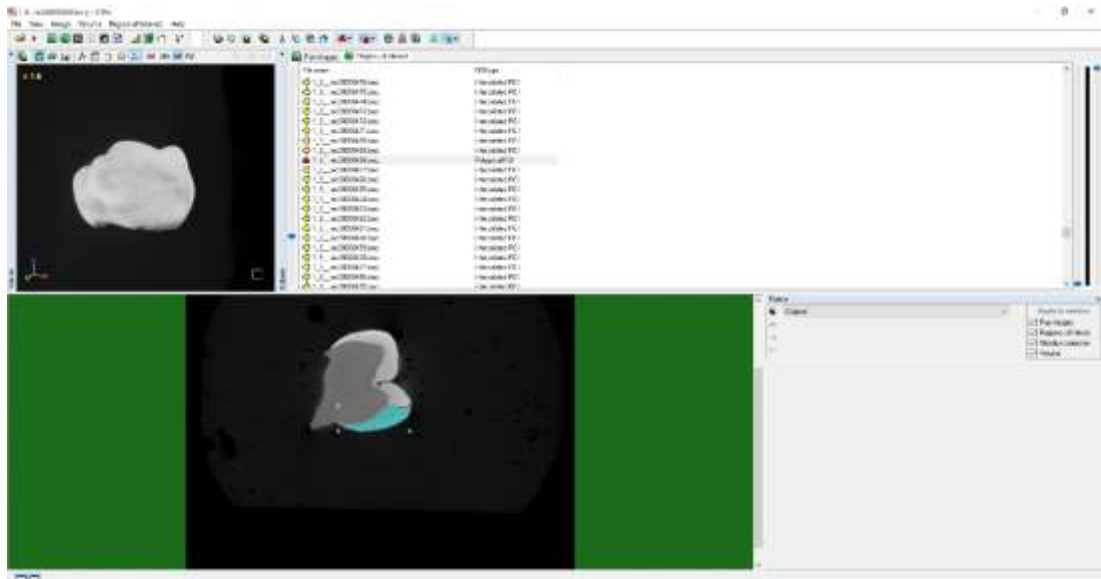
3.2.6.2. Mikro-BT’de Taranmış Örneklerin Mineral Yoğunluk Ölçümleri

NRecon (SkyScan, Kontich, Belgium) yazılımında rekonstrükte edilmiş örneklerin görüntülerinin, ileri seviyede hacimsel analizlerinin yapılabilmesi için CTan (versiyon 1,14,4,1 SkyScan, Kontich, Belgium) yazılımı kullanılmıştır. Her bir diş için başlangıç ve bitiş bölgeleri program üzerinde seçilerek belirlenmiştir (Resim 3.17.). Çalışmamızda bir dişin bukkal yüzeyindeki bölge, CTan (versiyon 1,14,4,1 SkyScan, Kontich, Belgium) programında analiz yapılacak alan olarak ayrılmıştır. Daha sonra her bir diş için adaptif interpolizasyon (interpolarided) uygulanarak seçilen alandaki farklı İlgi Bölge (Region of Interest-ROI)’leri, mineral yoğunluk ölçümü için belirlenmiştir (Resim 3.18.). Nrecon (SkyScan, Kontich, Belgium) ile elde edilen ve CTan (versiyon 1,14,4,1 SkyScan, Kontich, Belgium) programına atılan görüntüler üzerinde; en düşük limit 24’den 255’e kadar ve en yüksek limit ise spektrumun en parlak noktası olacak şekilde her bir görüntü için ayrı ayrı eşikleme (thresholding) işlemi yapıldı. Eşikleme işlemi için küresel eşikleme (Global thresholding) metodu tercih edildi.

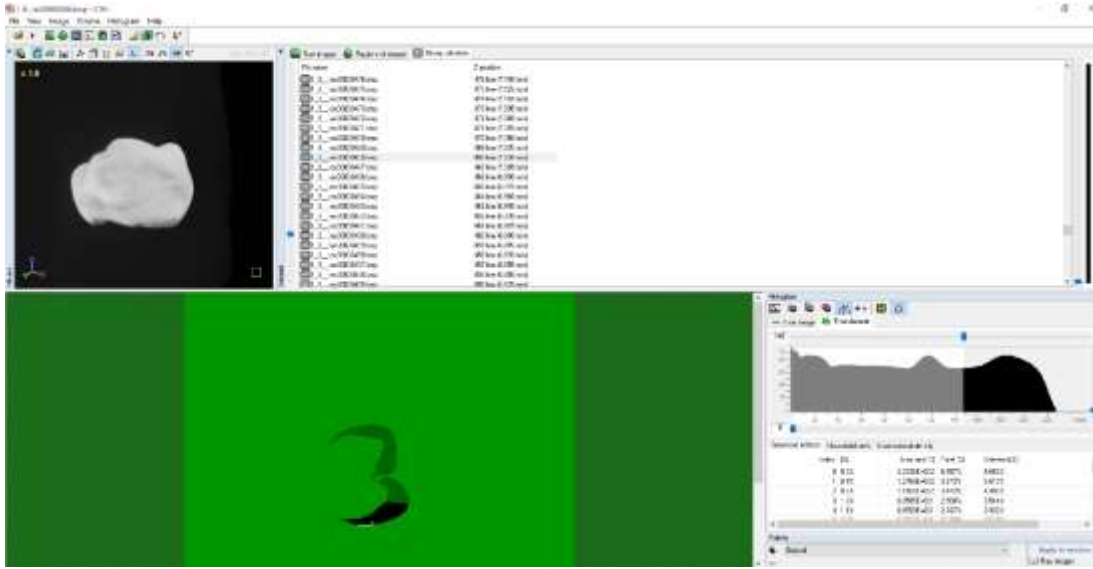


Resim 3.17. Örneklere ait kesitlerin analizlerinin yapılması için hazırlanması

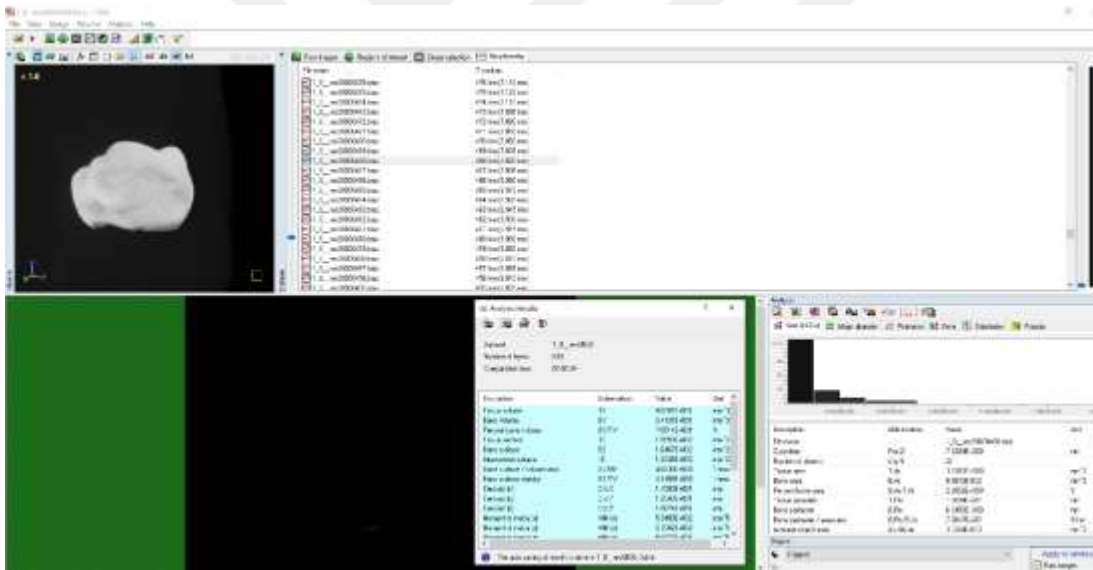
Manuel olarak belirlenen ROI'ler sadece mineyi içine alacak şekilde yerleştirilmiştir. Diğer bölgeler ise ROI seçiminin dışında bırakılmıştır. ROI'lerin hazırlanmasından sonra ortalama gri değer ve yoğunluk analizlerinin yapılabilmesi için ROI'ler orijinal görüntüden çıkarılmıştır. CTan (versiyon 1,14,4,1 Skycan, Kontich, Belgium) programı kullanılarak yapılan çıkarma işlemi sonrasında sadece incelemek istediğimiz alan kalacak şekilde görüntü elde edilmiştir (Resim 3.19.).



Resim 3.18. CTan Programı kullanılarak diş örneğinin ROI'sinin seçilmesi



Resim 3.19. CTan Programı kullanılarak diş örneğinin demineralizasyon alanının gösterilmesi



Resim 3.20. CTan Programı kullanılarak diş örneğinin mineral yoğunluğu hesaplamaları gösterilmektedir.

Seçilen ROI'lerde daha sonra CTan (versiyon 1,14,4,1 Skycan, Kontich, Belgium) programı aracılığıyla diş mineral yoğunluğu hesaplamaları yapılmıştır (Resim 3.20.). Mineral yoğunlukları HAP kalibrasyon fantomları yardımıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak program tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Daha sonra ROI'lerin yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Elde edilen bu

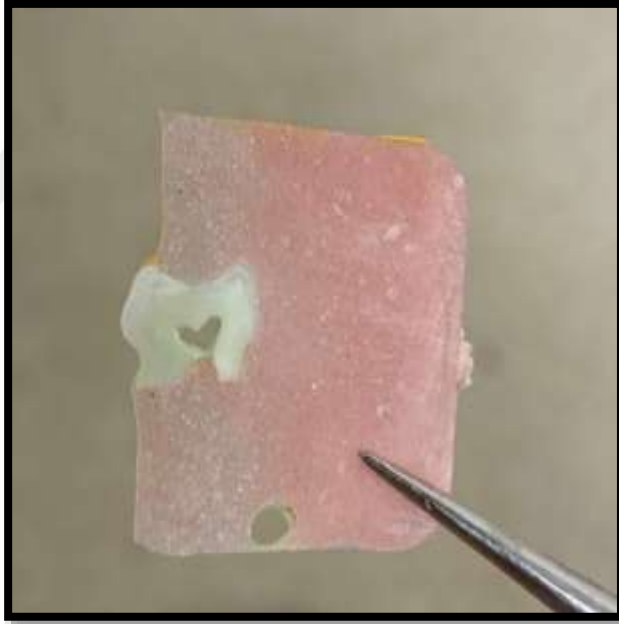
sayısal veriler Microsoft Office Excel (Microsoft 365, Microsoft corp., Washington, ABD) yazılımına aktarılarak istatistik analizlere hazır hale getirildi.

3.2.7.Polarize ışık mikroskobu analizi

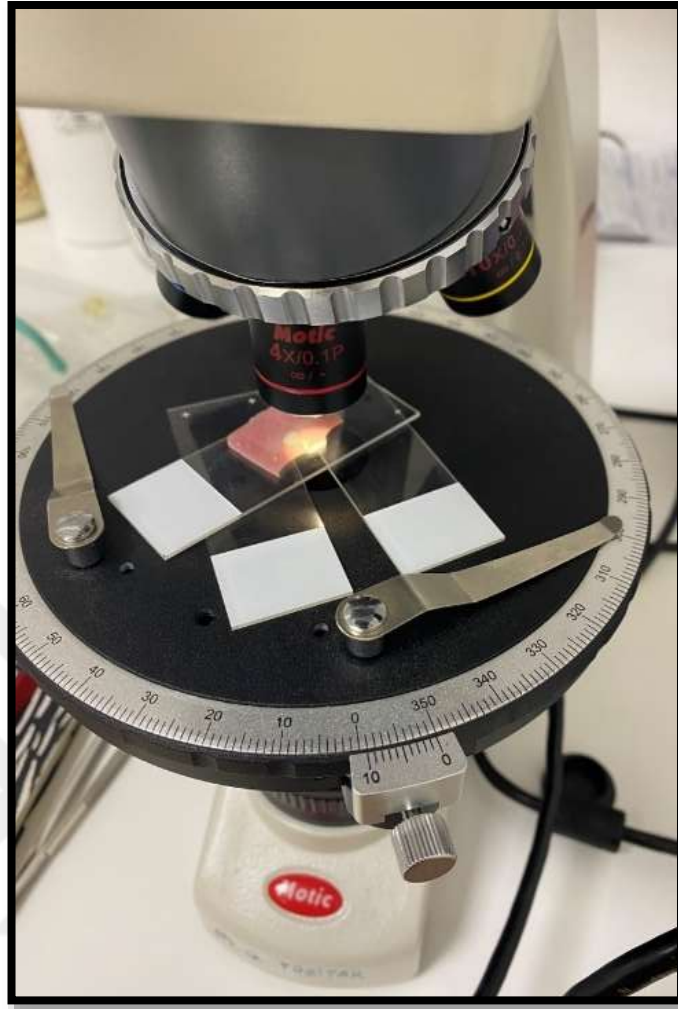
Dört hafta süren pH döngüsünden sonra örnekler mikrosertlik, micro-CT, FE-SEM analizlerini takiben polarize ışık mikroskobu analizi için hazırlandı. Her çalışma grubundan 8 örnek rastgele seçildi. Akrilik rezine gömülü dişler Microcut 201 hassas kesici (Metkon, Bursa, Türkiye) ile sagittal yönde kesildi. Dişin bukkal yüzeyindeki 3 mm x 3 mm lik çalışma alanını içine alacak şekilde bir örnekten 2 farklı kesit alınmıştır (Resim 3.21.). Kesitler yaklaşık 300 µm kalınlığında kesilmiştir. Daha sonra kesitler 500 grit silikon karbit polisaj stripleri kullanılarak 200 µm'na kadar inceltiştir ve 1200, 2400 ve 4000 grit polisaj stripleri kullanılarak zımparalandı. Zımparalanan örnekler 9, 3 ve 1 µm polikristal elmas süspansiyon (MetaDi Fluid, Buehler, Illinois, ABD) ile parlatılmıştır (Resim 3.22.). Kesitler cam mikroskop lamalarına yerleştirildi ve alkol ile inhibisyonundan sonra polarize ışık mikroskobu altında incelendi. PLM analizi, 4X büyütme altında bir Moticam 5 dijital kamera (Motic, Kowloon, Hong Kong) ile donatılmış bir BA310 POL Trinoküler mikroskobu (Motic, Kowloon, Hong Kong) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.23.). Lezyon derinlikleri Image Focus 4.0 (Motic, Kowloon, Hong Kong) yazılımı kullanılarak ölçüldü. Ölçümler, örneklerin kodlamasını bilmeyen bir pediatrik diş hekimi ve klinisyen olmayan bir araştırmacı tarafından yapıldı. Lezyonların başı, sonu ve en derin noktası olmak üzere 3 farklı yerinden derinlikleri ölçülüp ortalaması alındı.



Resim 3.21. Micro cutta 1 örnekten elde edilen 2 farklı kesit



Resim 3.22. 200 μm ' na kadar inceltilen ve parlatılan kesit örneği



Resim 3.23. Polarize ışık mikroskobu analizi

3.2.8. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) Analizi

Her çalışma grubundan rastgele seçilen 2 numune Microcut 201 (Metkon, Bursa, Türkiye) hassas kesici ile transversal yönde kesildi ve mine yüzeyleri akrilik bloktan ayrıldı. Numuneler bir aliminyum tutucuya takılan karbon bant üzerine yerleştirildi ve bir Leica EM ACE 200 vakum kaplayıcı kullanılarak altın ile kaplandı (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). FE-SEM görüntüleme ve EDS 10 kV hızlandırıcı voltajda bir Hitachi SU5000 alan emisyonlu FE-SEM cihazı (Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japonya) kullanılarak yapıldı.

FE-SEM görüntüleri 5000X ve 25000X büyütmede 10 kv gerilim uygulanarak elde edilmiştir. Kalsiyum, kalsiyum/fosfor oranı ve flor iyonunun kütlece değişim yüzdeleri EDS-X ışıını dedektörü aracılığıyla ölçülmüştür.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMİ

Zamana bağlı mikrosertlik, micro-CT değerlerinin gruplar arasındaki farkları tekrarlı ölçümler ANOVA (repeated measures-ANOVA, RM-ANOVA) ile belirlendi. PLM ile lezyon derinliği ölçümünün gruplar arası farkları tek yönlü ANOVA (One-way ANOVA) ile değerlendirildi. İstatistik değerlendirmeler IBM SPSS v.25.0 kullanılarak yapılmış olup tüm istatistik analizler için anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

PLM görüntülerinden lezyon derinliği ölçümü iki farklı değerlendirici tarafından birbirinden bağımsız olarak yapıldı ve değerlendiriciler arasındaki güvenilirlik sınıf içi korelasyon katsayısı (intraclass correlation coefficient) analizi ile ölçüldü. Analizde çift-yönlü karışık model, ortalama ölçümler ve mutlak uyum kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.MİKROSERTLİK ANALİZİNE AİT BULGULAR

Grupların başlangıçta, remineralizasyon ajanlarının uygulayıp pH döngüsünün başladığı 1.hafta ve 4. hafta mine yüzeyindeki mikrosertlik değerlerine ait bulgular Çizelge 4.1 verildi.

Çizelge 4.1. Vickers mikrosertlik analizi sonucu elde edilen bulgular

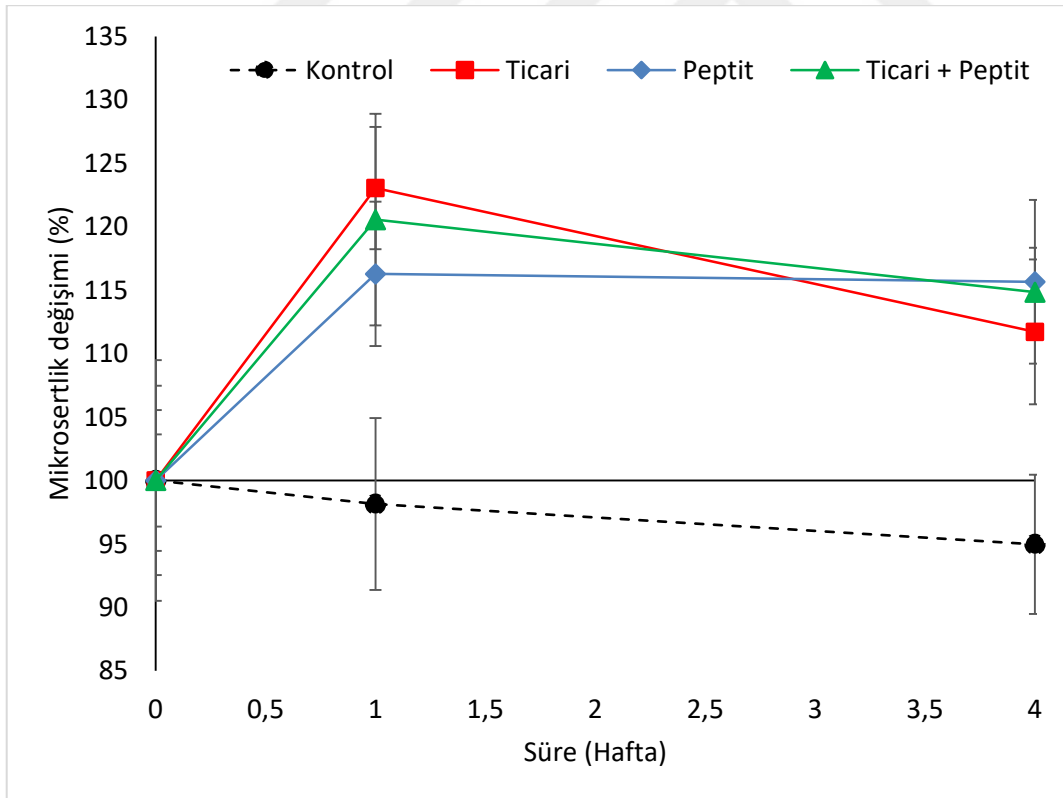
Gruplar	Zaman Periodu			
	Başlangıç Ort±St.sapma	1.Hafta Ort±St.sapma	4.Hafta Ort±St.sapma	P
Kontrol	345,77 ± 63,24 ^{a,f}	338,80±76,35 ^{b,f}	331,90±71,06 ^{d,f}	0,600
Ticari Flor jel	319,60 ± 58,24 ^a	421,83±69,90 ^c	370,73±58,09 ^d	0,0001
MPP3	359,70 ± 76,06 ^a	431,57±75,84 ^{c,g}	416,03±65,67 ^{d,e,g}	0,0001
Ticari flor jel + MPP3	372,17±113,01 ^{a,h}	420,30±93,22 ^{c,i}	379,17±45,15 ^{e,h,i}	0,005
P	0,102	0,0001	0,001	

Küçük harfler gruplar arasında istatistiksel fark olmadığını belirtmek amacıyla kullanılmıştır (p > 0.05). (Newton/mm²) (Ort±St.sapma) (n=30)

Sağlam mine dokusuna ait başlangıç değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ortalama mikrosertlik değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p=0,102). Remineralizasyon ajanları uygulanıp 1 hafta pH döngüsünde kalan örneklerin mikrosertlik değerleri arasında fark gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,0001). Bu fark kontrol grubunda ortalama mikrosertlik değerlerinin diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olmasından kaynaklanır. 4 haftanın sonunda gruplar karşılaştırıldığında ortalama mikrosertlik değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (p=0,001). MPP3 jel ve flor jel+MPP3 grubunda diğer gruplara nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek sertlik değerleri olduğu görülmektedir. Grupları kendi içinde zaman periyotlarına göre değerlendirdiğimizde; minede başlangıç mikrosertlik değerleri, 1.hafta mikrosertlik değerleri ve 4. hafta mikrosertlik değerleri ticari flor jel grubunda birbirinden farklı olup bu fark istatistiksel açıdan anlamlıdır (p= 0,0001). MPP3 jel grubunda başlangıç değeri, 1. ve 4. hafta ortalama mikrosertlik değerlerinden

istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşüktür ($p=0,0001$). Flor jel+MPP3 grubunda 1. hafta ortalama mikrosertlik değeri başlangıç ve 4. hafta ortalama mikrosertlik değerinden istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,005$).

Örneklerin başlangıç mikrosertlik değerleri, remineralizasyon ajanlarının uygulanmasının hemen ardından gerçekleşen 4 hafta süren pH döngüsü sonrası mikrosertlik değişimi yüzdesi değerlerine ait bulgular Şekil 4.1. de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre kontrol grubunun mikrosertlik değişim yüzdesinin istikrarlı bir şekilde negatif yönde arttığını görüyoruz. Ticari flor jel grubunda remineralizasyon ajanı uygulandıktan sonra 1. haftaya kadar diğer gruplardan daha hızlı bir artış, 1. haftadan sonra diğer gruplardan daha hızlı bir düşüş gözlemliyoruz. MPP3 grubunda ticari flor jel ve ticari flor jel+MPP3 gruplarına göre 1. Haftaya kadar daha yavaş bir yükseliş, 1. Haftadan sonra ticari flor jel ve flor jel+MPP3 gruplarına göre daha istikrarlı bir yol izler, yavaş bir düşüş görülür.



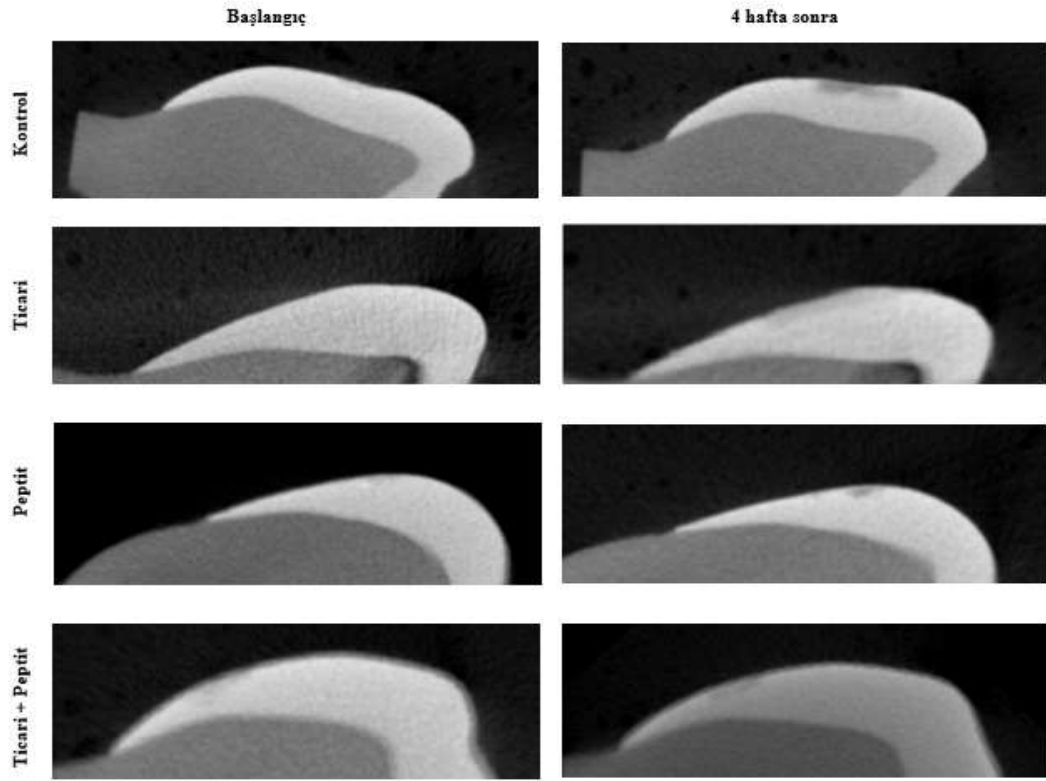
Şekil 4.1. Grupların 'Uygulama Sonrası' ve 'Ph Döngüsü Süresince' mikrosertlik değerlerinin yüzde olarak değişimi

4.2.MİKRO BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ ANALİZİNE AİT BULGULAR

Çalışmada remineralizasyon ajanları kullanılmadan önce başlangıç mineral yoğunluk değerleri ve remineralizasyon ajanları uygulanıp 4 hafta pH döngüne girdikten sonra ölçülen mineral yoğunluk değerleri Çizelge 4.2. de gösterilmiştir. Micro-CT taraması örneklerden alınan kesitlerin başlangıç ve 4 hafta sonraki görüntüleri Resim 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Grupların başlangıç ve 4.haftada mineral yoğunluklarının (gr /cm³) (Ort±St.sapma) karşılaştırması ve yüzdelik değişim değerleri

Gruplar	Başlangıç Ort±St.sapma	4.hafta Ort±St.sapma	p	Yüzdelik değişim değerleri
Kontrol	2,78±0,042	2,15±0,043	0,0001	% 22,35
Ticari Flor jel	2,73±0,044	2,41±0,059	0,0001	% 11,55
MPP3	2,77±0,045	2,51±0,067	0,0001	% 9,57
Ticari flor jel + MPP3	2,83±0,027	2,76±0,052	0,001	% 2,62
P	0,0001	0,0001		

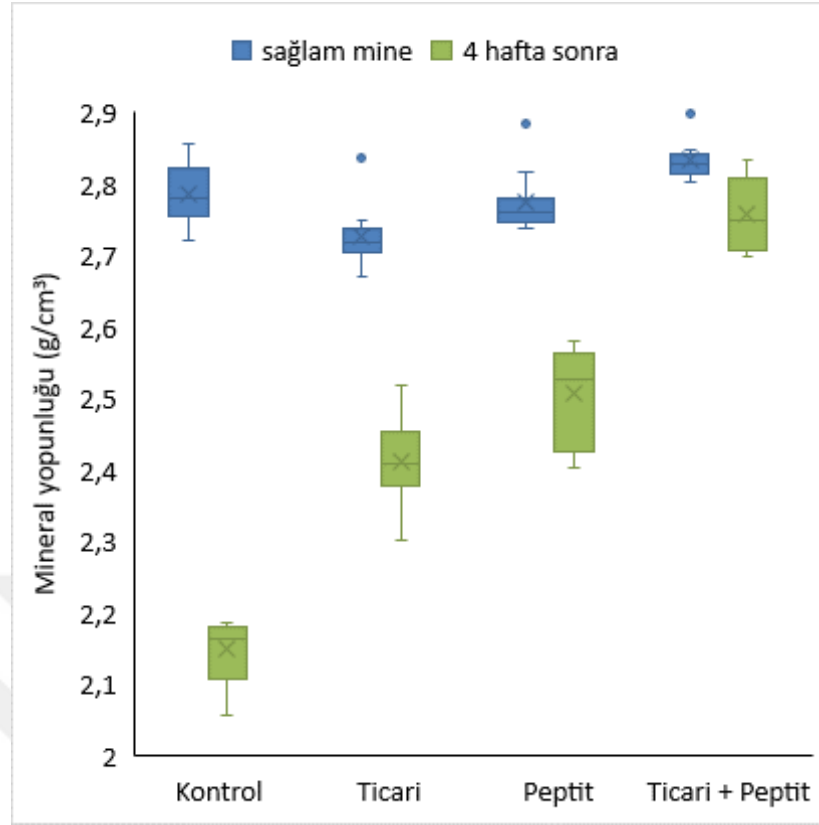


Resim 4.1. Örneklerin başlangıç ve 4 hafta sonraki micro-CT kesitleri

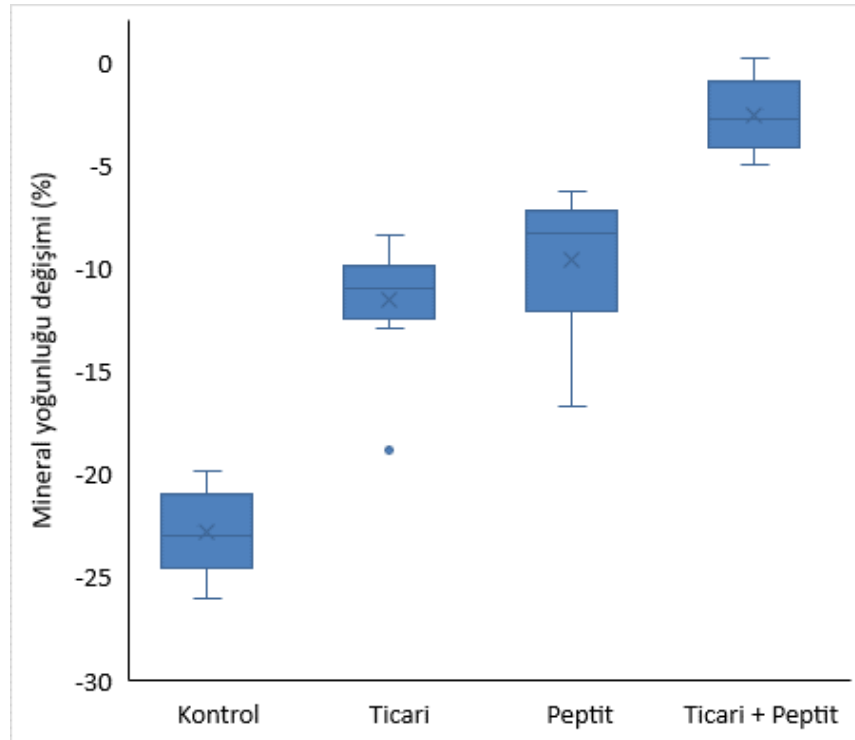
Yapılan Anova testinde gruplar arasında mineral yoğunlukları başlangıç değerleri incelendiğinde farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,0001$). Bu fark ticari flor jel grubunun başlangıç mineral yoğunluğunun diğer gruplardan istatistiksel açıdan daha düşük olmasından kaynaklanır. 4. haftada gruplar arası mineral yoğunlukları farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0001$). Bu farkın MPP3 ve flor jel+MPP3 gruplarındaki mineral yoğunluğunun diğer gruplardan yüksek olmasından kaynaklanır.

Kontrol grubunu kendi içinde zaman periyodlarına göre karşılaştırıldığında mineral yoğunluğu farkı 4. haftanın sonunda düşüş göstermiştir ve bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p=0,0001$). Ticari flor jel, MPP3, flor jel+MPP3 gruplarını da zaman periodlarına göre karşılaştıracak olursak 4.haftadan sonra ölçülen mineral yoğunlukları başlangıç mineral yoğunluğundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,0001$, $p=0,0001$, $p=0,001$). Bununla beraber flor jel+MPP3 grubunda mineral yoğunluğu sayısal değerinin 4 haftalık pH döngüsü sonunda diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmektedir.

Sağlam minede (başlangıç) ve 4 haftanın sonunda grupların mineral yoğunluğu değişimi grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Başlangıç ve 4 hafta sonra gruplarda gözlenen mineral yoğunluk değişimi yüzdesi grafiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Başlangıç ve 4 hafta sonra gruplarda mineral yoğunluk değişimi



Şekil 4.3. 4 hafta sonra gruplarda mineral yoğunluk değişimi yüzdesi

4.3.POLARİZE IŞIK MİKROSKOBUNA AİT BULGULAR

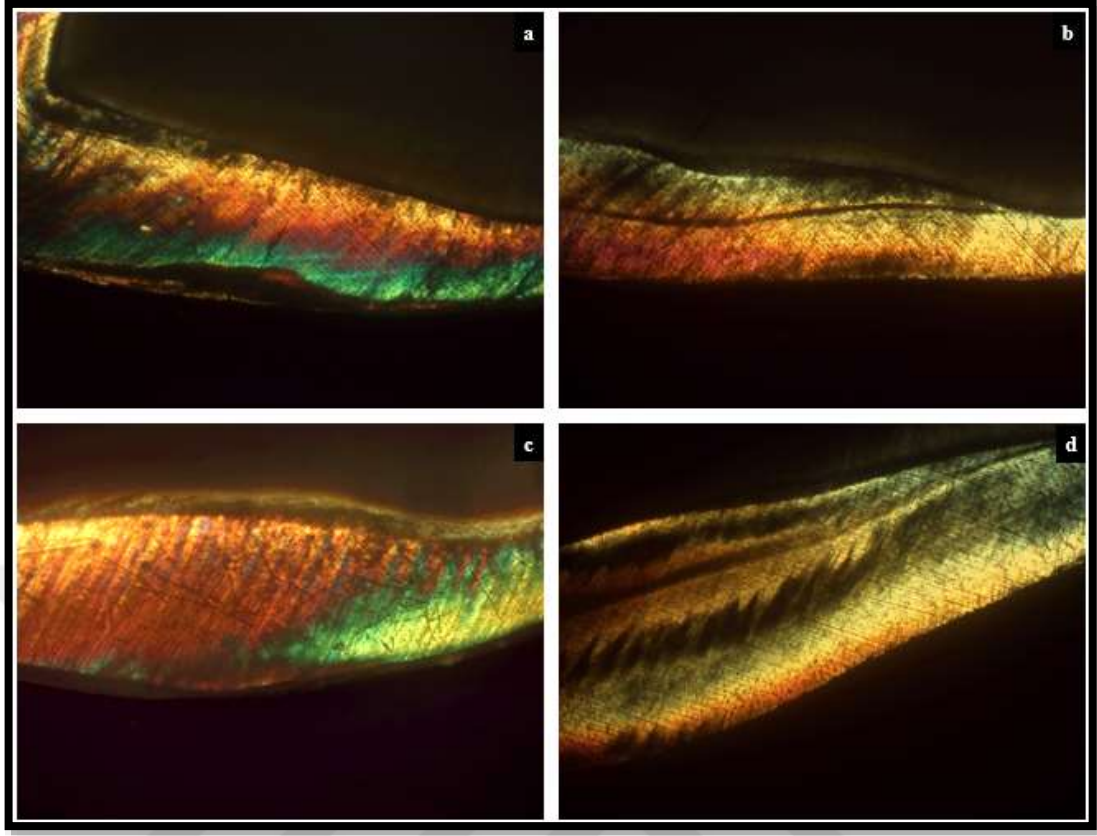
Çalışmada 4 haftanın sonunda gruplardan rastgele seçilen bazı numunelerin PLM görüntüleri gösterilmiştir (Resim 4.2). PLM görüntülerinin Image Focus 4.0 (Motic, Kowloon, Hong Kong) yazılımı kullanılarak ölçülen lezyon derinlikleri değerleri (Resim 4.3, Resim 4.4, Resim 4.5, Resim 4.6) Çizelge 4.3'deki gibidir. Ortalama lezyon derinliklerinin grafiksel gösterimi Şekil 4.4'de yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Grupların 4.haftada PLM analizi ile ölçülen lezyon derinlikleri ölçümleri (µm)

Gruplar	4.hafta Ort±St.sapma
Kontrol	37,3907±12,76002 *
Ticari Flor jel	35,3279 ±21,90301
MPP3	33,8698±15,66304
Ticari flor jel + MPP3	27,0336±12,53650 *

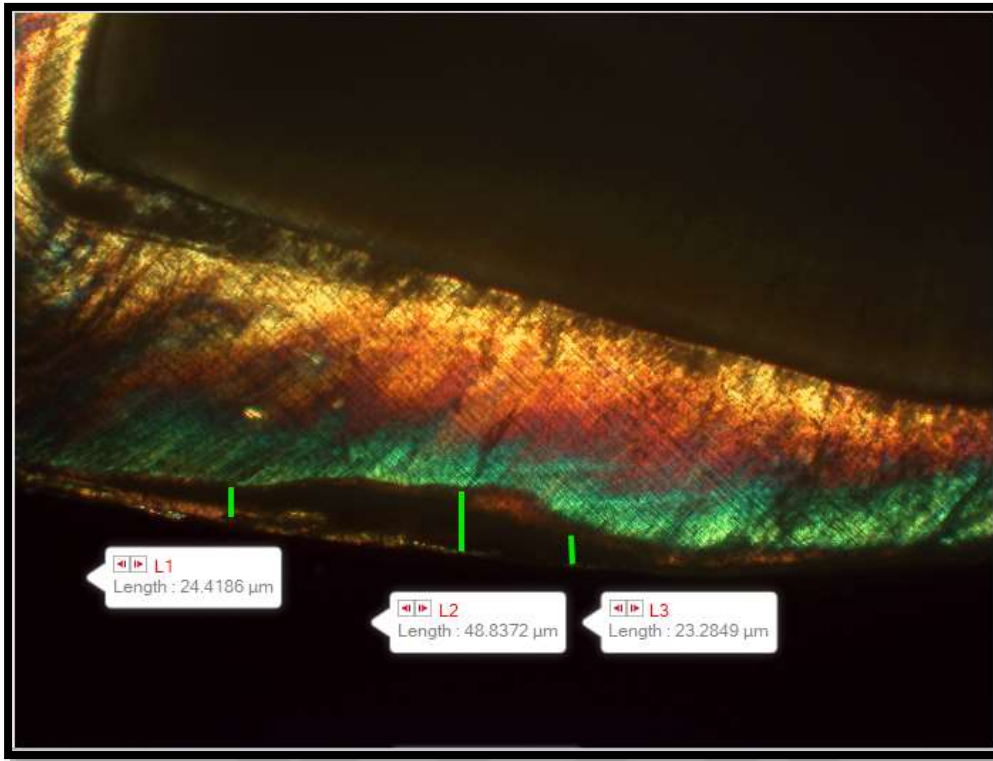
*: Gruplar arasında istatistiksel farkı belirtmek amacıyla kullanılmıştır ($p < 0,05$)

PLM ile lezyon derinliklerinin analizi Anova testi ile yapılmış olup gruplar arasında sadece kontrol grubu ile flor jel+MPP3 grubu arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark görülmüştür ($p=0,039$).

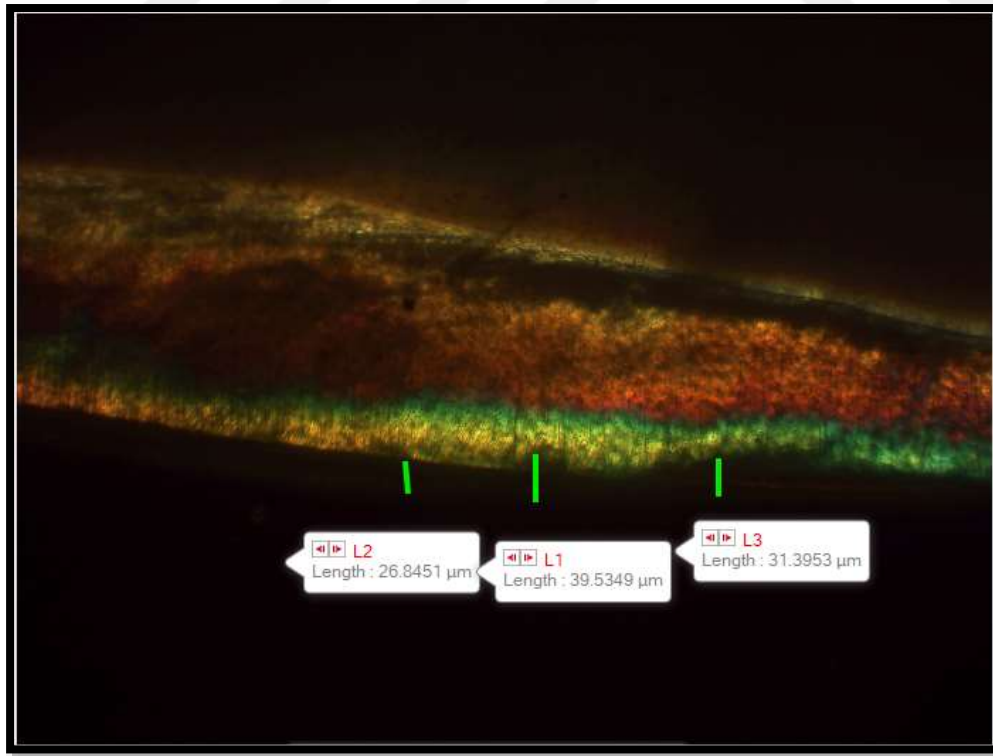


Resim 4.2. 4 haftanın sonunda gruplardan rastgele seçilen bazı numunenin PLM görüntüleri

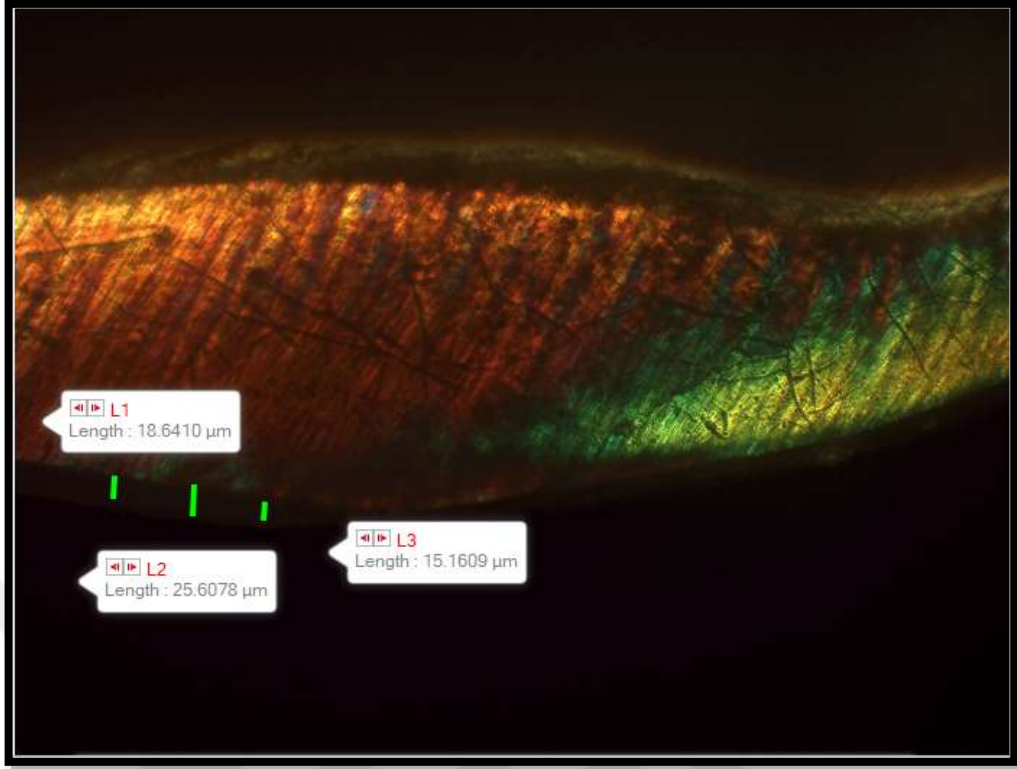
a) Kontrol grubuna ait örneğin 4X büyütmede 4.hafta PLM görüntüsü **b)** Ticari flor jel grubuna ait örneğin 4X büyütmede 4.hafta PLM görüntüsü **c)** MPP3 grubuna ait örneğin 4X büyütmede 4.hafta PLM görüntüsü **d)** ticari flor jel+MPP3 grubuna ait örneğin 4X büyütmede 4.hafta PLM görüntüsü



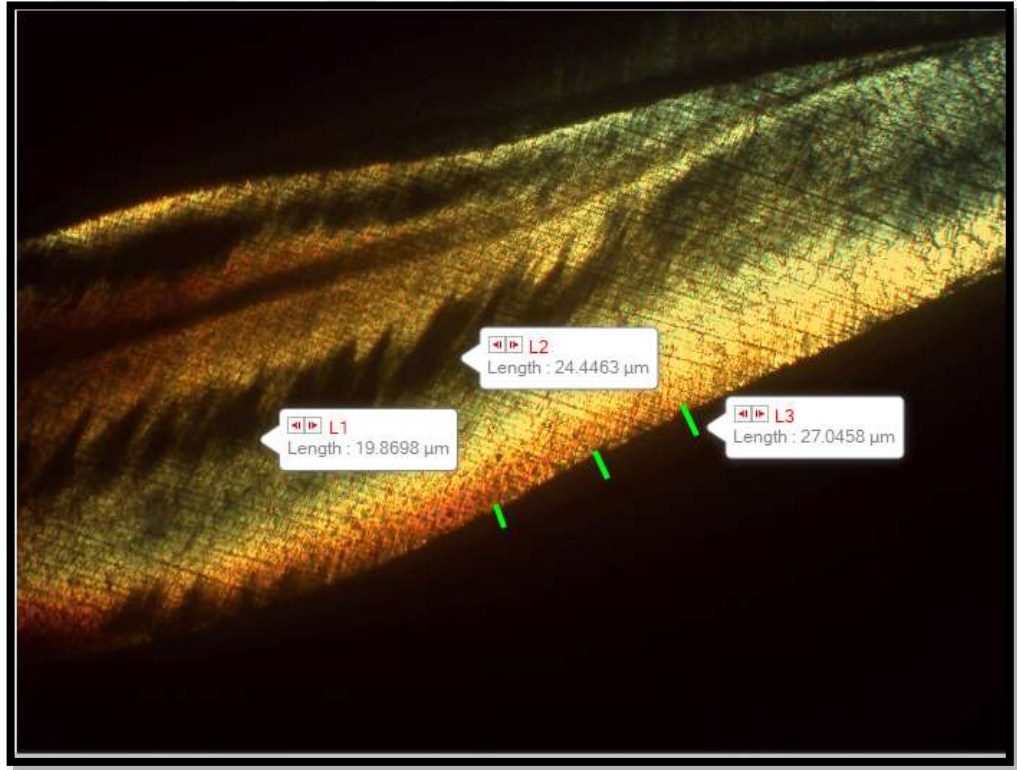
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programnda lezyon derinliği ölçümü



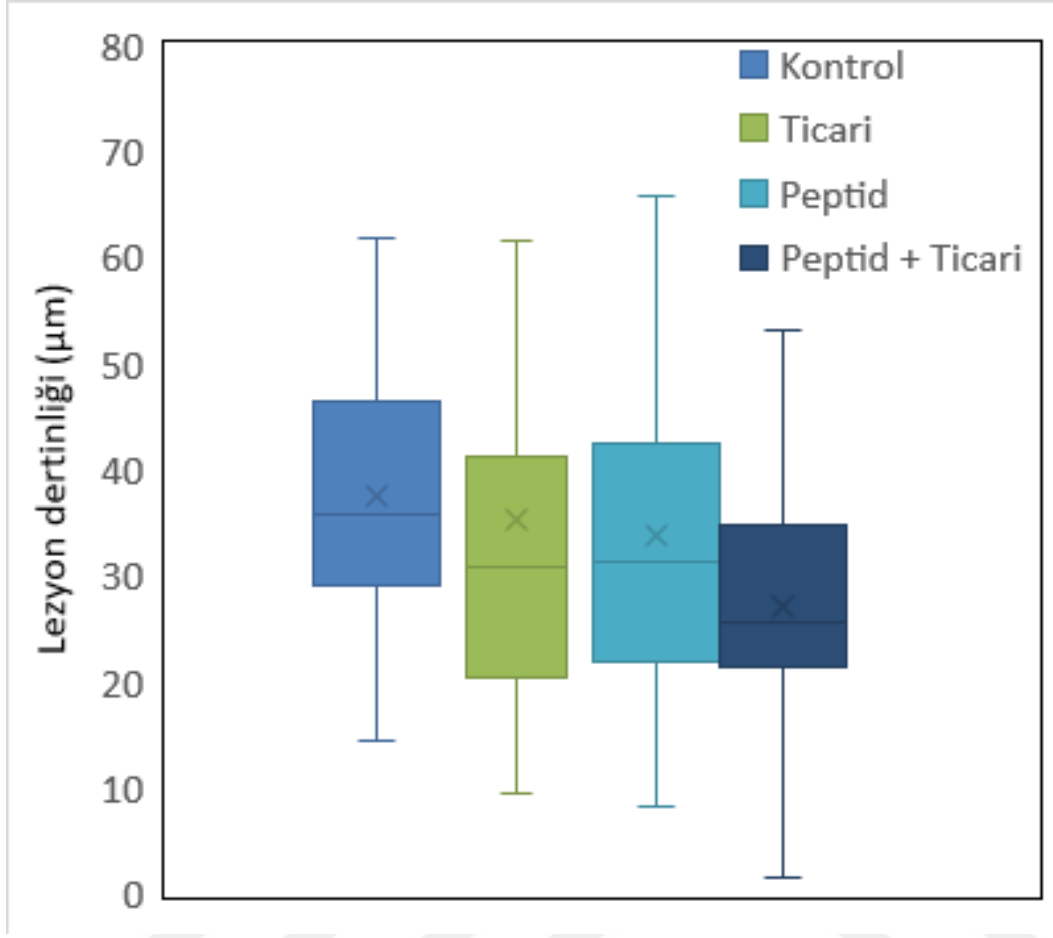
Resim 4.4. Ticari flor jel grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programnda lezyon derinliği ölçümü



Resim 4.5. MPP3 grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü

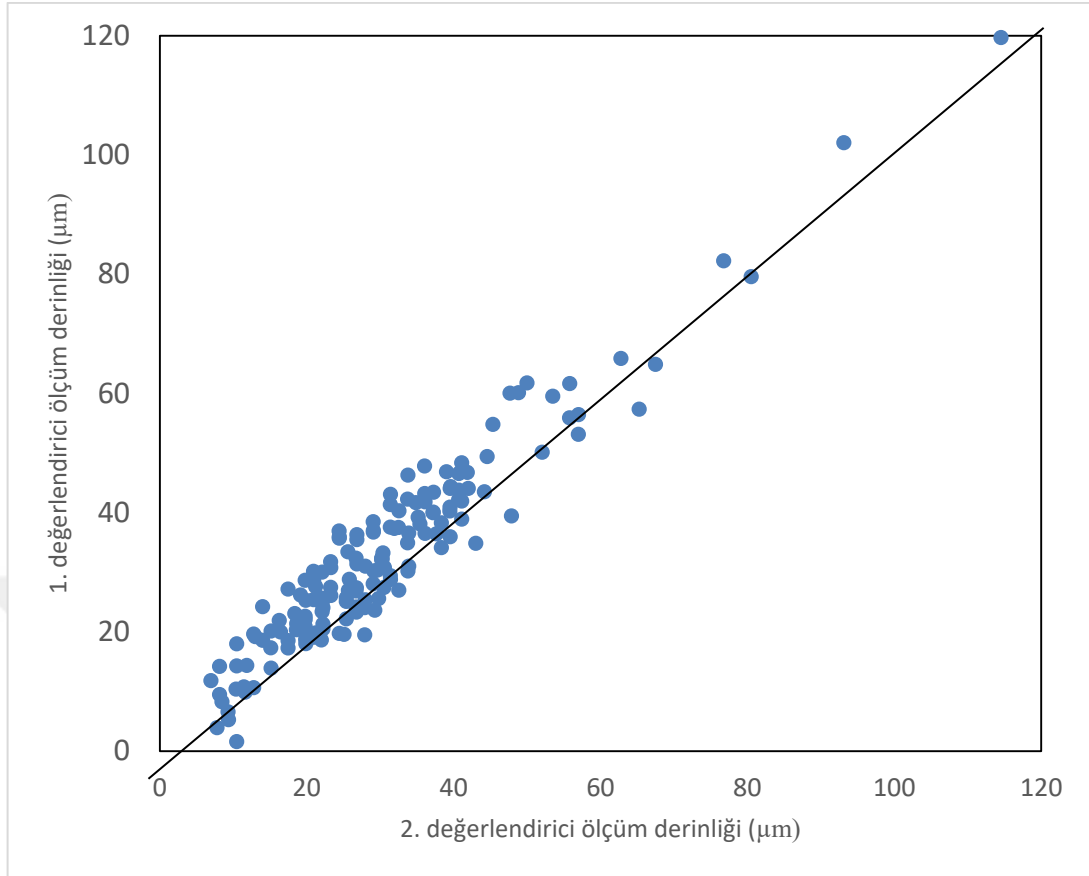


Resim 4.6. Ticari flor jel+MPP3 grubuna ait PLM görüntüsünün Motic programda lezyon derinliği ölçümü



Şekil 4.4. PLM görüntülerine dayalı ortalama lezyon derinlikleri

Sınıf içi korelasyon katsayısı analizinde, “değerlendiriciler arası uyum tahmininin yenilenmiş yorumlama standartlarına” göre çok kuvvetli uyum olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). Ortalama ölçümler sınıf içi korelasyon katsayısı 0,943 ve %95 güven aralığı 0,883-0,968 arasında bulundu. PLM analizlerinde iki değerlendiricinin ölçümlerinin ortalaması kullanıldı.

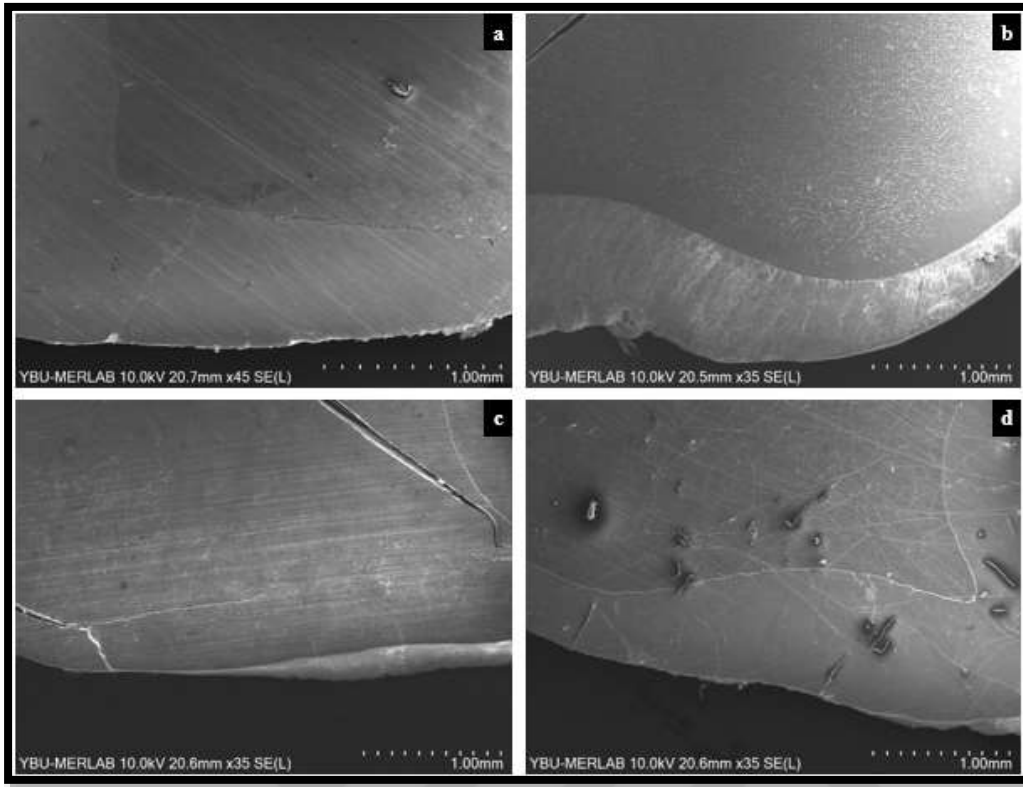


Şekil 4.5. PLM ölçümü yapan araştırmacılar arası uyum ölçümü

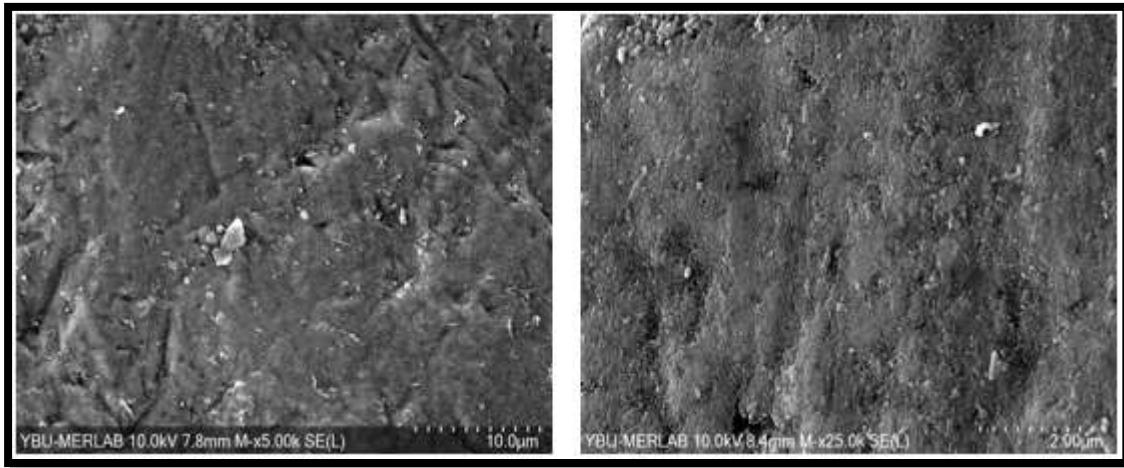
4.4. ALAN EMİSYONLU TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (FESEM) VE ENERJİ DAĞILIM SPEKTROSKOPİSİ (EDS)'NE AİT BULGULAR

4.4.1. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) görüntülemesine ait bulgular

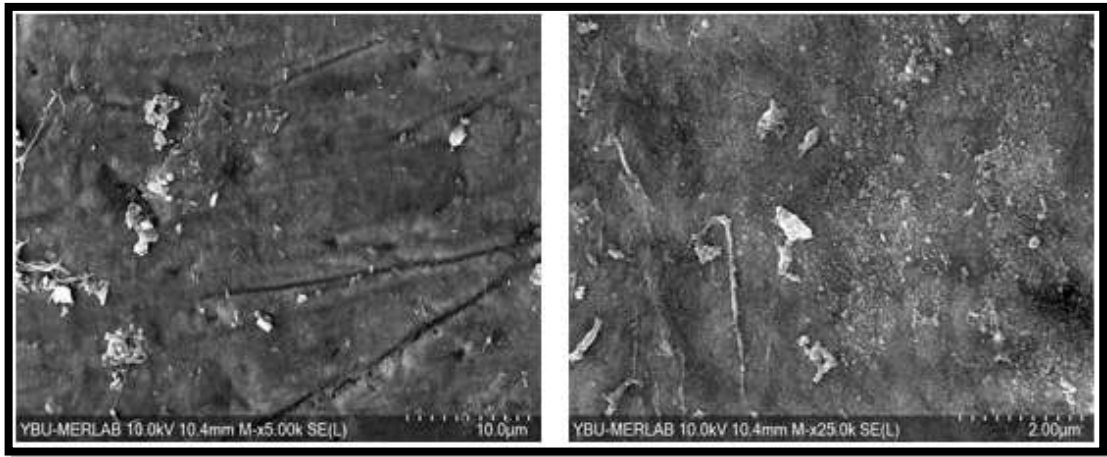
4. Haftanın sonunda örneklerin mine yüzeylerinden ve diş örneklerinin sagittal kesitlerinden FE-SEM görüntüleri alınarak kaydedildi (Resim 4.7, Resim 4.8, Resim 4.9, Resim 4.10, Resim 4.11).



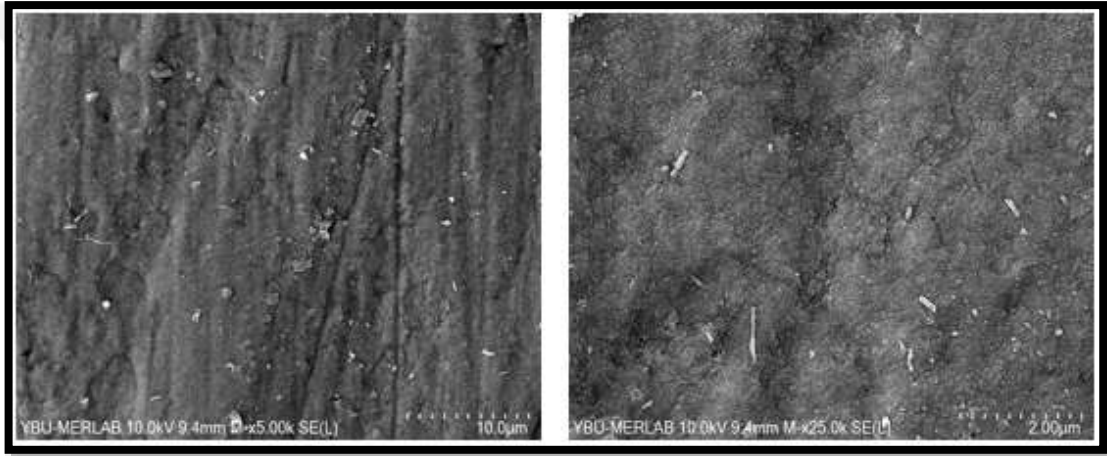
Resim 4.7.a) Kontrol grubuna ait sagittal (cross sectional) kesit FE-SEM görüntüsü **b)** Flor jel grubuna ait sagittal kesit FE-SEM görüntüsü **c)** MPP3 jel grubuna ait sagittal kesit FE-SEM görüntüsü **d)** Flor jel+MPP3 grubuna ait sagittal kesit FE-SEM görüntüsü



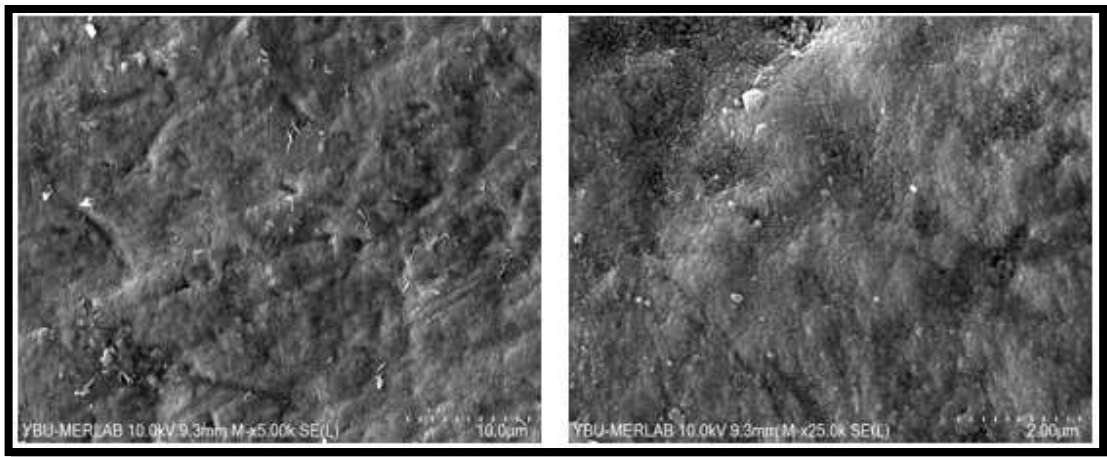
Resim 4.8. Kontrol grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü



Resim 4.9. Ticari flor jel grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü



Resim 4.10. MPP3 grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü

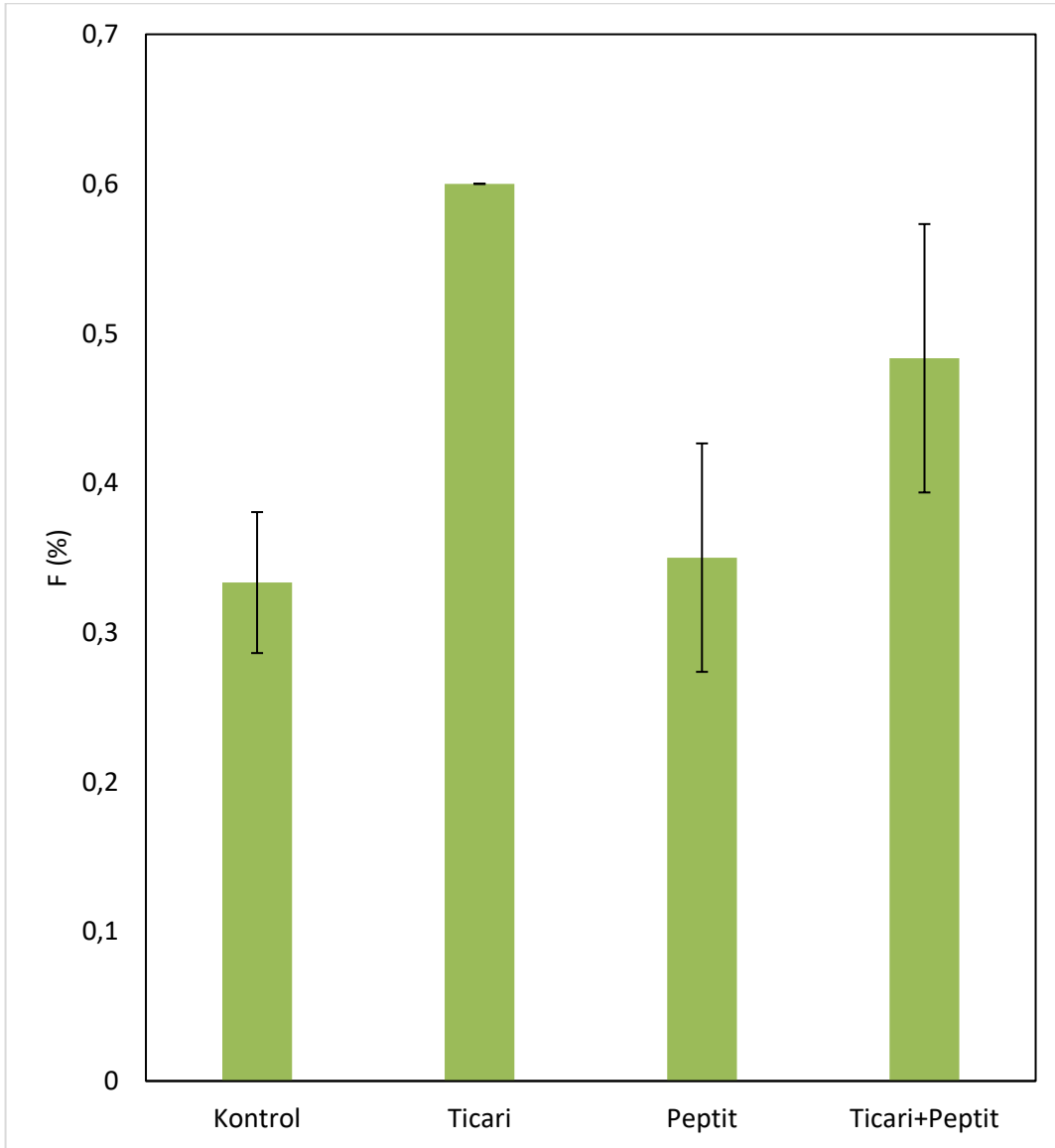


Resim 4.11. Ticari flor jel+MPP3 grubuna ait örneklerin X5000 ve X25000 büyütmede 4.hafta FE-SEM görüntüsü

Alınan FE-SEM görüntülerinde yüzey morfolojileri arasında gözlemlenebilir bir fark tespit edilememiştir.

4.4.2. Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisine ait bulgular

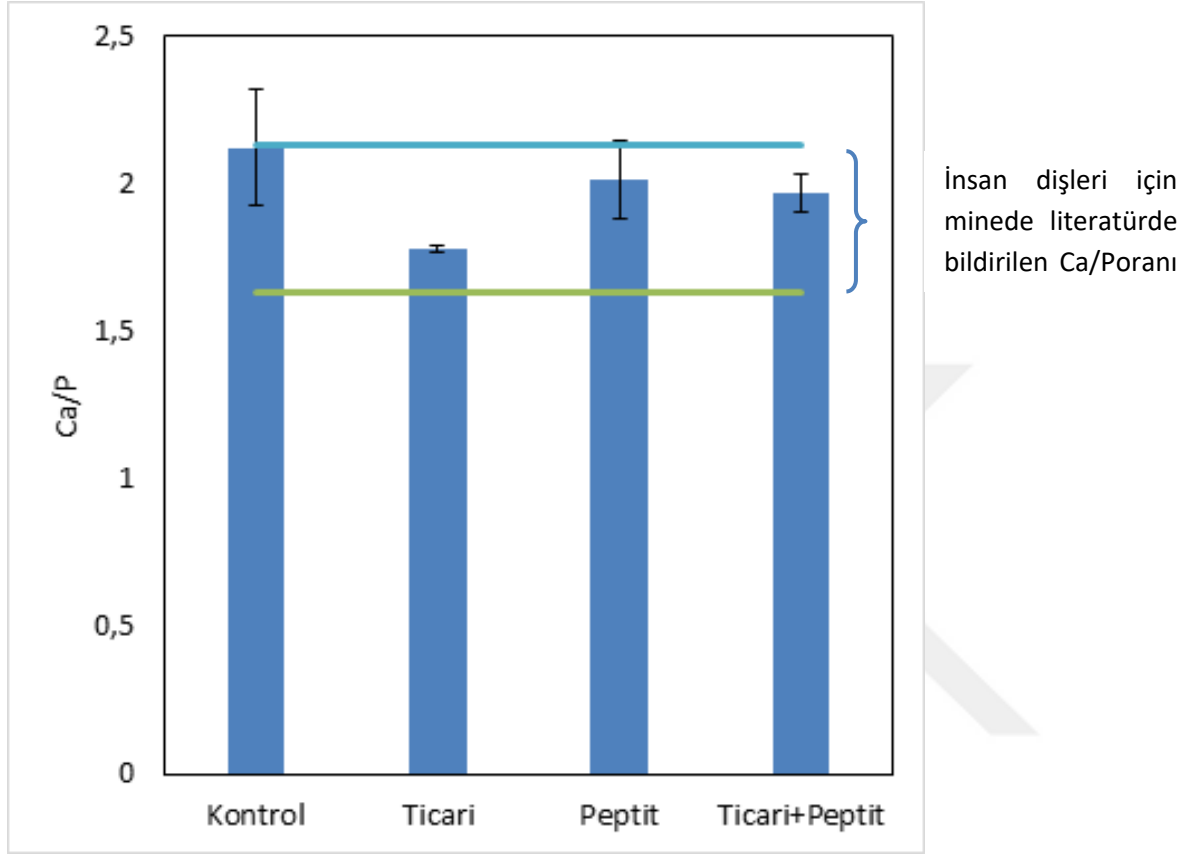
Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi analizlerine göre; gruplar için 4. Hafta sonunda F iyonu yüzdesi Şekil 4.6. da, Ca/P oranı Şekil 4.7. da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. 4. Hafta sonunda gruplardaki F iyonu yüzdeleri

Grafiğe göre F iyon yüzdesi kontrol grubunda % 0,33, ticari flor jel grubunda % 0,6, MPP3 grubunda % 0,35, ticari flor jel+MPP3 grubunda % 0,48 olduğu

gösterilmiştir. Ticari flor jel uygulanan grupta F yüzdesi beklentiler doğrultusunda en yüksek çıkmış, bunu ticari flor jel+ MPP3 uygulanan grubu izlemiştir.



Şekil 4.7. 4 hafta sonra gruplardaki Ca/P oranları

Gruplardaki Ca/P oranları 4. Haftanın sonunda değerlendirildiğinde kontrol grubu sağlam minedekine benzer Ca/P oranına sahip olduğu görülmüştür (142) (143) (144). Ca/P oranları sırasıyla kontrol grubunda 2,12, ticari flor jel grubunda 1,78, MPP3 jel grubunda 2,01, ticari flor jel+MPP3 grubunda 1,96 olduğu bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında uzun zamandır çocuk diş hekimliğinde çürükten koruyucu bir ajan olarak kullanılan flor jelin ve çürükten korunmada farklı bir yaklaşım sunabileceği düşünülen biyomimetik bir ajan olan MPP3'ün sağlam süt dişi minesindeki koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Diş çürüğü, dişlerin kalsifiye dokularının bakteriyel bir hastalığı olarak tanımlanabilir. Bir dişin inorganik içeriğinin demineralizasyonu ve organik içeriğinin yok edilmesi ile karakterizedir (145). Çürüklerin önlenmesi geleneksel olarak florür uygulamalarına, diyet kontrolüne, kapsamlı ağız hijyenine ve antibakteriyel önlemlere dayanmaktadır (146). Daha farklı bir ifadeyle çürüğü önlemede patojenik bakterileri kontrol etmeye, demineralizasyonu inhibe etmeye ve remineralizasyonu teşvik etmeye odaklanılmaktadır (147). Son zamanlarda çürük oluşumunu önlemek, demineralize mine dokusunu remineralize etmek için kullanılan bir çok remineralizasyon ajanı mevcuttur. Bu remineralizasyon ajanları çürük lezyon tedavisinde hala altın standart olarak kabul edilen florür başta olmak üzere, CPP-ACP, biyoaktifcam, fTCP, biyomimetikler, biyofilm modifiye ediciler olarak sıralanabilir (148).

Bu tarihe kadar florür, başlangıç çürüklerini önlemek ve tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir ajan olmuştur. Çürük önleyici etkilerine ilişkin yıllardır oluşmuş kanıtlar nedeniyle bilimsel kuruluşlar tarafından florür kullanımı önerilmektedir (8). Fakat florürün yaygın kullanımının florüre dirençli oral Streptococcus türlerinin ortaya çıkmasına neden olabileceği bazı yazarlar tarafından gündeme getirilmiştir (149).

Florun remineralizasyonu teşvik etme yeteneği, kalsiyum ve fosfat iyonlarının mevcudiyeti ile sınırlıdır. Florür uygulandığında tükürük veya plakta yeterli kalsiyum ve fosfat iyonları mevcutsa, florür iyonları mevcut kavitesiz çürük lezyonlarının remineralizasyonunu sağlayabilir. Florür, hidroksiapatitteki hidroksil iyonlarını kısmen değiştirerek, aside daha dirençli bir mineral olan FA oluşturarak çalışır. FA veya FHA oluşması için florür iyonlarının yanı sıra kalsiyum ve fosfat iyonları da gereklidir (3). Bu durum F'un limitasyonlarından bir tanesidir. Bir diğer konu florür esas olarak minenin dış yüzeyinin remineralizasyonunu artırır ve lezyon gövdesini

tamamen remineralize etmeden sadece yüzeysel bir remineralizasyon tabakası oluşturur (70,101,150,151). Yapılan çalışmada florürün tükürük aracılı remineralizasyonunun dişin dış 30 µm'si ile sınırlı olduğu görülmektedir (152). Bu sadece yüzeydeki remineralizasyonu iyileştirir, yüzey altı lezyonunun ne estetiğini ne de yapısal özelliklerini iyileştirmez (4). P11-4 peptit ya da doğal mine proteini olan amelogenin gibi biyomimetikler ise başlangıç çürük lezyonun alt tabakasına da nüfuz edebilirler (114,153). F ile ilgili bir başka limitasyon toksisite problemleridir. Dental uygulamalarda kullanılan dozlar akut zehirlenme riski oluşturmaz. Bununla birlikte, düşük dozlara uzun süre maruz kalmak iskelet sisteminde florozise ve özellikle altı yaşın altındaki çocuklarda diş florozisine neden olur (154,155). Topikal %1,23 APF uygulamasından sonra florun önemli ölçüde plazma ve idrar düzeyinde sistemik absorpsiyonun olduğu literatürde geçmektedir (156). Uygulanan topikal florürün yutulması durumunda sistemik bir etkisinin olabileceği unutulmamalıdır (68,157).

Florürün klinik alanda çürük seviyelerinin azaltılmasına katkısı ispatlanmış olsa da, yüksek çürük insidansı, sık diyet veya gastrik asit erozyonu olan bazı kişilerde hala yetersiz olduğu görünmektedir. Bunun yanı sıra dünya genelinde diyetlerin işlenmiş, şeker yüklü olması ve florürün onarım potansiyelinin sınırlı olması nedeniyle diş çürüğünün azalmasında hedeflenen etkilere ulaşılamamıştır (128). Bu durum florürün remineralize edici potansiyelini arttırma veya F'a alternatif yeni stratejiler bulma ihtiyacını arttırmaktadır (4,158). Florürün remineralize edici potansiyelini arttırmaya yönelik bir yaklaşım, ağız bakım ürünlerine daha fazla florür eklemek olabilir. 5000 ppm florürlü diş macunlarının, kök çürüğü lezyonlarının remineralizasyonunda 1000 ppm ve 1500 ppm florürlü diş macunlarından daha etkili olduğu bulunmuştur (159). Artan diş macunu florür konsantrasyonu ile azalan çürük insidansı arasında bir doz-yanıt ilişkisi gözlenmiştir (160). Ayrıca yakın zamanda florür kimyasal bir nörotoksik madde olarak sınıflandırılmıştır (161). Yüksek konsantrasyonlu florür ürünlerinin kullanımı toplumda endişe uyandırmaktadır. Bu bağlamda florürün konsantrasyonunu arttırmaktansa, florürün etkinliğini artıracak farklı remineralizasyon ajanları ile kombine kullanımının daha güvenli olduğu düşünülmektedir. Klinisyenler florürün etkinliğini artıran veya florürün üzerinde remineralizasyon etkinliği gösteren remineralizasyon ajanları arayışındadır. Son zamanlarda güncel remineralizasyon sistemleri içinde biyomimetikler dikkat

çekmektedir. O nedenle bu tez çalışmasında biyomimetik ajanlardan olan MPP3'ün geleneksel florür jellerle kıyaslanması yapılmıştır.

Biyomimetikler başlangıç çürüğü lezyon gövdesinde mineral kazanımı sağlayan ve buradaki yapıyı yeniden oluşturan sistemlerdir. Mine, dentin gibi çürük atağına cevap verebilen canlı bir doku değildir (145). Rejeneratif olmayan yapısı nedeniyle, mine, demineralizasyon sonrası kendini iyileştiremez ve onarmaz (5). Doku mühendisliği yöntemlerindeki ilerlemeler, mine mikroyapısının rejenerasyonu için güçlü bir potansiyel sergileyen biyomimetik yöntemleri ortaya çıkarmıştır. Mine çürüğü tedavisinde biyolojik bir yaklaşım izleyerek apatit kristallerinin oluşumunu sağlar (4).

Literatürde biyomimetik peptitler ile yapılmış bir çok çalışma yer almaktadır. Chung ve ark.'nın (162) biyoyumlu asparajin-serin-serin (NSS) peptidin 3NSS, 5NSS gibi türevlerinin kullanıldığı çekilmiş üçüncü molar insan dişleri ile yapılmış bir in vitro çalışmada SEM, X-ışını kırınımı (XRD) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi analiz yöntemleri kullanılarak 3NSS peptidin erozyona uğramış minede nanohidroksiapatit kristallerinin oluşumunu desteklediği ve mineyi onardığı gösterilmiştir. Chung ve ark.'nın (163) yaptığı başka bir in vitro çalışmada 3DSS peptit (aspartat-serin-serin) kullanılmıştır. 3DSS peptit asitte demineralize edilmiş insan minesine uygulanmış ve mine yüzeyinde küçük kristal boyutuna sahip apatit oluşumunu desteklediği görülmüştür.

Biyomimetik bir ajan olan amelogeninin kalsiyum fosfat mineralizasyonunun belirli yönlerini kontrol etme yeteneğini göstermek için çok sayıda in vitro çalışma yapılmıştır (164-167).

Han ve ark.'nın (168) bir hayvan modelinde oluşturdukları çalışmada mine çürüğünü rastgele 3 gruba ayırıp, grupları 24 gün boyunca 25mM amelogenin türevli peptit, 1 g/L NaF ve deiyonize su ile muamele etmişlerdir. Sonuçlar kantitatif lazer ışıklı floresans ve PLM ile analiz edilmiş peptit ve NaF ile tedavi edilen grupta, deiyonize su ile muamele edilen gruba göre önemli ölçüde mineral kazanımı sağlandığı görülmüştür. Peptit veya NaF ile tedavi edilen dişlerdeki lezyonların, PLM analizine göre deiyonize suda bekletilen gruba nazaran daha sığ olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan amelogenin türevli peptit, bir sıçan çürüğü modelinde

remineralizasyonu desteklemiştir. Bu sonuç da klinik kullanım için güçlü bir potansiyel olduğunu göstermiştir.

Hossein ve ark.'nın (169) lösinden zengin amelogenin peptiti ile mikro-CT analizi kullanılarak yaptıkları in vitro çalışmada sığır minesinde yapay çürük lezyonları hazırlanmıştır. Lösinden zengin amelogenin solüsyonu ile muamele edilen örneklerde micro-CT analizinde lezyon derinliğinin düştüğü, biyomimetik mineralizasyonun gerçekleştiği görülmüştür.

Chen ve ark. (106) tarafından yapılmış bir in vitro çalışmada PAMAM dendrimerlerin mine kristal yapısında kendi kendine biraraya geldiklerini sağlam mine ile aynı yapı ve mineral fazında kristaller oluşturdıkları gösterilmiştir.

Güngörmüş ve ark. (103) tarafından amelogenin türevli peptid 5 (ADP5) olarak adlandırılan 22 amino asit uzunluğundaki peptitin, demineralize edilmiş insan kök dentini üzerinde hücresiz sement benzeri bir HAP mineral tabakasının oluşumunu kolaylaştırdığı ve bunun da periodontal ligament hücrelerinin bağlanmasını desteklediği gösterilmiştir. ADP5, amelogenin proteininde HAP biyomineralizasyonunda görevli peptit dizilerinden yararlanılarak üretilmiştir. Amelogenin proteinindeki HAP bağlayıcı peptit bölgeleri kalsiyum, fosfat mineralleri ile etkileşime girdiği öne sürülen bölgelerdir. Mineral nükleasyon alanları tespit edilerek amelogeninden türetilen yeni nesil bir peptittir. Biyolojik apatitin çekirdeklenmesinin ve büyümesinin düzenleyicileri olarak görev yapan yeni nesil peptitlerden biri olan MPP3 Güngörmüş ve ark. (9) tarafından yapılmış başka bir çalışmada MPP1, MPP2, MPP4, ADP5 ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada MPP3'ün Ca tüketme hızının, mineralizasyon kinetiğinin ADP5'ten yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ADP5'te plaka benzeri küresel HAP yapıları gözlenirken, MPP3'te daha kristalize iğne benzeri HAP yapıları gözlenmiştir. Bu durum MPP3'ün ADP5'e göre daha yüksek sayıda zıt yüklü aminoasit çifti içermesi ve daha kararsız bir yapıda olmasına bağlanabilir.

Kamal ve ark.'nın P11-4, CPP-ACP, florür ajanlarının çekilmiş daimi molar dişler üzerinde yapılmış bir in vitro çalışmasında CPP-ACP'ye ve flora, P11-4 ilave edilmiştir. P11-4 ilavesi yapılan grupların yalnız CPP-ACP ve F uygulanan grupların üzerinde remineralizasyon etkinliği gösterdiğini bulmuşlardır (101). P11-4 üç boyutlu

fibriler yapı iskeleleri oluşturup, biyoaktif yüzey grupları aracılığıyla diş çürüklerinin tedavisinde ve çürük oluşumunun önlenmesinde kullanılabilir bir ajandır (112). Biyoaktif bir malzeme, vücutta, özellikle konakçı kemik dokusuna bağlanma ve bir malzeme yüzeyinde kalsiyum fosfat tabakası oluşumuna katkıda bulunan bir ajan olarak tanımlanır. Biyoaktif camlar, cam seramikler ve biyoseramikler dahil biyoaktif malzemeler, kemik grefti için yapay malzemeler olarak üzerinde çalışılmıştır (169-171). Diş aynı zamanda mineralize bir doku olduğundan, potansiyel dental uygulamalar için biyoaktif materyaller düşünülmüştür. Aslında, bazı biyoaktif materyaller kalsiyum fosfat oluşumunu indükleyebildiğinden, diş remineralizasyonunda potansiyel uygulamalar için çalışılmış ve literatürde çeşitli biyoaktif teknoloji türleri tanımlanmıştır (27). Bu tez çalışmasında kullanılan MPP3'ün de biyoaktif bir ajan olduğu, diş dokularında biyomineralizasyonda rol alıp iyon değişimine katıldığı görülmektedir.

Daha önce flor vernik ve MPP3'ün yapay başlangıç lezyonunda remineralizasyon etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır (8). Bu tez çalışmasında ise yapay çürük lezyonu oluşturulmadan, MPP3 ve APF jelin in vitro ortamda sağlam süt dişi minesindeki koruyucu etkinlikleri değerlendirilmektedir. % 1,23 APF jel diş hekimliği pratiğinde sık kullanılan bir ajan olması, ucuz ve kolay bir flor uygulama yöntemi olması sebebiyle kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan MPP3 konsantrasyonu benzer peptitlerin kullanıldığı daha önce yapılmış çalışmalar baz alınarak ayarlanmıştır (9,103).

APF'nin, minede nötr jelden (NaF) daha fazla florür oluşturduğu ve karyojenik bir zorluğa maruz kalan mine bloklarının demineralizasyonunu azaltmada nötr olandan daha etkili olduğu Delbem ve ark. (172) tarafından yapılmış çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca bu yayında flor jelin uygulama süresinin F alımı açısından önemli olduğu ancak mineyi demineralizasyona karşı daha dirençli hale getirmediği bulunmuştur. Daha önce yapılmış in vitro remineralizasyon çalışmalarında APF jel mine yüzeyine 4 dk uygulanmıştır (173,174). Her ne kadar APF jelin 1 dk uygulanmasıyla 4 dk uygulanmasının benzer etkiler sağladığını gösteren çalışmalar olsa da MPP3 ile ilgili ideal bir uygulama süresi henüz belirsiz olduğundan çalışmamızda ajanların 4 dk uygulanması tercih edilmiştir (175).

Bu tez çalışmasının in vitro olarak tasarlanması nedeniyle kullanılacak olan pH döngüsünün seçiminde bazı kriterlere dikkat edilmiştir. Ağız ortamında ve diş yüzeylerinde pH değişkenlik göstermektedir (176). Remineralizasyon ihtiyacı olan yüzeylerde meydana gelen oral pH dalgalanmalarını simüle etmek için aralıklı olarak demineralizasyon-remineralizasyon solüsyonları kullanılmalıdır (101). İn vivo çalışmalarda gerçeğe en yakın sonuçlar elde edilmekle beraber, in vivo ortamı in vitro koşullarda simüle etmek çok zordur. Çünkü in vivo çalışmalar hasta işbirliği gerektirir ve in vivo koşullarda standardizasyon sağlamak zorlaşır (177). Diğer taraftan in situ ve in vivo çalışmalar ağız ortamındaki kimyasal, mekanik, termal bir çok faktörün etkisi altındadır. Sonucu etkileyecek bir çok değişkenin bulunması başarısızlığa neden olan gerçek etkenin ayırt edilmesini güçleştirir (178). Araştırmacılar, demineralizasyon-remineralizasyon sürecini incelemek için genellikle in vitro çalışmaları kullanırlar. In vitro çalışmalar, ağız ortamını farklı perspektiflerden simüle eder ve doğal bir ortama göre daha kontrol edilebilir koşullar sunar. In vitro çalışmaların tasarımları genellikle basittir. Basitleştirilmiş çalışma tasarımı deneylerin tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir olmasını sağlar. Ayrıca in vitro çalışmalar, tüm laboratuvar çalışmaları arasında en az masraf gerektiren ve en az zaman harcayan çalışmalardır. Her in vitro modelin kendi çalışma tasarımı vardır. Farklı demineralizasyon-remineralizasyon modellerinde çürük lezyonların oluşturduğu morfoloji ve mineral kaybı değişiklik gösterir. Bu tez çalışmasında pH döngüsü modeli tercih edilmiştir. pH döngüsü modeli nötr ortamının periyodik olarak asit ataklarıyla kesintiye uğradığı bir şemaya dayanmaktadır. Bir çürük lezyonu oluşturmak için şekerler metabolize edildiğinde ağızda meydana gelen pH değişimini in vitro taklit etmeyi amaçlar. pH döngüsü modelinin önemli bir avantajı, çürük oluşumunda yer alan mineral kaybı ve kazanım dinamiklerini taklit etmek için tasarlanmış olmasıdır (179). Bu nedenle bu tez çalışmasında MPP3 ve florun sağlam süt dişi minesinde koruyucu etkinliği in vitro koşullarda 1 ay boyunca 6 saat demineralizasyon 18 saat remineralizasyon yapılan bir pH döngüsü kullanılarak değerlendirilmiştir. Wierichs ve ark. (180) sığır dişi minesinde peptit ve çeşitli konsantrasyonda flor solüsyonu ve düşük vizkoziteli rezinin remineralizasyon etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada 6 saat demineralizasyon 18 saat remineralizasyon modeli kullanılmıştır. Süt dişlerinde çeşitli miktarlardaki florlu diş macununun yapay çürük lezyonları üzerindeki

etkinliğinin değerlendirildiği bir in vitro çalışmada 6 saat demineralizasyon, 18 saat remineralizasyon pH döngüsü modeli kullanılmıştır (157). Ancak in vitro çalışmalarının çeşitli handikapları da mevcuttur. Örneğin in vivo ortam dinamiklerinden olan diş yüzeyinde bulunan biyofilm ve pelikül faktörünün olmaması in vitro çalışmalarının en büyük limitasyonlarından bir tanesidir.

Bir diğer konu da biyomimetik ajanlarla mine yüzeyinde yapılmış remineralizasyon çalışmalarında genelde daha kısa pH döngüsü süreleri seçilmiş olmasıdır (181-183). Remineralizasyon uzun vadeli bir süreçtir. Bu yüzden çalışmamızda 4 hafta süren pH döngüsü modeli uygulanmıştır.

Literatürde çürük önleyici etkinlik açısından flor ve peptit ajanları ile yapılmış çalışmaların çoğu daimi dişlerle veya sığır dişlerinde yapay çürük lezyonları oluşturularak remineralizasyon etkinliklerinin ölçümü şeklinde tasarlanmıştır (184-191). Süt dişlerinde çürükten koruyucu etkinliği ölçmek için yapılan az sayıda çalışma vardır. Daimi dişlerdeki çürük insidansı süt dişlerdeki çürük prevalansına göredir. Bu nedenle süt dişlerini çürüklerden korumanın önemi, tüm bireylerde sağlıklı daimi dişler sağlamak için önemlidir. Bu bağlamda bu tez çalışmasında süt dişinde koruyucu etkinlik araştırılmak istenmiştir.

Remineralizasyon ajanlarının mine üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda mikrosertlik testi (192), micro-CT (132), SEM (101), EDS, PLM (8), kantitatif lazer ışınli floresans (193), lazer floresans (194), radyoaktif izotop (114) gibi bir çok analiz yöntemi kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında mine yüzeyindeki mekanik özelliklerin değişimini gözlemlemek için mikrosertlik analizi, kullanılan ajanların mine yüzeyi morfolojisine etkisini gözlemlemek için FE-SEM analizi, element dağılımlarını görmek için EDS, pH döngüsü sonrası minede oluşan lezyon derinliklerini ölçmek için PLM analizi, mine yüzeyinde mineral yoğunluğu değişimini başlangıçta ve sonrasında ölçmek için micro-CT analizi gibi birbirini tamamlayan yöntemler tercih edilmiştir. Böylece remineralizasyonun farklı yönleri hakkında detaylı bir inceleme yapılmıştır.

Mikro sertlik analizinde mine sertliğinin en doğru şekilde değerlendirilmesi için düzleştirilmiş cilalı yüzeyler gereklidir ve test yüzeyi elmas ucun uzun eksenine dik olarak yerleştirilmelidir. Bu durum doğal dişlerin morfolojisi nedeniyle,

mikrosertlik ölçümünün doğruluğunu sınırlar (121). Literatürde çekilmiş dişlere uygulanan remineralizasyon ajanlarının etkilerini değerlendirmek amacıyla mikrosertlik testinin kullanıldığı birçok çalışma vardır (88,110,145,195).

Benzer bir çalışmada süt dişlerinde yapay çürük lezyonu üretmek için kullanılan 6 saat demineralizasyon 18 saat remineralizasyon uygulanan pH döngüsünde %1,23 APF jel, %5 flor vernik kaynakları ile kombine edilmiş veya edilmemiş Nd:YAG lazer kullanılmıştır. Çalışmada mikrosertlik ve lezyon derinliği değerlendirilmiştir. Mikrosertlik yüzey değişim yüzdesi en düşük APF ve APF+lazer uygulanan grupta olduğu, lezyon derinliğinin en az görüldüğü grubun da yine APF+lazer uygulanan grup olduğu bulunmuştur (196).

Nanoparçacıklı APF jelinin, geleneksel APF jele karşı çekilmiş insan dişi minesine üzerine 4 dk uygulanarak 30 gün yapay tükürükte bekletilen örneklerin yüzey mikrosertliğine etkisinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada ölçümler başlangıçta, 1. gün ve 30. gün yapılmıştır. 1. günün sonunda hem APF jel hem nanoparçacıklı APF jel grubunda yüzey mikrosertliğinde önemli bir artış gözlenmiştir. 30 gün sonra her iki gruptaki mikrosertlik 1. gün bulunan sonuca kıyasla azalmıştır (197).

Akbari ve ark.'nın (198) flor vernik, flor jel, CPP-ACP'nin daimi dişlerde yapay çürük lezyonuna uygulanarak mikrosertlik değerine etkilerinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada, ortalama mikrosertlik flor jel (%2,59 APF) grubunda $241,21 \pm 15,60$, flor vernik (Enamelast, Ultradent) grubunda $221,12 \pm 75,69$, CPP-ACP grubunda $211,16 \pm 43,04$ ve kontrol grubunda ise $178,21 \pm 63,9$ olarak bulundu. Tüm remineralize edici bileşikler, minenin mikrosertliğini arttırdı. Bununla birlikte, florür içeren ürünler, CPP-ACP içeren bileşiklere kıyasla dişlerin mikrosertlik seviyesini iyileştirmede daha büyük potansiyel göstermiştir.

Bu tez çalışmasında başlangıçta mikrosertlik değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, 4. haftanın sonunda MPP3, flor jel+MPP3 grubundaki mikrosertlik değerlerinin diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca 4. haftanın sonunda MPP3 uygulanan grupta mikrosertlik değişim yüzdesinin, flor uygulanan gruptan yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum MPP3'ün başlangıç lezyonunun sadece yüzeyinde değil yüzeyaltında da remineralizasyon sağlaması ve burada daha stabil bir kristal yapı

oluşturmasına bağlanabilir. Şekil 4.1. grafiği incelendiğinde MPP3'ün ticari flor jele göre mikrosertlik değişimin 1. Haftaya kadar flor jele göre daha yavaş bir artış gösterdiği, 1. haftadan sonra flor jel kadar hızlı bir düşüş göstermediği görülmektedir. Bu durum, MPP3'ün mikrosertliği hızlı bir şekilde arttırmaktan ziyade demineralizasyona direnmedeki etkinliği olarak kabul edildi. Sonuç olarak biomimetik bir ajan olan MPP3'ün hem tek başına hem de ticari flor jel ile beraber kullanıldığında mikrosertlik değerlerini olumlu ölçüde artırdığı görülmüştür. Mikrosertlik analizinden elde edilen bulgular ile diğer analizlerle elde ettiğimiz bulgular uyumludur.

Nicolae ve ark.'nın (199) topikal sodyum florür uygulamasından sonra mine yüzeyindeki morfolojik değişiklikleri inceledikleri bir in vitro çalışmada insan dişlerinden elde edilmiş sağlam mine kesitleri üzerinde çalışılmıştır. % 0,05 sodyum florür solüsyonu ile muamele edilmiş mineye 60 sn % 37 fosforik asit uygulayarak demineralizasyon alanları oluşturulmuştur. Demineralizasyon alanları, 30 gün boyunca günde iki kez 100 mL sodyum florür solüsyonuna daldırılmıştır. SEM görüntüleri incelemesinde mine yüzeyinde florür rezervuarı görevi gören amorf CaF_2 çökeltilerinin küresel yapılar oluşturduğu gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan farklı remineralizasyon ajanlarının mine yüzeyinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskop yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmamızda morfolojik farklılıkları daha detaylı incelemek için X5000 ve X25000 iki farklı büyütme kullanılmasına rağmen alınan görüntüler incelendiğinde gruplar arasında morfolojik bir farklılık tespit edilememiştir. Bu durum yüzeye herhangi bir asitleme işlemi yapılmamasına, remineralizasyon ajanları uygulanmadan önce mine apizmatik yapının kaldırılmamış olmasına bağlanmaktadır. Cehong ve ark. tarafından (200) süt ve daimi diş minesine çürük oluşum insidansında azalmayı sağladığı bilinen APF uygulamasının ardından süt dişi minesinin yüzeylerinin ve APF uygulamasının ardından asitle muamelesi sonucu demineralize olmuş süt dişi minesinin morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiştir. İki süt dişi minesinin morfolojik farklılıkları görüntülenmiştir. Ayrıca süt dişleri daimi dişlere göre daha sık prizmasız bir tabaka göstermektedir. Bu prizmasız tabakanın asitle aşınma direnci gösterdiği kabul edilmiştir.

Eymirli ve ark.'ları (201) tarafından süt molar dişlerinde çürükten koruyucu etkinliğin değerlendirilmesinde üç farklı florür formu (nötr NaF jeli, APF jeli ve NaF verniği), CPP-ACP tek başına ve lazerle kombine bir şekilde kullanılmıştır. Örnekler 5 gün boyunca 6 saat demineralizasyon 18 saat remineralizasyonun uygulandığı pH döngüsünde kalmış, ardından 2 gün boyunca remineralizasyon solüsyonunda bekletilmiştir. Tüm gruplarda pH döngüsünden sonra ortalama mikrosertlik değerleri başlangıç değerine göre azalırken, ancak APF uygulanan grup için istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır. SEM görüntülerinde remineralizasyon ajanları ve lazer uygulamasından sonra mine yüzeylerinde CaF_2 benzeri partiküller gözlenirken pH döngüsünden sonra CaF_2 benzeri partiküllerde azalma, yüzey yapısında bozulma ve porozitede artış gözlenmiştir. Tez çalışmamızdaki in vitro modele çok benzer bir şekilde tasarlanmış bu çalışma baz alınarak, elde ettiğimiz FE-SEM görüntülerinin arasında morfolojik bir fark gözlemleyememiz görüntülerin 4 hafta süren pH döngüsü sonrasında alınmış olmasına bağlanabilmektedir.

Micro-CT invaziv olmayan, numune hazırlamak için daha az zaman gerektiren, mineral yoğunluğundaki sayısal değişiklikleri değerlendirmek için tercih edilen bir yöntemdir. Buna karşılık histolojik inceleme, zaman alan bir yöntem olmakla beraber, incelenen dişin tamamen tahrip olmasına neden olur. Bu konuda altın standart olarak kabul edilen transversal mikroradyografi (TMR) ve PLM, diş örneklerinin histolojik kesitini gerektirir ve bu nedenle yapısı gereği yıkıcıdır ve yalnızca 2 boyutlu görüntülerden bilgi sağlar (6) (131). Ayrıca micro-CT minimum dilim kalınlığı yalnızca X-ışını demetinin boyutuna bağlıdır, bu nedenle micro-CT dilimleri, bir kesme makinesi kullanılarak dilimlenenlerden çok daha ince olabilir (128). Bu koşullar araştırmacılara micro-CT analizlerinde hassasiyet sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında yaptığımız micro-CT analizi sonucunda 4 haftalık karyojenik pH döngüsü ardından mineral yoğunluğunu en iyi koruyan flor jel+MPP3 grubu olup bunu MPP3 grubu izlemiştir. Grupların başlangıçtan 4. hafta sonuna kadarki mineral değişim yüzdeleri incelendiğinde en fazla mineral kaybı yüzdesi gözlemlenen grup beklentiler doğrultusunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kontrol grubu olmuştur. Bunun yanı sıra istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa dahi karyojenik pH döngüsüne karşı en koruyucu olan yöntem flor jel+MPP3 olarak ön plana çıkmıştır. Benzer şekilde pH döngüsü ile süt dişlerinde yapılmış bir in vitro

çalışmada 1mm×1mm'lik pencere bırakılarak yapay çürük lezyonları oluşturulmuştur. Örnekler rastgele kontrol grubu, bioaktifcam, 500 ppm florlu diş macunu, 1000 ppm florlu diş macunu, CPP-ACP'yi içeren 5 gruba ayrılmıştır. 7 gün süren pH döngüsünden sonra micro-CT analizi sonucunda mineral yoğunluğundaki yüzde değişimi incelendiğinde biyoaktif camın 500 ppm F içeren diş macunu ve CPP-ACP'ye karşı önemli bir üstünlüğünün olmadığı tespit edilmiştir. Ancak biyoaktif camın 1.000 ppm F içeren diş macunundan önemli ölçüde daha az etkinlik gösterdiği bulunmuştur (202). Micro-CT kullanılarak daimi dişler üzerinde florür ve Er:YAG lazerin mine demineralizasyonunu önleyici etkisinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada mineral yoğunluğu kaybı yüzdesi florür uygulanan grupta $7,669 \pm 2,255$, Er:YAG uygulanan grupta $6,341 \pm 2,204$, florür+Er:YAG uygulanan grupta $4,870 \pm 1,434$ olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak florür ve lazer tedavisinin demineralizasyonu önleyici etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (203). Bu tez çalışmasında mineral yoğunluğu kaybı flor jel+MPP3 grubunda % 2,62, MPP3 grubunda % 9,57 oranındadır (Bk. Çizelge 4.2.).

Sağlam süt dişi minesindeki mineral yoğunluğunun değerlendirildiği bir çalışmada, test edilen dişlerin ortalama mineral yoğunluğunun $2,81 \text{ gr/cm}^3$ olduğunu bulmuşlardır (204). Bu tez çalışmasında MPP3+ flor jel uygulanan grupta 4. Haftanın sonunda mineral yoğunluk değeri ortalama $2,76 \text{ gr/cm}^3$ çıkmış olup flor jel grubuna göre sağlam süt dişi mineral yoğunluk değerine en yakındır.

Çekilmiş insan premolar dişleri üzerinde % 1,23 APF ile birlikte CO₂ lazer uygulanmasının minenin demineralizasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesinde, 1dk ışınlamanın ardından dişler 72 saat demineralizasyon solüsyonunda bekletilmiştir. Micro-CT kullanılarak yapılan minenin derinliğine bağlı mineral yoğunluğu analizinde APF+lazer uygulanan grupta flor konsantrasyonunun sadece APF uygulanan gruptan daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (205).

Nakata ve ark.'nın (206) sığır minesinde yapay çürük lezyonu oluşturularak yapmış olduğu bir çalışmada 4 hafta boyunca remineralizasyon solüsyonunda bekletilen örneklerin micro-CT taraması yapılmıştır. 1., 2.,3. ve 4. haftalarda ölçülen mineralizasyon yüzdesinin her hafta giderek artış gösterdiği bulunmuştur.

Ding ve ark. (182) yaptıkları çalışmada tuftelin türevi peptit kullanmışlardır. Bir mine matriks proteini olan tuftelin kristalleşmenin başlamasını ve hücre dışı HAP kristallerinin şeklini ve boyutunu kontrol etmede anahtar bir rol oynar. Biyomimetik mine mineralizasyonunu desteklemesi, demineralizasyonu engellemesi beklenen bu ajanın etkinliği, çekilmiş insan dişi minesinde başlangıç çürük lezyon oluşturularak 12 gün pH döngüsü modelinde incelenmiştir. Tuftelin türevli peptitin uygulandığı grupta lezyon yüzeyinde ve derininde oluşturduğu değişiklikleri gözlemlemek için PLM kullanılarak, 1 g/L NaF ve deiyonize su uygulanan gruplar ile karşılaştırıldı. Tuftelin türevli peptit ve NaF uygulanan gruplarda, deiyonize su uygulanan gruba göre önemli ölçüde daha sığ lezyonlar olduğu ve daha az mineral kaybı meydana geldiği bulunmuştur. Tufterin türevli peptit ve NaF grubunda lezyon derinliği 20-40µm arasında seyrederken, deiyonize su grubunda 40-60 µm aralığında seyretmektedir. Bu tez çalışmasında PLM analizi sonucu lezyon derinliği ortalamaları kontrol grubunda $37,3 \pm 12,7$, ticari flor jel grubunda $35,3 \pm 21,9$, MPP3 grubunda $33,8 \pm 15,6$, ticari flor jel+MPP3 grubunda ise $27 \pm 12,5$ değerleri elde edilmiştir (Bk. Çizelge 4.3.). Çalışmamızda lezyon derinliklerinin daha sığ çıkması başlangıçta yapay çürük lezyonu oluşturulmamış olmasına bağlanabilir. PLM ölçüm derinliği analizi tek bir araştırmacı tarafından değil 2 farklı araştırmacı tarafından yapılmış ve ölçüm sonuçlarının tutarlılığı “değerlendiriciler arası uyum tahmininin yenilenmiş yorumlama standartlarına” göre karşılaştırılmıştır (207). Böylece daha objektif ve güvenilir bir sonuç elde edilmeye çalışılmıştır (Bk. Şekil 4.5.).

Bu tez çalışmasındaki EDS analizi bulgularında Ca/P oranının bütün gruplarda sağlam minedekine benzer olduğu görülmüştür. Bir dizi çalışmada minedeki Ca/P oranı için farklı değerler bulunmuştur (23-26). Diş sert dokularına uygulanan remineralizasyon ajanları minenin mineral içeriğine katkıda bulunur. Fakat çalışmalar arasındaki farklılıkların nedenlerini açıklamak zordur ve Ca/P oranının gerçekte neyi temsil ettiği tam olarak açık değildir (208). Alifakioti ve ark.’nın (209) hipomineralize süt dişi minesini ile sağlam minenin özelliklerini karşılaştırdığı bir çalışmada Ca/P oranı için sağlam ve hipomineralize mine arasında istatistiksel bir fark çıkmamıştır. Mahoney ve ark.’nın (210), Fagrell ve ark.’nın (211) yaptıkları çalışmalarda Ca, P, O ve C konsantrasyonu ile Ca/P oranı arasında istatistiksel olarak

anlamalı bir fark bulunamamıştır. Bu bilgiler ışığında Ca/P oranının remineralizasyonun göstergesi olmadığı söylenilebilir.

Biyopolimer bazlı bir hidrojelde kitosan ve agarozun eşzamanlı kullanımına ilişkin yapılan biyomimetik remineralizasyonun hedeflendiği bir çalışmada Ca/P oranı doğal diş minesine benzer şekilde 1,62-1,75 arasında bulunmuştur (212). Nanohidroksiapatit ile insan premolar dişleri üzerinde yapılmış bir in vitro çalışmada, ilk başta mine yüzeylerinde başlangıç çürük lezyonu oluşturulmuştur. Nanohidroksiapatit ile muamele edilen grupta Ca/P 1,52 değerindedir ve biyolojik mineninkine yakın bir Ca/P oranı sergiler (213). İnsan daimi dişlerinde yapay çürük lezyonu oluşturularak nHAP ve kitosanın biyomimetik remineralizasyon etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada kitosan ile muamele edilmiş grupta Ca/P oranı 1,61, nHAP ile muamele edilmiş grupta Ca/P oranı 1,58 idi. HAP gerçek değeri 1,67 kabul edilmektedir (214). ADP5 kullanılarak yapay mine çürüğü oluşturulan insan dişi üzerinde yapılmış bir biyomimetik rejenerasyon çalışmasında, ADP5 ile muamele edilen grubun Ca/P oranı 1,54 bulunmuştur (5). Bu tez çalışmasında flor jel+ MPP3 grubunda Ca/P oranı ortalama 1,94 değerindedir. Ayrıca MPP3 uyguladığımız grupta Ca/P oranının ticari flor jel uygulanan gruptaki Ca/P oranından yüksek olması MPP3'ün Ca^{+2} iyonlarını yapısında daha kararlı bir şekilde tutmuş olmasına dayandırılabilir.

Mine matriks proteinlerinin başlangıç lezyonunun remineralizasyonundaki etkisinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada sığır dişlerinden mine blokları elde edildi ve örnekler 24 gün pH döngüsü rejimine tabi tutuldu. Her döngüde gruplara sırayla 3 dk 1 g/L NaF sulu solüsyonu, % 6 propilen glikol aljinat (PGA), deiyonize su, mine matrisi türevi ve PGA'dan (EMDgel) oluşan bir jel uygulandı. NaF örnekleri, tüm gruplar arasında en yüksek mikrosertlik kazanımı, daha az mineral kaybı, daha sığ lezyonlar gösterdi. EMDgel numuneleri, PGA numunelerinden önemli ölçüde daha yüksek mikrosertlik değeri, daha az mineral kaybı ve daha sığ lezyonlar ile sonuçlandı. EMDgel'in aktif bileşeni olan EMD (mine matriks türevleri), başlangıçtaki mine çürük lezyonlarının remineralizasyonunu teşvik etmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, bir bütün olarak EMDgel, bu tür lezyonların in vitro olarak saptanabilir bir şekilde remineralizasyonuna neden olmamıştır (23).

Bu tez çalışmasının limitasyonları arasında literatürde daha önce süt dişlerinde biyomimetik ajanların etkinliğinin araştırıldığı çok az çalışma bulunması söylenebilir. Bu durum parametrelerin karşılaştırılamaması gibi bir kısıtlılık oluşturmuştur. Bir başka limitasyon, çalışmada kullanılan dişlerin her ne kadar çürüksüz olmasına defekt içermemesine dikkat edilse de dişlerin ağız ortamında maruz kaldıkları etkenlerin bilinmemesidir. Çalışmada kullanılacak dişler çürük, mine defekti, çatlak içermeyecek şekilde seçilmeye çalışılsa da başlangıçta alınan micro-CT analizindeki mineral yoğunlukları arasında gruplar arası fark gözlenmiştir. Ancak başlangıçta gruplar arasında gözlenen bu fark mikrosertlik analizinde saptanmamıştır. Bu durum mikrosertlik testinin micro-CT testi kadar hassas olmamasından kaynaklanabilir. MPP3'ün kısa peptitler olmaları onları hidrolitik enzimler için nispeten zor hedefler haline getirmesine rağmen, bu peptitlerin ağız boşluğunda enzimatik etkide hayatta kalıp kalamayacakları bilinmemektedir (128). Bu konuda yeterli sayıda çalışmanın olmaması ileride yapılacak araştırmaları zorunlu kılmaktadır. Elde edilen sonuçları doğrulamak için uzun süreli klinik çalışmalar yapılmalıdır.

6.SONUÇ

Bu tez çalışması MPP3'ün tek başına ve Flor jel ile kombine kullanımının süt dişlerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı literatürde bilinen ilk çalışmadır. Çalışma sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Çalışma sonunda mikrosertlik değerlerinin MPP3 ve flor jel+MPP3 grubunda diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür.
- Mikro-CT sonuçlarına göre MPP3'ün minede mineral yoğunluğunu artırdığı, 4 haftalık pH döngüsü sonunda en yüksek mineral yoğunluğu değerinin MPP3+flor jel grubunda olduğu tespit edilmiştir.
- PLM görüntüleri analiz edildiğinde lezyon derinliği en yüksek kontrol grubunda görülürken lezyon derinliği en düşük flor jel+MPP3 grubunda izlenmektedir. İki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.
- FE-SEM ve EDS analizi incelemelerinde 2 numune ile çalışılmıştır. Numune sayısı nedeniyle bulgular istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır. Bununla beraber EDS analizi sonuçları diğer bulguları desteklemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Alkilzy M, Tarabaih A, Santamaria RM, Splieth CH. Self-assembling Peptide P11-4 and Fluoride for Regenerating Enamel. *J Dent Res*. 2018;97(2):148–54.
2. Goswami M, Saha S, Chaitra TR. Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2012;30(1):2–6.
3. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res*. 2010;89(11):1187–97.
4. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res*. 2019;53(3):284–95.
5. Dogan S, Fong H, Yucesoy DT, Cousin T, Gresswell C, Dag S, Huang G, Sarikaya M. Biomimetic Tooth Repair: Amelogenin-Derived Peptide Enables in Vitro Remineralization of Human Enamel. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4 (5):1788–96.
6. Silvertown JD, Wong BPY, Sivagurunathan KS, Abrams SH, Kirkham J, Amaechi BT. Remineralization of natural early caries lesions in vitro by P11 -4 monitored with photothermal radiometry and luminescence. *J Investig Clin Dent*. 2017;8 (4).
7. Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2011;98(1):150–9.
8. Tulumbaci F, Gungormus M. In vitro remineralization of primary teeth with a mineralization-promoting peptide containing dental varnish. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:1–9.
9. Gungormus M, Ozdogan MS, Ertem SY, Tulumbacı F, Kara H, Orhan M. Accelerated Calcium Phosphate Mineralization by Peptides with Adjacent Oppositely Charged Residues. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(7):3791–3798.
10. Ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. *Dental Caries: The disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell Munksgaard. 2003, pp 49-69.
11. Ten Cate JM, Featherstone JD. Physicochemical aspects of fluoride enamel interactions. *Fluoride Dent Ed*. 1996;2:252.
12. Sabel N. Enamel of primary teeth morphological and chemical aspects. *Swed Dent J Suppl*. 2012;(222):1-77.
13. Pearce EIF, Nelson DGA. Microstructural Features of Carious Human Enamel Imaged with Back-scattered Electrons. *J Dent Res*. 1989;68 (2):113–8.

14. Pandya M, Diekwisch TGH. Enamel biomimetics-fiction or future of dentistry. *Int J Oral Sci.* 2019;11(1):8.
15. Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res* . 2006;85(9):775–93.
16. Fang Z, Guo M, Zhou Q, Li Q, Wong HM, Cao CY. Enamel-like tissue regeneration by using biomimetic enamel matrix proteins. *Int J Biol Macromol.* 2021;183:2131–2141.
17. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126 (3):270–99.
18. Cerný R, Slaby I, Hammarström L, Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res.* 1996;11(7):883–91.
19. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol.* 2004;167 (5):973–83.
20. Weiner S, Wagner HD. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annu Rev Mater Sci.* 1998;28 (1):271–298.
21. Weiner S, Addadi L. Design strategies in mineralized biological materials. *J Mater Chem.* 1997;7(5):689–702.
22. Beniash E, Traub W, Veis A, Weiner S. A transmission electron microscope study using vitrified ice sections of predentin: Structural changes in the dentin collagenous matrix prior to mineralization. *J Struct Biol.* 2000;132 (3):212–25.
23. Xiang C, Ran J, Yang Q, Li W, Zhou X, Zhang L. Effects of enamel matrix derivative on remineralisation of initial enamel carious lesions in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58 (4):362–9.
24. Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright Timothy J, Paine ML. Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(2):91-103.
25. Hanaizumi Y, Yokota R, Domon T, Wakita M, Kozawa Y. The initial process of enamel prism arrangement and its relation to the Hunter-Schreger bands in dog teeth. *Arch Histol Cytol.* 2010;73(1):23–36.
26. Diekwisch TG, Berman BJ, Gentner S, Slavkin HC. Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. *Cell Tissue Res.* 1995;279(1):149-67.
27. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. *J Dent.* 2014;42:12–20.
28. Seow WK. Early Childhood Caries. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(5):941-954

29. Øgaard B. White Spot Lesions During Orthodontic Treatment: Mechanisms and Fluoride Preventive Aspects. *Semin Orthod*. 2008 ;14 (3):183–93.
30. Cochrane NJ, Anderson P, Davis GR, Adams GG, Stacey MA, Reynolds EC. An X-ray microtomographic study of natural white-spot enamel lesions. *J Dent Res*. 2012;91(2):185–91.
31. Roopa KB, Pathak S, Poornima P, Neena IE. White Spot Lesions: A Literature Review. *J Pediatr Dent* . 2015;3 (1):1-7.
32. Roberson TM, Heymann HO, Edward J, Jr Swift EJ. *Cariology: the lesion, etiology, prevention, and control*. 5 th Ed., Mosby, St.Louis.2006.
33. Pinkham JR, Casamassimo PS, Field HW, McTigue DJ, Nowak AJ. *Pediatric Dentistry. Infancy through adolescence*. (4 .). Missouri: Elsevier Saunders. 2005.
34. Geiger AM, Gorelick L, Gwinnett AJ, Griswold PG. The effect of a fluoride program on white spot formation during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop* . 1988;93 (1):29–37.
35. Fontana M, González-Cabezas C, Haider A, Stookey GK. Inhibition of Secondary Caries Lesion Progression Using Fluoride Varnish. *Caries Res*. 2002;36 (2):129–35.
36. Llana C, Forner L, Baca P. Anticariogenicity of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A review of the literature. *J Contemp Dent Pract*. 2009;10(3):1–9.
37. Schirmer JF, Seger RK, Altenburger MJ, Lussi A, Hellwig E. Effects of various forms of calcium added to chewing gum on initial enamel carious lesions in situ. *Caries Res*. 2007;41 (2):108–14.
38. Reich E, Lussi A, Newbrun E. Caries-risk assessment. *Int Dent J*. 1999;49(1):15–26.
39. Akbaş Y, Hazar Bodrumlu E. Pedodontide Güncel Koruyucu Yaklaşımlar. *J Int Dent Sci*. 2015;1(1):1-8.
40. Palmer CA, R. Kent J, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and Caries-associated Bacteria in Severe Early Childhood Caries. *J Dent Res*. 2010;89(11):1224–9.
41. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007;369 (9555):51–9.
42. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006;85 (10):878–87.
43. O'Mullane D. Can prevention eliminate caries? *Adv Dent Res* . 1995;9 (2):106–9.
44. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on dietary recommendations for infants, children, and adolescents. *Pediatr Dent*. 2017;39(6):64–6.

45. Kim YR, Nam SH. Comparison of the preventive effects of slightly acidic HOCL mouthwash and CHX mouthwash for oral diseases. *Biomed Res.* 2018;29(8):1718–23.
46. Demir G. Remineralizasyon Materyalleri ve Teknolojilerine Güncel Bakış. *7tepe Klin.* 2020;16 (1):81–94.
47. Horst JA, Tanzer JM, Milgrom PM. Fluorides and Other Preventive Strategies for Tooth Decay. *Dent Clin North Am.* 2018;62(2):207-234.
48. Gupta G, Bansal M. Ozone therapy in periodontics. *Journal of Medicine and Life.* 2012;5(1):59-67.
49. Almaz ME, Sönmez İŞ. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *J Formos Med Assoc.* 2015;114 (1):3–11.
50. Boztaş G, Ömürlü H. Restoratif Diş Hekimliğinde Ozon Tedavileri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg .* 2015;24(3):158–68.
51. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J .* 2000;33 (3):173–85.
52. Brenneise CV, Blankenau RJ. Response of associated oral soft tissues when exposed to Argon laser during polymerization of dental resins. *Lasers Surg Med.* 1997;20 (4):467–72.
53. Ranjbar Omrani L, Khoshamad S, Tabatabaei Ghomshe E, Chiniforush N, Sadat Hashemi Kamangar S. In Vitro Effect of Bleaching With 810 nm and 980 nm Diode Laser on Microhardness of Self-cure and Light-Cure Glass Ionomer Cements. *J Laser Appl Med Sci.* 2017;8(4):191–6.
54. Cobb CM. Lasers in Periodontics: A Review of the Literature. *J Periodontol.* 2006;77(4):545-64.
55. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Murakami Y, Matsumoto K. Compositional and structural changes of human dentin following caries removal by Er, Cr: YSGG laser irradiation in primary teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2002 Jul;26 (4):377–82.
56. Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO2 laser on fluoride uptake in enamel. *J Dent.* 2004 Feb 1;32 (2):161–7.
57. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med .* 2012;44(10):824–31.
58. Kahraman Altundağ S. Düşük Seviyeli Lazer Terapisi. *Türkiye Klin Diş Hekim Bilim Özel Derg.* 2012;3 (2):34–42.

59. Soltanimehr E, Bahrampour E, Yousefvand Z. Efficacy of diode and CO₂ lasers along with calcium and fluoride-containing compounds for the remineralization of primary teeth. *BMC Oral Health* . 2019;19 (1):1–9.
60. Poosti M, Ahrari F, Moosavi H, Najjarian H. The effect of fractional CO₂ laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions. *Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1349-55.
61. Sun M, Wu N, Chen H. Laser-assisted Rapid Mineralization of Human Tooth Enamel. *Sci Rep*. 2017;7:9611.
62. Khamverdi Z, Kordestani M, Panahandeh N, Naderi F, Kasraei S. Influence of CO₂ Laser Irradiation and CPP-ACP Paste Application on Demineralized Enamel Microhardness. *J Lasers Med Sci* . 2018;9(2):144–8.
63. Ahrari F, Mohammadipour H-S, Hajimomenian L, Fallah-Rastegar A. The effect of diode laser irradiation associated with photoabsorbing agents containing remineralizing materials on microhardness, morphology and chemical structure of early enamel caries. *J Clin Exp Dent* . 2018;10 (10):e955-e962.
64. Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* . 2003;2003 (4):CD002782.
65. Uysal S, Tulga Öz F. DERLEME:BAŞLANGIÇ MİNE LEZYONLARININ REMİNERALİZASYONUNDA KULLANILAN AJANLAR . *A Ü Diş Hek Fak Derg*. 2018;45 (3):201–10.
66. Sharma D, Singh A, Verma K, Paliwal S , Sharma S, Dwivedi J . Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies. *Environ Toxicol Pharmacol* . 2017;56:297–313.
67. Miller FY, Campus G, Giuliana G, Piscopo MR, Pizzo G. Topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Curr Pharm Des* . 2012;18 (34):5532–41.
68. Ogard B, Seppä L, Rølla G. Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res* . 1994;8 (2):190–201.
69. Ercan E, Bağlar S, Çolak H. Diş Hekimliğinde Topikal Florür Uygulama Metotları. *Cumhuriyet Dent J*. 2010;13 (1).
70. Kucukyilmaz E, Savas S. Measuring the Remineralization Potential of Different Agents with Quantitative Light-Induced Fluorescence Digital Biluminator. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2017;15 (1):101–6.
71. Ballıkaya E, Çehreli ZC. Gümüş Diamin Florürün Çürük Yönetimindeki Yeri. *Türkiye Klin Diş Hekim Bilim Derg*. 2020;26 (2):276–84.
72. Liu BY, Lo ECM, Li CMT. Effect of silver and fluoride ions on enamel demineralization: a quantitative study using micro-computed tomography. *Aust Dent J* . 2012;57 (1):65–70.

73. Yu OY, Mei ML, Zhao IS, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dent Mater*. 2018 Dec 1;34 (12):e344–52.
74. Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. In vitro antibacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials*. 2006;27 (32):5512–7.
75. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res*. 2018;29 (1):55–59.
76. Gurunathan D, Somasundaram S, Kumar SA. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J* . 2012 ;57 (4):404–8.
77. Caruana PC, Mulaify S Al, Moazzez R, Bartlett D. The effect of casein and calcium containing paste on plaque pH following a subsequent carbohydrate challenge. *J Dent*. 2009;37 (7):522–6.
78. Çetin B, Avşar A, ULUSOY AT. Kazein içerikli besinler ve dental ürünler. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg*. 2011;2011(4):24–31.
79. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* . 1997;76 (9):1587–95.
80. Zhang Q, Zou J, Yang R, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Int J Paediatr Dent* . 2011;21 (5):374–81.
81. Mathias J, Kavitha S, Mahalaxmi S. A comparison of surface roughness after micro abrasion of enamel with and without using CPP-ACP: An in vitro study. *J Conserv Dent* . 2009;12 (1):22-5.
82. Saitoh M, Shintani S. Molar incisor hypomineralization: A review and prevalence in Japan. *Jpn Dent Sci Rev*. 2021;57:71–77.
83. ElSayad I, Sakr AK, Badr YAH. Combining casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate with fluoride: synergistic remineralization potential of artificially demineralized enamel or not? *J Biomed Opt* . 2009;14 (4):044039.
84. Singh RD, Ram SM, Shetty O, Chand P, Yadav R. Efficacy of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to prevent stain absorption on freshly bleached enamel: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2010;13 (2):76-9.
85. Bröchner A, Christensen C, Kristensen B, Tranæus S, Karlsson L, Sonnesen L, et al. Treatment of post-orthodontic white spot lesions with casein phosphopeptide-stabilised amorphous calcium phosphate. *Clin Oral Investig*. 2011;15 (3):369–73.

86. Mitchell JC, Musanje L, Ferracane JL. Biomimetic dentin desensitizer based on nano-structured bioactive glass. *Dent Mater.* 2011;27 (4):386–93.
87. Burwell AK, Litkowski LJ, Greenspan DC. Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin): remineralization potential. *Adv Dent Res.* 2009;21 (1):35–9.
88. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker ER, Frederick KE. Preparation, characterization and in vitro efficacy of an acid-modified beta-TCP material for dental hard-tissue remineralization. *Acta Biomater.* 2010;6 (3):969–78.
89. Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride Plus Functionalized β -TCP: A Promising Combination for Robust Remineralization. *Adv Dent Res.* 2012 ;24 (2):48-52.
90. Waly GH. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Post-Bleaching Enamel Remineralizing Gel. *Acta Scientific Dent Sci.* 2018;2(6):88-95.
91. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010;144 (1):51–63.
92. Tarsi R, Muzzarelli RA, Guzmán CA, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J Dent Res.* 1997;76 (2):665–72.
93. Zhang T, Chu J, Zhou X. Anti-cariious Effects of *Galla chinensis*: A Systematic Review. *Phytother Res.* 2015;29 (12):1837–42.
94. Chu JP, Li JY, Hao YQ, Zhou XD. Effect of compounds of *Galla chinensis* on remineralisation of initial enamel carious lesions in vitro. *J Dent.* 2007;35 (5):383–7.
95. Nayak PA, Nayak UA, Khandelwal V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2014;6:89–94.
96. Peterson ME. Xylitol. *Top Companion Anim Med.* 2013;28 (1):18–20.
97. Benahmed AG, Gasmi A, Arshad M, Shanaida M, Lysiuk R, Peana M, et al. Health benefits of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(17):7225–7237.
98. Harłukowicz KA, Kaczmarek U. Effectiveness of xylitol in caries prevention. *Dent Med Probl.* 2015;52 (4):479–484.
99. Ástvaldsdóttir Á, Naimi-Akbar A, Davidson T, Brolund A, Lintamo L, Granath AA, et al. Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. *Caries Res.* 2016;50(4):383–93.
100. Acevedo AM, Machado C, Rivera LE, Wolff M, Kleinberg I. The inhibitory effect of an arginine bicarbonate/calcium carbonate CaviStat-containing dentifrice on the development of dental caries in Venezuelan school children. *J Clin Dent.* 2005;16(3):63–70.

101. Kamal D, Hassanein H, Elkassas D, Hamza H. Complementary remineralizing effect of self-assembling peptide (P11-4) with CPP-ACPF or fluoride: An in vitro study. *J Clin Exp Dent* . 2020;12 (2):e161-e168.
102. Wang D, Deng J, Deng X, Fang C, Zhang X, Yang P. Controlling Enamel Remineralization by Amyloid-Like Amelogenin Mimics. *Adv Mater* . 2020;32 (31):2002080.
103. Gungormus M, Oren EE, Horst JA, Fong H, Hnilova M, Somerman MJ, et al. Cementomimetics—constructing a cementum-like biomineralized microlayer via amelogenin-derived peptides. *Int J Oral Sci*. 2012;4 (2):69–77.
104. Chen L, Yuan H, Tang B, Liang K, Li J. Biomimetic Remineralization of Human Enamel in the Presence of Polyamidoamine Dendrimers in vitro. *Caries Res* . 2015;49 (3):282–90.
105. Chen M, Yang J, Li J, Liang K, He L, Lin Z, et al. Modulated regeneration of acid-etched human tooth enamel by a functionalized dendrimer that is an analog of amelogenin. *Acta Biomater*. 2014;10 (10):4437–46.
106. Chen L, Liang K, Li J, Wu D, Zhou X, Li J.. Regeneration of biomimetic hydroxyapatite on etched human enamel by anionic PAMAM template in vitro. *Arch Oral Biol*. 2013;58 (8):975–80.
107. George A, Bannon L, Sabsay B, Dillon JW, Malone J, Veis A, et al. The Carboxyl-terminal Domain of Phosphophoryn Contains Unique Extended Triplet Amino Acid Repeat Sequences Forming Ordered Carboxyl-Phosphate Interaction Ridges That May Be Essential in the Biomineralization Process . *J Biol Chem* . 1996;271 (51):32869–73.
108. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res* . 2010;51 (5):404–17.
109. Yarbrough DK, Hagerman E, Eckert R, He J, Choi H, Cao N, et al. Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcif Tissue Int* . 2010;86 (1):58–66.
110. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res*. 2011;45 (5):460–8.
111. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater*. 2009;4 (3):034104.
112. Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, et al. Self-assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. *J Dent Res*. 2016;86 (5):426–30.
113. Takahashi F, Kurokawa H, Shibasaki S, Kawamoto R, Murayama R, Miyazaki M. Ultrasonic assessment of the effects of self-assembling peptide scaffolds on preventing enamel demineralization.. *Acta Odontol Scand*. 2016;74 (2):142–7.

114. Kind L, Stevanovic S, Wuttig S, Wimberger S, Hofer J, Müller B, et al. Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. *J Dent Res*. 2017;96 (7):790–797.
115. Burunton PA, Davies RPW, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, et al. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides--a clinical safety trial. *Br Dent J* . 2013;215 (4):6.
116. Jablonski-Momeni A, Heinzel-Gutenbrunner M. Efficacy of the self-assembling peptide P11-4 in constructing a remineralization scaffold on artificially-induced enamel lesions on smooth surfaces. *J Orofac Orthop*. 2014;75 (3):175–90.
117. Üstün N, Aktören O. Analysis of efficacy of the self-assembling peptide-based remineralization agent on artificial enamel lesions. *Microsc Res Tech*. 2019;82 (7):1065–1072.
118. Alkilzy M, Santamaria RM, Schmoekkel J, Splieth CH. Treatment of Carious Lesions Using Self-Assembling Peptides. *Adv Dent Res*. 2018 ;29 (1):42–47.
119. Schlee M, Schad T, Koch JH, Cattin PC, Rathe F. Clinical performance of self-assembling peptide P 11 -4 in the treatment of initial proximal carious lesions: A practice-based case series. *J Investig Clin Dent*. 2018;9 (1):12286.
120. Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):481-8.
121. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Res*. 2011;45 (1):13–23.
122. Featherstone JD, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles. *Caries Res*. 1983;17 (5):385–91.
123. Kargul B, Özcan M, Peker S, Nakamoto T, Simmons WB, Falster AU. Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study. *Oral Health Prev Dent* . 2012;10 (3):275–82.
124. Hamba H, Nikaido T, Sadr A, Nakashima S, Tagami J. Enamel lesion parameter correlations between polychromatic micro-CT and TMR. *J Dent Res* . 2012;91 (6):586–91.
125. Ünsal Şahin F, Topuz Ö. Diş hekimliği araştırmalarında mikrobilgisayarlı tomografi uygulamaları. *Acta Odontol Turc*. 2014;31(2):114–20.
126. Çivitçi F, Malkoç MA. Diş Hekimliğinde Mikro BT'nin Kullanım Alanları. *Dent J Dicle*. 2013;14:279–84.

127. Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Wevers M, Lambrechts P. A methodology for quantitative evaluation of root canal instrumentation using microcomputed tomography. *Int Endod J* . 2001;34 (5):390–8.
128. Swain M V., Xue J. State of the Art of Micro-CT Applications in Dental Research. *Int J Oral Sci* . 2009;1 (4):177-88.
129. Hsiao J, Wang Y, Zheng L, Liu R, Said R, Hadjiyski L, et al. In Vivo Rodent Models for Studying Dental Caries and Pulp Disease. *Methods Mol Biol*. 2019;1922:393–403.
130. Akbulut N, Çetin S, Bilecenoğlu B, Altan A, Akbulut S, Ocak M, et al. The micro-CT evaluation of enamel-cement thickness, abrasion, and mineral density in teeth in the postmortem interval (PMI): new parameters for the determination of PMI. *Int J Legal Med* . 2020;134 (2):645-653.
131. Rovaris K, Ferreira LM, Sousa TO, Peroni LV, Freitas DQ, Wenzel A, et al. Feasibility of micro-computed tomography to detect and classify proximal caries lesions in vitro. *Dent Res J (Isfahan)* . 2018;15 (2):123-129.
132. Memis Ozgul B, Orhan K, Tulga Oz F. Micro-computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration. *J Oral Sci* . 2015 ;57 (3):177–83.
133. Küçük EB. Farklı yöntemlerle tedavi edilen başlangıç çürük lezyonlarındaki iyileşmenin mikro-bt analizi ile değerlendirilmesi. İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi;2014.
134. Nguyen JNT, Harbison AM. Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. *Methods Mol Biol* . 2017;1606:71–84.
135. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning Electron Microscopy. *Curr Protoc Microbiol* . 2012;25 (1):2B.2.1-2B.2.47.
136. Terim Kapakin KA. Scanning-Elektron Mikroskobu. *YYÜ Vet Fak Derg*. 2006;17 (2):55–8.
137. Saghiri MA, Asgar K, Lotfi M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physiochemical properties. *Int Endod J* . 2012;45 (11):979–88.
138. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* . 1992 ;71:924–8.
139. Neves AA, De Sousa FB, Carlos Pereira L, Guzela LR. Transmission polarized light microscopy of carious human dental enamel. *Microsc Microanal*. 2003;9(2):1534–1535.
140. Amaechi BT, AbdulAzees PA, Okoye LO, Meyer F, Enax J. Comparison of hydroxyapatite and fluoride oral care gels for remineralization of initial caries: a pH-cycling study. *BDJ Open*. 2020;6 (1):9.

141. Almeida LF, Marín LM, Martínez-Mier EA, Cury JA. Fluoride Dentifrice Overcomes the Lower Resistance of Fluorotic Enamel to Demineralization. *Caries Res* . 2019;53 (5):567–575.
142. Li Z, Al-Jawad M, Siddiqui S, Pasteris JD. A mineralogical study in contrasts: highly mineralized whale rostrum and human enamel. *Sci Reports* . 2015;5 (1):16511.
143. Lelli M, Putignano A, Marchetti M, Foltran I, Mangani F, Procaccini M, et al. Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic Zn-carbonate hydroxyapatite containing toothpaste: a comparative in vivo study. *Front Physiol*. 2014;5:333.
144. Zaichick V, Zaichick S. The Effect of Age and Gender on Calcium, Phosphorus, and Calcium-Phosphorus Ratio in the Roots of Permanent Teeth. *The Journal of Dentists*. 2014;2(2):78-89.
145. Chu CH, Lo ECM. Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *J Dent*. 2008;36 (6):387–91.
146. Twetman S. Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *Eur J Oral Sci*. 2018;126 (1):19–25.
147. Ren Q, Ding L, Li Z, Wang X, Wang K, Han S, et al. Chitosan hydrogel containing amelogenin-derived peptide: Inhibition of cariogenic bacteria and promotion of remineralization of initial caries lesions. *Arch Oral Biol*. 2019;100:42–48.
148. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. 2018;29 (1):55–59.
149. Men X, Shibata Y, Takeshita T, Yamashita Y. Identification of Anion Channels Responsible for Fluoride Resistance in Oral Streptococci. *PLoS One* . 2016;11 (11):0165900.
150. Weatherell JA, Deutsch D, Robinson C, Hallsworth AS. Assimilation of Fluoride by Enamel throughout the Life of the Tooth. *Caries Res* . 1977;11 (1):85–115.
151. Wiegand A, Krieger C, Attin R, Hellwig E, Attin T. Fluoride uptake and resistance to further demineralisation of demineralised enamel after application of differently concentrated acidulated sodium fluoride gels. *Clin Oral Invest*. 2005;9(1):52–7.
152. Schmidlin P, Zobrist K, Attin T, Wegehaupt. In vitro re-hardening of artificial enamel caries lesions using enamel matrix proteins or self-assembling peptides. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(1):31-36.
153. Ruan Q, Liberman D, Bapat R, Chandrababu KB, Phark JH, Oldak Moradian J. Efficacy of amelogenin-chitosan hydrogel in biomimetic repair of human enamel in pH-cycling systems. *J Biomed Eng Inform*. 2016;2 (1):119-128.
154. Falwell JK . Fluoride in drinking-water. *Guidel Drink Qual* . 2006;2 (3):1–11.

155. Bossù M, Saccucci M, Salucci A, Di Giorgio G, Bruni E, Uccelletti D, et al. Enamel remineralization and repair results of Biomimetic Hydroxyapatite toothpaste on deciduous teeth: An effective option to fluoride toothpaste. *J Nanobiotechnology*. 2019;17 (1).
156. Lecompte EJ. Clinical Application of Topical Fluoride Products- Risks, Benefits, and Recommendations. *J Dent Res* . 1987;66 (5):1066–71.
157. Itthagarun A, Thaveesangpanich P, King NM, Tay FR, Wefel JS. Effects of different amounts of a low fluoride toothpaste on primary enamel lesion progression: a preliminary study using in vitro pH-cycling system. *Eur Arch of Paediatr Dent*. 2007;8(1):69-73.
158. Featherstone JDB . Remineralization, the natural caries repair process--the need for new approaches. *Adv Dent Res* . 2009;21 (1):4–7.
159. Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. Systematic Review on Noninvasive Treatment of Root Caries Lesions. *J Dent Res* . 2015 ;94 (2):261-71.
160. Walsh T, Worthington H V, Glenny A-M, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane database Syst Rev* . 2010; (1):CD007868.
161. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*.2014;13(3):330-8.
162. Chung HY, Huang KC. Effects of peptide concentration on remineralization of eroded enamel. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013;28:213–21.
163. Chung HY, Li CC, Hsu CC. Characterization of the effects of 3DSS peptide on remineralized enamel in artificial saliva. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012 ;6:74–9.
164. Iljima M, Moradian-Oldak J. Control of octacalcium phosphate and apatite crystal growth by amelogenin matrices. *J Mater Chem*. 2004 ;14 (14):2189–99.
165. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J Struct Biol*. 2005;149 (2):182–90.
166. Fan YW, Sun Z, Wang R, Abbott C, Moradian-Oldak J. Enamel inspired nano-composite fabrication through amelogenin supramolecular assembly. *Biomaterials* . 2007;28 (19):3034.
167. Habelitz S, Kullar A, Marshall SJ, DenBesten PK, Balooch M, Marshall GW, et al. Amelogenin-guided crystal growth on fluoroapatite glass-ceramics. *J Dent Res*. 2004;83 (9):698–702.
168. Han S, Fan Y, Zhou Z, Tu H, Li D, Lv X, et al. Promotion of enamel caries remineralization by an amelogenin-derived peptide in a rat model. *Arch Oral Biol*. 2017;73:66–71.

169. Hossein BG, Sadr A, Epigares J, Hariri I, Nakashima S, Hamba H et al. Study on the influence of leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) on the remineralization of enamel defects via micro-focus x-ray computed tomography and nanoindentation. *Biomed Mater.* 2015; 10(3):035007.
170. Ohtsuki C, Kobayashi Y, Tsuru K, Osaka A. Compositional Dependence of Bioactivity of Glasses in the System CaO-B₂O₃-SiO₂: Its in vitro Evaluation. *J Soc Mater Sci Japan* . 1995;44 (501):693–9.
171. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc* . 1991;74 (7):1487–510.
172. Delbem ACB. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* . 2002;15(3);169-72.
173. Zancopé BR, Rodrigues LP, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Rodrigues LKA, Nobre-dos-Santos M. CO₂ laser irradiation enhances CaF₂ formation and inhibits lesion progression on demineralized dental enamel—in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2016;31 (3):539–47.
174. Ana PA, Tabchoury CPM, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention. *Caries Res* . 2012;46 (5):441–51.
175. Calvo AFB, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Da Silva WJ, Cury JA. Effect of Acidulated Phosphate Fluoride Gel Application Time on Enamel Demineralization of Deciduous and Permanent Teeth. *Caries Res* . 2012;46 (1):31–7.
176. Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(5):11S-17S.
177. Pollard MA. Potential cariogenicity of starches and fruits as assessed by the plaque-sampling method and an intraoral cariogenicity test. *Caries Res.* 1995;29 (1):68–74.
178. Meerbeek B Van, Munck J de, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003; 28(3):215-35.
179. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J* . 2017;5 (2):20.
180. Wierichs RJ, Kogel J, Lausch J, Esteves-Oliveira M, Meyer-Lueckel H. Effects of Self-Assembling Peptide P11-4, Fluorides, and Caries Infiltration on Artificial Enamel Caries Lesions in vitro. *Caries Res* . 2017 ;51 (5):451–9.
181. Fan M, Zhang M, Xu HHK, Tao S, Yu Z, Yang J, et al. Remineralization effectiveness of the PAMAM dendrimer with different terminal groups on artificial initial enamel caries in vitro. *Dent Mater.* 2020;36 (2):210–20.

182. Ding L, Han S, Peng X, Wang K, Zheng S, Li H, et al. Tuftelin-derived peptide facilitates remineralization of initial enamel caries in vitro. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* . 2020;108 (8):3261–9.
183. Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, et al. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res*. 2007;86 (5):426–30.
184. Ding L, Han S, Wang K, Zheng S, Zheng W, Peng X, et al. Remineralization of enamel caries by an amelogenin-derived peptide and fluoride in vitro. *Regen Biomater*. 2020;7 (3):283–92.
185. Lena Sezici Y, Yetkiner E, Aykut Yetkiner A, Eden E, Attin R. Comparative evaluation of fluoride varnishes, self-assembling peptide-based remineralization agent, and enamel matrix protein derivative on artificial enamel remineralization in vitro. *Prog Orthod* . 2021;22 (1):1–12.
186. Li D, Lv X, Tu H, Zhou X, Yu H, Zhang L. Remineralization of initial enamel caries in vitro using a novel peptide based on amelogenin. *Front Mater Sci* . 2015;9 (3):293–302.
187. Savaş S, Kucukyılmaz E, Uzer Çelik E. Effects of Remineralization Agents on Artificial Carious Lesions. *Pediatr Dent*. 2016;38(7):511-518.
188. Golland L, Schmidlin PR, Schätzle M. The potential of self-assembling peptides for enhancement of in vitro remineralisation of white spot lesions as measured by quantitative laser fluorescence. *Oral Health Prev Dent* . 2017 ;15 (2):147–52.
189. Jablonski-Momeni A, Nothelfer R, Morawietz M, Kiesow A, Korbmacher-Steiner & H. impact of self-assembling peptides in remineralisation of artificial early enamel lesions adjacent to orthodontic brackets. *Sci Rep*. 2020;10(1):15132.
190. Lv X, Yang Y, Han S, Li D, Tu H, Li W, et al. Potential of an amelogenin based peptide in promoting remineralization of initial enamel caries. *Arch Oral Biol*. 2015;60 (10):1482–7.
191. Yang Y, Lv X, Shi W, Zhou X, Li J, Zhang L. Synergistic inhibition of enamel demineralization by peptide 8DSS and fluoride. *Caries Res*. 2016 ;50 (1):32–9.
192. Shetty S, Hegde M, Bopanna T. Enamel remineralization assessment after treatment with three different remineralizing agents using surface microhardness: An in vitro study. *J Conserv Dent* . 2014;17 (1):49–52.
193. Zheng W, Ding L, Wang Y, Han S, Zheng S, Guo Q, et al. The effects of 8DSS peptide on remineralization in a rat model of enamel caries evaluated by two nondestructive techniques. *J Appl Biomater Funct Mater* . 2019;17 (1):1-9..
194. Mendes FM, Nicolau J, Duarte DA. Evaluation of the Effectiveness of Laser Fluorescence in Monitoring in vitro Remineralization of Incipient Caries Lesions in Primary Teeth. *Caries Res*. 2003;37(6):442–4.

195. Amaechi BT, Porteous N, Ramalingam K, Mensinkai PK, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A, et al. Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine. *Caries Res* . 2013;47 (5):399–405.
196. Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli J dos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J* . 2012;23 (2):104–9.
197. Anusha R, Arthi B, Balashanmugam P, Iyer K, Kumar PDM. Effectiveness of nanoparticle-based acidulated phosphate fluoride (APF) gel on surface microhardness of human enamel: an in vitro study. *Int Soc Fluoride Res*. 2019;52 (3):221–30.
198. Akbari B, Hali H, Mesgarani A, Moosazadeh M. Comparison of CPP-ACP, Fluoride Varnish and Gel effects on enamel microhardness of permanent teeth: In-Vitro. *J Int Ped*. 2021;9 (6):13875–86.
199. Nicolae C, Hincu M, Amariei C. Scanning electron microscopic observation of morphological modifications produced by Fluorostom on enamel surface. *Rom J Morphol Embryol* . 2011;52 (4):1255–9.
200. Cheong Y, Choi S, Kim SJ, Park HK. Nanostructural effect of acid-etching and fluoride application on human primary and permanent tooth enamels. *Mater Sci Eng C*. 2012;32 (5):1127–32.
201. Serdar-Eymirli P, Turgut MD, Dolgun A, Yazici AR. The effect of Er,Cr:YSGG laser, fluoride, and CPP-ACP on caries resistance of primary enamel. *Lasers Med Sci*. 2019;34 (5):881–91.
202. Benjasuwantep P, Rirattanapong P. The remineralization effect of bioactive glass on enamel caries-like lesions in primary teeth. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2017;48(5):1127-1132.
203. Liu Y, Hsu CYS, Teo CMJ, Teoh SH. Potential mechanism for the laser-fluoride effect on enamel demineralization. *J Dent Res*. 2013 ;92 (1):71–5.
204. Wong FSL, Anderson P, Fan H, Davis GR. X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Arch Oral Biol*. 2004;49 (11):937–44.
205. Nakagaki S, Iijima M, Endo K, Saito T, Mizoguchi I. Effects of CO2 laser irradiation combined with fluoride application on the demineralization, mechanical properties, structure, and composition of enamel. *Dent Mater J*. 2015;34 (3):287–93.
206. Nakata K, Nikaido T, Nakashima S, Nango N, Tagami J. An approach to normalizing micro-CT depth profiles of mineral density for monitoring enamel remineralization progress. *Dent Mater J*. 2012;31 (4):533–40.

207. LeBreton JM, Senter JL. Answers to 20 questions about interrater reliability and interrater agreement. *Organ Res Methods* . 2008;11 (4):815–852.
208. Rythén M, Sabel N, Dietz W, Robertson A, Norén JG. Chemical aspects on dental hard tissues in primary teeth from preterm infants. *Eur J Oral Sci* . 2010;118 (4):389–95.
209. Alifakioti E, Arhakis A, Oikonomidis S, Kotsanos N. Structural and chemical enamel characteristics of hypomineralised second primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2021;22 (3):361–6.
210. Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FSM, Kilpatrick NM, Swain M V. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials*. 2004 ;25 (20):5091–100.
211. Fagrell TG, Dietz W, Jälevik B, Norén JG. Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta Odontol Scand* . 2010;68(4):215–222.
212. Muşat V, Anghel EM, Zaharia A, Atkinson I, Mocioiu OC, Buşilă M, et al. A chitosan–agarose polysaccharide-based hydrogel for biomimetic remineralization of dental enamel. *Biomolecules* . 2021;11 (8):1137.
213. Swarup J, Rao A. Enamel surface remineralization: Using synthetic nanohydroxyapatite. *Contemp Clin Dent* . 2012;3 (4):433–436.
214. Hanafy RA, El-Fattah AA, Mostafa D, Kandil S. Biomimetic chitosan against bioinspired nanohydroxyapatite for repairing enamel surfaces. *Bioinspired, Biomim Nanobiomaterials*. 2020;9 (2):85–94.

8. EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : 46418926

06.05.2021

Konu : Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Kararları

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ : 06 MAYIS 2021 PERŞEMBE
TOPLANTI SAATİ : 13:30 (Covid-19 tedbirleri kapsamında toplantı online yapılmıştır.)
TOPLANTI NO : 2021/09
PROJE/ KARAR NO : 2021/198 (Değerlendirilme Tarihi: 06.05.2021)

Üniversitemiz Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalında görevli Dr. Öğr. Üyesi Cenkhan BAL'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Merve ÜNÜVAR, Prof. Dr. Kaan ORHAN'ın ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŞ'ün yardımcı araştırmacı oldukları, 2021/198 kayıt numaralı, "Peptide Mineralizasyonu Desteklenmiş Flor Jelin Süt Dişi Minesinde Remineralizasyona Etkisinin Micro CT ,SEM ,PLM Kullanılarak İn Vitro Analizi" başlıklı doktora tezi proje önerisi, araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur. Rica ederim.

S.NO	AD SOYAD VE UZMANLIK ALANI	İMZA
1	Prof. Dr. Ahmet COŞAR (Anestezi AD Bşk.lığı) Etik Kurul Başkanı	
2	Prof. Dr. Alper GÖZÜBÜYÜK (Göğüs Cerr. AD Bşk.lığı) Etik Kurul Başkanı Yardımcısı	
3	Prof. Dr. Selahattin BEDİR(Üroloji AD Bşk.lığı)	
4	Prof. Dr. Levent KENAR(KBRN, Enstitü)	
5	Prof. Dr. Yusuf İZCİ (Beyin ve Sinir Cerr. AD.Bşk.lığı)	
6	Prof. Dr. Ali Kağan COŞKUN(Genel Cerr. AD Bşk.lığı)	
7	Prof. Dr. Suat DOĞANCI(Kalp Damar Cerr. AD Bşk.lığı)	
8	Prof. Dr. Cantürk TAŞÇI(Göğüs Hast. AD Bşk.lığı)	
9	Prof. Dr. Fulya TOKSOY TOPÇU (Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi AD.Bşk.lığı)	
10	Prof. Dr. Ayten TÜRKKANI(Histoloji AD.Bşk.lığı)	
11	Prof. Dr. Gülten GÜVENÇ(Hemşirelik Fakültesi)	
12	Prof. Dr. Dilek YILDIZ (Hemşirelik Fakültesi) Sekreter	
13	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNEY(Mikrobiyoloji AD Bşk.lığı)	

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu
Etlik-Ankara Telefon: 0 (312) 304 6135

EK 2. DOĞA İLAÇ FİRMASINDAN ELDE EDİLEN YENİLEBİLİR SIĞIR JELATİNİNİN SERTİFİKASI

	YENİLEBİLİR JELATİN ANALİZ SERTİFİKASI EDIBLE GELATIN CERTIFICATE OF ANALYSIS (1)	
Döküman No: SAT.PR.01.FR.01	Rev: 05/06.11.2017	Sayfa No: 1/1
Parti Numarası / Batch Number: PE17-00976-1		Müşteri / Customer: DOĞA İLAÇ
Analiz Tarihi / Analysis Date: 28.11.2017		Tip / Type: YENİLEBİLİR HELAL SIĞIR JELATİNİ 150 BLOOM, 20 MESH TİP B / EDIBLE HALAL BOVINE GELATINE 150 BLOOM, 20 MESH TYPE B
Üretim Tarihi / Production Date: 28.11.2017		
Son Kullanma Tarihi / Expiry Date: 28.11.2022		
Parti Ağırlığı / Shipment Weight: 100 KG		Orijin/ Country of Origin: Türkiye/ Turkey
		Menşei/ Source: Sığır Derisi/ Bovine Hides

PARAMETRELER PARAMETERS	METOD METHODS	BİRİM UNITS	SPESİFİKASYONLAR SPECIFICATIONS	SONUÇLAR RESULTS
Görünüş / Aspect			Grains yellow to amber	Grains yellow to amber
Partikül büyüklüğü / Particle size		ASTM Sieve	20	20
Jel dayanıklılığı/ Gel strength (6.67%)	GME	Bloomgram	140 - 160	152
Viskozite/ Viscosity (6.67%)	GME	mPa.s	1.80-3.60	2.19
pH (1%)	GME	U pH	5.0-6.5	5.88
Nem/Moisture	GME	%	Max. 12	10.57
Kül/Ashes	GME	%	Max. 1%	0.10
Kükürt dioksit/Sulphur dioxide (SO ₂)	GME	ppm	Max. 10 ppm	5.00
Arsenik / Arsenic (As) *	EN 15763	ppm	<=1	<=1
Kadmiyum / Cadmium (Cd) *	EN 15763	ppm	<=0.5	<=0.5
Krom / Chromium (Cr) *	ISO 11885	ppm	<=10	<=10
Bakır/ Copper (Cu) *	EN 15763	ppm	<=30	<=30
Kurşun/ Lead (Pb) *	EN 15763	ppm	<=5	<=5
Civa / Mercury (Hg) *	EN 15763	ppm	<=0.15	<=0.15
Çinko / Zinc (Zn) *	EN 15763	ppm	<=50	<=50
Aerobik Koloni Sayısı/Total aerobic count **	GME	CFU/g	<=1000	0
Küf ve Maya Sayısı/Yeast and moulds *	ISO 21527	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Koliform Bakteri Sayısı/Coliforms **	ISO 4831	CFU/10g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Escherichia coli **	GME	CFU/10g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Enterobacteriaceae *	ISO 21528-2	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Salmonella species *	DMS 102747	BAC./25g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Sulphite-reducing anaerobes *	GME	CFU/25g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Clostridium perfringens *	ISO 7937	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent
Staphylococcus aureus *	ISO 6888-1	CFU/g	Bulunmamalı - Absent	Yok - Absent

* İşaretili analizler ayda bir kez dış laboratuvar tarafından analiz edilmektedir. / * Marked analysis are done by external laboratory, once a month.
 ** İşaretili analizler ayda bir kez hem dış laboratuvar hem de her parti üretimde kendi laboratuvarımızda analiz edilmektedir. / ** Marked analysis are done by our laboratory for every batch and sent to external laboratory once a month.
 İşaretili olmayan analizler her parti üretimde kendi laboratuvarımızda analiz edilmektedir. / Unmarked analysis are done by our own laboratory for every batches.

Laboratuvar Onayı / Laboratory Validation Laboratuvar Sorum Derya Durmaz	Kalite Onayı / Quality Validation Kalite Müdürü/ Quality Manager İke Çakmak Saraçbaşı
--	---





FACTORY ADDRESS: SEL SANAYİ ÜRÜNLERİ TİCARET VE PAZARLAMA A.Ş. KURTULUŞ MH. YILMAZ ÇOLPAN CD. NO:10 10900 GÖNEN / BALIKESİR / TÜRKİYE TEL:

HEADQUARTERS ADDRESS: TEZMAN HOLDİNG A.Ş. PİYALEPAŞA BULVARI KASTEL İŞ MERKEZİ D BLOK KAT:7 NO: 124 - 34440 KASIMPAŞA/ İSTANBUL TÜRKİYE TEL:

EK 3. SBÜ GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Sayın veli,

Sizden çocuğunuzun çekim endikasyonu konularak çekilmiş dişinin “*Peptide Mineralizasyonu Desteklenmiş Flor Jelin Süt Dişi Minesinde Remineralizasyona Etkisinin Mikro CT, SEM, PLM Kullanılarak İn Vitro Analizi*” isimli bilimsel araştırma çalışmasında kullanılabilmesi için izin istenmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Çekilmiş dişlerin “ Peptide Mineralizasyonu Desteklenmiş Flor Jelin Süt Dişi Minesinde Remineralizasyona Etkisinin Mikro CT, SEM, PLM Kullanılarak İn Vitro Analizi ” isimli çalışmada değerlendirilmesi ile süt dişlerinde kullanılan mineral yapıyı güçlendiren ajanların etkinliği araştırılmış olacaktır.

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: Merve Ünüvar, SBÜ Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği AD
Telefon:

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

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

Gönüllü Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	
---------------------	--	----------------	--

Araştırmacı Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:	
----------------------------	--	----------------	--

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Merve Yaşar Ünüvar

Doğum yeri ve tarihi :

Uyruğu : T.C.

Medeni durum : Bekar

İletişim adresi ve telefonu : Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hekimliği
Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği AD

Yabancı dili : İngilizce

II. Eğitimi

SBÜ Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi : 2018-2022

Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi : 2010-2015

Ahmet Eren Anadolu Lisesi : 2005-2009

Mehmet Soysaraç İlköğretim Okulu : 1999-2005

III. Ünvanları

Diş Hekimi : 2015-2017

Araştırma Görevlisi : 2018-2022

IV. Mesleki Deneyimi

Diş Hekimi : 2015-2017

Araştırma Görevlisi : 2018-2022