

MERVE ŞAHİN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2021



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

UZMANLIK TEZİ

**FARKLI REMİNERALİZASYON AJANLARININ KÖK
ÇÜRÜKLERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ**

MERVE ŞAHİN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞE DİNA ERDİLEK**

**RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve ŞAHİN

(İmza)

İTHAF

Bu tez çalışmasını eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda sevgi, sabır ve desteğini esirgemeyen, kendimi öğrencisi olmaktan dolayı hep şanslı hissettiğim çok değerli danışman hocam *Doç. Dr. Dina Erdilek'e*,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bugünlere gelmemde emekleri olan başta Anabilim Dalı Başkanı *Prof. Dr. Yasemin Benderli Gökçe* olmak üzere Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tezimin mikrobiyolojik aşamalarının tüm imkansızlıklara rağmen tamamlanmasını sağlayan *Prof. Dr. Nursen Topçuoğlu* ve *Araştırmacı Emine Mutlu'ya*,

Deney aşamalarında kimyasal solüsyonların hazırlanması konusunda yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi *Doç. Dr. Canan Küçükgergin'e*,

Santrifüj cihazını kullanabilmemize imkan tanıyan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi *Prof. Dr. Ufuk Çakatay* ve *Arş. Gör. Karolin Yanar'a*,

Verdiği tavsiyelerle bilim yolunda desteğini esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi öğretim üyesi *Prof. Dr. Cemalettin Yaman'a* ve Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı müdür yardımcısı *Prof. Dr. Aysel Kantürk Figen* başta olmak üzere, FTIR analizleri için *Dr. Bilge Coşkun Filiz* ve *Dr. Duygu Ceylan Erdoğan'a*, SEM görüntülemeleri için *Uzman Erhan Akkaya'ya*,

CLSM analizlerini, laboratuvarlarında gerçekleştiren İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden *Sayın Khusan Khodzhaev'e*,

Tez çalışmamın istatistiksel değerlendirmelerinde yardımına koşan sevgili arkadaşım *Endüstri Müh. Zeynep Öztürk'e*,

Uzmanlık eğitimimin başından beri bu zorlu süreçte yakın arkadaşlıklarını esirgemeyen *Gülsüm Aydoğmuş, Fatma Evin, Duygu Hisarbeyli, Oyun-Erdene Batgerel, Ezgi Erden Kayalidere* ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Çok uzun yıllar önce başlayan arkadaşlığımızın hiç bitmemesini dilediğim sevgili dostlarım *Emine Kıtın, Müge Çavuş, Nazlı Ayşeşek, Gül Gizem Pamuk, Zeynep Gümüşdüğme ve Dilek Aydın'a,*

Annem, babam ve kardeşlerime,

Ve kocam *Onur Şahin'e*

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No : 36623



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVİİİ
ABSTRACT.....	XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Çürük ve Etiyolojisi	3
2.2. Kök Çürükleri	4
2.2.1. Kök Sert Dokularının Kompozisyonları	4
2.2.2. Kök Sert Dokularının Histomorfolojisi Ve Yapısal Özellikleri.....	5
2.2.3. Kök Çürüklerinin Biyokimyası Ve Histopatolojisi.....	6
2.2.3.1. Sement Lezyonları	8
2.2.3.2. Dentinde Başlangıç Lezyonu	9
2.2.3.3. Dentinde İlerlemiş Lezyon	9
2.2.3.4. Durağan Lezyonlar	9
2.2.4. Kök Yüzeylerinde Biyofilm Oluşumu	10
2.3. Dişlerde Demineralizasyon Remineralizasyon Süreçleri.....	13
2.3.1. Mineralizasyon.....	13
2.3.2. Demineralizasyon.....	15
2.3.3. Remineralizasyon.....	16
2.4. Çürük Önleyici Ajanlar ve Remineralizasyon Ajanları	17
2.4.1. Mineral ve İyon Teknolojileri	18
2.4.1.1. Flor İyonu.....	18
2.4.1.2. Gümüş İyonu	20

2.4.2. Antibakteriyel Materyaller ve Biyofilm Modifiye Ediciler	23
2.4.2.1. Klorheksidin	23
2.4.2.2. Ksilitol	24
2.4.2.3. Arjinin	25
2.4.2.4. Triklosan	25
2.4.3. Biyoaktif Materyaller ve Nanoteknoloji Ürünleri	25
2.4.3.1. Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP)	25
2.4.3.2. İşlevselleştirilmiş β -Trikalsiyum Fosfat (β -TCP)	26
2.4.3.3. Kendiliğinden Birleşen Peptidler	26
2.4.3.4. Dentin Fosfoprotein Türevi 8DSS Peptidler	27
2.4.4. Bitkisel Kaynaklı Ajanlar	27
2.4.4.1. Proantosyanidin	27
2.4.4.2. Hesperidin	27
2.4.5. Diğer Kalsiyum Ve Fosfat Kaynaklı Remineralizasyon Ajanları	28
2.4.5.1. Sodyum Trimetafosfat (TMP)	28
2.5. Yapay Çürük Modelleri	28
2.5.1. Bakteriyolojik (Biyofilm) Model	28
2.5.2. Basit Demineralizasyon Modeli	29
2.5.3. pH Döngüsü Modeli	29
2.5.4. Yapay Çene Modelleri	29
2.5.5. İn Vivo Hayvan Modelleri	30
2.5.6. İnsan Çenesinde İn Situ Çalışmalar	30
2.6. Dişlerde Oluşan Demineralizasyon ve Remineralizasyonu Değerlendirme Yöntemleri	30
2.6.1. Mikrosertlik Analizi	31
2.6.2. Elektriksel İletkenlik Metodu (ECM)	31
2.6.3. Fiber Optik Transillüminasyon (FOTİ)	31
2.6.4. Lazer Floresans (LF)	31
2.6.5. Kantitatif Işık Ölçümlü Floresans (QLF)	32
2.6.6. Polarize Işık Mikroskobu (PLM)	33
2.6.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	33
2.6.8. Optik Koherens Tomografi (OCT)	34
2.6.9. SEM, TEM, SEM-EDX	34

2.6.10. Transvers Mikroradyografi (TMR).....	35
2.6.11. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT).....	35
2.7. Biyofilm İnceleme Yöntemleri	35
2.7.1. Kantitatif Karakterizasyon Yöntemleri	35
2.7.1.1. Mikrobiyal Kültür Yöntemi	36
2.7.1.2. Coulter Yöntemi.....	36
2.7.1.3. Flow Sitometri.....	36
2.7.1.4. Işık Mikroskobu	37
2.7.1.5. Floresan Mikroskobu	37
2.7.1.6. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM)	37
2.7.1.7. Kuru Kütle.....	38
2.7.1.8. Toplam Organik Karbon Ölçümü	38
2.7.1.9. Kristal Viyole Analizi	38
2.7.1.10. Tetrazolium Tuzları.....	39
2.7.1.11. ATP Biyolüminesans	39
2.7.2. Kalitatif Karakterizasyon Yöntemleri	39
2.7.2.1. Elektron Mikroskobu	39
2.7.2.2. Taramalı Elektrokimyasal Mikroskop (SECM)	40
2.7.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	40
2.7.2.4. Spektroskopik Analizler.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Etik Kurul Onayı.....	42
3.2. Dişlerin Seçilmesi	42
3.3. Dişlerin Preparasyonu ve Örneklerin Hazırlanması	43
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	46
3.5. Demineralizasyon Öncesi Lazer Floresans Ölçümlerinin Yapılması	46
3.6. Diş Yüzeylerinde Yapay Çürük Lezyonu Oluşturulması	48
3.7. Demineralizasyon Sonrası Lazer Floresans Ölçümlerinin Yapılması	50
3.8. Demineralizasyon Sonrası FTIR-ATR Analizleri	50
3.9. Remineralizasyon Ajanlarının Uygulanması	52
3.10. Ağız Ortamını Taklit Eden pH Döngüsü Uygulaması	55
3.11. pH Döngüsü Sonrası Lazer Floresans İncelemeleri.....	56
3.12. pH Döngüsü Sonrası FTIR-ATR Analizleri	56

3.13. Biyofilm İncelemeleri İçin Gerekli Hazırlıkların Yapılması	57
3.13.1. Tükürüğün Hazırlanması.....	57
3.13.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	59
3.14. Biyofilmlerin Oluşturulması	61
3.15. Biyofilmlerin İncelenmesi	63
3.15.1. Biyofilmlerin CLSM incelemesi	65
3.15.2. Biyofilmin SEM incelemesi	68
3.16. İstatistiksel Değerlendirme	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. Lazer Floresans (DIAGNOdent) Ölçümlerine Ait Bulgular.....	71
4.2. FTIR-ATR Analizlerine Ait Bulgular.....	75
4.3. CLSM Analizlerine Ait Bulgular	80
4.4. SEM Görüntülemelerine Ait Bulgular	91
5. TARTIŞMA	95
KAYNAKLAR	122
FORMLAR	149
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	152
ETİK KURUL KARARI	153
ÖZGEÇMİŞ	156

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan vernikler	54
Tablo 4-1: Lazer floresans D2 ile D1 farkının gruplar arası karşılaştırılmasına ait istatistiksel analiz	72
Tablo 4-2: D2 ve D3 arasındaki lazer floresans değerleri farkının gruplar arası karşılaştırılması	73
Tablo 4-3: Mineral/matriks oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri	78
Tablo 4-4: pH döngüsü öncesi ve sonrası Fosfat/Amid I oranlarının çoklu karşılaştırmaları	79
Tablo 4-5: Toplam biyokütle ve canlı biyokütle ortalama ve standart sapma değerleri.	86
Tablo 4-6: Toplam biyokütlenin gruplar arası karşılaştırılması	87
Tablo 4-7: Canlı biyokütlenin gruplar arası karşılaştırılması	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Çürük gelişiminde patolojik ve koruyucu faktörlerin şematik diyagramı	4
Şekil 2-2: Kök çürüklerinin spesifik özellikleri [23]	6
Şekil 2-3: Kök çürüğü evreleri [27]	7
Şekil 2-4: Sağlıklı dişte flor ve diş yüzeyinin reaksiyonu [106]	21
Şekil 2-5: Çürük diş dokusunda gümüş diamin florürün etki mekanizması [106]	22
Şekil 2-6: DIAGNOdent cihazı tarafından diş yüzeyine gönderilen ve sonrasında geri yansıtılarak algılanan fotonlar [166]	32
Şekil 2-7: FTIR spektrometrenin şematik olarak gösterimi [178]	33
Şekil 2-8: ATR çalışma prensibi [179]	34
Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan sıgır dişi örneği	42
Şekil 3-2: Isomet 1000 hassas kesme cihazı (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, ABD)	43
Şekil 3-3: Elmas kesim diski (Isomet Saw, Buehler Ltd, Evanston IL, ABD)	44
Şekil 3-4: Örneklerin gömüldüğü akrilik reçine	44
Şekil 3-5: Akriliğe gömülmüş örnek	44
Şekil 3-6: Zımparalama ve parlatma cihazı (Buehler MetaServ 250, Almanya)	45
Şekil 3-7: Ultrasonik temizleme cihazı (Digital Ultrasonic Cleaner, Codyson, Çin)	45
Şekil 3-8: DIAGNOdent 2095 (KaVo, Almanya)	47
Şekil 3-9: Lazer Floresans ölçümlerinin yapılması	48
Şekil 3-10: Demineralizasyon solüsyonu	49
Şekil 3-11: Demineralizasyon solüsyonuna bırakılan örnekler	49
Şekil 3-12: Çalışmada kullanılan etüv (Termal Laboratuvar Aletleri, İstanbul, Türkiye)	50
Şekil 3-13: FTIR-ATR cihazı Spectrum 100 (Perkin Elmer, ABD)	51
Şekil 3-14: FTIR-ATR cihazına numunenin yerleştirilmesi	51
Şekil 3-15: NaF Grubu (Proshield Vernik)	52
Şekil 3-16: NaF+CPP-ACP Grubu (MI Vernik)	52
Şekil 3-17: NaF+ TCP Grubu (Clinpro)	53
Şekil 3-18: NaF+ CXP™ Grubu (Embrace)	53
Şekil 3-19: SDF/KI Grubu (Riva Star)	53
Şekil 3-20: Remineralizasyon ajanlarının uygulanması	55
Şekil 3-21: pH döngüsünde kullanılan solüsyonlar	56

Şekil 3-22: Soğutmalı santrifüj (3-18K, Sigma, Almanya)	57
Şekil 3-23: Tükürük örneklerinin santrifüj edilmesi.....	58
Şekil 3-24: Oluşan süpernatanın filtrasyonu.....	58
Şekil 3-25: <i>L.casei</i> ve <i>S.mutans</i> 'ın %5 koyun kanlı agarda üremiş kolonileri	59
Şekil 3-26: Beyin Kalp İnfüzyon besiyeri	60
Şekil 3-27: Bakteri süspansiyonu	60
Şekil 3-28: Örneklerin tükürükle kaplanması.....	61
Şekil 3-29: Örneklerin tükürükle kaplanması için çalkalayıcıya yerleştirilmesi.....	61
Şekil 3-30: Bakteri süspansiyonu ve %5 sakkarozlu BHI buyyon eklenmesi.....	62
Şekil 3-31: Plakaların anaerop ortam sağlayan kavanozlarda çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesi.....	63
Şekil 3-32: K ve P gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü.....	63
Şekil 3-33: C ve E gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü.....	64
Şekil 3-34: M ve RS gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü	64
Şekil 3-35: Live/Dead Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD).....	65
Şekil 3-36: Örneklerin Live/Dead Bacterial Viability Kit ile boyanması	66
Şekil 3-37: CLSM (TCS SPE, Leica, ABD).....	67
Şekil 3-38: Image J programı (National Institutes of Health, ABD)	67
Şekil 3-39: Altın kaplama cihazı (SC7620 Sputter Coater, Quorum, İngiltere).....	68
Şekil 3-40: Altın kaplanmış örnekler.....	68
Şekil 3-41: Çalışmada kullanılan SEM cihazı (EVO LS10, Zeiss Microscopy, Almanya)	69
Şekil 4-1: Tüm gruplar için başlangıç, demineralizasyon sonrası ve pH döngüsü sonrası lazer floresans ortalama ve standart sapma değerleri dağılımı	71
Şekil 4-2: K grubuna ait FTIR-ATR grafiği	75
Şekil 4-3: P grubuna ait FTIR-ATR grafiği.....	75
Şekil 4-4: M grubuna ait FTIR-ATR grafiği	76
Şekil 4-5: C grubuna ait FTIR-ATR grafiği	76
Şekil 4-6: E grubuna ait FTIR-ATR grafiği.....	77
Şekil 4-7: RS grubuna ait FTIR-ATR grafiği	77
Şekil 4-8: K grubuna ait CLSM görüntüsü.....	80
Şekil 4-9: P grubuna ait CLSM görüntüsü.....	81

Şekil 4-10: M grubuna ait CLSM görüntüsü	82
Şekil 4-11: C grubuna ait CLSM görüntüsü	83
Şekil 4-12: E grubuna ait CLSM görüntüsü	84
Şekil 4-13: RS grubuna ait CLSM görüntüsü	85
Şekil 4-14: K grubuna ait SEM görüntüsü.....	91
Şekil 4-15: P grubuna ait SEM görüntüsü	91
Şekil 4-16: M grubuna ait SEM görüntüsü	92
Şekil 4-17: C grubuna ait SEM görüntüsü.....	92
Şekil 4-18: E grubuna ait SEM görüntüsü	93
Şekil 4-19: RS grubuna ait SEM görüntüsü.....	93



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C: Santigrad derece

mg: Miligram

nm: Nanometre

mm: Milimetre

µm: Mikrometre

mM: Milimol

µl : Mikrolitre

mA : Miliamper

Ppm: Parts per million, Milyonda bir birim

pH: Power of Hydrogen

G : Gravite

RCF : Göreceli Santrifüj Kuvveti

Ca₁₀(PO₄)₆ (OH)₂ : Hidroksiapatit

F: Flor

Ca: Kalsiyum

P: Fosfor

PO₄: Fosfat

HF : Hidrojen Florür

CaF₂: Kalsiyum Florür

Al₂O₃: Alüminyum Oksit

(Ca₃PO₄)₂: Trikalsiyum fosfat

CaCl₂ : Kalsiyum Klorür

KH₂PO₄ : Monopotasyum Fosfat

KOH : Potasyum Hidroksit

HEPES : (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit)

KCl : Potasyum Klorür

KBr : Potasyum Bromür

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

ATP : Adenozin Trifosfat

FTIR: Fourier Transform Infrared Spektrometre

ATR : Attenuated Total Reflectance

LF : Lazer Floresans

CLSM : Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

NaF : Sodyum Florür

SDF : Gümüş Diamin Florür

KI : Potasyum İyodür

CPP : Kazein Fosfopeptid

ACP : Amorf Kalsiyum Fosfat

TCP : Trikalsiyum Fosfat

ßTCP : İşlevselleştirilmiş β –TCP

CXP : Ksilitol kaplı Kalsiyum Fosfat

DPP : Dentin Fosfoproteinleri

AMPs : Antimikrobiyal Peptidler

TMP : Sodyum Trimetafosfat

DCPD : Dikalsiyum Fosfat Dihidrat

CaCO₃ : Kalsiyum Karbonat

ECM : Elektriksel İletkenlik Metodu

FOTİ : Fiber Optik Transillüminasyon

DİFOTİ : Dijital Fiber-optik Transillüminasyon

QLF : Kantitatif Işıık Ölçümlü Floresans

PLM : Polarize Işıık Mikroskobu

OCT : Optik Koherens Tomografi

TEM : Geçirimli Elektan Mikroskobu

EDS : Enerji Dispersiv Spektroskopi

EDX : Enerji Dağınımlı (X-ray) Spektroskopi

TMR : Transvers Mikroradyografi

Mikro-BT : Mikro-bilgisayarlı tomografi

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

DMFRS : Decayed, Missing and Filled Root Surfaces

CFU : Colony Forming Unit

GtfB : Beta glikozil transferaz

DAPI : 4ı 6-diamidino-2-phenylindole

TOC : Toplam organik karbon

UV-Vis : Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

OTO : osmium-thiocarbohydrazide-osmium

ESEM : Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu

SECM: Taramalı Elektrokimyasal Mikroskop

AFM : Atomik Kuvvet Mikroskobu

IR : Kızılötesi

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

SPRi : Surface Plasmon Resonance Imaging

BHI : Beyin Kalp İnfüzyon

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

ÖZET

ŞAHİN, M. Farklı remineralizasyon ajanlarının kök çürüklerine etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul. (2021).

Bu çalışmanın amacı; remineralizasyon ajanlarının yapay kök çürükleri ve *S. mutans* ile *L. casei* biyofilmi üzerindeki etkilerini incelemektir. Sığır dişlerinin kök yüzeylerinden elde edilen 138 adet örnek 5 gün demineralizasyon solüsyonunda bekletildi. Yapay çürük oluşturulan örnekler (1) kontrol, (2) Sodyum florür (NaF), (3) NaF+Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP), (4) NaF+Trikalsiyum Fosfat (TCP), (5) NaF+Ksilitol kaplı Kalsiyum Fosfat (CXP) ve (6) Gümüş Diamin Florür/Potasyum İyodür (SDF/KI) gruplarına (n=23) ayrıldı. Sonrasında spektral analiz yapılacak örneklerle remineralizasyon ajanları uygulandıktan sonra pH döngüsüne tabi tutuldu. pH döngüsü öncesi ve sonrasında LF ve FTIR-ATR analizleri yapıldı. Biyofilm değerlendirmeleri içinse demineralize örneklerle ajanlar uygulanıp, üzerlerinde *S. mutans* ve *L. casei* ile ikili biyofilm oluşumu sağlandı. Oluşan biyofilm CLSM ve SEM ile incelendi. Elde edilen veriler SPSS 25.0 programı ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde analiz edildi. LF ölçümlerinde pH döngüsü öncesi ve sonrası fark değerlendirildiğinde kontrol grubuyla diğer gruplar arasında, deney grupları lehine anlamlı farklılık tespit edilirken, SDF/KI grubu en düşük LF değerleriyle, diğer tüm gruplardan anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$). FTIR-ATR analizinde SDF/KI grubunda yapıda kimyasal reaksiyonlar olduğunu gösteren sonuç verirken, kontrol grubunda Fosfat/Amid I oranındaki düşüş, diğer dört deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). CLSM analizinde, hem toplam hem de canlı biyokütle bakımından tüm remineralizasyon ajanlarının, oluşturulan biyofilm üzerinde etkili olduğu görüldü. Bununla birlikte, tüm materyaller arasında en etkili ajan %5 NaF olarak bulundu. Çalışmamızda tüm remineralizasyon ajanlarının demineralizasyonu önlemede başarılı olduğu, *S. mutans* ve *L. casei* biyofilmi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kök çürüğü, remineralizasyon, Lazer Floresans, FTIR-ATR, CLSM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36623

ABSTRACT

ŞAHİN, M. *In Vitro* Evaluation of the Effects of Various Remineralization Agents in Root Caries. Istanbul University, Faculty of Dentistry, Department of Restorative Dentistry. Master's thesis. Istanbul. (2021)

The aim of this study was to compare the effects of different fluoride varnishes on artificial root caries lesions and biofilm formation. Bovine root dentin specimens (n=138) were prepared and demineralised for 5 days. Dentin blocks randomly allocated to 6 groups (n=23/group): (1) untreated control, (2) Sodium Fluoride (NaF), (3) NaF+ Casein Phosphopeptide-stabilized Amorphous Calcium Phosphate complexes (CPP-ACP), (4) NaF+ Tricalcium Phosphate (TCP), (5) NaF+ Xylitol-coated Calcium and Phosphate (CXP) and (6) Silver Diamine Fluoride/Potassium Iodide (SDF/KI). Specimens spared for spectral analysis (n=15) were subjected to pH cycling for 8 days. Before and after pH cycling, FTIR-ATR and Laser Fluorescence were used to detect changes in organic/inorganic content. *S. mutans* and *L. casei* dual-species biofilm were performed on artificial caries lesions treated with remineralization agents (n=8). Bacterial biofilm formation was evaluated with CLSM and SEM. The obtained data was analyzed with SPSS version 25.0. The results were evaluated at p=0.05 significance level. According to the results of LF, SDF/KI showed maximum remineralization values after pH cycling. All treatments reduced LF values significantly compared to control group. FTIR-ATR showed chemical reactions within dentin tissue in SDF/KI group. The most significant and highest decrease at hydrogen phosphate-to-amide I ratio observed in control group, compared to other four test groups. CLSM analysis showed that all varnishes are effective on total and viable biomass. However NaF was the most effective material against biofilm formation. Application of varnishes reduced the biofilm formation and demineralisation of root caries.

Key Words: Root caries, Remineralization, Laser Fluorescence, FTIR-ATR, CLSM

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36623

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü; dünya çapında her yaş grubunu etkileyen, kronik, multifaktöriyel bir hastalıktır [1]. Çürükler sebep oldukları ağrı ve diş kayıpları ile bireylerin hayat kalitesini düşürürken, tedavi giderleriyle de topluma finansal yük oluşturlar [2].

İleri yaşlarda kök çürükleri oldukça sık görülen vakalardır ve son yıllarda yapılan çalışmalarda dünya genelinde kök çürüğü prevalansı ortalama %41,5 olarak bildirilmiştir [3, 4]. Günümüzde artan yaşam süresi ve kalitesi, bireylerin doğal dişlerini ileri yaşlara kadar koruma şansını arttırmaktadır [5].

Periodontal hastalıklar, yanlış fırçalama alışkanlıkları gibi nedenlerle gelişen diş eti çekilmeleri, zayıf ağız hijyeni, karbonhidrattan zengin beslenme, sistemik hastalıklar nedeniyle ilaç kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen ağız kuruluğu, ve düşük sosyo-ekonomik durum gibi etkenlerin de desteklemesiyle, zaman içinde kök yüzeylerinde çürük lezyonlarının gelişme riski artmaktadır. Bu nedenle modern diş hekimliğinde kök yüzeyi çürükleri önemli bir araştırma sahası haline gelmektedir [6].

Kök çürükleri, kök yüzeyinde sınırlı kalabilen ya da mine-sement birleşiminde, mine, sement ve dentin dokularını da kapsayarak ilerleyebilen, genellikle koyu renkli, düzensiz sınırlı, kronik veya progresif lezyonlardır [7].

Sement ve dentin yüzeylerinde oluşan çürükler, risk faktörleri, gelişimleri ve tedavileri bakımından mine çürüklerinden daha farklıdır. Sement dokusunun daha fazla organik materyal içermesi, hidroksiapatit kristallerinin daha küçük boyutlarda ve az olması, Sharpey liflerinin bakteriler ve metabolik ürünlerinin geçişini kolaylaştırması gibi nedenlerle kök yüzeylerinin çürük ataklarına karşı direnci zayıftır [8, 9].

Kök yüzeylerinde restoratif işlemlerin başarısı, kök yüzeyinde subgingival izolasyon ve erişimin zor olabilmesi, adeziv prosedürlerde dentin dokusuna bağlanma zayıflığı, diş üzerine gelen kuvvetlerin servikal alanlarda yoğunlaşabilmesi gibi faktörlerden olumsuz etkilenebilmektedir. Bu yüzden erken dönemde çürüğün durdurulması ve lezyonda gerileme sağlanabilmesi çok önemlidir [10].

Çürükleri önlemek için kullanılan koruyucu yöntemlerin başında florür uygulamaları gelmektedir. Demineralizasyonun önüne geçmek ve/veya remineralizasyonu sağlamak amacıyla uygulanan topikal florür preparatlarının

etkinliğini artırmak amacıyla, son yıllarda içeriklerine gümüş iyonları, fosfoproteinler, proteaz inhibitörleri, hidroksiapatit prekürsörleri, şeker alkoller gibi bileşenler ilave edilmektedir [11].

Bu çalışmada çeşitli remineralizasyon ajanlarının yapay kök çürüğü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared Spektrometre-Attenuated Total Reflectance) analizi ile lezyonların organik içeriği ve kimyasal yapısındaki potansiyel değişikliklerin tespiti, LF (Lazer Floresans) yöntemiyle mineral kaybı ve kazancının gösterilmesi, CLSM (Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop) ile toplam ve canlı bakteri biyokütlesinin görüntülenerek hesaplanması, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile bakteri topografisinin görüntülenmesi planlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

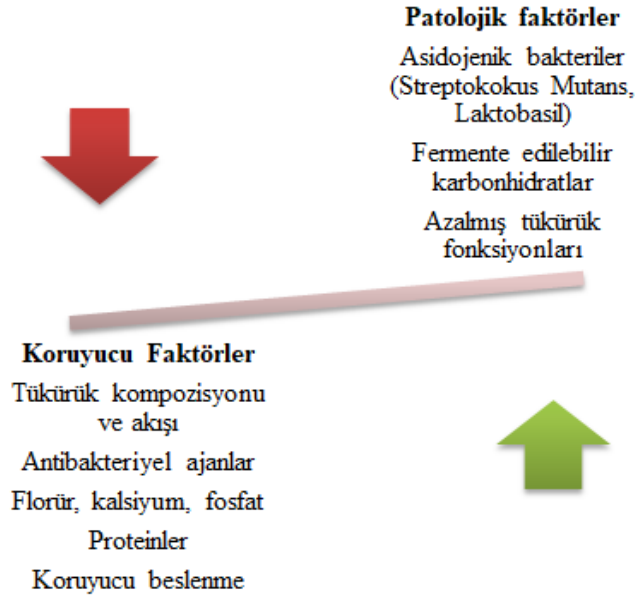
2.1. Çürük ve Etiyolojisi

Diş çürükleri, dünya çapında sık rastlanan kronik hastalıklardandır [12]. Çürük lezyonu, karyojen bakterilerin metabolizma faaliyetleri sonucu di ve mono sakkaritlerin bakteriyel fermantasyonu ile oluşturulan laktik asidin, diş sert dokularında oluşturduğu lokalize demineralizasyon ve yıkım süreci olarak tanımlanır [13].

Sert doku yüzeyinden kalsiyum, fosfat ve karbonatların ayrılması ve bakteriyel biyofilm ile sert doku yüzeyi arasındaki mineral dengesinin diş dokusu aleyhine bozulması ile çürük lezyonu ilerleyebilmektedir. Demineralizasyon süreci, erken safhalarda, kalsiyum ve fosfat iyonlarının geri alımıyla tersine dönebilir. Ortamda bulunan flor, kalsiyum ve fosfatın dişe difüzyonunda katalizör olarak görev yaparak remineralizasyona yardımcı olur. Yeni oluşan florapatit kristalleri asit ataklarına daha dirençli hale gelmiştir. Demineralizasyon remineralizasyon döngüsü, mevcut durumun devam etmesi, tamir, ya da kavite oluşması ile sonuçlanabilir [14].

Kök çürüklerinde de süreç, önce demineralizasyon ve sonrasında kollajen fibrillerin açığa çıkmasıyla başlar [15]. Kollajen açığa çıktığında, bakteriyel asitlerin etkilerine açık hale gelerek, hızla kök yüzeyinde dentin dokusunun yıkımına sebep olabilir [16].

Demineralizasyon remineralizasyon dengesi, ağız içindeki koruyucu ve patolojik faktörler arasındaki ilişkiye bağlıdır [17] (Şekil 2.1).



Şekil 2-1: Çürük gelişiminde patolojik ve koruyucu faktörlerin şematik diyagramı

[17]

Çürük oluşumunda diğer faktörler olan beslenme, dişlerin dizilimi ve morfolojileri, ağız hijyeni alışkanlıkları, bağışıklık sistemi, sistemik hastalıklar ve ilaç kullanımı, sosyo-ekonomik durum gibi etkenler de çürük oluşumunda bir bütün olarak ele alınmalıdır [18].

2.2. Kök Çürükleri

Kök yüzeyleri, kompozisyon, morfoloji, topografi ve yapısal farklılıkları ile dişin koronal kısmından farklıdır.

2.2.1. Kök Sert Dokularının Kompozisyonları

Sement ağırlıkça yaklaşık %45-50 inorganik, %50 ise çoğunlukla tip I kollajenden oluşan organik yapı içerir. Dentin bileşiminde ise ağırlıkça yaklaşık %70 inorganik, %18 organik yapı ve % 12 su bulunur. Bu organik içerik kök sert dokularını, ağırlığının yaklaşık %95-98 oranında inorganik içeriğe sahip olan mineden daha esnek kılar [19].

Diş sert dokularının inorganik yapısında hegzagonal formda hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kristalleri bulunur; ancak kök mineral içeriği mineye kıyasla daha az ve kristal boyutu daha küçüktür. Minede kristaller yaklaşık 100 nm uzunlukta ve 40 nm

genişlikteyken, dentin ve sementte 50 nm uzunluk ve 20 nm genişliktedir. Ayrıca sementin kristal yoğunluğu diğer diş sert dokularından azdır [9].

Kristal yapının içerdiği iyonlar da dokular arasında farklılık gösterir. Dentin ve sementin magnezyum ve karbonat içeriği de mineden fazladır ($\sim$ % 6.2 ve $\sim$ % 1.2). Bu durum asidik ortamda kök sert dokularının, mineye göre daha kolay çözünmesine yol açabilir [20].

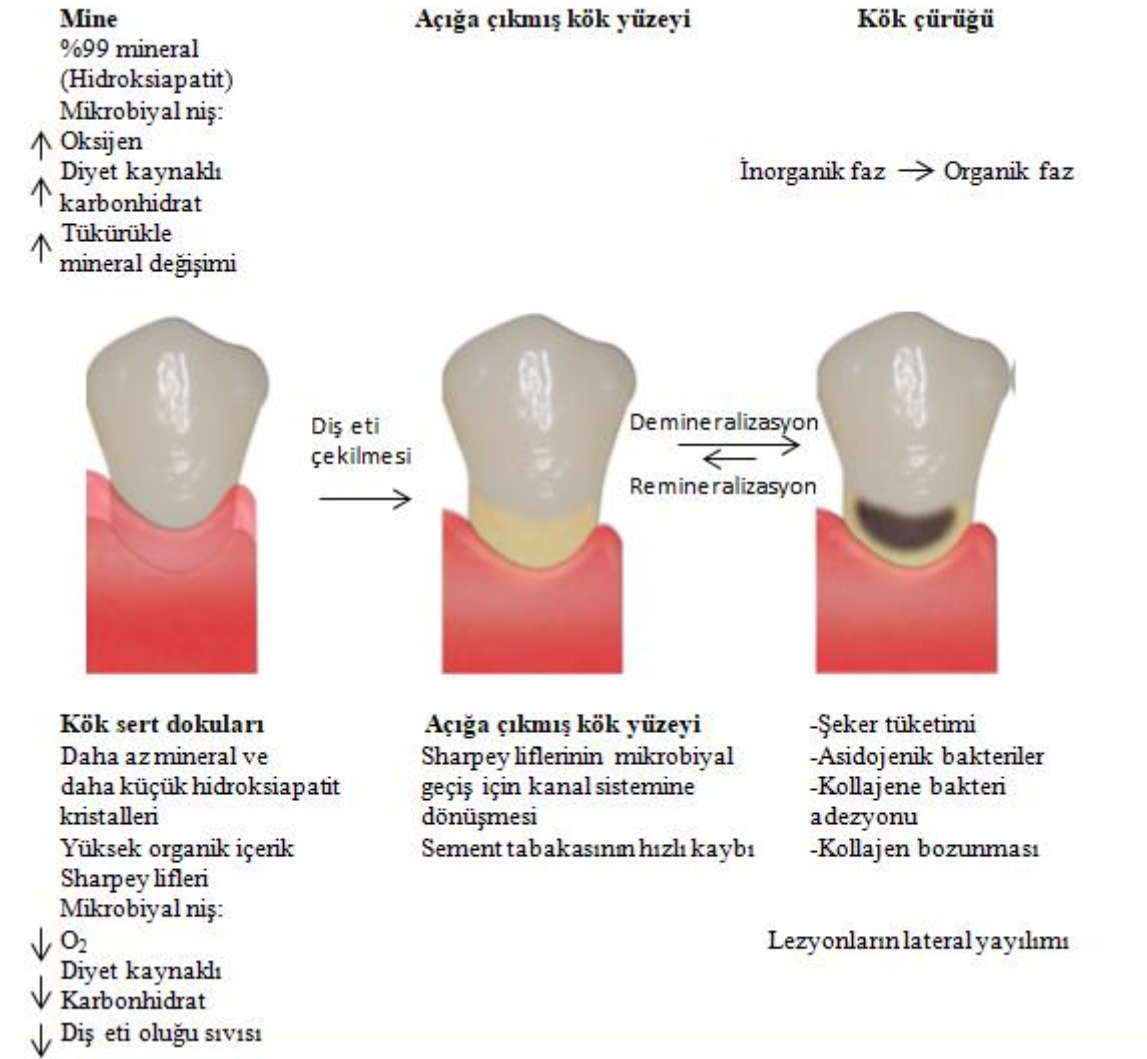
2.2.2. Kök Sert Dokularının Histomorfolojisi Ve Yapısal Özellikleri

Sement dokusu, hücreli ve hücresiz sement olarak iki farklı dokusal yapıya sahiptir. Hücresiz sement kök dentinini mine-sement sınırından başlayarak 2/3 lük kısma kadar sarar. Kökün apikal 1/3 ünde ve molar dişlerin furkasyon bölgelerinde hücreli sement bulunur [9]. Hücresiz sementte kollajen lifler kök yüzeyine paralel, periodontal aralıkta ise kök yüzeyine dik gelecek şekilde konumlanır. Bu kollajen liflerin sement dokusu içine gömülü kısmına Sharpey lifleri denir. Bu lifler bir uçlarıyla kemiğe diğer uçlarıyla sementte gömülerek diş alveol kemiğine mekanik olarak bağlar. Sement kalınlığı bölgeye göre değişir, apekse doğru artar [9].

Dentin kanallarının içinde odontoblast uzantılarının bulunması itibarıyla dentin canlı bir doku olarak kabul edilmektedir. Odontoblastlar, primer dentin yapımı tamamladıktan sonra yavaş ancak sürekli olarak sekonder dentin yapmaya devam eder. Tersiyer dentin, kimyasal uyaranlar, çürük, restoratif işlemler, atrizyon ve travmalar gibi değişik irritanlara cevaben hayat boyu yapılır. Tersiyer dentin; irritasyon dentini, irregüler sekonder dentin, reaksiyoner dentin ya da reperatif dentin olarak da adlandırılır [8].

Mine-sement birleşimi düzensiz yapıda, fırça ile ulaşmanın zor olduğu ve plak birikiminin fazla olabildiği bir alandır; kök yüzeylerinin de açığa çıkmasıyla çürüğe zemin hazırlanır. Diş eti çekilmesi, epitelyal ataşmanın apikale doğru çekilmesiyle sementin açığa çıkması olarak tanımlanır [21]. Kök çürüklerinin %80-90'ı diş eti çekilmesi olan bölgelerde, kalan kısmı ise subgingival olarak görülebilmektedir [22].

Kök ağız ortamına açıldıktan sonra yüzeyde yeni bir ekolojik niş meydana gelir. Ortamda oksijen artar, anaerobik ortam aerobik ortama dönüşür, mikrobiota değişir. Diş eti oluşu sıvısı da mikroorganizmalar için besin kaynağı haline gelir. Sharpey lifleri de bakteriler ve metabolik ürünlerinin sement matriksine kolayca geçişini sağlar [23].



Şekil 2-2: Kök çürüklerinin spesifik özellikleri [23]

2.2.3. Kök Çürüklerinin Biyokimyası Ve Histopatolojisi

Diş dokularındaki biyokimyasal farklılıklar çürük paternine de yansır. Kök çürüğü oluşumu iki aşamalı olarak gerçekleşir. İlk aşama mineral çözünmesi, ikinci aşama ise organik matriksin etkilenecek yapısının bozulmasıdır [24]. Dentin ve sementin inorganik fazda çözünmeleri benzerlik gösterir. Bu nedenle genellikle diş kökünün mineral yapısı ile ilgili çalışmalarda birlikte ele alınırlar.

İlk dönemde asidojenik ve asidürik bakteriler sement dış yüzeyini demineralize ederek ortama yerleşirler [25]. Bu şekilde ortaya çıkan lezyon, primer sement çürüğüdür (inorganik faz). *Streptococcus mutans*, *Laktobasiller*, *Actinomyces*, *Veillonella* gibi bakteri türleri ve ayrıca *Candida albicans* gibi mikroorganizmalar, Sharpey lifleri ve

kollajen fibrillerin bulunduğu kanallara ulaştığında [26], kökün özellikle koronal kısımlarındaki sement dokusu da ince ve genellikle tek tabakalı olduğundan, bu bölgelerde çürük lezyonu sement-dentin sınırına çok hızlı bir şekilde ulaşım yayılmaktadır. Sonrasında endojen ve eksojen kollajenazlar kollajen yıkımına sebep olur (organik faz) [24].



Şekil 2-3: Kök çürüğü evreleri [27]

Mineral çözünmesi açısından bakıldığında mine için 5,4 civarında olan kritik pH'nın kök sert dokuları için yaklaşık 6- 6,8 aralığında olduğu tahmin edilmiştir [28]. Ancak 2010 yılında yapılan bir çalışma, belli konsantrasyonlardaki çevresel kalsiyum ortamı şartlarında bu değerin 5,22 – 5,66 aralığına kadar inebildiğini de göstermiştir [29]. Kritik pH, diş yüzeyindeki dental plak sıvısının hidroksiapatite göre doymamış olduğu ve diştten kalsiyum fosfatın ayrılmasına yol açan değerdir [23].

Organik matriks yıkımı için öncelikle dentin dokusunun farklılıklarına bakmak gerekir. Dentin yapısının büyük bir kısmını oluşturan tip I kollajen, heterotrimer yapıdadır. Kollajen moleküler stabilizasyonu sağlarken dentine mekanik özelliklerini kazandırır. Çürüğün ilerlemesiyle kök sert dokularında kollajen matriks yıkımı başlar [23].

Dentin yıkımında çeşitli endojen kollajenazların etkisi olduğu bilinmektedir. Matriks metalloproteinazlar, doku gelişimi ve onarımının yanı sıra patolojik süreçte de yer alır. Matriks metalloproteinazlara bağlı inaktif formdaki (fibril formasyonunu sağlayan kollajen I, II ve III) yapıları, asidik koşullar altında (yaklaşık 4,5 pH) aktive olurlar [30]. Kollajen yapısında bulunan amino gruplarında Glisin-Lösin bağları parçalanır ve proteolitik yıkım gerçekleşir [31].

Demineralizasyon sonucu açığa çıkan kollajen matriks, bakteriyel kolonizasyon için bir taşıyıcı altyapı oluşturur. Asit üreterek dentinin demineralizasyonundan sorumlu

olan bakterilerin aynı zamanda matriks yıkımından da sorumlu olabileceği düşünülmüştür [23]. Ancak konuyla ilgili karşıt görüşler de vardır [32].

2.2.3.1. Sement Lezyonları

Klinik olarak başlangıç kök çürükleri tek ya da çoklu lezyonlar olarak gözlenmektedir. Çürük sürecinin bu erken evrelerinde, sement çizgileri boyunca kırıklar oluşur, böylece aşamalı demineralizasyon gözlenir. Bazen de küçük yarıklar sementi boydan boya geçerek periferal dentine uzanır. Yarıklar büyüyerek bakteri penetrasyonu için giriş noktası oluşturur [33].

Kök yüzeyinde de mineye benzer şekilde mineral değişimleri sonucu demineralizasyon ve remineralizasyon gerçekleşir. Kök çürüğünün erken dönemlerinde mineraller dış yüzeyden dentine doğru çözünmeye başlar. Çözünen mineraller karyojenik biyofilmin hemen altında çökerek 10–30 µm kalınlığında, ince bir koruyucu katman oluşturur. Bu hipermineralize yüzey tabakası yaygın görülen bir özelliktir. Mineralize yüzey tabakasının altı, lezyon gövdesine benzer şekilde daha az mineral içeriğe sahiptir [34].

Yüksek oranda mineralize olmuş yüzeyel bir tabakanın oluşması, remineralize dentin lezyonunun dehidrasyona uğramasına karşı çok önemli bir koruyucu alan oluşturabilir [35].

Demineralize dentin ve sement alanlarında, kollajen yapının dehidrasyona bağlı olarak su kaybetmiş olması sonucunda, dokuda bir büzülme olmaktadır. Çürük lezyonu ne kadar ileri aşamadaysa, büzülme miktarı da o kadar fazla olmaktadır. Lezyon remineralize olmuşsa ve yüksek derecede mineralize intakt bir yüzeyel tabaka meydana gelmişse, büzülme miktarı azalmaktadır [36].

Lezyon şiddeti ile büzülme miktarı arasında bir korelasyon vardır. Demineralize olmuş bir lezyon alanı tekrar remineralize olduğunda, matriks yapısı orijinal konturlarına tekrar ulaşmakta ve büzülme şartları ortadan kalkmaktadır [37].

Kök çürüğü lezyonlarında kollajen yapıda oluşan büzülme miktarı, lezyonun şiddetini gösteren bir indikatör olabilmekte ve aktif lezyon ile hapsolmuş lezyon arasında bir ayırıcı tanı oluşturabilmektedir [38].

Kök çürükleri lezyon şekli bakımından koronal çürüklerden farklıdır. Mine çürükleri prizma doğrultusunu takip ederek, derinleşerek ilerlerken; kök çürükleri sementin inkremental çizgilerini takip ederek lateral olarak yayılır. Daha geniş ancak ince lezyonlar şeklinde görülür. Bu lateral yayılımın muhtemel açıklaması olarak diş eti oluşu sıvısının varlığı, bakteriyel birikimlerin kalınlığı, tükürük akışına maruziyet, diş dokusunun yapısı gibi faktörler düşünülmüştür. Bunun dışında diş eti oluşu sıvısı nötral-zayıf alkalin pH sayesinde düzenleyici ajan olarak görev yapıyor olabilir. Ayrıca ince biyofilm tükürüğün geçişine izin vererek metabolitlerin inaktive edilmesine imkan verebilir [24].

2.2.3.2. Dentinde Başlangıç Lezyonu

Başlangıç lezyonu, dentinde aşamalı yıkımla gerçekleşir. Gelişmekte olan dentin yıkım alanları, daha önce gerçekleşen hasardan ayırt edilebilir. Sement lezyonlarında görülen mineralize alanlara dentinde de rastlanabilir. Yüzeye dik oluşan çoklu yarıklar birleşerek mikrokavitelere dönüşür. Yarıklardan penetre olan mikroorganizmalar daha sonra kanallara invaze olur [39].

2.2.3.3. Dentinde İlerlemiş Lezyon

İlerlemiş lezyonlarda intertübüler dentinin neredeyse tamamı demineralize olur ve böylece mikrokaviteler genişler. Dentin kanallarına bakteri invazyonu sonrası peritübüler dentin de çürükten etkilenir. Buna rağmen remineralizasyon işaretleri de gözlenir. Yüzeyde küçük iğne benzeri kristaller ve dentin tübüllerinde mineral birikimine rastlanabilir. Bu durum dentin kontaminasyonu olsa da, eksternal biyofilm kontrol altına alındığında kök çürük lezyonlarının durdurulabileceğini göstermektedir [40].

2.2.3.4. Durağan Lezyonlar

Durağan çürükler belirgin yüzey aşınması gösterirler ve neredeyse tamamen mineralize dokulardır. Yüzeye yakın dentin kanalları mikroorganizma kalıntıları ve granüler kristaller ile doludur. Dentinde tübüler sklerozis gözlenir. Granüler kristallerin tübüler lümeni tıkayarak intertübüler dentinin mineralizasyonunu sağlaması, pulpa dentin kompleksinin kök çürükleri üzerindeki reperatif potansiyelini gösterir [40].

2.2.4. Kök Yüzeylerinde Biyofilm Oluşumu

Mikroorganizmaların hastalıklarla ilişkisini ele alan germ teorisi Pasteur ve Koch tarafından 1850'lerin sonlarından itibaren şekillendirilmiş olsa da [41], kök çürüklerinin mikrobiyal etiyojisine dair çalışmalar çok daha yenidir [42].

Araştırmaların ilk dönemlerindeki çalışmalar hastalığa mikrobiyatadaki bazı türlerin neden olduğuna işaret eden spesifik plak hipotezinden bahseder. Ancak diğer bir görüş olan non-spesifik plak hipotezi ise tüm plağın patojenik olduğunu savunur. Üçüncüsü ise günümüzde en fazla kabul gören ekolojik plak hipotezidir.

İlk olarak Marsh tarafından önerilen hipotez, ilk iki hipotezdeki anahtar kavramları birleştirerek, hastalığın çevresel koşullardaki değişikliğe yanıt olarak mikrofloradaki bazı türlerin artışıyla meydana geldiğini ileri sürer [43] .

Kök yüzeyleri ağız ortamına açıldığında, ağız sıvılarındaki moleküller kazanılmış pelikül olarak adlandırılan filmi oluşturmak için hızla adsorbe edilir. Diş yüzeylerindeki peliküllerin ana bileşenleri amilaz, statherin, prolinden zengin peptitler, müsinler gibi yapıları içeren glikoproteinler, fosfoproteinler, lipidler, antimikrobiyal proteinler ve konak savunma faktörleridir [44]. Bakteriyel kaynaklı glukoziltransferazlar pelikülda glukan sentezleyebilir ve streptokoklar için reseptör gibi davranarak doğrudan bakteri kolonizasyonunu etkiler. Ekspozе kök yüzeylerindeki pelikül mine ile karşılaştırıldığında daha fazla plazma proteini içerir ve bu durum biyofilm oluşum paternini etkileyebilir [45].

Mikroorganizmaların hücre yüzeyindeki adezinlerle, sement yüzeyindeki pelikül yapısı moleküler bir etkileşime girerek elektrokimyasal kuvvetlerle kök yüzeyine tutunma gerçekleşir. Primer kolonize türler kök yüzeyine tutunduktan sonra diğer türler koagregasyon yaparak birikime devam eder. Adezyon kabiliyeti kuvvetli olan türler erken ve geç kolonize olan türler arasında bir köprü görevi görür [46]. Bakteriyel kaynaklı glukoziltransferazların enzimatik etkileriyle sentezlenen glukanların varlığı mutans streptokokların ve diğer asit üretebilen mikroorganizmaların plak içerisinde tutunmasını ve kolonizasyonunu güçlendirir [47].

Kök yüzeyine tutunan mikroorganizmalar için temel besin kaynakları, tükürük ve diş eti oluğu sıvısı kaynaklı protein ve glikoproteinlerdir. Tükürük ve diş eti oluğu sıvısı aynı zamanda tampon görevi de görerek pH'nın nötralize edilmesine destek verir; ayrıca biyofilmlerin üreme ve aktivitesini düzenler [43].

Kök yüzey çürüklerinin gelişiminde rol oynayan birçok farklı bakteri cinsleri içerisinde en araştırılan ve tartışılanları Streptococcus, Lactobacillus ve Actinomyces tir.

Streptococcus

- Gram (+) kok
- Katalaz (-)
- Fakültatif anaerob, aerob
- Hareketsiz
- Ekstrasellüler polisakkarit (dekstran, levan) yapma kapasitesine sahiptir.
- Hidrojen peroksit oluşturarak diğer bakterileri baskılar.

Lactobacillus

- Gram (+), sporsuz
- Anaerob, fakültatif anaerob
- Çürüksüz ağızda bulunmaz.
- Çomaklar zincir şeklindedir.
- Asidofilik, asidojenik olup laktik asit üretirler.
- Diş yüzeyine afinitesi olmadığından çürüğün başlamasından çok ilerlemesinde etkindir.
- Fırsatçı bir mikroorganizma olup tek başına çürük etkeni değildir.

Actinomyces

- Gram (+) çomak,
- Sporsuz
- Fakültatif anaerob
- Katalaz (+)
- Laktik asit, asetik, süksinik ve formik asit üretirler [48].

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda *Actinomyces*'e yapılan vurgunun aksine, daha yeni çalışmalar kök çürüğünün gelişiminde önemli bir rol oynasa da, kök yüzeyi lezyonlarının birincil nedeni olmadığını göstermiştir.

İnsanlarda kök yüzey çürük lezyonlarının ilk çalışmaları Sumney ve Jordan tarafından yapılmış, *Streptococcus mutans* floranın önemli bir bileşeni olarak belirlenmiştir. Ancak, *Actinomyces*'in de tespit edilmesiyle kök yüzeylerinin kendine özgü bir florası olduğu vurgulanmıştır [42].

1985 yılındaki çalışmalar, *Lactobacillus* ve *S. mutans* barındıran kök yüzeylerinin çürümeye yatkın olduğu ve plaklarında her iki bakteri bulunan bireylerde kök yüzey çürüğü riskinin arttığı sonucuna varmıştır [49].

1986'da yapılan bir çalışmanın bulguları, kökte başlangıç lezyonu alanlarında önemli ölçüde daha yüksek sayıda *S. mutans* olduğunu kanıtlamıştır. İlginç bir şekilde, çürük içermeyen kök yüzeyi alanlarının, çürük kök örnekleriyle karşılaştırılması, bu çürüksüz bölgelerin kök lezyonlarından daha fazla sayıda *Actinomyces*'e sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, kök yüzey lezyonlarının birincil nedeni olarak *Actinomyces*'i vurgulayan çalışmaların aksi yönündedir [50].

1988 yılındaki bir çalışmada en yüksek lezyon sayısına sahip bireylerde daha yüksek sayıda *Actinomyces* bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hem *S. mutans* hem de *Lactobacillus* varlığı ile artan kök yüzey çürüğü riski arasındaki ilişki doğrulanmıştır. Bunun dışında, *S. sanguinis* ise, çürük yüzeylere kıyasla sağlam kök dokularında daha yüksek oranlarda bulunmuştur [51].

Newburn, bakteriyolojik araştırmasında kök yüzey lezyonlarını kaplayan plak örneklerinde, ağırlıklı olarak *Actinomyces viscosus* bulunduğunu bildirmiştir. Bunun yanında *Actinomyces*'in diğer türleri *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. eriksonii* ile *Rothia dentocariosa*, *Nocardia* ve *S. mutans*'a da rastlanmıştır [52].

Shen ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada ise, kök çürük lezyonlarından izole edilen baskın mikroorganizmalar olarak *Lactobacillus* spp. (% 90), *Streptococcus* spp. (100%) ve *Actinomyces* spp. (% 63) tespit edilmiştir [53].

2013 yılında, Aparna ve ark. izole edilen örneklerde *Streptococcus* (%56,7) ve *Lactobacillus* (%28,3) prevalansının *Actinomyces* türlerinden daha yüksek bulunduğunu (%15) rapor etmişlerdir. Çalışmada *Lactobacillus* 55-75 yaş aralığında %76,5 oranında

görülürken, 35-44 yaş aralığında yalnızca %23,5 olarak görülmüş ve *Lactobacillus*'un yaşla yakından ilgili olabileceği belirtilmiştir [54].

Preza ve ark. çalışmalarında kök çürüklerinin kompleks mikrobiyal birlikteliklerden oluştuğunu, yalnızca *S. mutans*, *Lactobacillus* ve *Actinomyces* değil, aynı zamanda *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium* ve *Selenomonas* gibi birçok türü de içerdiğini bildirmiştir [55].

Dame-Teixeira ve ark. ise 2016 yılında *Actinomyces* spp. gen ekspresyonunu aktif çürüklü ve sağlıklı kök yüzeylerindeki biyofilmleri RNA dizileme yöntemiyle analiz etmiş, her iki grup arasında fark bulunmadığını rapor etmişlerdir [56].

Bunun dışında *Candida albicans* yumuşak kök yüzey lezyonlarında görülmekle birlikte, kök çürüklerinin başlangıcında etiyolojik faktör olarak görülmemektedir [53, 57].

Sonuç olarak kök çürüklerinde ortam şartları, lezyon aktivitesi, lezyon derinliği ve lezyon derinliğine bağlı olarak değişebilen çeşitli tür ve oranlarda, farklı mikrobiyal oluşumlar görülebilmektedir.

2.3. Dişlerde Demineralizasyon Remineralizasyon Süreçleri

2.3.1. Mineralizasyon

Mineralizasyon organik matriksin üzerine içsel ve yüzeyel olarak inorganik madde çökmesiyle meydana gelen, hayat boyu süren bir süreçtir. Normal biyolojik süreçte kemik, dentin ve sement gibi sert dokularda kollajen fibrillerden oluşan iskelet matrikse kalsiyum fosfat kristallerinin yerleşmesi söz konusudur [58]. Kemik, dentin ve minede hücreler kristal morfolojisi, büyüme, kompozisyon ve konumları kontrol ederken, ekstraselüler matriks molekülleri ve enzimler mineral tuzlarının dokuya giriş ve yerleşimine yön verir [59, 60].

Dentin, dişin büyük bölümünü oluşturan bir dokudur. Ağırlıkça yaklaşık %70'i mineralize olup, %20 organik matriks ve %10'u sudan oluşur. Dentinin organik kısmının yaklaşık %85'i tip I kollajen içerirken, geri kalan kollajen tip III ve IV tür. Non-kollajen bölümün yaklaşık yarısı da dentin fosfoproteinlerden ibarettir. İnorganik yapı ise esas olarak hidroksiapatit kristallerinden oluşur [61].

Dentin dokusundaki Tip I kollajen, mineralize alanın ~% 56'sını kaplar; mineral yapı fibril uzantılarının aralarındaki bağlantı porlarında ve fibrillerin yüzeyel alanlarında yer alır [59, 60]. Kollajen olmayan proteinler, mineral birikiminin inhibitörleri, hızlandırıcıları ve/veya stabilizatörleri olarak işlev görür. Örneğin, glikoproteinler, kolajen fibrilleri olgunlaşana ve doğru boyutlarına ulaşana kadar erken mineralleşmeyi önler. Asidik bir fosfoprotein olan dentin matriks protein-1, nükleasyonun başlatılmasında ve mineral faz morfolojisinin modülasyonunda önemli bir rol oynar [62].

Dentinogenez sırasında genellikle üç tip mineralizasyon meydana gelir; matriks vezikülleri kaynaklı (manto dentininde), ekstrasellüler matriks molekülü kaynaklı (dentinin çoğunluğunda) ve kan-serum kaynaklı mineralizasyon (peritübüler dentinde) gerçekleşir [63]. Odontoblastlar, mineralizasyonun başlaması için bir ön koşul olan kondroitin sülfat gibi bir asit mukopolisakkarit salgılar. Bu mukopolisakkarit, dentin matriksinde mineralizasyon bölgesine taşınır. Böylece kalsiyumu çeker ve mineralleri hücrelerden ekstrasellüler matrikse taşımaya yarar [8].

Kalsiyum fosfat, diş oluşumu için gerekli temel yapıdır. $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ hidroksiapatitin stokiyometrik formülünü gösterir. $\text{Ca}_{10-X}\text{Na}_X(\text{PO}_4)_6-\text{Y}(\text{CO}_3)(\text{OH})_{2-Z}\text{F}_Z$ ise hidroksiapatitin atomik yer değiştirme kısımlarını gösterir. Bu hidroksiapatit kalsiyumdan daha fakirdir ve karbonatlı bir yapı içerir. X kalsiyumun metal katyonla yer değiştirmesini, Y fosfatın karbonatla yer değişimini ve Z hidroksitin florla yer değiştirmesinin ifade eder [64–66].

Kalsiyumdan daha fakir ve karbonatlı hidroksiapatit bu yer değişimlerinin çoğunu oluşturan kısımdır. Diğer çok az sayıda değişim, kalsiyum iyonlarının (~% 1) potasyum, sodyum ve magnezyum gibi diğer metal iyonları ile değiştirildiği durumlarda meydana gelir [67]. Karbonat ve diğerler iyonik değişimler, hidroksiapatitin kristal ağını önemli ölçüde bozar. Bu durum hidroksiapatiti zayıflatır, asit saldırılarına karşı duyarlılığını ve çözünürlüğünü artırır [68]. Dentin karbonat içeriği %5 - %6 iken minede %3'tür. Dentindeki hidroksiapatit kristal boyutu da minedekinden daha küçüktür, böylece dentin matriksi asit saldırılara karşı daha savunmasız bir hale gelir [69]. Yaşla birlikte, dişte hidroksiapatitin kristallliği azalır, ancak karbonat içeriği artar. Karbonat içeriği hidroksiapatitin reaktivitesi ve çözünürlüğünde oldukça önemlidir [70].

Mine dokusunda da yüzel mineden dentin-mine birleşimine doğru karbonat içeriği artmakta, kristal yapı azalmakta ve özellikleri değişmektedir [71].

Kalsiyum, fosfat ve florür iyonları demineralizasyon ve remineralizasyon arasındaki ilişkide önemli bir rol oynar ve sert dokuların lezyonun ilerlemesine karşı olan duyarlılığını modifiye eder. Mine, dentin ve sement dokularında oluşan demineralizasyon sırasında, kalsiyum salınımı fosfat salınımından önce gelir. Bu nedenle, demineralizasyon sürecini baskılamak için fosfat yerine kalsiyum kullanımının daha etkili olacağı düşünülmüştür [72].

Demineralizasyon, mine, dentin, sement ve kemik sert dokularının hidroksiapatit kristallerinden mineral iyonlarının uzaklaşmasıdır. Bu mineral iyonlarının hidroksiapatit kristallerine yeniden kazandırılmasınaysa remineralizasyon denir. Diş yüzeyinde mineral kaybıyla hidroksiapatit ağının bütünlüğünün bozulmasıyla, mikro kaviteler oluşur. Demineralizasyon tersine çevrilebilir bir süreçtir; dolayısıyla, dişlerdeki kısmen demineralize hidroksiapatit kristalleri, remineralizasyonu destekleyen ortamlara maruz kalırlarsa orijinal boyutlarına dönebilirler [73].

2.3.2. Demineralizasyon

Dişlerin kimyasal demineralizasyonuna asit ataklar sebep olur. Bu ataklar tüketilen yiyecek veya içeceklerin asit yapısı veya sert doku yüzeyindeki bakteri plağının metabolik aktiviteleri sonucu gerçekleşebilir [8]. Kimyasal çözünme sürecinde hem organik hem de inorganik yapılar etkilenir. Bu durum sert dokulara olan asit difüzyonu ve mine ve dentindeki su içeriğiyle ilgilidir [69].

Demineralizasyonun iki ana sonucu erozyon ve çürük lezyonlardır. Dişler diyet dışında gastroözofageal reflü, bulimia nervosa, ruminasyon gibi durumlarda da asit erozyonuna maruz kalır ve hasar görür. Yapısı zayıflamış doku aynı zamanda çürüğe yatkın hale gelir [74]. Bakteriler dişin demineralize bölgelerinde kolayca kolonize olup, oluşan lezyonun ilerlemesiyle dentine nüfuz edebilir [75].

Çürük lezyonu, başta *Streptococcus mutans* olmak üzere asidojen bakterilerin ve şekerin diş yüzeyindeki etkileşiminden kaynaklanır. Bakteriler, sukroz, glikoz ve fruktoz gibi fermente olabilen karbonhidratları metabolizmaları için kullanarak çürük lezyonlara yol açan asidik bir ortama neden olurlar [76, 77].

Bakterilerin asit üretimi ve çürük oluşumundaki rolü ile ilgili en yaygın kabul gören hipotez, "ekolojik hipotez" dir. Burada bakteri plağı, dinamik stabiliteyi sürdürmek için mutans olmayan bakterilerin de koloni yapısı içinde yer aldığı dinamik bir mikrobiyal ekosistem olarak tanımlanır. *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *Lactobacillus* şeker fermentasyonunun ardından yüksek seviyelerde laktik asit üretme yetenekleri ve düşük pH'nın olumsuz etkilerine dirençlerinden dolayı ana oral karyojenik patojenler olma özelliği taşır [78].

2.3.3. Remineralizasyon

Remineralizasyon; özellikle erken safhasında durdurulabilen veya geri döndürülebilen demineralizasyonun, hem önlenmesini hem de iyileştirilmesini kapsamaktadır. Tükürük, diyet kontrolü, probiyotik bakteriler, oral hijyen uygulamaları ve remineralizasyon ajanları koruyucu faktörler olmaktadır [8].

Tükürük, asit maruziyetinin ağız içi nötralize edici etkilerini belirleyen en önemli biyolojik faktörlerden biri olarak kabul edilir [79]. Ağız içi temizleme ve antibakteriyel unsurlarının yanı sıra, daimi kalsiyum ve fosfat kaynağı olmasıyla düşük pH şartlarında, tamponlama ve demineralizasyonu engelleyerek remineralizasyona katkı sağlama potansiyeli taşır [80]. Ayrıca, tükürük salgılanması uyarıldığında, pH seviyesinde nötr değerin de üzerine çıkan hızlı bir yükselme meydana gelir. Sonuç olarak tükürük çökeltisi adı verilen bir kalsiyum fosfat ve glikoprotein kompleksi oluşur. Bu kompleksin, dental plağa kolaylıkla dahil olarak kalsiyum ve fosfatın yüksek çözünürlüğü sayesinde (dişteki kalsiyum fosfattan sekiz ile on kat daha yüksek), diş dokusundan önce çözünen, yani diş sert dokusundaki demineralizasyonu azaltan bir mineral yapı görevi gördüğü düşünülmüştür [81].

Probiyotikler Dünya Sağlık Örgütü tarafından 'uygun miktarlarda verildiğinde konak yapıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar' olarak tanımlanan, genellikle bakteriyoterapi için önerilmeye aday bakteriler olmuşlardır. Probiyotik kelimesi "yaşam için" anlamına gelir ve bu amaçla doğal ya da genetiği değiştirilmiş bakteri suşları kullanılabilir [82].

Konak için ağız sağlığına yarar sağlama yeteneğine sahip probiyotik örnekler arasında *Lactobacillus* (örn., *L. salvarius* [83], *L. reuteri* [84] ve *L. rhamnosus* [85]) ve normal oral floranın bir parçası olan *Bifidobacterium* bulunur [86]. Biyoterapide diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların tedavisi ve önleme için kullanılabilirler.

Probiyotik bakteri, bu işlevi patojen bakteri sayısını azaltarak (*S. mutans*) [87] veya GtfB ve LuxS [85, 88, 89] gibi *S. mutans* virulans genlerinin ekspresyonunu inhibe ederek ve dolayısıyla biyofilm oluşumunu değiştirerek yerine getirir.

2.4. Çürük Önleyici Ajanlar ve Remineralizasyon Ajanları

Çürük önleyici ajanlar ve remineralizasyon ajanları, içerdikleri aktif bileşene ya da etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Bu materyaller başlıca,

1.Mineral ve İyon Teknolojileri

- Flor iyonu
- Gümüş iyonu
- Demir iyonu

2.Antibakteriyel Materyaller ve Biyofilm Modifiye Ediciler

- Klorheksidin
- Kitosan
- Ksilitol
- Arjinin
- Triklosan

3.Biyoaktif Materyaller ve Nanoteknoloji Ürünleri

- Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP)
- Trikalsiyum Fosfat (TCP)
- Kendiliğinden Birleşen Peptitler
- Dentin Fosfoprotein Türevleri (8DSS Peptitler)
- Kalsiyum Sodyum Fosfosilikat (Biyoaktif Cam)
- Trikalsiyum Silikat
- Nano Hidroksiapatit

4.Bitkisel Kaynaklı Ajanlar

- Proantosiyanidin

- Hesperidin
- Galla Chinensis
- Teobromin

5. Diğer Kalsiyum ve Fosfat Kaynaklı Remineralizasyon Ajanları

- Sodyum Trimetafosfat (TMP)
- Dikalsiyum Fosfat Dihidrat (DCPD)
- Kalsiyum Fosforil Oligosakkaritleri
- Kalsiyum Karbonat (CaCO_3)

gibi örneklerle sınıflandırılabilir [11, 90].

Bunların arasında geleneksel ve yeni yaklaşımlar bulunmakla birlikte, bazı ajanlar özellikle kök çürüklerinin önlenmesi ve tedavisi bakımından öne çıkmaktadır.

2.4.1. Mineral ve İyon Teknolojileri

2.4.1.1. Flor İyonu

Günümüzde kök çürükleri de dahil olmak üzere, diş çürüklerini önlemek amacıyla en sık kullanılan remineralizasyon yöntemi flor uygulamalarıdır. Sistemik veya topikal uygulamalarla alınan flor antikaryojenik etkisini farklı mekanizmalar üzerinden gösterir [91].

-Demineralizasyonu Önleyici Etki

Plak sıvısında bulunan flor, kristalin yapısına girerek florapatit oluşturur. Bakterilerin asit üretimi esnasında hidroksiapatitten daha dirençli olan bu yapı, diş dokularını çözünmekten korur [17]. Kalsiyumla birleştiğinde oluşan kalsiyum florür (CaF_2), pH kontrollü florid olarak nitelendirilir ve kalsiyum rezervuarı olarak görev yapar.

-Remineralizasyonu Artırıcı Etki

Flor asit üretimini engelleyerek tükürük pH'sının tamponlanmasına destek verir ve pH seviyesi kritik değerin üzerine çıktığında tükürükteki Ca ve PO_4 iyonları CaPO_4 şeklinde diş yüzeyine çökerek remineralizasyon süreci başlayabilir [17].

-Antibakteriyel Etki

Yüksek konsantrasyondaki flor (12000 ppm) *Streptococcus mutans*'ın da içinde olduğu karyojenik bakteriler üzerinde direkt toksik etki gösterir [92]. Flor, bakterilerin enolaz, üreaz, fosfataz gibi hücresel enzimlere direkt, ya da metallerle kombinasyonu ile nitrojenaz, RecA ve CheY proteini gibi yapılarına bağlanarak inhibe edici ve asit üretimini önleyici etki gösterir [93]. Ayrıca hidrojen florür (HF) formuyla bakterinin hücre membranının proton geçirgenliğini artırır [94]. Glikoliz ve intrasellüler polisakkarit yapımı inhibe olur. Böylece makromoleküllerin sentezi ve hücre dışına salınımı önlenir [93]. Ancak 2017'de yayınlanan bir çalışmanın sonuçlarına göre, bazı Mutans suşlarının flora karşı direnç gösterebildiği bildirilmiştir [95].

Florun çürük önleyici etkisi 1930'lu yıllardan bu yana ele alınmaktadır. Toplum ağız sağlığının korunması için bireylerin ağız sıvılarında düşük fakat sabit düzeyde flor bulunması amaçlanmıştır. Bunun için içme suları, tuz ve süt gibi gıdalara flor ilaveleri yapılmış, florürlü tablet ve damlalar üretilmiştir. Ancak bu ürünlerin aşırı tüketiminin florun toksik etkilerine neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [96].

Florun remineralizasyona etkisinin, sistemik yoldan çok topikal uygulanması ile olduğu belirtilmektedir. Topikal florür uygulamaları bireysel ve profesyonel olmak üzere iki ayrı kategoriye ayrılır [97].

Bireysel uygulanan florlu ürünler mililitresinde 0,23 ile 5 mg florür içeren, 230 ile 5000 ppm aralığında flor konsantrasyonuna sahip ürünlerdir. Bu ürünler ;

- Florlu diş macunları
- Florlu diş ipleri
- Florlu ağız gargara ve jellerdir.

Profesyonel olarak uygulanan florlu ürünler mililitresinde 1 ile 22,6 mg florür içeren 1000 ve 22.600 ppm arasında konsantrasyona sahiptirler [98]. Bu ürünler;

- Flor vernikleri
- Florlu jeller
- Florlu solüsyonlar
- Flor iyonoferez

- İntra oral flor salan cihazlardır [99].

Bireysel florür uygulamalarının kök çürükleri üzerine etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur. 1100 ppm sodyum florür (NaF) içeren diş macununun florür içermeyen diş macunu ile karşılaştırıldığında kök çürüğü insidansını azaltmada etkili bulunmuştur [100].

6 ve 8 aylık takibi yapılmış iki klinik çalışmada yüksek konsantrasyon (5000 ppm) flor içeren diş macunlarının, 1350-1450 ppm flor içeren diş macunlarına kıyasla kök çürüklerini durdurma etkisinin daha fazla olduğu kanıtlanmıştır [101, 102].

Ekstrand ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada günde bir kez 5000 ppm florürlü diş macununun kullanılması, tükürük ve biyofilmdeki flor konsantrasyonunu ve dişteki CaF_2 oluşunu artırırken, biyofilm oluşumu ve *S. mutans* and *Lactobacillus* sayılarını azaltmıştır [103].

Yapılan bir sistematik derlemede, 5000 ppm florürlü diş macunu kullanıldığında, kök çürüğü riskinin, 1100-1450 ppm macunlara kıyasla çok daha az olduğuna dair güçlü kanıtlara ulaşılmıştır. Amin florür ve kalay florür içeren diş macunu ve gargaraların kök çürüğü başlangıcını sodyum florüre göre daha fazla önlediği belirtilmiştir. 225–900 ppm flor içeren gargaranın plasebo grubuna göre daha etkili bir şekilde (DMFRS) (Decayed, Missing and Filled Root Surfaces) değerlerini düşürdüğü gösterilmiştir [104].

Günümüzde flor uygulamaları, çürük prevalansını düşürmesine rağmen tam olarak önlemede yetersiz kalmaktadır. Ayrıca florozis riski nedeniyle flor içeren ajanlara alternatif arayışlar devam etmekte olup, araştırmalar florun diğer çürük önleyici ajanlarla kombine edilmesi yönünde yoğunlaşmıştır [105].

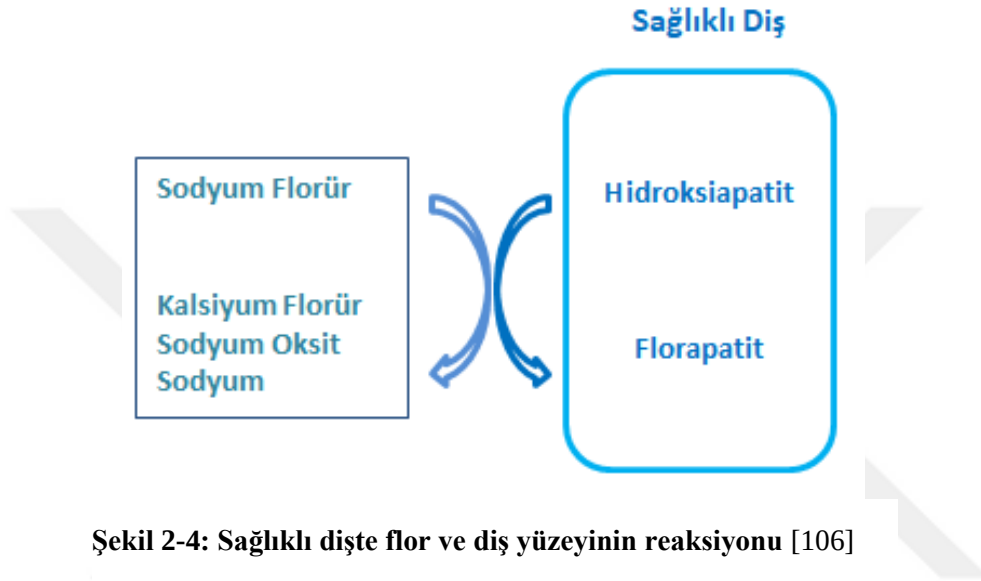
2.4.1.2. Gümüş İyonu

Gümüş iyonu, yüksek polarizasyon özelliği ile proteinlerdeki sistein ve histidin gibi sülfür ve nitrojen bağları içeren yapılarla etkileşime girebilir. Bu durum, gümüşün bakteri ve diş dokuları üzerine olan etkilerini açıklamaktadır [106].

Gümüş; bakteriler, protozoa, mantar ve virüsler gibi biyolojik organizmalar, hücre membranı, organeller, çekirdek gibi hücre içi elemanlar ile hücre metabolizması ve replikasyonu üzerinde etkili olabilir. Yapılan çalışmalarda gümüşün; proteinlerin sülfidril grupları ve DNA ile etkileşime girdiği, hidrojen bağlarını değiştirdiği, solunum

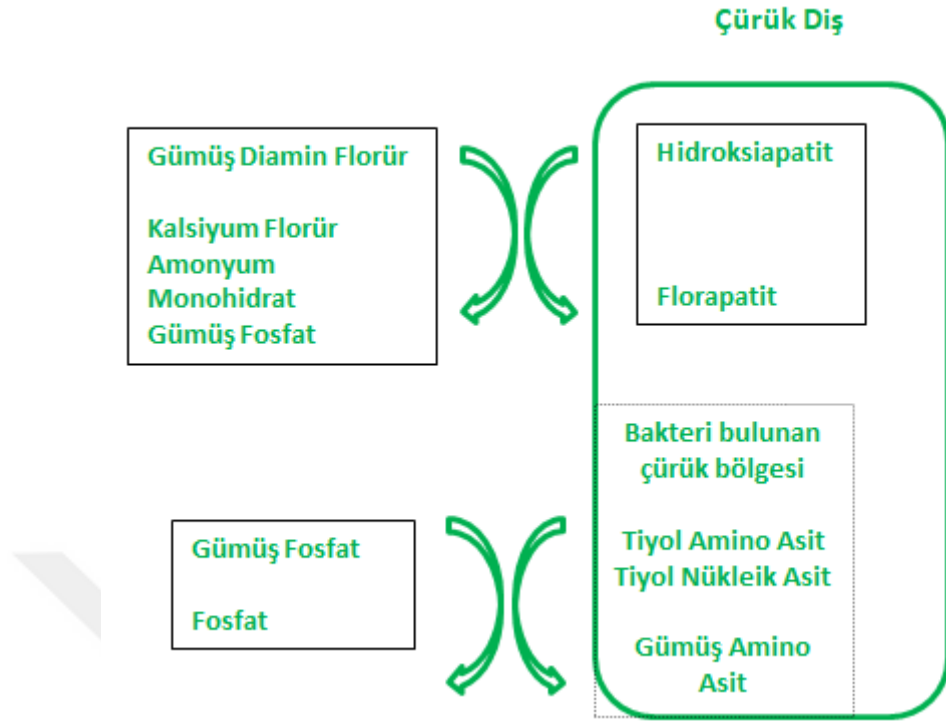
işlevlerini, DNA ayrılmasını, hücre duvarı sentezini ve hücre bölünmesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu etkiler makro düzeyde bakteriyel ölüm ve biyofilm oluşumunun önlenmesi ile sonuçlanır [107–109].

Şekil 2-4 ve Şekil 2-5'te florun ve gümüş diamin florürün diş yüzeyi ve bakteriler üzerine etkisi gösterilmektedir [106].



Şekil 2-4: Sağlıklı dişte flor ve diş yüzeyinin reaksiyonu [106]

Sağlıklı bir dişte florapatit oluşturmak üzere flor ve diş yüzeyinin reaksiyonu sonucu florapatit oluşur. Florapatit, asitler karşısında hidroksiapatite göre daha dayanıklıdır.



Şekil 2-5: Çürük diş dokusunda gümüş diamin florürün etki mekanizması [106]

Gümüş diamin florür (Silver Diamine Fluoride) hidroksiapatit ile reaksiyona girerek florapatit ve yan ürün olarak gümüş fosfat oluşturur. Bakteri hücresi içerisine giren gümüş, amino asit ve nükleik asitlerin tiyol grupları ile reaksiyona girer. Gümüş amino asitler ile gümüş nükleik asitler metabolik fonksiyonları ve yaşamsal fonksiyonları yerine getiremezler ve bu durum, bakterilerin ölümüne yol açar [106].

Gümüş diamin florür (SDF) 2014 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından dentin hassasiyeti tedavisinde kullanım onayı almıştır. 2016 yılında ise SDF ile diş çürüklerinin durdurulması 'yenilikçi tedavi' olarak tanımlanmıştır [110].

SDF'nin avantajları klinik uygulamalarının kolay ve ucuz olması, non-invaziv bir yöntem olup hem koruyucu hem terapötik özellikte olmasıdır. Fakat dişlerde renklenmeye sebep olması, metalik tadı ve geçici diş eti irritasyonuna neden olabilmesi gibi dezavantajları mevcuttur. SDF'nin çürük lezyonuna uygulanmasının ardından oluşan sarı renkli gümüş fosfat tabakası, gün ışığı ile reaksiyona girdiğinde koyu kahverengiye dönmektedir [111].

Renklenmenin engellenebilmesi için gümüş diamin florür uygulaması sonrası potasyum iyodür (KI) uygulanması önerilmektedir. KI, serbest gümüş iyonları ile reaksiyona girerek beyaz renkteki gümüş iyodür bileşimini oluşturmaktadır [112].

İleri yaşlardaki bireylerde yapılan 24-30 aylık takip çalışmalarında, %38 gümüş diamin florürün yılda bir kez uygulanmasının, yalnızca ağız bakım eğitimi verilmiş gruba göre kök çürüklerini önleme ve durdurmada daha başarılı olduğu bulunmuştur [113, 114].

Li ve arkadaşlarının yaptıkları 30 aylık klinik araştırmanın sonucunda, kök çürüğü lezyonlarına SDF uygulamasının ardından, lezyonların %90'ının, plasebo grubunda ise %45'inin durağan hale geldiği rapor edilmiştir [114].

3 ayda bir %1'lik klorheksidin vernik, %5'lik NaF ve yılda bir kez SDF uygulamasının kök çürüklerini önleme üzerine etkisi de araştırılmıştır. Kök çürüğü ortalama skorlarında en fazla düşüş SDF ile (0,7), sonrasında NaF (0,9) ve klorheksidin ile (1,1) görülürken, kontrol grubunda skor 2,5 olarak rapor edilmiştir. Uygulama sıklığı göz önüne alındığında SDF'nin daha avantajlı olabileceği sonucuna varılmıştır [115].

Schwendicke ve Göstemeyer yüksek risk gruplarında yılda iki kez SDF uygulamasının, yılda iki kez klorheksidin ya da günlük NaF gargara kullanımından daha düşük maliyetli bir yaklaşım olabileceğini belirtmiştir [116].

Bazı araştırmacılar kök çürük lezyonlarının önlenmesinde 5000 ppm diş macununun günlük kullanımı ile beraber 3 ayda bir %5'lik NaF vernik uygulama protokolünü tercih ederken [117], bazıları ise primer yaklaşım olarak yeni kök çürüklerinin önlenmesi için yılda bir kez %38'lik SDF uygulamasını, ikincil olarak da kök çürük lezyonlarının durdurulması için 3 ayda bir %5'lik NaF vernik uygulamasını önermiştir [118].

Bunun dışında florlu gargara, jel ve köpüklerin kök çürük lezyonlarının önlenmesindeki etkisini araştıran çalışmalar da mevcuttur [119].

2.4.2. Antibakteriyel Materyaller ve Biyofilm Modifiye Ediciler

2.4.2.1. Klorheksidin

Klorheksidin, ilk olarak 1940'larda öncelikle cilt yaraları için antiseptik olarak tanıtılmış, sonrasında geniş spektrumlu antibakteriyel etkileri nedeniyle diş hekimliği

alanında da kullanılmaya başlanmıştır [120]. Ağız kuruluğu olan hastalarda, %10'luk klorheksidinin vernik şeklinde uygulamasının kök çürüklerin önlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur [121].

Yapılan bir klinik çalışmada klorheksidinli verniğin kök çürüğü riskini, kontrol grubuna göre %50 azalttığı gösterilmiştir. Cervitec® klorheksidinli vernik ilk hafta iki kez, bir ay sonra ve üç ayda bir olacak şekilde uygulanarak bir yılı aşkın süre boyunca takip edilmiş, ortalama yeni kök çürüğü oranı deney grubunda 0,67, kontrol grubunda ise 1,32 olarak tespit edilmiştir [122].

Kök çürüklerinin non invaziv tedavilerini ele alan bir sistematik derlemede florür gargaraları (225-900 ppm), SDF ve klorheksidin uygulamalarının kök çürüğü insidansını düşürdüğü sonucuna varılmıştır [104].

2.4.2.2. Ksilitol

Ksilitol; selülozlu ürünlerden elde edilebilen, oral mikroorganizmalar tarafından metabolize edilemeyen 5 karbonlu bir şeker alkolüdür. Antikaryojenik etkileri sayesinde ağız ve diş sağlığı alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır [123].

Ksilitolün bireylerde tükürük akış hızını ve tamponlama kapasitesini artırdığı bilinmektedir. Yapısında bulunan hidroksil iyonları tükürük sıvısında bulunan Ca ve P ile bağlanmaktadır. Bu şekilde tükürük içerisinde ve ağız ortamında Ca seviyesi belirli bir düzeyde kalır. Ksilitolün bakteriler tarafından fermente edilememesi mikroorganizmaların asit üretimini inhibe ederek pH değerinin düşmesini önler [124]. Ayrıca ksilitol ekstrasellüler polisakkarit miktarını azaltarak asidojenik bakterilerin diş sert dokularına adezyonuna engel olur [125].

Ksilitollu sakızların karyojenik bakteriler üzerindeki etkinliğini değerlendiren randomize klinik bir çalışmada, ksilitolün *S. mutans* ve *S. sobrinus* sayısını azalttığı rapor edilmiştir. Çalışmanın sonucunda ksilitolün tek başına karyojenik streptokok seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [126].

Yapılan bir klinik çalışmada (The Xylitol for Adult Caries Trial (X-ACT)) ksilitollü pastil kullanan grupta çürük oranında görülen % 11'lik düşüş, plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak sonuçlar diş yüzeylerine göre analiz edildiğinde, ksilitolün kök çürüklerine yönelik olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [127].

2.4.2.3. Arjinin

Arjinin, tükürük proteinlerinde veya peptitlerinde bulunan yarı esansiyel bir amino asittir. Arjinin patojenik olmayan bakteriler tarafından metabolize edildiğinde enerji, amonyak ve karbondioksit açığa çıkar. Amonyak üretimi biofilm pH'sını artırarak karyojenitenin azalmasına yardımcı olabilir [128, 129].

%1,5'lük arjinine ek 1450 ppm florür içeren bir diş macunu ve geleneksel 1450 ppm florür içeren macun kıyaslandığında arjininin kök çürük lezyonlarını durdurma ve geriletmede faydalı olduğu ifade edilmiştir [130].

Sistemantik bir derlemede arjininli diş macunu kullanıldığında kök çürüğü oluşma riski, geleneksel diş macunlarına göre 0,79 oranında daha az bulunmuştur [131].

2.4.2.4. Triklosan

Triklosan geniş spektrumlu, antimikrobiyal bir ajandır. Biyofilm içerisindeki asit üretiminin azalmasına yol açarak, mineral doygunluğunun da artmasıyla remineralizasyona yardımcı olur [132].

3 yıllık bir klinik takip çalışmasında 1100 ppm NaF içeren diş macununa triklosan eklenmiştir. Sonuç olarak, 1100 ppm NaF'lü diş macununa triklosan eklenmesiyle, başlangıç kök çürüğüne yönelik koruyucu etkinin artırıldığı ifade edilmiştir [133].

2.4.3. Biyoaktif Materyaller ve Nanoteknoloji Ürünleri

Tükürük, diş çürüklerinin ilerlemesini etkileyen önemli bir konak faktörüdür. Pelikül proteinleri, prolinden zengin proteinler ve staterin kalsiyum iyonlarını çekerek remineralizasyonu artırır [134]. Sistatinler gibi aside dirençli proteinler ise demineralizasyonu azaltarak etki eder [135]. Ayrıca bazı proteinler mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını önlerken, diğerleri ağız içinde ilk savunma elemanları olarak görev yaparlar [134]. Bu gibi peptidlerden kaynak alan kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat, kendiliğinden birleşen peptidler, dentin fosfoproteinleri, antimikrobiyal peptidler (AMPs) gibi ajanlar kök çürüklerinde yeni yaklaşımlar olarak tanımlanmaktadır [136].

2.4.3.1. Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP)

Kazein fosfopeptidin (CPP) amorf kalsiyum fosfat (ACP) ile kombine edilmesiyle ortaya çıkan CPP-ACP teknolojisi çürükleri önlemede kullanılmaktadır.

Ağız içinde CPP-ACP mekanizması, mine ve dentinde ACP'nin hidroksiapatite bağlanması ile işler. Ayrıca CPP-ACP dental biyofilme difüze olarak dış yüzeylerini demineralizasyondan korur.

- Tamponlama kapasitesi sayesinde karyojenik atak sonrası pH'yı nötralize eder.
- Biyofilm içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunu artırır.
- Biyofilmde ACP'yi stabilize eder [137].

Yapılan bir çalışmada, %1 CPP içeren solüsyonla, 500 ppm flor içeren solüsyon bir arada kullanılmış, kombine kullanımla remineralizasyon etkisinin arttığı ve florun %50'sinin CPP-ACP'ye bağlandığı rapor edilmiştir. Bu yeni bileşik CPP-ACFP olarak tanımlanmış ve CPP-ACP'ye göre daha fazla remineralizasyon sağlayabildiği gösterilmiştir [138, 139].

Dentinin de incelendiği in vitro, in situ ve hayvan çalışmalarında CPP-ACP'nin remineralizasyonu etkileme konusunda güçlü potansiyeli olduğu rapor edilmiştir [138–141]. Ancak kök çürükleriyle ilgili için kesin önerilerde bulunmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.4.3.2. İşlevselleştirilmiş β -Trikalsiyum Fosfat (β -TCP)

Trikalsiyum fosfatın (Ca_3PO_4)₂ ağız ortamındaki serbest Ca ve P seviyesini arttırarak diş sert dokularının remineralizasyonunu sağladığı düşünülmektedir [142].

β - trikalsiyum fosfat (β -TCP) hidroksi apatit formasyonunda bir prekürsördür. β –TCP ın modifikasyonu ile oluşturulan işlevselleştirilmiş β –TCP (fTCP) ve sodyum florür kombinasyonu ile geliştirilen preparatta, koruyucu fumarik asit bariyeri sayesinde, kalsiyumun flor ile erken etkileşimi önlenerek F ve Ca iyonlarının daha yararlı olması amaçlanmıştır. fTCP nin mine yüzeyinde anlamlı derecede remineralize edici etkisi olduğu kanıtlanmıştır [143]. Dentinde yapılan çalışmalarda ise mineral kazanımı elde edilebildiği bildirilmiştir [144].

2.4.3.3. Kendiliğinden Birleşen Peptidler

Kendiliğinden birleşen peptidler (P11-4) remineralizasyonu artırmak ve demineralizasyonu inhibe etmek amacıyla önerilmektedir [145]. Beyaz nokta lezyonlarına uygulandığında P11-4 düşük viskozitesi ile porlara penetre olarak, hidroksiapatit rejenerasyonunu yönlendirebilecek bir iskeletin yapı taşlarını oluşturur

[146]. İn vitro ortamda oluşturulan çürükten etkilenmiş dentin üzerine uygulandığındaysa tip I kollajen ile etkileşime girerek, kollajen fibrillerin proteolize karşı direncini artırdığı gösterilmiştir [147].

2.4.3.4. Dentin Fosfoprotein Türevi 8DSS Peptidler

Dentin fosfoproteinleri (DPP), dokunun mineralizasyonunda kritik bir rol oynarlar. Biyomineralizasyonu artıran en etkili DPP tipinin aspartat-serin-serin tekrarları olan sekiz tekrarlı 8DSS peptidi olduğu bildirilmiştir [148]. Demineralize dentinle güçlü bir bağlantı yaparak, hem yüzeyde hem dentin kanallarında nanokristal birikimini indüklediği gösterilmiştir. Yeni oluşan yüzeyin, kontrol grubuna göre mekanik özelliklerinin önemli ölçüde geliştiği bildirilmiştir [149, 150].

2.4.4. Bitkisel Kaynaklı Ajanlar

2.4.4.1. Proantosyanidin

Üzüm çekirdeğinde yüksek miktarda bulunan proantosyanidin doğal bir antioksidandır. Dentin gibi yüksek miktarda kollajen içeren dokularda çapraz bağ sayısını artırarak yapıyı güçlendirir. Ayrıca *Streptococcus mutans*'ın glikoziltransferaz aktivitesini ve asit üretimini baskılar [151].

Kök çürüklerinde proantosyanidin remineralizasyon etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada sodyum florür ile karşılaştırma yapılmış ve remineralizasyonu pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir [152].

Bir in vitro çalışmada ise kök çürüklerinde demineralizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [153]. Kök çürüklerindeki remineralizasyon etkinliğinin CPP-ACP ile karşılaştırıldığı başka bir in vitro çalışma sonucunda proantosyanidin demineralizasyonu önleyebilen ve remineralizasyona yardımcı olabilen doğal bir ajan olabileceği gösterilmiştir [151].

2.4.4.2. Hesperidin

Hesperidin bir narenciyeden elde edilir. Antioksidan, antienflamatuar, antikarsinogenik, hipoglisemik etkisi olduğu söylenen ve kemik kaybını önleyen bir maddedir.

İn vitro olarak yapılmış bir çalışmanın sonuçlarına göre, hesperidin sığır dentini üzerine uygulanmasıyla kollajen yapıyı koruduğu, proteolitik aktiviteyi azalttığı

dentinin demineralizasyonuna karşı olan duyarlılığını azalttığı ve remineralizasyon sürecini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [154].

2.4.5. Diğer Kalsiyum Ve Fosfat Kaynaklı Remineralizasyon Ajanları

2.4.5.1. Sodyum Trimetafosfat (TMP)

Sodyum trimetafosfat (TMP) ve sodyum hekzametafosfat (HMP) gibi siklik polifosfatların özellikle florürle kombinasyonlarında sinerjistik etki açığa çıkmaktadır. Bu çalışmaların çoğu mineyle ilgili yapılmış olsa da, bu tuzların dentin üzerinde terapötik etkisine dair kanıtlar mevcuttur. TMP'nin demineralize dentinde tip I kollajenin fosforilasyonunu artırdığı [155], ve intrafibriller kollajen remineralizasyonunu indüklediği gösterilmiştir [156].

2.5. Yapay Çürük Modelleri

Kariyoloji çalışmalarında çürüğün patojenitesini araştırmak, yeni çürük önleyici/tedavi edici metod ve ürünleri geliştirerek test etmek amacıyla birçok in vivo ve in vitro yöntem kullanılmaktadır [157].

İn vitro demineralizasyon yöntemleri bakteriyolojik modeller ve kimyasal modeller olarak sınıflandırılabilir. Kimyasal modelde ise basit mineralizasyon ve pH döngüsü yöntemleri tercih edilebilir. Kimyasal modeller, çalışma kolaylığı, düşük maliyeti, zamandan tasarruf sağlaması, tekrarlanabilir ve stabil olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Temel dezavantajı ise çürük oluşumuyla ilgili olarak mikrobiyolojik mekanizmanın tamamen ihmal ediliyor oluşudur [158].

2.5.1. Bakteriyolojik (Biyofilm) Model

Bakteriler fermente olabilen karbondhidratları metabolize ederek asit açığa çıkarırlar. Bu yüzden karyojenik bakteriler, çürük lezyon paternini etkileyen temel faktörlerden biridir [8]. Ağız içi bakteriyel ortamı taklit etmek için biyofilm modelleri kullanılabilir.

Çalışmalarda yaygın olarak kapalı kap ya da tüplerde sınırlı kültür ortamı ile elde edilen kapalı sistem modeli uygulanmaktadır. Bakteriyel üreme koşulları besinin tüketimine ve matabolik ürünlerin birikimine bağlı olarak değişir. Kapalı sistem modeller basit, düşük maliyetli, kontrollü ve tekrar edilebilir yöntemlerdir. Açık sistem modeller ise in vivo çevreyi daha iyi simüle edip değişkenleri düzenlemeye izin

vermesine rağmen, deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği düşük ve kontaminasyon riski yüksektir [158].

2.5.2. Basit Demineralizasyon Modeli

Düşük pH değerlerine sahip demineralize edici ajanlarla oluşturulan, en basit yapay çürük sistemidir. Laktik asit ya da asetik asit gibi orta dereceli pH'a sahip organik asitler ya da asit tamponları kullanılır. Orta pH'daki asitlerin oluşturduğu lezyonlar, doğal çürüğe inorganik asitlerin meydana getirdiği lezyonlardan daha fazla benzerlik gösterir. Birçok deneyde 4,4 – 5 pH aralığı optimal değer olarak kabul edilmiştir [159].

2.5.3. pH Döngüsü Modeli

pH döngüsü modeli, nötr ortamın periyodik olarak asit atakları ile kesintiye uğradığı bir döngüye dayanarak ağız içinin dinamik değişimini taklit etmeyi amaçlar [160].

pH döngüsü modellerinin, klinik uygulamalardan daha duyarlı olduğu ve küçük örneklem büyüklüğü ile bile yüksek düzeyde bilimsel kontrol sağlanabildiği belirtilmektedir [161].

Remineralizasyon çözeltisi genellikle nötrdür (pH=7). Demineralizasyon çözeltisi için kullanılan pH, farklı substratlara ve demineralize eden aside bağlı olarak 4,4 ile 5,5 arasında değişmektedir. pH döngüsünün süresi birkaç günden birkaç aya kadar değişmektedir. pH döngü modelleri sıklıkla dentin çürüğü mekanizmasını incelemek için kullanılmıştır [158].

2.5.4. Yapay Çene Modelleri

İnsan çalışmalarındaki etik problemler nedeniyle ağız ortamını taklit eden çene modelleri geliştirilmiştir. Önceleri kontrollü koşullarda dental plağın büyümesi, patojenitesi, metabolizma ve mineralizasyonu değerlendirilirken, modern yapay çene modelleri ile dental plak ve benzeri biyofilmlerdeki mikrobiyal etkileşimler değerlendirilerek, fiziksel, kimyasal, biyolojik ve moleküler özellikler yüksek doğruluk oranıyla izlenebilmektedir. Yapay çene modelleri çiğneme kuvvetleri ve hareketleri, ağız içi ısı, nem ve oksijenlenme ile tükürük bileşenlerinden oluşur [162].

2.5.5. İn Vivo Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri birçok hastalığın etiyolojisi, patogenezi ve önlenmesinin açığa çıkmasında kritik rol oynar. Ancak çürük çalışmalarında hayvanın yaşı, diyet şartları, enfeksiyon, bakım ve gelişim gibi değişkenlerden dolayı tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek oldukça zordur [163].

2.5.6. İnsan Çenesinde İn Situ Çalışmalar

İn situ çalışmalar, diş çürüğü lezyonlarını oluştuğu yerde incelerken dental ekosistemin fiziko-kimyasal yapısıyla ilgili de bilgi verir. Bu sistemler genellikle insan ya da hayvan kaynaklı diş dokusu, karyojenik biyofilm, düzenli karbonhidrat alımı ve geçerli reaksiyon süresi sağlanarak elde edilir. Dikkat edilmesi gereken nokta, anlamlı sonuçların oluşabilmesi için değişkenlerin kontrol altında tutulmasıdır [164].

2.6. Dişlerde Oluşan Demineralizasyon ve Remineralizasyonu Değerlendirme Yöntemleri

Son yıllarda minimal invaziv yaklaşım sayesinde, diş sert dokularının remineralizasyonu oldukça önem kazanmıştır. Çeşitli remineralizasyon ajanlarının demineralizasyon sonrası diş yüzeylerinde meydana getirdiği değişiklikler; in vivo, in situ ya da in vitro çalışmalarla belirlenebilmektedir.

İn vitro ortamda remineralizasyon ajanlarının çürük lezyonları üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında çeşitli direkt ve indirekt yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlar;

- Mikrosertlik analizi
- Elektrikseletkenlik metodu (ECM)
- Fiber Optik Transillüminasyon (FOTİ ve DİFOTİ)
- Lazer floresans (LF)
- Kantitatif Işık Ölçümlü Floresans (QLF)
- Polarize ışık mikroskobu (PLM)
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)
- Optik koherens tomografisi (OCT)
- SEM, SEM- EDX ve TEM

-Transvers mikroradyografi (TMR)

-Mikro-bilgisayarlı tomografi (Micro-BT) gibi yöntemlerdir [165–167].

2.6.1. Mikrosertlik Analizi

Örnek üzerine yerleştirilen Knoop ya da Vicker's elmasının belirli bir süreyle belirli bir yük altında yüzeyde oluşturduğu çukurcuğun derinlik değeriyle tayin edilir. Mikrosertlik analizi, indirekt mineral kaybı ya da kazancını gösterirken çukurcukta oluşan değerler ile mineral içeriği arasındaki ilişki kalitatifdir [167].

2.6.2. Elektriksel İletkenlik Metodu (ECM)

Elektriksel iletkenlik metodu sağlam diş dokusunun iyi bir iletken olmaması, demineralize ve çürüklü diş yüzeylerinin daha fazla suya sahip olmasının ölçülebilir düzeyde iletkenlik sağlaması düşüncesiyle geliştirilmiştir. Elektriksel iletkenlik yönteminde dişlerde meydana gelen pörözite alanları sayesinde demineralizasyon remineralizasyon farkının ölçülebildiği bildirilmiştir [168, 169].

2.6.3. Fiber Optik Transillüminasyon (FOTİ)

Fiber optik transillüminasyon (FOTİ), diş sert dokularının optik özelliklerinden yararlanılarak üretilmiş bir metoddur. Yüksek yoğunluklu beyaz ışık, fiber optik uç yardımıyla diş yüzeyine uygulandığında sağlıklı ve çürük doku arasındaki kontrasttan faydalanılarak erken dönem mine ve dentin çürükleri teşhis edilebilmektedir. Demineralizasyon alanları, sağlıklı dokudan daha koyu olarak gözlenir. FOTİ'nin etkinliğini artırabilmek için dişin dijital görüntüsünün bilgisayar ortamında analiz edildiği, Dijital Fiber-optik Transillüminasyon (DİFOTİ) yöntemi geliştirilmiştir [170].

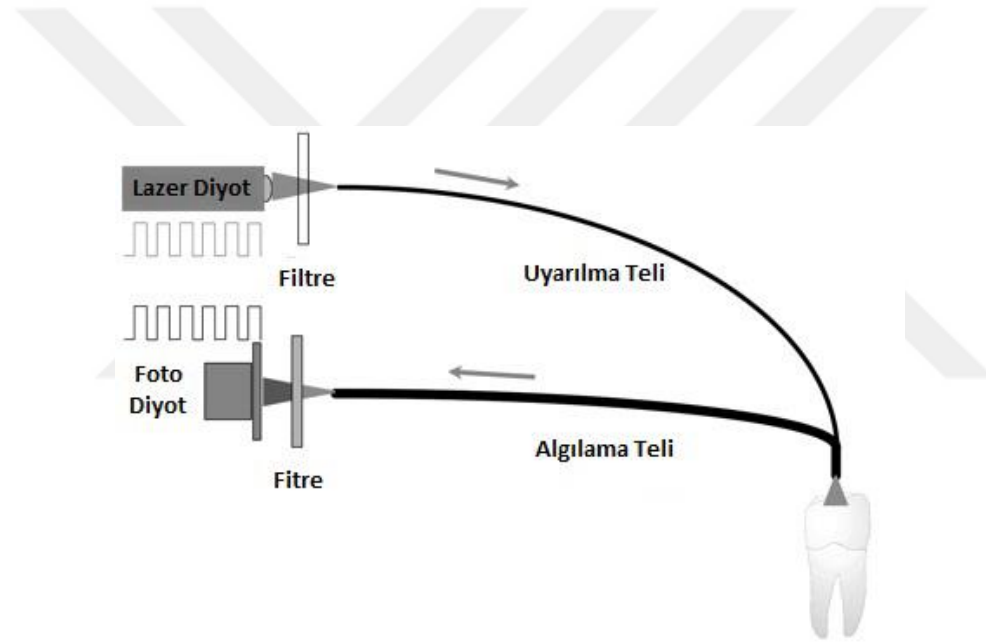
2.6.4. Lazer Floresans (LF)

Floresans belirli bir dalga boyunda ışık ile uyarılan bazı maddelerin foton enerjisini farklı bir dalga boyunda geri verme özelliğidir [171].

Lazer floresans sistemlerin çalışma prensibiyle ilgili iki teori mevcuttur. İlk teori, dişin, ışığın bir kısmını absorbe ederken diğer kısmını da saçarak geri yansıtmasıyla ilgilidir. Çürük dokuda mineral kaybı meydana gelir ve demineralizasyon nedeniyle oluşan pörözite, dişin floresansında değişikliğe neden olur. İkinci teorideyse floresans değişimi çürük dişte ağız içindeki bakteri metabolitleriyle (protoporfirin, mezoporfirin, proporfirin) ilişkilendirilmektedir [172].

Lazer floresans sistemlerinden en bilineni olan DIAGNOdent (Kavo, Biberach, Almanya), 655 nm dalga boyunda diyet lazerden yararlanılarak üretilmiştir. Düz yüzeydeki başlangıç çürüklerinin, okluzal yüzeylerde pit ve fissür çürüklerinin tespitinde yararlı olduğu gösterilmiştir [173].

Cihazda 655 nm dalga boyundaki kırmızı diyet lazer ışını özel bir uç vasıtasıyla diş yüzeyine gönderilir. Diş tarafından absorbe edilen ışın, floresans fotonları olarak geri yansır. Bu floresans sinyalleri filtreden geçer ve aynı uçtaki farklı fiber demeti tarafından toplanır. Sonrasında bir fotodiyod ile sayısal veriler haline getirilir ve ekrana ulaştırılır. 0-99 arasında değişebilen sayısal değerlerin artışı, çürük derinliği ile doğru orantılıdır [174].



Şekil 2-6: DIAGNOdent cihazı tarafından diş yüzeyine gönderilen ve sonrasında geri yansarak algılanan fotonlar [166]

2.6.5. Kantitatif Işık Ölçümlü Floresans (QLF)

Lazer floresans yönteminin, lazer yerine ışık kullanılan halidir. Diş çürükleri ile ilgili in vivo ve in vitro olarak kantitatif değerlendirmeye imkan veren bir cihazdır. Işığın dağılması, saçılması prensibinin mineral kaybıyla ilişkisini kullanarak, çürük lezyonunun ölçümünde kullanılır [175].

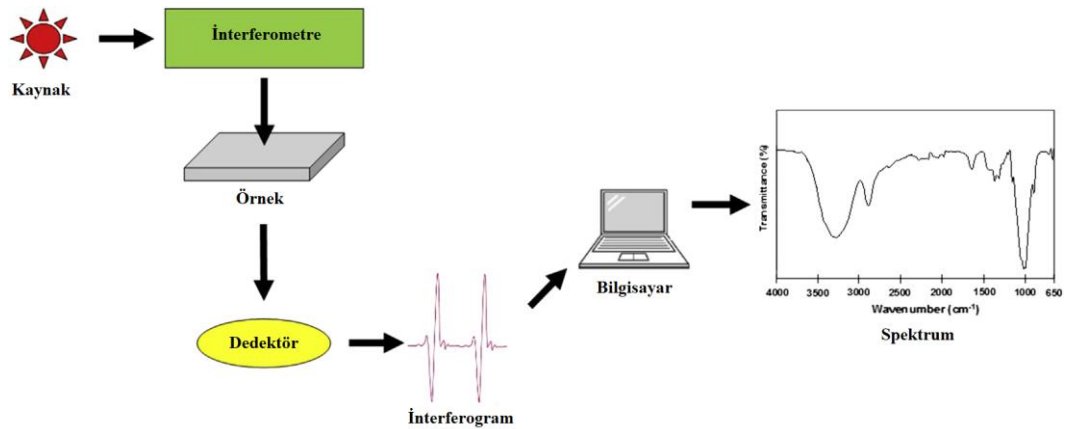
2.6.6. Polarize Işık Mikroskobu (PLM)

Polarize ışık mikroskobu (PLM), bir örneğin kırılma ve soğurma gibi optik özelliklerinin lokal anizotropisini gösterir. PLM, bir ışık mikroskobuna ek olarak birbirine dik olarak konumlandırılmış olan polarizör ve analizörden oluşmaktadır. Örnek polarizör ile analizör arasına yerleştirildiğinde, ışığın düzlemini değiştirerek karşıt renklerden oluşan bir seri oluşur. Renk spektrumu sayesinde, hem kalitatif hem de kantitatif değerlendirme yapılabilmesine imkan verir [176]. Diş sert dokularında ise demineralizasyon ve remineralizasyonun gözlemlenebilmesi için kullanılmaktadır [151].

2.6.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

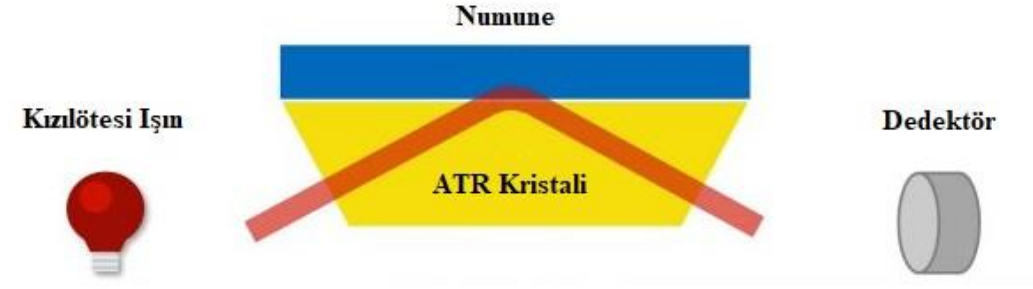
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi, moleküllerin kızılötesi ışığını absorpsiyonu ile titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanan bir yöntemdir. FTIR spektrumları ile, kimyasal konsantrasyon, kompozisyon, yapı ve içerilen fonksiyonel gruplar gibi pek çok kalitatif ve kantitatif bilgi elde etmek mümkündür [177].

FTIR spektroskopisi kızılötesi ışık kaynağı, interferometre ve dedektörden oluşmaktadır. Kızılötesi kaynağından çıkan ışın, ışın bölücü, sabit ve hareketli aynalardan oluşan interferometreden yansıdıktan sonra örnekten geçer. Örnek bu ışının bir kısmını absorbe ederken, kalan ışın dedektöre ulaşır. Absorbe edilen kısmın belirlenebilmesi için referans olarak kullanılan bir lazer ışınıyla karşılaştırılır. Sonrasında elde edilen interferograma bilgisayar aracılığıyla Fourier dönüşümü uygulanarak FTIR spektrumu elde edilir [178].



Şekil 2-7: FTIR spektrometrenin şematik olarak gösterimi [178]

Azaltılmış Toplam Yansımaya (Attenuated total reflectance) (ATR-FTIR) tekniği ise orta kızılötesi spektruma duyarlı olup, numuneye temas eden bir kristale belirli bir açıyla gönderilen kızılötesi ışındaki değişimleri bir dedektör yardımıyla ölçer.



Şekil 2-8: ATR çalışma prensibi [179]

ATR tekniği FTIR'dan farklı olarak absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirerek daha kolay bir yöntemle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak spektrum analizlerine olanak sağlar. Bu spektroskopik teknik, uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, örneğe zarar vermeden hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve etkin sonuçların elde edilmesi bakımından avantajlıdır [178].

2.6.8. Optik Koherens Tomografi (OCT)

İyonlaştırıcı radyasyon yerine yakın kızıl ötesi ışığın kullanıldığı, histolojik kesit benzeri tomografik görüntülerin elde edildiği non invaziv bir görüntüleme sistemidir. Diş hekimliğinde diş dokusunun remineralizasyon-demineralizasyon derecelerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [180].

2.6.9. SEM, TEM, SEM-EDX

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu) görüntüleri elektronların yüzeye gönderilerek taranmasıyla oluşan etkileşimin algılayıcılarda toplanarak elde edilen sinyal yükseltildikten sonra monitöre yansıtılmasıyla elde edilir. Lezyonun pörözitesi veya biriken mineralleri miktarı ile ilgili bilgi verir [167].

Bu yöntemle diş sert dokularındaki lezyonların demineralizasyon ve remineralizasyonunda mineral değişiklikleri kantitatif olarak belirlenememektedir. Bu

yüzden SEM ile birlikte mikroanalitik teknikler olan EDS (Enerji Dispersiv Spektroskopi) veya EDX (Enerji Dağınımlı (X-ray) Spektroskopi) yöntemleri kullanılarak, minerallerin dağılımı ve miktarı görülebilmektedir. Enerji dispersif spektrum, SEM ve TEM'e eklenmek suretiyle, elementlerin enerjilerinden faydalanarak kantitatif kimyasal analiz yapmakta kullanılır [167].

2.6.10. Transvers Mikroradyografi (TMR)

TMR diş sert dokularındaki demineralizasyonun in vitro ve in situ ortamda iki boyutlu görüntülenmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilir. Monokromatik bir X ışını kullanılarak mineral kaybı ve lezyon derinliğinin yanında yüzeyde mineralizasyonun kalınlığı ve derecesi de ölçülebilmektedir [181].

2.6.11. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (Micro-CT)

Mikro bilgisayarlı tomografi (μ CT) mikro-odaklı bir x-ışını kaynağına sahip bir tomografi sistemidir [182]. Bu metod, dental sert doku örneklerinin in vitro ortamda zarar görmeden incelenmesi sayesinde tekrarlayan ölçümlere imkan verir [183].

Yüksek çözünürlüklü Mikro-BT kübik voksel ve izotonik çözünürlük kullanarak 3 boyutlu görüntü oluşturur. Teknik olarak 1 μ m'lik çözünürlükte hassas görüntüleme yapılabilmektedir [184, 185]. Voksel, bir pikselin 3 boyutlu karşılığıdır ve radyasyonun simülasyonlarında kullanılan bir göstergedir. Piksel, dijital göstergelerde görüntünün elde edilmesini sağlayan ve kontrol edilebilen en küçük birimdir [186].

2.7. Biyofilm İnceleme Yöntemleri

Biyofilm, diş yüzeyi veya dental materyal üzerinde üreyen ve çevresiyle ile etkileşime giren karmaşık, üç boyutlu bir mikrobiyal topluluktur [187, 188]. Biyofilm yapısında genel olarak canlı ve ölü bakteri hücreleri, hücre dışı polimerik maddeler ve diğer hücreler tarafından salgılanan maddeler bulunur [189].

Biyofilm çalışmalarında seçilecek teknikler, elde edilmek istenen sonuçlara göre kantitatif ve kalitatif olabilir.

2.7.1. Kantitatif Karakterizasyon Yöntemleri

Kantitatif değerlendirmeler için kullanılan başlıca direkt sayım yöntemleri, mikrobiyal kültür yöntemi, coulter yöntemi, flow sitometri, ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, konfokal lazer taramalı mikroskobu şeklindedir. Biyofilm miktarını temsil

eden belirteçleri kullanan indirekt sayım yöntemleri kuru kütle, toplam organik karbon, kristal viyole analizi, tetrazolium tuzları ve ATP biyoluminesans olarak sıralanabilir.

2.7.1.1. Mikrobiyal Kültür Yöntemi

Canlı hücre sayımı, yani CFU/ml testi veya aerobik plak sayımı, canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan standart bir ölçüm yöntemidir [190, 191].

Ölçüm mikroorganizmanın besi yerinde koloni oluşturması, oluşan kolonilerin sayılarak örnekteki mikroorganizma sayısının hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. CFU tekniği özel veya gelişmiş ekipman gerektirmeden birçok laboratuvar koşulunda eğitimli kişiler tarafından uygulanabilir [192].

Bu yöntemi seçerken göz önünde bulundurulması gereken önemli bir husus, yalnızca koloni oluşturabilen canlı hücrelerin sayılabileceğidir. Ayrıca tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek zaman ve yoğun uğraş gerektirir [192]. Ayrıca biyofilm süspansiyonunda bakteri kümelenmesi nedeniyle hatalar meydana gelebilir. Bu teknik özellikle verilen koloni sayısı yüksek olduğunda ve sayım manuel olarak yapıldığında sayım ve uygulayıcı hatalarına karşı da hassastır [193].

2.7.1.2. Coulter Yöntemi

Coulter yöntemi, bir elektrolit çözeltisindeki yüklü partiküllerin, elektrik devresinin parçası olan bir açıklıktan geçirilmesini içerir. Parçacıkların varlığı, devrenin empedansını (öz direnç) değiştirir ve voltajdaki değişiklik olarak kaydedilir. Voltajdaki değişiklik partikül boyutuyla ilişkilendirilerek bakteri hücrelerinin ayırt edilmesini sağlar. Voltaj pulsları belirli bir süre boyunca sayılır ve hücre sayısı ile ilişkilendirilir [194, 195].

Oldukça kolay bir metod olmasına rağmen ‘Coulter Counter’ ekipmanının maliyeti ve canlı/ölü hücre ayırımı yapamaması sistemin dezavantajlarıdır [193].

2.7.1.3. Flow Sitometri

Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Bu teknikte süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, bir bölmeden geçerken lazer ışığına maruz kaldığında saçılma, soğurulma ya da intrinsik ve ekstrinsik floresan sonucu oluşan sinyaller analiz edilir [196].

Akış sitometrisinin başlıca avantajları, hızlı, basit ve yüksek doğrulukta ölçümler yapılabilmesidir. Dezavantajları ise yine cihazın maliyetli olması, kalibrasyon ve ayarlarının teknik hassasiyet gerektirmesi olarak sayılabilir [197].

2.7.1.4. Işık Mikroskobu

Bakteri hücreleri gibi küçük yapılar, ışık mikroskobu ile görselleştirilebilir. 2-8 µm uzunluğundaki bakteri hücreleri, toplamda 200x veya daha büyük büyütme gerektirir. Mikroskopla birlikte çeşitli metabolik veya seçici geçirgen boyaların kullanılması, hücrelerin görünürlüğünü artırabilir. Canlı hücreleri cansızlardan ayırt ederek sayımı daha doğru hale getirir [193, 198].

2.7.1.5. Floresan Mikroskobu

Floresan mikroskobu, ışık mikroskobunun optik yeteneklerinin, intrinsik veya eklenmiş floresan ışık emisyonu sayesinde artırılmasıyla ortaya çıkmıştır. Optik mikroskopta görülemeyen örnekler, floresan boya/floforlarla boyanarak görüntülenebilmektedir [198, 199].

2.7.1.6. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM)

Konfokal lazer taramalı mikroskopi (CLSM), biyofilmin 3 boyutlu, yüksek çözünürlüklü, keskin görüntülerini üreten özel bir mikroskopi biçimidir. Örnekler floresan boyalarla boyandıktan sonra lazer ile taranır. Taranan kesitler birleştirilerek 3 boyutlu görüntü elde edilir.

CLSM kullanılarak, örneklerin dehidrasyon ve fiksasyon işlemlerine maruz bırakılmadan doğal nemli durumunda incelenmesi, biyofilmin alt tabakalarına doğru ince optik kesitler halinde kaydedilmesi en büyük avantajlarıdır [200].

Biyofilmin kalınlığı, hücre dağılımının tespiti, biyofilmin pH ölçümü, canlı ve ölü bakteri oranı belirlemede kullanılır [193].

CLSM ile görüntüleme yapılırken, elde edilmek istenen veriyle ilgili çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Örneğin canlı/ölü hücre DNA'sının Adenin ve Timinden zengin bölgelerine bağlanan, DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindole) ile CFU sayılarını karşılaştırılması, toplam bakteriyel miktarın hesaplanması ve görüntülenmesi mümkündür. SYPRO Ruby Biyofilm matriks boyası, FM boyaları, Calcein boyası gibi

boyalar hedef dokuya, canlı/ölü hücre ayrımı yapabilme ve membrandan geçme kabiliyetine bağlı olarak seçilebilmektedir [193].

Son zamanlarda in vitro biyofilm analizi için CLSM ile floresan boya (LIVE/DEAD BAC light) kombinasyonunun kullanımı rutin uygulama haline gelmiştir. Bu kit iki bileşenli boya (SYTO 9 ve propidium iyodür) içerir. Üretici firma talimatları doğrultusunda 1:1 oranında karıştırılarak kullanılır. Propidium iyodür düşük iyonik yüke sahip olduğundan, DNA'ya yüksek afinitesi vardır. Canlı hücreler için, küçük moleküllü Syto 9, canlı ve cansız hücreler için kullanılabilirken, propidium iyodür sadece ölü hücrelerin boyanmasında kullanılır. Böylece CLSM ile incelendiğinde biyofilmdeki bakterilerden ölü hücreler kırmızı, canlı hücreler yeşil ışık yayar [193].

2.7.1.7. Kuru Kütle

Genellikle birim alan başına kütle olarak ifade edilen kuru kütle veya biyofilm yoğunluğu, yaygın olarak kullanılan, büyüme miktarını tespit eden bir belirteçtir. Kuru kütle bulmak için, biyofilm, su uzaklaşana kadar sabit sıcaklıkta bir fırına yerleştirilir ve bir ağırlık elde edilir [199].

Kuru kütle ölçümlerinin dezavantajları olarak substratın ısıya dirençli olması gerekliliği, hücre kütlesini ekstraselüler matriks gibi farklı film bileşenlerinden ayıramamaları, kurutma sonrası başka bir karakterizasyon yöntemi kullanılamaması sayılabilirken, en önemli avantajı asgari koşullara sahip laboratuvarlarda uygulanabilmesidir [193].

2.7.1.8. Toplam Organik Karbon Ölçümü

Toplam organik karbon (TOC), organik bileşiklerle ilişkili bir numunedeki karbon miktarının ya da canlı kaynaklı karbon bileşiklerinin (proteinler, lipitler, üre vb.) dolaylı bir ölçümüdür [201].

2.7.1.9. Kristal Viyole Analizi

Gram boyama, bakteri ayrımı ve görüntülenmesi için mikrobiyolojide en çok kullanılan ve iyi optimize edilmiş yöntemlerden biridir [202]. Gram boyama için birincil bileşen ve yaygın olarak kullanılan boya olan kristal viyole, gram pozitif ve negatif hücrelerde geçirgen hücre zarından geçebilen bazik bir triyanilin boyasıdır [203].

Temel dezavantajları ölü/canlı hücre ayrımı yapamaması ve inkübasyon zamanı, inkübasyon sıcaklığı ve ağartıcı boya gibi birçok değişkenin sonuçları etkileyebilmesidir [193].

2.7.1.10. Tetrazolium Tuzları

Bu yöntem tetrazolium tuzlarının biyofilm tabakasının üzerine eklenerek bir süre inkübe edildikten sonra oluşan kolorimetrik değişimin gözlenmesi esasına dayanır. Biyofilm değerlendirmesi için başarıyla kullanılan, Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) ve floresans spektroskopisi yoluyla hücresel canlılığın ve metabolizmanın kantifikasyona ve görüntülenmesine imkan veren bir tekniktir [204].

2.7.1.11. ATP Biyolüminesans

ATP biyolüminesans testi, gıda ve biyomedikal alanlarda yüzeylerin mikrobiyal kontaminasyonunu tespit etmek amacıyla kullanılan mikrobiyal bir testtir [205, 206].

Adenozin trifosfat (ATP), tüm organizmalarda primer enerji kaynağı olarak işlev gördüğünden canlılık için temel bir belirteçtir. Biyolüminesans, organizmaların kimyasal enerjiyi ışığa çevirdiği süreci ifade eder [207]. Bu yöntem oldukça güvenilir ve hızlı olmasının yanı sıra analiz için yalnızca bir lüminometre gerektirmesiyle kolay ulaşılabilir bir düzendir [193].

Bu yöntemler dışında Total Protein Belirleme, Kuvars Kristal Mikroterazi, Radyoaktif İşaretleme ve Floresans Spektroskopisi gibi teknikler de kantitatif analizler için kullanılabilir [193].

2.7.2. Kalitatif Karakterizasyon Yöntemleri

2.7.2.1. Elektron Mikroskobu

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), yüzey topografisinin yüksek çözünürlüklü, büyütülmüş görüntülenmesi için kullanılabilir. Büyütme yaklaşık 10-500.000 arasında değişebildiğinden biyofilmleri de içeren mikroskobik yapıların analizinde oldukça yararlıdır [190, 208].

SEM analizinin önemli bir dezavantajı canlı örnekler üzerinde gerçekleştirilememesidir. Biyolojik numunelerin analizinden önce yüksek vakum ve kapsamlı hazırlık gereklidir. Örnek hazırlama işlemleri, fiksasyon, tüm nemin

giderilmesi ve numunenin ince bir iletken metal tabakası ile kaplanması gibi basamakları içerir [209].

Fiksasyon, sekonder ve tersiyer protein yapısını korumak için bir aldehit çözeltisinin proteinlere kovalent olarak bağlanmasıyla oluşturulur. Örnekler daha sonra bir dizi farklı dereceli alkol ile muamele edilerek dehidre edilir. Numunedeki nem, SEM'in yeterli vakum koşullarının sağlanması, numunenin toplam dehidrasyonu, görüntülemenin optimum çözünürlüğü için çok önemlidir. Biyofilmler yaklaşık % 97 sudan oluştuğundan, dehidrasyonun örnekte yapısal ve boyutsal bozulmalarına sebep olması kaçınılmazdır [209]. Son olarak, numune artefakta sebep olabilecek statik yüklerin dağılmasına izin vermek için iletken hale getirilmelidir. Bu genellikle altın veya platin gibi bir metalin püskürtülerek kaplanmasıyla elde edilir. Alternatif olarak osmium-thiocarbohidrazide-osmium (OTO) ile boyama yöntemi tercih edilebilir [210, 211].

Örnek hazırlama prosedürlerini elimine etmek amacıyla Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM) geliştirilmiştir [212]. Ancak bu yöntemde, elektron ışınının gaz moleküllerinden geçtiği mesafenin çözünürlüğü azaltması söz konusudur. Ayrıca elektron ışını hala nemli olan canlıya zarar verebileceğinden kullanımı önerilmemektedir. Bu yöntem hala geliştirilme aşamasındadır [193].

2.7.2.2. Taramalı Elektrokimyasal Mikroskop (SECM)

SECM yöntemiyle biyofilm yüzeylerinin topografik yapısı ve kimyasal özellikleri çok yönlü olarak değerlendirilebilmektedir. Bu inceleme tekniği başka yöntemlerle de beraber kullanılabilir. Canlı hücreler yüzeyel yapısı , intrasellüler makromoleküller ve DNA yapısı ile ilgili üç boyutlu değerlendirmeler sunabilir [213].

2.7.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM tekniği, biyofilmi, altındaki substratı ve etkileşimleri belirleyebilir. Biyofilmin pürüzlülük, topografya ve sertlik gibi özelliklerinin değerlendirilmesinde faydalı olabilir [214].

2.7.2.4. Spektroskopik Analizler

Biyofilmin spektroskopik analizleri, biyofilm agregasyonu, yapışma ve EPS bileşiminin daha iyi anlaşılması amacıyla kullanılabilecek tahribatsız bir yöntem olmasıyla giderek daha fazla tanınmaktadır. Kızılötesi (IR) ve Raman spektroskopik

karakterizasyon, kimyasal işaretleri tanımlamak için ışığın absorpsiyonunu (IR) ve saçılımını (Raman) kullanır [215].

Sözü edilen teknikler dışında, biyofilm yapısının incelenmesi amacıyla geliştirilmiş olan Small Angle X-ray Scattering (SAXS), Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi), Kongo Kırmızısı Agar Metoduyla Kolorimetrik Analizler gibi alternatif kalitatif yöntemler de mevcuttur [193].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Araştırma için gerekli olan etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığından alındı (Dosya no: 2019/63, sayı: 88, Tarih: 11/07/2019).

3.2. Dişlerin Seçilmesi

Çalışmamızda, İstanbul Oral Et Entegre Tesislerinden elde edilen sığır üst keser dişleri kullanıldı. Dişler çalışmaya dahil edilmeden önce görsel muayene ile incelenerek, çürük, çatlak ya da defektli olanlar ayrıldı. Dişler, üzerindeki yumuşak doku artıkları ve eklentilerden arındırılarak flor içermeyen pomza ve fırça ile temizlendi. Literatürde benzer metodolojiye sahip çalışmalar referans alınarak yapılan örneklem grubu istatistik hesaplamaları sonucu 50 adet çekilmiş sığır dişi (Şekil 3-1) çalışmaya dahil edilerek dezenfeksiyon amacıyla bir hafta +4 °C'de % 0,1'lik timol solüsyonunda bekletildi.



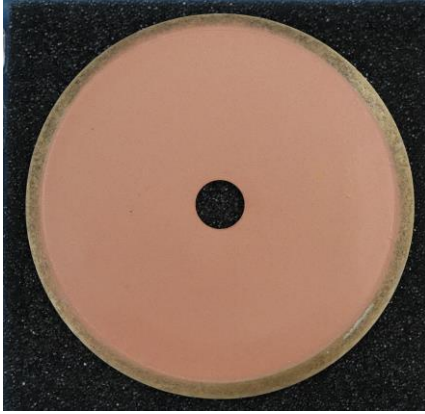
Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan sığır dişi örneği

3.3. Dişlerin Preparasyonu ve Örneklerin Hazırlanması

Sığır dişlerinin kök yüzeylerinden örnekler elde etmek amacıyla, düşük hızlı hassas kesme cihazı (Isomet 1000, Buehler Ltd, Evanston IL, ABD) (Şekil 3-2) ve çift taraflı kesen 0,3 mm kalınlığında elmas kesim diski (Isomet Saw, Buehler Ltd, Evanston IL, ABD)(Şekil 3-3) kullanılarak, sement ve altındaki dentin dokusu, kare prizma bloklar halinde çıkarıldı. Kumpas ile ölçüm yapılarak 4x4x2 mm standart boyutlarda, her grup için 23 adet olacak şekilde, toplam 138 adet örnek elde edildi.



Şekil 3-2: Isomet 1000 hassas kesme cihazı (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, ABD)

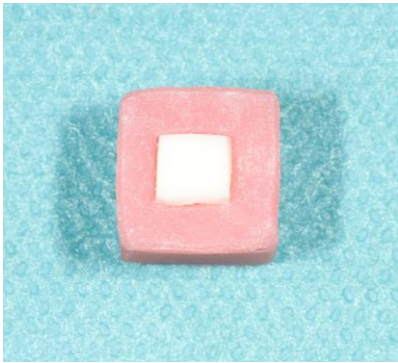


Şekil 3-3: Elmas kesim diski (Isomet Saw, Buehler Ltd, Evanston IL, ABD)

Sonrasında elde edilen örnekler, demineralizasyon ve remineralizasyon uygulanacak olan yüzeyler açıkta kalacak şekilde alt ve üst kısımları birbirine paralel olan, 10 mm² genişlik ve 10 mm yüksekliğe sahip silikon kalıp yardımıyla akrilik reçineye (Blaucryl, Efes Dental Medikal İç ve Dış Tic. Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) (Şekil 3-4) gömüldü.



Şekil 3-4: Örneklerin gömüldüğü akrilik reçine



Şekil 3-5: Akriliğe gömülmüş örnek

Sement yüzeyleri açıkta kalacak şekilde akriliğe gömülmüş olan örneklerin yüzeyleri (Şekil 3-5), zımparalama ve parlatma cihazı (Buehler MetaServ 250 Grinder-Polisher, Buehler, Düsseldorf, Almanya) (Şekil 3-6) kullanılarak 600, 800 ve 1200 grenli abraziv kağıt diskler (Al_2O_3) (Allied High Tech Product Inc., Compton, CA, USA) aracılığı ile sement dokusu uzaklaştırılarak, düz ve pürüzsüz bir yüzey elde edilecek şekilde zımparalandı.



Şekil 3-6: Zımparalama ve parlatma cihazı (Buehler MetaServ 250, Almanya)

Oluşan smear tabakasını uzaklaştırmak için örnekler distile su içerisinde ultrasonik temizleme cihazında (Digital Ultrasonic Cleaner, Codyson, Çin) (Şekil 3-7) 5 dakika boyunca tutuldu.



Şekil 3-7: Ultrasonik temizleme cihazı (Digital Ultrasonic Cleaner, Codyson, Çin)

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Dişler her grupta 23 numune olacak şekilde, kontrol grubu ve deney grupları şeklinde rastgele 6 gruba ayrıldı. Deney grupları: Sodyum florür (NaF), Sodyum florür+Kazein Fosfopeptid Amorf Kalsiyum Fosfat (CPP-ACP), Sodyum florür+Trikalsiyum Fosfat (TCP), Sodyum florür+Ksilitol kaplı Kalsiyum Fosfat (CXP) ve Gümüş Diamin Florür/Potasyum İyodür (SDF/KI).

Kullanılan materyallerin çürük lezyonlu kök sert dokularında oluşturduğu değişiklikleri değerlendirmek amacıyla kullanılacak iki ayrı test yöntemi için her gruptan;

a) Uygulanan ajanların kök sert dokularında remineralizasyon etkisini değerlendirmek amacıyla Lazer Floresans incelemeleri için on örnek (n=10),

b) Remineralizasyon ajanlarının lezyonların organik içeriği ve kimyasal yapısında meydana getirdikleri potansiyel değişiklikleri tayin etmek amacıyla ile Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR-ATR) analizleri için beş örnek (n=5) seçildi.

Materyallerin biyofilm üzerine etkilerinin değerlendirilmesi aşaması için *S. mutans* ve *L.casei* ikili biyofilm modeli uygulanmasının ardından iki ayrı basamakta gerçekleştirilecek analizler öncesinde her gruptan;

a) Biyofilm biyokütlesi ve canlı/ölü bakteri sayısının CLSM (konfokal lazer taramalı mikroskop) ile görüntülenmesi için yedi örnek (n=7),

b) Bakteri adezyonunun SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile görüntülemeleri için bir örnek (n=1) seçildi.

3.5. Demineralizasyon Öncesi Lazer Floresans Ölçümlerinin Yapılması

Çalışmada öncelikle yüzeylerin başlangıç floresans değerleri elde edildi. Her gruptan 10 örneğin Lazer Floresans (LF) ölçümleri İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalında bulunan 655 nm dalga boyu ve 1mV pik gücüne ve diyod lazer floresan ışınına sahip DIAGNOdent 2095 (KaVo, Almanya) (Şekil 3-8) cihazı ile yapıldı.



Şekil 3-8: DIAGNOdent 2095 (KaVo, Almanya)

Kullanımdan önce diş yüzeylerinde akrilik kalıntıların bulunmadığından emin olundu. Tüm yüzeyler nem standardizasyonunu sağlamak için hava su spreyi ile 10 saniye süresince hafifçe kurutuldu.

DIAGNOdent cihazının düz yüzeyler için tasarlanmış olan B tipi fiber optik ucu (probe B) kullanıldı. Her ölçüm öncesinde sistem, üretici firmanın önerilerine uygun olarak cihazın yan tarafında bulunan seramik standart ölçeği ile kalibre edildi.

Kalibrasyon sonrası probun uç kısmıyla 4 mm²'lik yüzeylerde üç ayrı noktadan ölçüm yapılarak; her örneğin başlangıç yüzey floresans değerleri saptandı (Şekil 3-9). Ölçümlerin sonunda gözlenen değerler, örnekler üzerindeki kodlar dikkate alınarak kaydedildi.

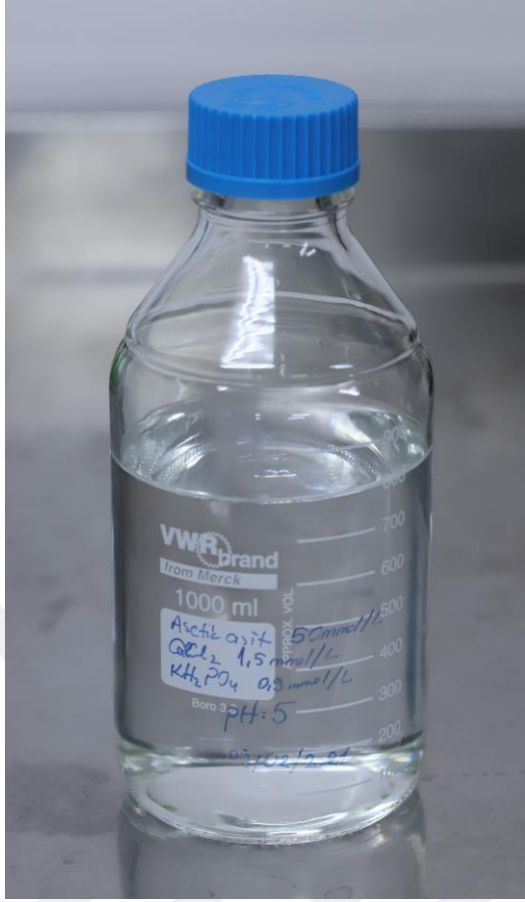


Şekil 3-9: Lazer Floresans ölçümlerinin yapılması

3.6. Diş Yüzeylerinde Yapay Çürük Lezyonu Oluşturulması

Kök yüzeyinde demineralizasyon ve remineralizasyon işlemlerinin dokuda oluşturduğu değişimleri değerlendirmek amacıyla, 138 adet örnek yüzeyinde yapay çürük lezyonu oluşturulması aşamasına geçildi.

Demineralizasyon solüsyonu benzer çalışmalar göz önünde bulundurularak; İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında 50 mM asetik asit, 1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM KH_2PO_4 (monopotasyum fosfat) içeriği ile hazırlandı. Solüsyon KOH (potasyum hidroksit) ilavesi ile pH'sı 5 olacak şekilde ayarlandı (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: Demineralizasyon solüsyonu

Tüm örnekler, her biri için 20 ml demineralizasyon solüsyonu içeren bölmeli kaplarda (Şekil 3-11), 37°C sıcaklıkta 5 gün süreyle etüv (Termal Laboratuvar Aletleri, İstanbul, Türkiye)(Şekil 3-12) içerisinde bekletildi. Solüsyondan çıkartılan yapay çürük lezyonları oluşturulmuş örnekler, deiyonize su ile yıkandıktan sonra 24 saat boyunca deiyonize su içerisinde nemli ortamda muhafaza edildi.



Şekil 3-11: Demineralizasyon solüsyonuna bırakılan örnekler



Şekil 3-12: Çalışmada kullanılan etüv (Termal Laboratuvar Aletleri, İstanbul, Türkiye)

Sonrasında demineralize olmuş örnek yüzeyleri DIAGNOdent ve FTIR-ATR cihazları ile incelenerek değerlendirildi.

Ayrıca biyofilm canlılık, biyokütle ve topografi analizleri için çalışmanın bakteriyolojik aşaması gerçekleştirildi.

3.7. Demineralizasyon Sonrası Lazer Floresans Ölçümlerinin Yapılması

Her gruptan 10 örneğin yüzeylerinde demineralizasyon sonrasına ait floresans değerleri DIAGNOdent cihazı ile ölçüldü. Ölçümler yine demineralizasyon öncesi uygulanmış olan yöntem doğrultusunda yapıldı.

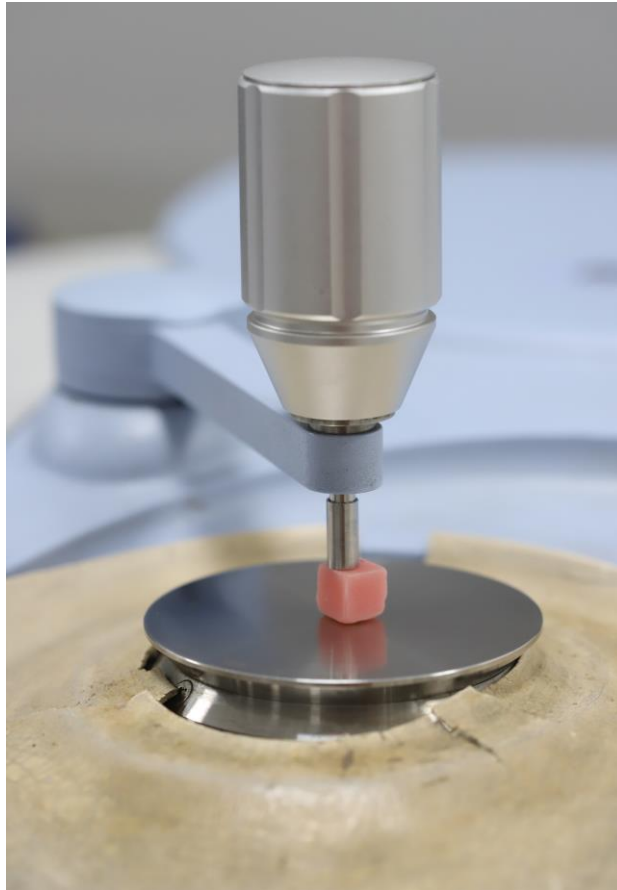
3.8. Demineralizasyon Sonrası FTIR-ATR Analizleri

Her gruptan 5 örnek pH döngüsü öncesinde, remineralizasyon ajanlarının lezyonların kimyasal yapısı ve organik içeriğinde meydana getirecekleri olası değişiklikleri tespit edebilmek amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan Spectrum 100 (Perkin Elmer, ABD)(Şekil 3-13) cihazının elmas kristal uç bulunan ATR (Attenuated Total Reflectance) ünitesi kullanıldı.



Şekil 3-13: FTIR-ATR cihazı Spectrum 100 (Perkin Elmer, ABD)

İnceleme öncesinde, örnekler 30 saniye distile su ile yıkanıp hava ile kurutuldu. Her örnekte 3 referans noktası işaretlenerek remineralizasyon öncesi ve sonrasında aynı pozisyonda ölçüm yapılabilmesi sağlandı (Şekil 3-14). Çalışma parametreleri tarama aralığı $4000-450\text{ cm}^{-1}$, çözünürlük 4 cm^{-1} , tarama frekansı 32 olacak şekilde belirlendi.



Şekil 3-14: FTIR-ATR cihazına numunenin yerleştirilmesi

3.9. Remineralizasyon Ajanlarının Uygulanması

Demineralizasyon işleminin ardından, remineralizasyon ajanları (Tablo 3-1) üretici firmaların önerileri doğrultusunda uygulandı (Şekil 3-20). Kontrol grubu için ise deiyonize su kullanıldı.

1. Kontrol Grubu
2. Sodyum florür (NaF) Grubu (Proshield Vernik) (Şekil 3-15)
3. Sodyum florür + CPP-ACP (NaF+CPP-ACP) Grubu (MI Vernik) (Şekil 3-16)
4. Sodyum florür + TCP (NaF+ TCP) Grubu (Clinpro) (Şekil 3-17)
5. Sodyum florür + CXP (NaF+ CXP) Grubu (Embrace) (Şekil 3-18)
6. Gümüş diamin florür/Potasyum İyodür (SDF/KI) Grubu (Riva Star) (Şekil 3-19)



Şekil 3-15: NaF Grubu (Proshield Vernik)



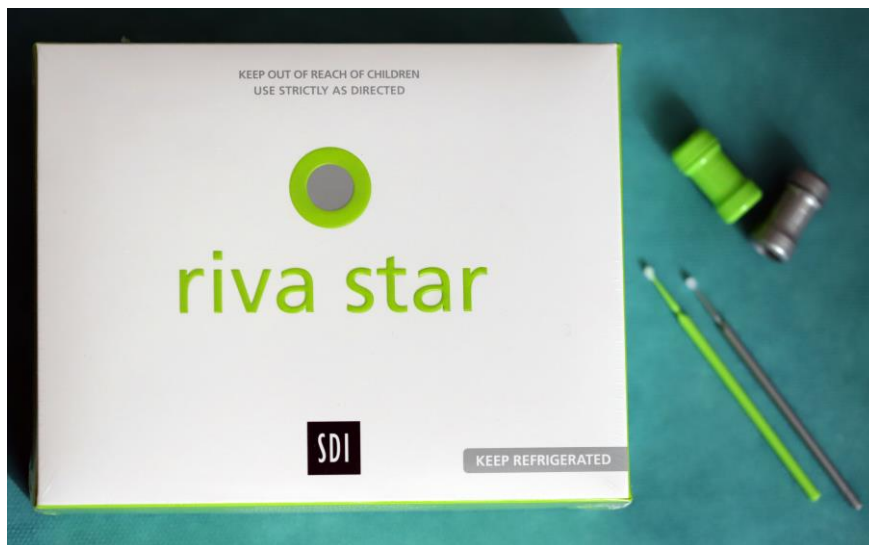
Şekil 3-16: NaF+CPP-ACP Grubu (MI Vernik)



Şekil 3-17: NaF+ TCP Grubu (Clinpro)



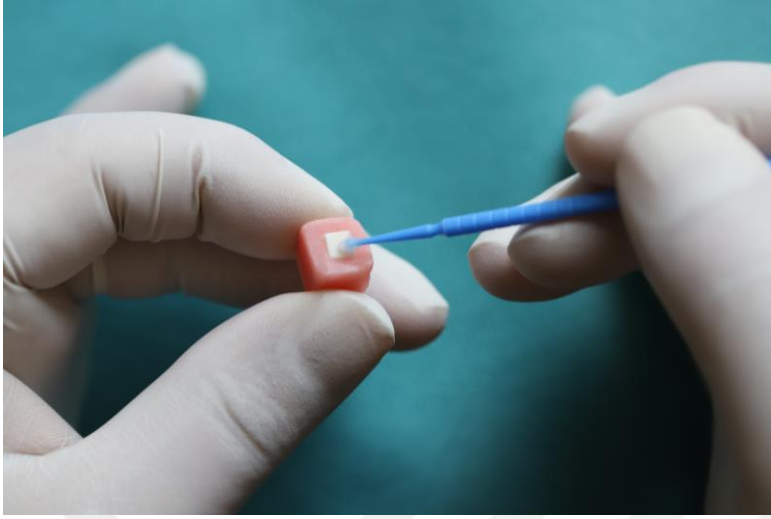
Şekil 3-18: NaF+ CXP™ Grubu (Embrace)



Şekil 3-19: SDF/KI Grubu (Riva Star)

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan vernikler

Ürün Adı	Aktif İçerik	Üretici Firma
Steril Deiyonize Su (K)	Klor, amonyum, sülfat, magnezyum, kalsiyum, sodyum (<2 ppm)	-
Proshield Vernik (P)	Sodyum florür (%5), reçine, etanol, ksilitol	President Dental, Almanya
MI Varnish™ (M)	Sodyum florür (%5), CPP-ACP, polivinil asetat, etanol, hidrojene reçine, silikon dioksit (%1-5), tatlandırıcı (çilek/nane aromalı)	GC Corp., Japonya
Clinpro™ (C)	Sodyum florür (%5), trikalsiyum fosfat (TCP), doğal reçinenin pentaeritritol gliserol esterleri, etil alkol, su, ksilitol, tatlandırıcı	3M ESPE, ABD
Embrace™ Vernik (E)	Sodyum florür (%5), ksilitol kaplı kalsiyum fosfat (CXP™), hidrojene reçine, etanol, silika	PULPDENT Corp., ABD
Riva Star (RS)	Aşama 1: gümüş florür % 35–40, amonyak çözeltisi % 15–20 Aşama 2: potasyum iyodür	SDI, Avustralya



Şekil 3-20: Remineralizasyon ajanlarının uygulanması

3.10. Ağız Ortamını Taklit Eden pH Döngüsü Uygulaması

Ağız ortamındaki gün boyu değişen pH değişikliklerini taklit etmek amacıyla her gruptan remineralizasyon kapasiteleri değerlendirilecek olan örneklere pH döngüsü uygulandı. Kullanılan demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonları; İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında hazırlandı. Hazırlanan demineralizasyon ve remineralizasyon solüsyonlarının kimyasal yapısı;

Demineralizasyon solüsyonu;

-50 mM asetik asit

-1,5 mM CaCl_2

-0,9 mM KH_2PO_4 içermekte olup pH'sı 5,0 e ayarlandı.

Remineralizasyon solüsyonu;

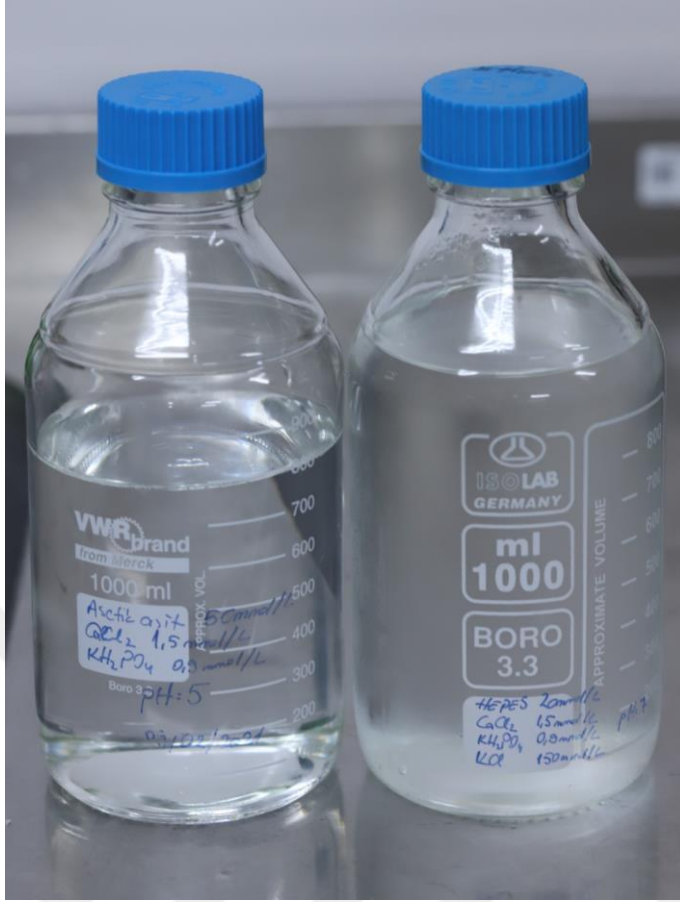
-20 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit)

-1,5 mM CaCl_2

-0,9 mM KH_2PO_4

-150 mM KCl (potasyum klorür) içermekte olup pH'sı 7,0 ye ayarlandı (Şekil 3-

21).



Şekil 3-21: pH döngüsünde kullanılan solüsyonlar

Örnekler gün boyunca oda sıcaklığında 30 dakika süreyle demineralizasyon; 10 dakika süreyle remineralizasyon solüsyonunda bekletildi. Bu döngü ile günde 6 kere pH değişimine tabi tutulmuş oldu. Ardından gece boyunca +4°C de deiyonize su içerisinde bekletildi. pH döngüsü taze hazırlanarak günlük değiştirilen solüsyonlar ile 8 gün boyunca uygulandı.

3.11. pH Döngüsü Sonrası Lazer Floresans İncelemeleri

Daha önce demineralizasyon öncesi ve sonrasında ölçümleri yapılmış olan örneklerin son olarak tedavi uygulaması ve pH döngüsü sonrası remineralizasyona ilişkin floresans değerleri DIAGNOdent 2095 cihazı ile ölçüldü.

3.12. pH Döngüsü Sonrası FTIR-ATR Analizleri

Çalışmada demineralizasyon sonrası FTIR-ATR ünitesiyle analiz edilmiş örnekler, pH döngüsü sonrasında yeniden tarandı. Veriler EssentialFTIR yazılımında (Operant LCC, ABD) işlendi. Her bir spekturumda, baseline doğrulamaları ve

normalizasyon yapılarak işlendikten sonra Fosfat ve Amid I pik değerleri elde edildi. Spektrumda oluşan fosfat/amid I piklerinin altında kalan alan hesaplanarak pH döngüsü öncesi ve sonrası değerler karşılaştırılarak mineral/matriks oranındaki değişimler yarı-kantitatif olarak ölçüldü.

3.13. Biyofilm İncelemeleri İçin Gerekli Hazırlıkların Yapılması

3.13.1. Tükürüğün Hazırlanması

Yapay kök çürük lezyonları üzerinde bakteri adezyonunu sağlamak ve pelikül tabakasını oluşturmak için, çürüğü bulunmayan ve periodontal açıdan sağlıklı gönüllüden yeme, içme ve diş fırçalama işlemlerinden en az 1,5 saat sonra uyarımsız tükürük örnekleri toplandı. Örnekler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında bulunan soğutmalı santrifüj (3-18K, Sigma, Almanya)(Şekil 3-22) ile 4°C’de, 15.000 G/RCF (göreceli santrifüj kuvveti) devirde 15 dk boyunca santrifüj edildi (Şekil 3-23).



Şekil 3-22: Soğutmalı santrifüj (3-18K, Sigma, Almanya)



Şekil 3-23: Tükürük örneklerinin santrifüj edilmesi

Tüplerin üst kısımda biriken süpernatant 0,45 μm ' lik enjektör filtresi (Minisart, Sartorius, Almanya) ile süzülerek sterilize edildi (Şekil 3-24). Steril tükürük -20°C 'de saklandı.



Şekil 3-24: Oluşan süpernatanın filtrasyonu

3.13.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Bakteri biyofilm deneyleri için uluslararası standartlara sahip *L.casei* ATCC 4646 ve *S.mutans* ATCC 25175 suşları kullanıldı. Stoktan (-80 °C) çıkarılan bakteriler, %5 koyun kanlı agara ekilerek 37°C’de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3-25). Bu kültürlerden alınan bakterilerle 10 ml %5 sakkarozlu Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) buyyon besiyerinde (Şekil 3-26) 0,5 McFarland standartlarına göre (10^8 cfu/ml) bir bakteri süspansiyonu hazırlanarak 100 kat sulandırıldı. Böylece süspansiyonun 1 ml’inde 1×10^6 bakteri bulunması sağlandı (Şekil 3-27).



Şekil 3-25: *L.casei* ve *S.mutans*’ın %5 koyun kanlı agarda üremiş kolonileri



Şekil 3-26: Beyin Kalp İnfüzyon besiyeri

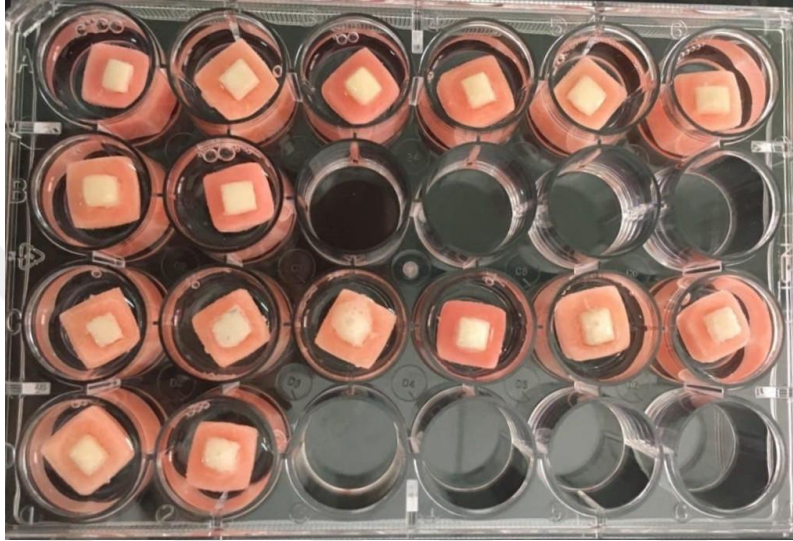


Şekil 3-27: Bakteri süspansiyonu

3.14. Biyofilmlerin Oluşturulması

Remineralizasyon ajanları, yapay çürük lezyonu oluşturulduktan sonra sterilize edilmiş örneklerle üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı.

Biyofilmlerin oluşturulmasında 24 kuyucuklu doku kültürü plakları kullanıldı. Her kuyucuğa bir örnek yerleştirildikten sonra pelikül kaplaması için üzerlerine 2 ml tükürük eklendi (Şekil 3-28).



Şekil 3-28: Örneklerin tükürükle kaplanması

Daha sonra plaklar çalkalayıcıda (MiniRocker MR-1, BioSan, Riga, Letonya) 37°C’de 1 saat inkübe edildi (Şekil 3-29).



Şekil 3-29: Örneklerin tükürükle kaplanması için çalkalayıcıya yerleştirilmesi

Tükürükteki örnekler PBS (fosfat tamponlu salin) solüsyonu ile yıkandı. Bu aşamalardan sonra yeni kuyucuğa yerleştirilen örnekler üzerine 200 µl bakteri süspansiyonu ve 1,6 ml %5 sakkarozlu BHI buyyon eklendi (Şekil 3-30)



Şekil 3-30: Bakteri süspansiyonu ve %5 sakkarozlu BHI buyyon eklenmesi

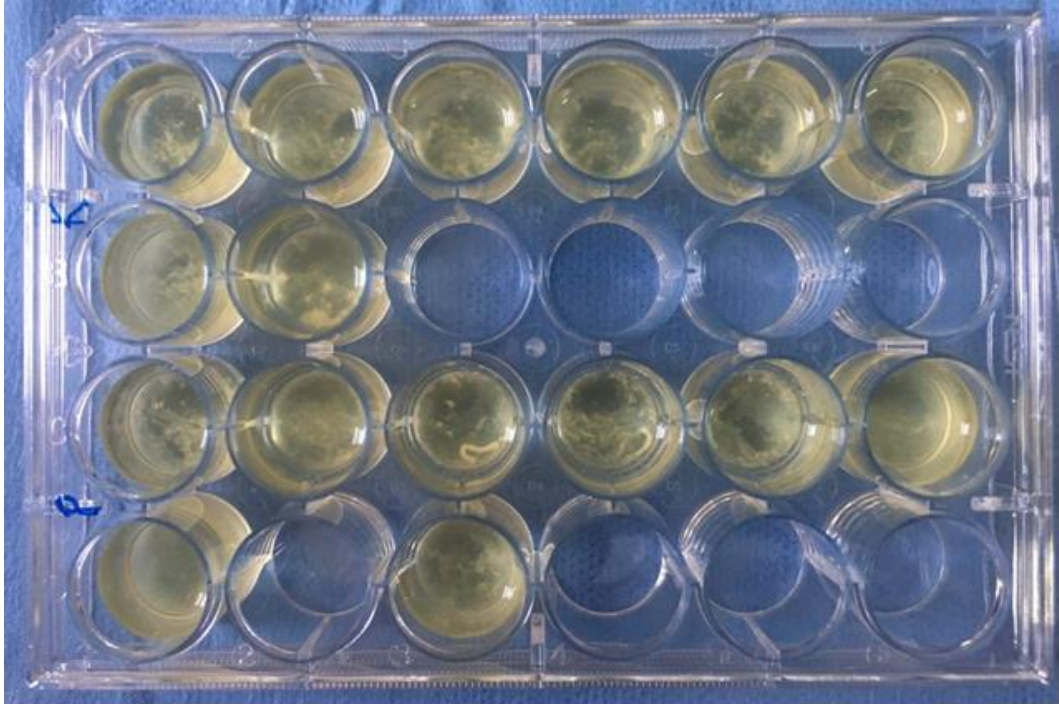
Daha sonra plaklar anaerop kavanoza alınarak çalkalayıcı üzerinde 37°C’de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3-31).



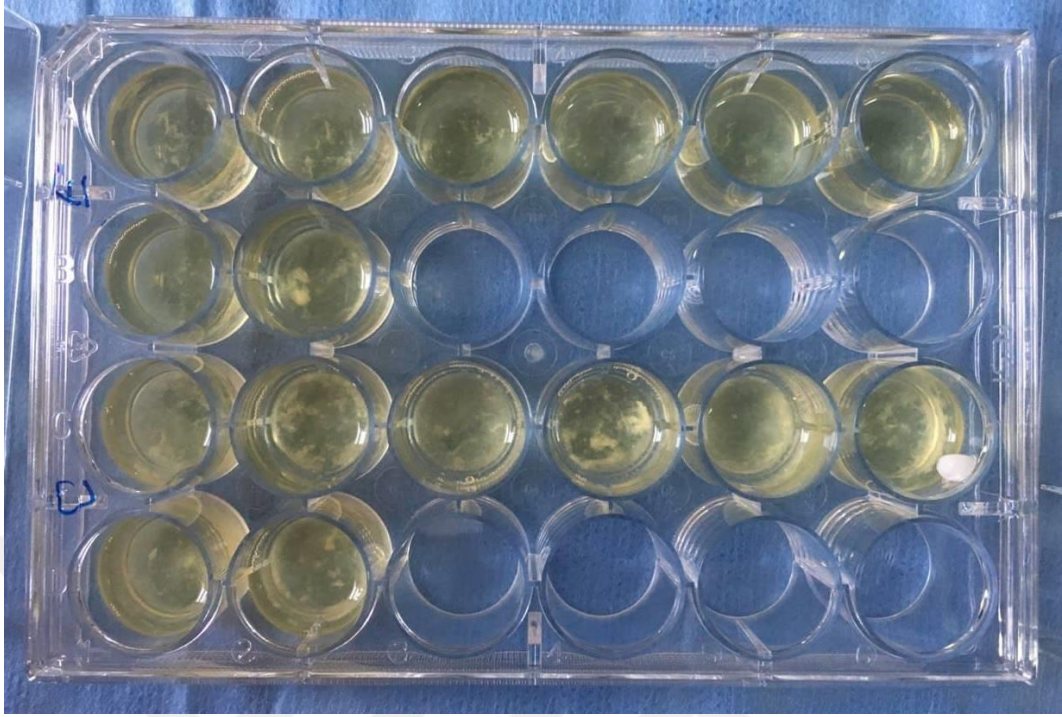
Şekil 3-31: Plakaların anaerop ortam sağlayan kavanozlarda çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesi

3.15. Biyofilmlerin İncelenmesi

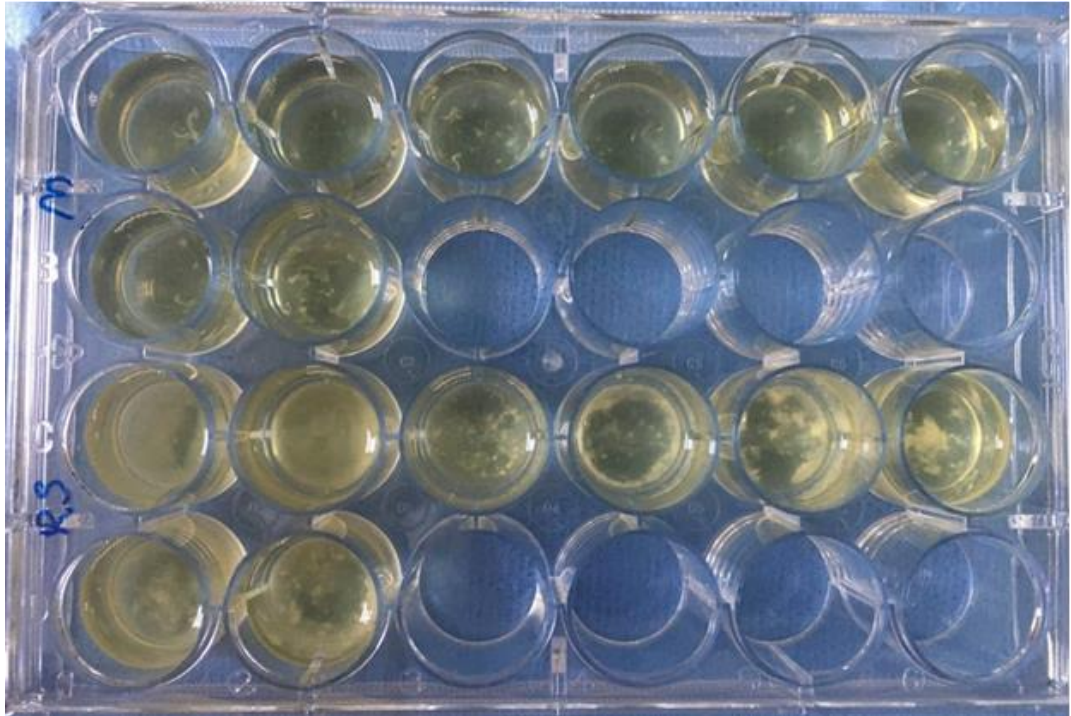
İnkübasyon sonunda örnekler, bakteri çoğalması gözlenen (Şekil 3-32, Şekil 3-33, Şekil 3-34) plaklardan alınarak yapışmamış bakterileri uzaklaştırmak için 5 ml steril tuzlu su ile üç kez yıkandı.



Şekil 3-32: K ve P gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü



Şekil 3-33: C ve E gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü



Şekil 3-34: M ve RS gruplarının bulunduğu plakların görüntüsü

Her gruptan 7 örnek CLSM, 1 örnek SEM incelemesi için ayrıldı.

3.15.1. Biyofilmlerin CLSM incelemesi

Biyofilmi boyamak için kullanılan Live/Dead Bacterial Viability Kit'in (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD) (Şekil 3-35) A ve B bileşenlerinden 0,4'er µl/ml olacak şekilde DMSO'da (Dimetil sülfoksit) hazırlandı.



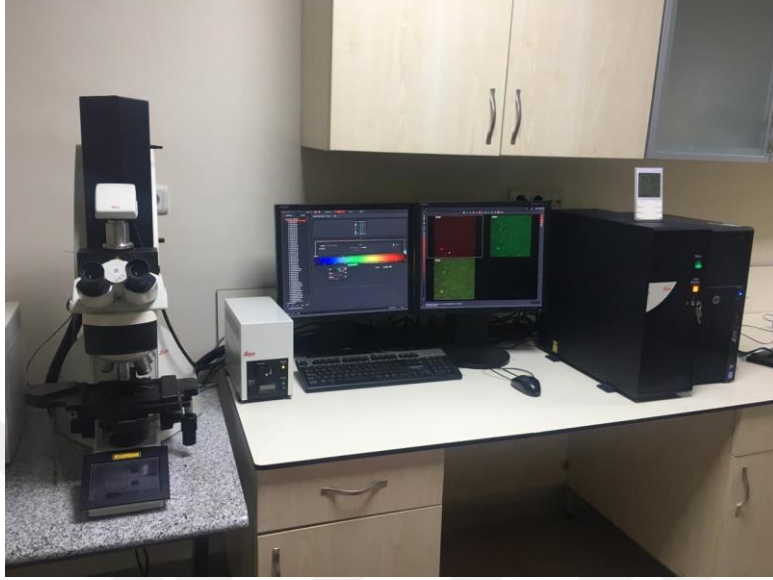
Şekil 3-35: Live/Dead Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD)

Hazırlanan boya karışımı, plaklar içinde bulunan materyallerin üzerine 20'şer μ l bırakılarak (Şekil 3-36) 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.



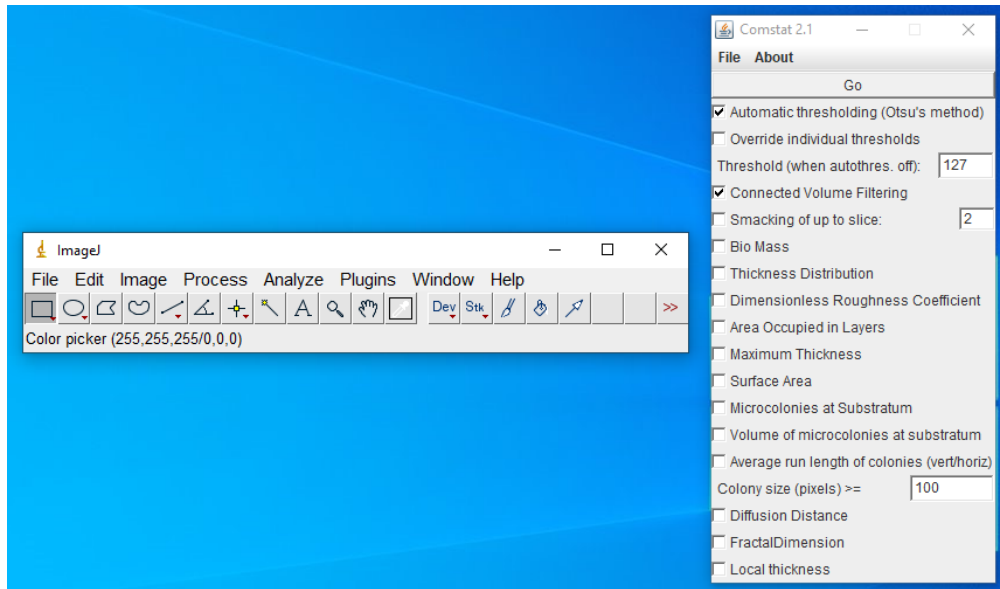
Şekil 3-36: Örneklerin Live/Dead Bacterial Viability Kit ile boyanması

Boyanan örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsünde bulunan CLSM (TCS SPE, Leica Microsystems, ABD)(Şekil 3-37) ile 488 and 532 nm’de 10’luk büyütmede incelendi.



Şekil 3-37: CLSM (TCS SPE, Leica, ABD)

Sonrasında elde edilen biyofilm görüntülerinden biyokütle ve canlılık oranının hesaplanabilmesi için Image J programı (National Institutes of Health, ABD) (Şekil 3-38) kullanıldı.



Şekil 3-38: Image J programı (National Institutes of Health, ABD)

3.15.2. Biyofilmin SEM incelemesi

Biyofilmi fıkse etmek için örnekler 40 dakika %4 formolde bekletildi. Su ile yıkandıktan sonra derecelenmiş (%50, %75, %90 ve 2x%100 seride) etilen glikol ile kurutuldu. Kurutulan örnekler Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan kaplama cihazında (SC7620 Sputter Coater, Quorum Technologies Ltd, İngiltere)(Şekil 3-39) 15 mA’de, 120 saniye, ortalama 1-2 nm Altın ile kaplandı (Şekil 3-40).



Şekil 3-39: Altın kaplama cihazı (SC7620 Sputter Coater, Quorum, İngiltere)



Şekil 3-40: Altın kaplanmış örnekler

İletken hale getirilen örnekler Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan SEM (EVO LS10, Zeiss Microscopy, Almanya)(Şekil 3-41) ile 20 kV’da, 5000x büyütmede incelendi.



Şekil 3-41: Çalışmada kullanılan SEM cihazı (EVO LS10, Zeiss Microscopy, Almanya)

3.16. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago IL, ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Kolmogrov-Smirnov testi ve Histogram grafiği değerlendirilerek verilerin normal dağılım gösterip göstermediği tespit edildi.

Materyaller arası farklılıkların karşılaştırılması amacıyla Kruskal-Wallis testi yapıldı. Farklılık çıkan ölçümlerde materyallerin birbirleriyle olan ilişkisi değerlendirilirken Post hoc analizi olarak Bonferroni ve Dunn's test uygulandı.

Tekrarlı ölçümlü gruplar için, aşamalar arasındaki ilişkiyi belirlemek için ikili karşılaştırma yapan Wilcoxon Signed Rank testi uygulandı. Gruplar arası fark anlamlı çıktığında, Post hoc analizi olarak Bonferroni testi kullanıldı.

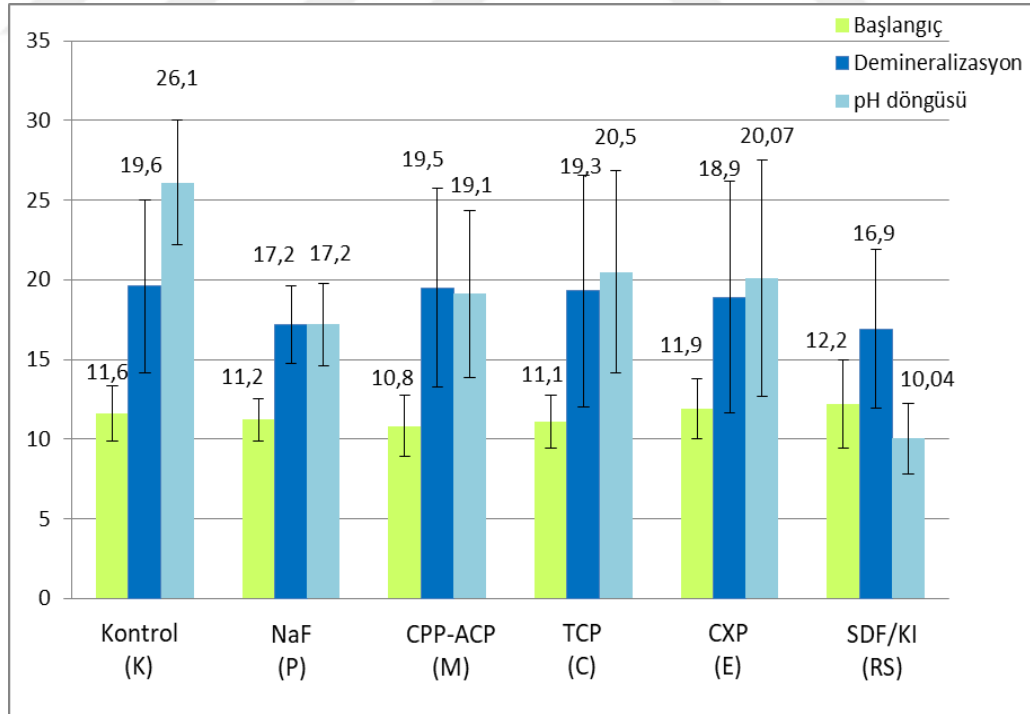
Bütün istatistiksel analizlerde, $p < 0,05$ değeri, anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Lazer Floresans (DIAGNOdent) Ölçümlerine Ait Bulgular

Çalışmamızda kök yüzeylerinde yapay çürük oluşturulan örnekler üzerine remineralizasyon ajanları uygulandıktan sonra, yüzeylerde oluşan değişiklikler DIAGNOdent cihazı ile ölçülmüştür. Örnek yüzeyleri başlangıçta (D1), yapay çürük oluşturulduktan sonra (D2) ve pH döngüsü uygulandıktan sonra (D3) olarak değerlendirilmiş, elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Kontrol (K), Proshield-(P) (%5 NaF), MI Vernik-(M) (%5 NaF+CPP-ACP), Clinpro-(C) (%5NaF+TCP), Embrace- (E)(%5NaF+CXP) ve Riva Star- (RS)(SDF/KI) gruplarının lazer floresans yöntemi ile elde edilen başlangıç, demineralizasyon sonrası ve pH döngüsü sonrası ortalama ve standart sapma değerleri Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4-1: Tüm gruplar için başlangıç, demineralizasyon sonrası ve pH döngüsü sonrası lazer floresans ortalama ve standart sapma değerleri dağılımı

Her grup için eşit varyans ve normalite testleri sonrası, D2-D1 ve D3-D2 lazer floresans değerleri farklarının gruplar arasında anlamlı düzeyde olup olmadığını tespit etmek için Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır.

D2 ile D1 farkının gruplar arası karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4-1: Lazer floresans D2 ile D1 farkının gruplar arası karşılaştırılmasına ait istatistiksel analiz

	D2-D1
Ki-Kare	5,423
Serbestlik derecesi	5
p değeri	,367

- Bu sonuç **demineralizasyon ile ortaya çıkan lazer floresans artışı açısından, tedavi grupları arasında anlamlı fark olmadığını** göstermektedir ($p>0,05$).

Kruskal-Wallis testi sonucunda **D2 ile D3 arasındaki farkın gruplar arasında anlamlı çıkması** üzerine Post hoc analizleri yapılmıştır. Demineralizasyon ve pH döngüsü sonrası elde edilen veriler arasında fark eşit varyans varsayımını sağladığı için Bonferroni Testi (Bonferroni Düzeltmesi) uygulanmıştır.

Demineralizasyon sonrası (D2) ve pH döngüsü sonrası (D3) ölçümleriyle elde edilen lazer floresans değerleri arasındaki farkın gruplar arası karşılaştırmalarına ait istatistiksel analizler Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: D2 ve D3 arasındaki lazer floresans değerleri farkının gruplar arası karşılaştırılması

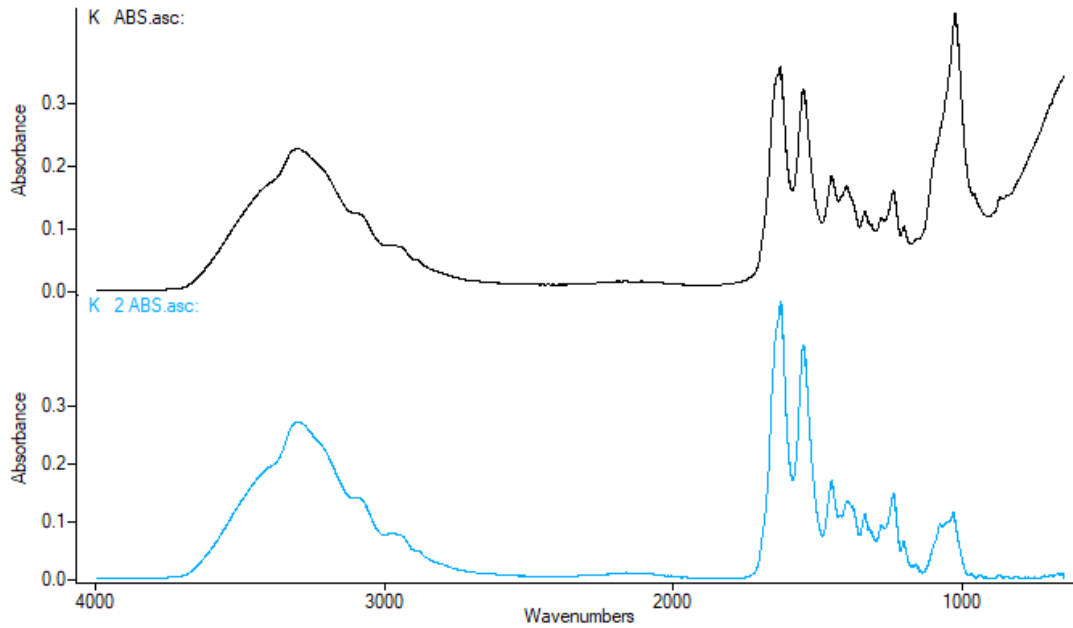
(I) Vernik	(J) Vernik	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	p değeri
K	P	-,37612*	,07731	,000
	M	-,38695*	,07731	,000
	C	-,27962*	,07731	,010
	E	-,27426*	,07731	,012
	RS	-,74465*	,07731	,000
P (NaF)	K	,37612*	,07731	,000
	M	-,01083	,07731	1,000
	C	,09649	,07731	1,000
	E	,10186	,07731	1,000
	RS	-,36854*	,07731	,000
M (CPP-ACP)	K	,38695*	,07731	,000
	P	,01083	,07731	1,000
	C	,10733	,07731	1,000
	E	,11269	,07731	1,000
	RS	-,35770*	,07731	,000
C (TCP)	K	,27962*	,07731	,010
	P	-,09649	,07731	1,000
	M	-,10733	,07731	1,000
	E	,00536	,07731	1,000
	RS	-,46503*	,07731	,000
E (CXP)	K	,27426*	,07731	,012
	P	-,10186	,07731	1,000
	M	-,11269	,07731	1,000
	C	-,00536	,07731	1,000
	RS	-,47039*	,07731	,000
RS (SDF/KI)	K	,74465*	,07731	,000
	P	,36854*	,07731	,000
	M	,35770*	,07731	,000
	C	,46503*	,07731	,000
	E	,47039*	,07731	,000

Tüm tedavi gruplarında, demineralizasyon ve pH d6ngüsü sonrası ortaya çıkan lazer floresans miktarı farklarına bakıldığında (D3-D2);

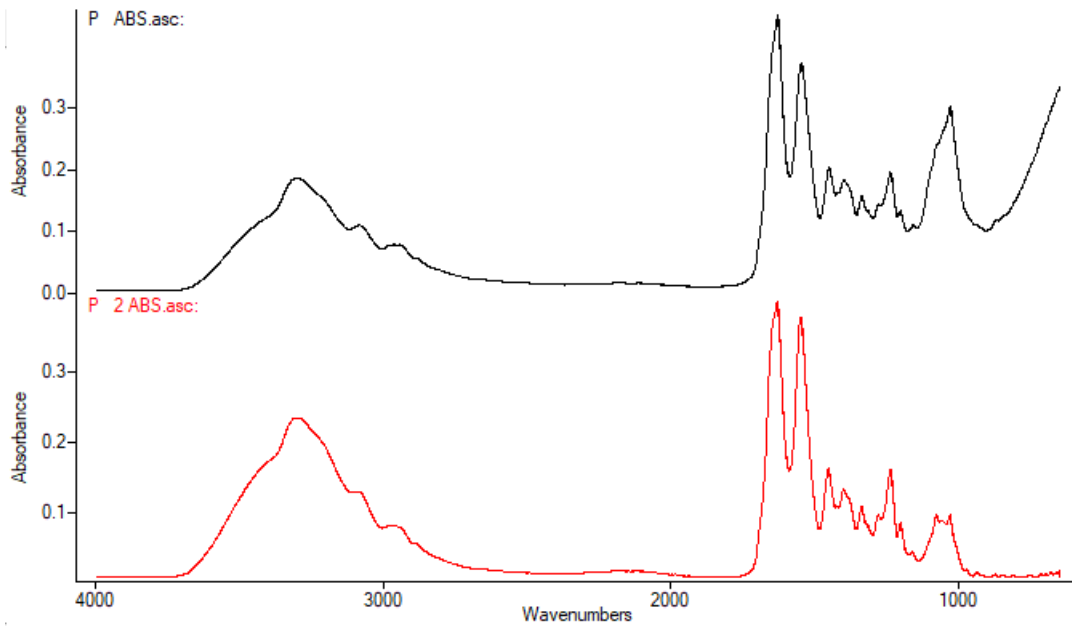
- **Kontrol grubuyla diğ er gruplar arasında, deney grupları lehine anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.05$).**
- **RS grubu, pH d6ngüsü sonrası elde edilen en düşük lazer floresans değ erleriyle, diğ er tüm gruplardan anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p<0,05$).**
- **P, M, C ve E gruplarının çoklu karşılaştırmaları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).**

4.2. FTIR-ATR Analizlerine Ait Bulgular

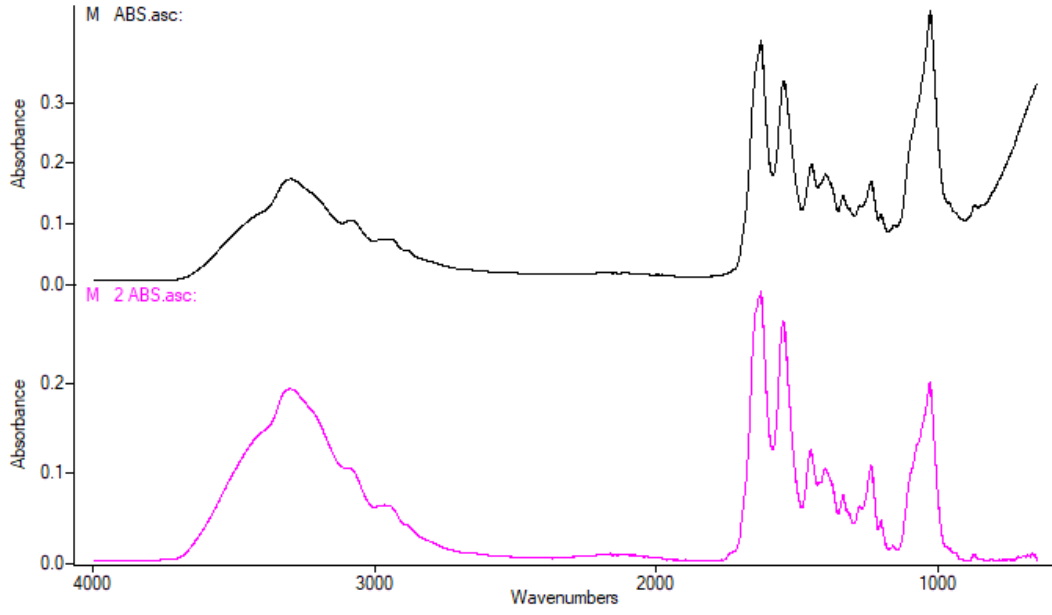
K (Kontrol), P (NaF), M (CPP-ACP), C (TCP), E (CXP) ve RS (SDF/KI) gruplarının FTIR-ATR yöntemi ile elde edilen **pH döngüsü öncesi ( stte) ve sonrası (altta)  l  mlerine ait  rnekler** Şekil 4.2 ve 4.7 arasında gösterilmiştir.



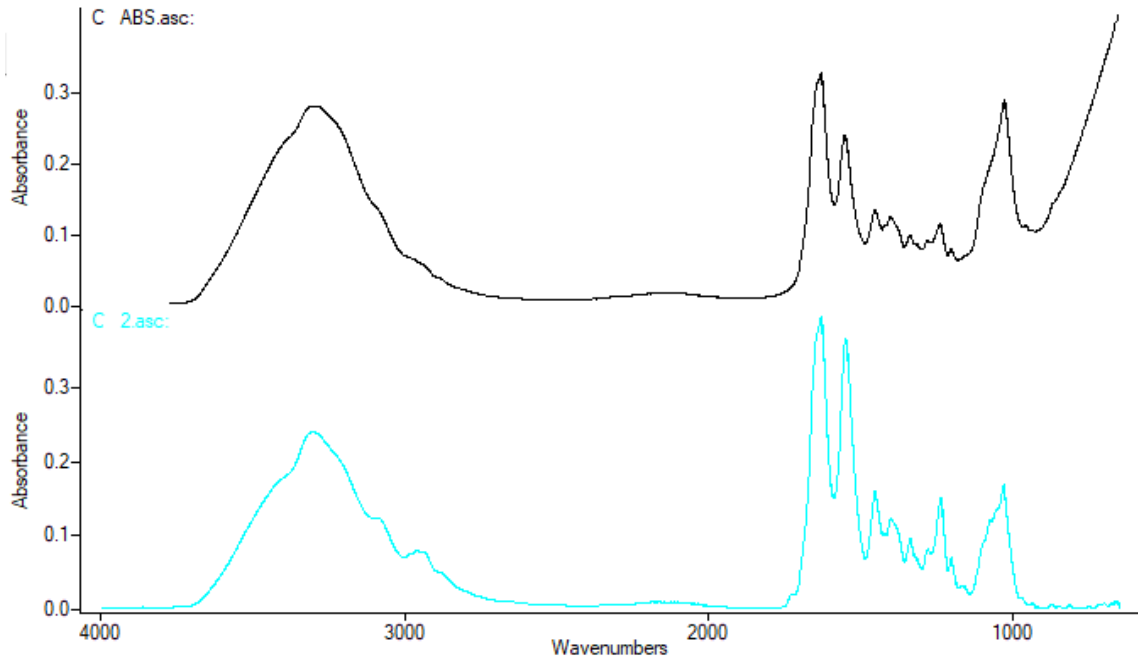
Şekil 4-2: K grubuna ait FTIR-ATR grafiği



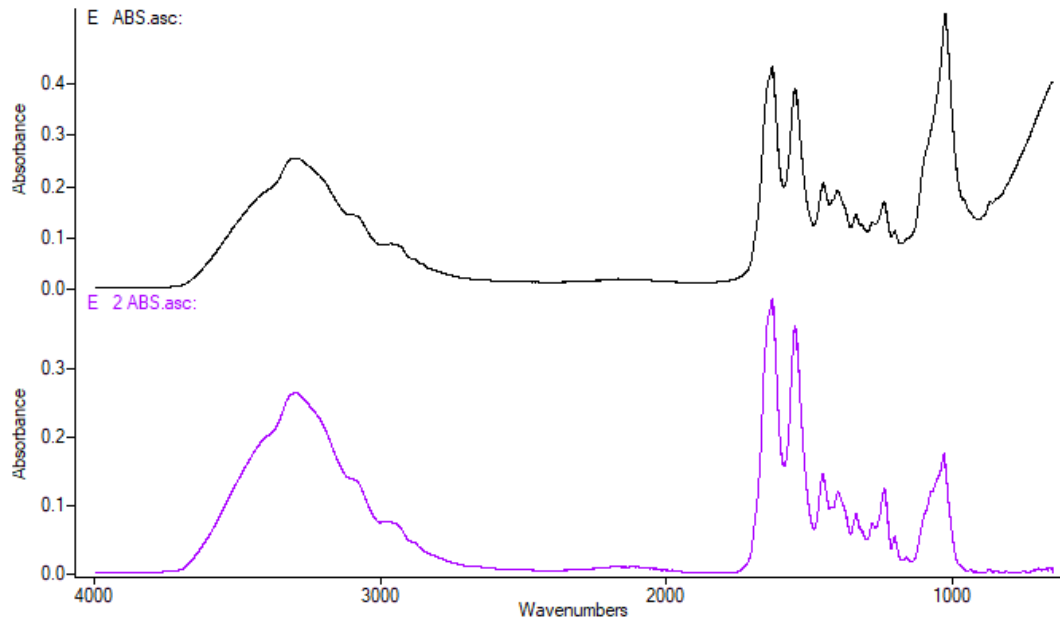
Şekil 4-3: P grubuna ait FTIR-ATR grafiği



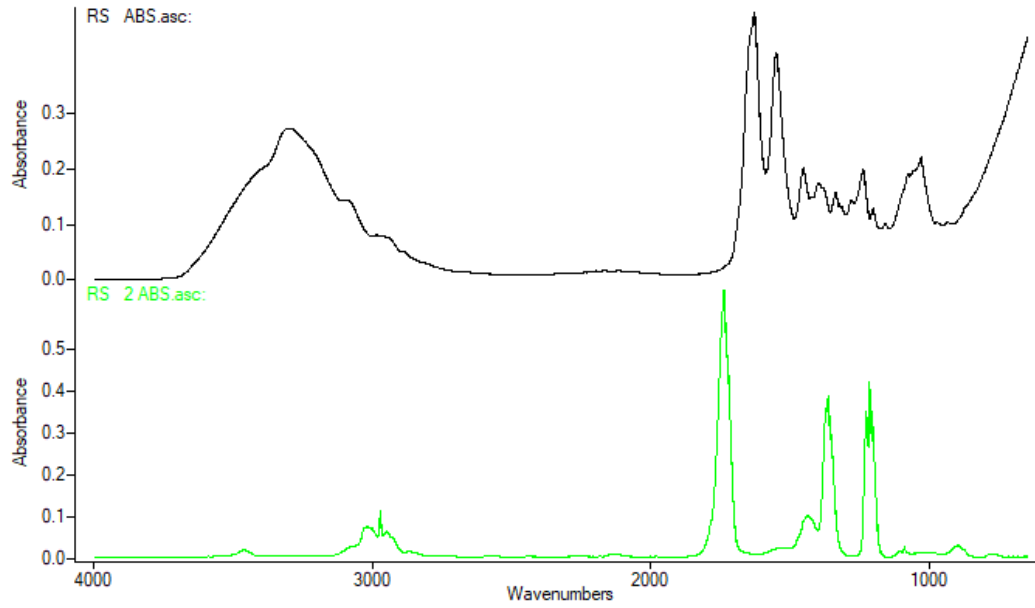
Şekil 4-4: M grubuna ait FTIR-ATR grafiği



Şekil 4-5: C grubuna ait FTIR-ATR grafiği



Şekil 4-6: E grubuna ait FTIR-ATR grafiği



Şekil 4-7: RS grubuna ait FTIR-ATR grafiği

FTIR-ATR analizinden elde edilen grafikler üzerinden yapılan Fosfat/Amid I (Mineral/Matriks) oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4-3 te verilmiştir.

Tablo 4-3: Mineral/matriks oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri

	pH döngüsü ncesi Fosfat/Amid I	pH döngüsü sonrası Fosfat/Amid I
Kontrol (K)	1,74±0,16	0,39±0,26
NaF (P)	1,32±0,57	0,67±0,55
CPP-ACP (M)	1,45±0,65	1,08±0,68
TCP (C)	0,72±0,22	0,35±0,20
CXP (E)	0,77±0,54	0,27±0,10

RS grubunda referans pikler hesaplanamayacak düzeyde olduğundan, bu grup değerlendirme dışında tutulmuştur. Geri kalan gruplar için varyans ve normalite testlerinin ardından, tekrarlı ölçümlü gruplar için kullanılan Wilcoxon Signed Rank testi uygulanmıştır.

Sonucunda **gruplar arası farklar anlamlı çıkmış**, Post-hoc analizinde ise Bonferroni testi (Tablo 4-4) kullanılmıştır.

Tablo 4-4: pH d6ngüsü 6ncesi ve sonrası Fosfat/Amid I oranlarının 6oklu karşılaştırılmaları

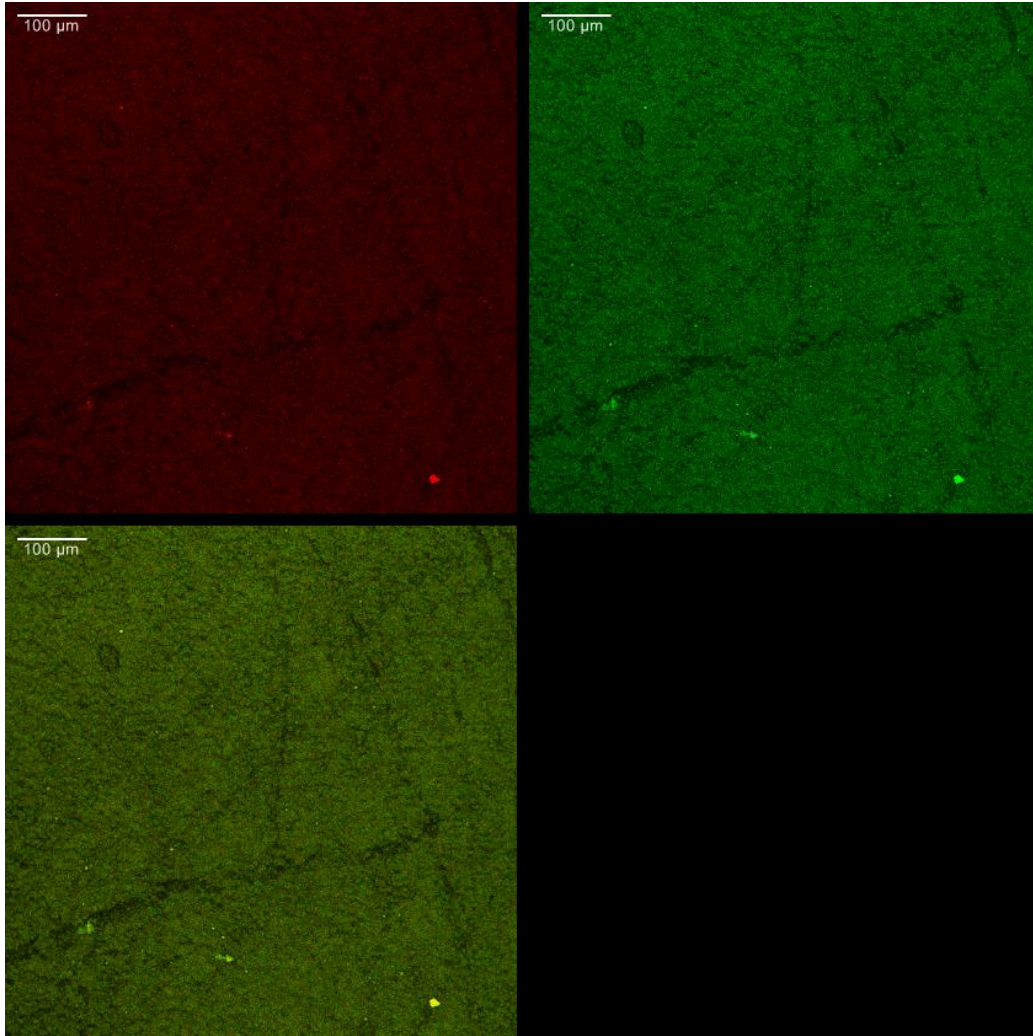
(I)Vernik	(J)Vernik	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	p değeri
K	P	-,71057*	,17194	,005
	M	-,98474*	,17194	,000
	C	-,97924*	,17194	,000
	E	-,85000*	,17194	,001
P (NaF)	K	,71057*	,17194	,005
	C	-,26867	,17194	1,000
	M	-,27417	,17194	1,000
	E	-,13943	,17194	1,000
M (CPP-ACP)	K	,98474*	,17194	,000
	P	,27417	,17194	1,000
	C	,00550	,17194	1,000
	E	,13474	,17194	1,000
C (TCP)	K	,97924*	,17194	,000
	P	,26867	,17194	1,000
	M	-,00550	,17194	1,000
	E	,12924	,17194	1,000
E (CXP)	K	,85000*	,17194	,001
	P	,13943	,17194	1,000
	M	-,13474	,17194	1,000
	C	-,12924	,17194	1,000

Bonferroni Testi sonuçlarına g6re **Fosfat/Amid I** (mineral/matriks) **oranlarının pH d6ngüsü 6ncesi ve sonrası değişikliğine bakıldığında;**

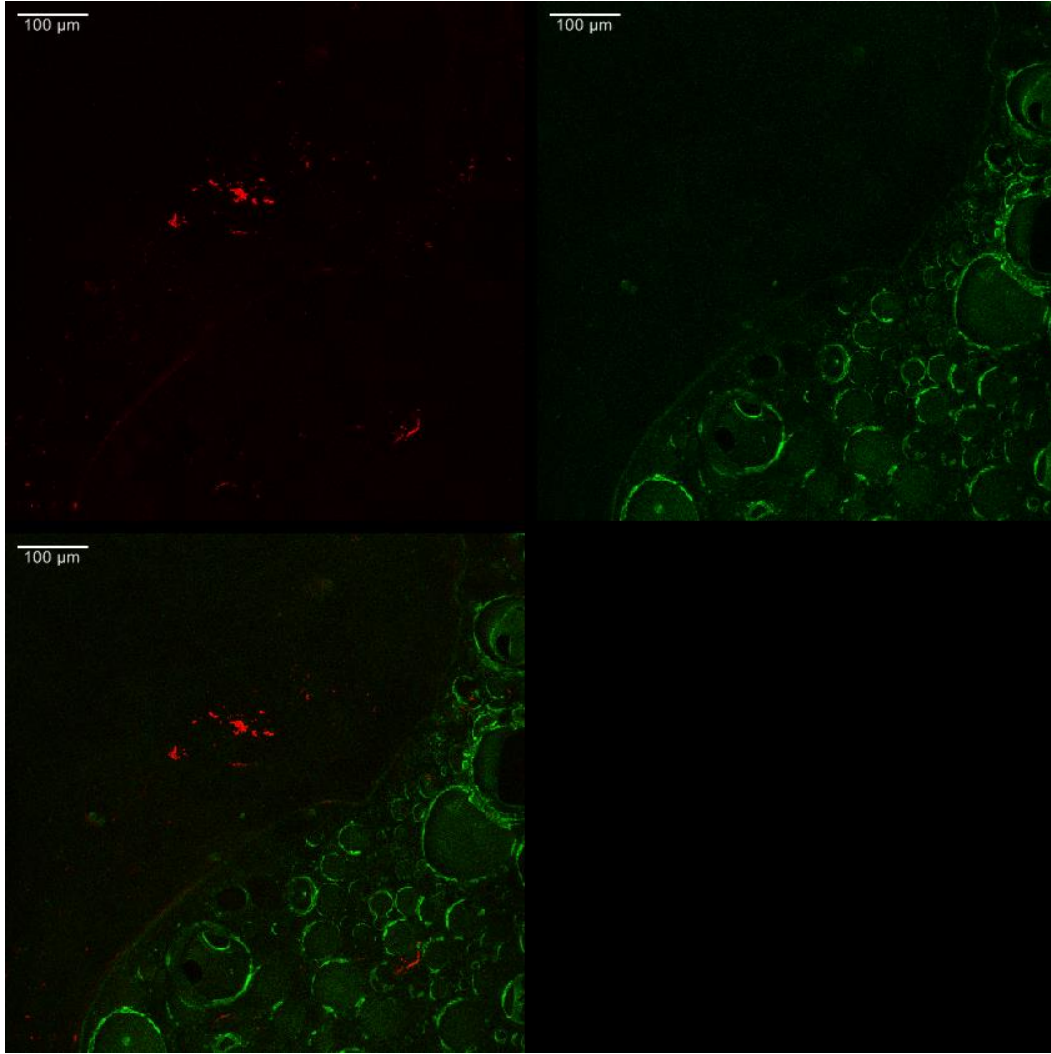
- **Kontrol grubunda Fosfat/Amid I oranındaki d6şüş,** diğer gruplardakine g6re istatistiksel olarak **anlamlı** bulunmuştur ($p < 0,05$).
- **P, M, C ve E grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır** ($p > 0,05$).

4.3. CLSM Analizlerine Ait Bulgular

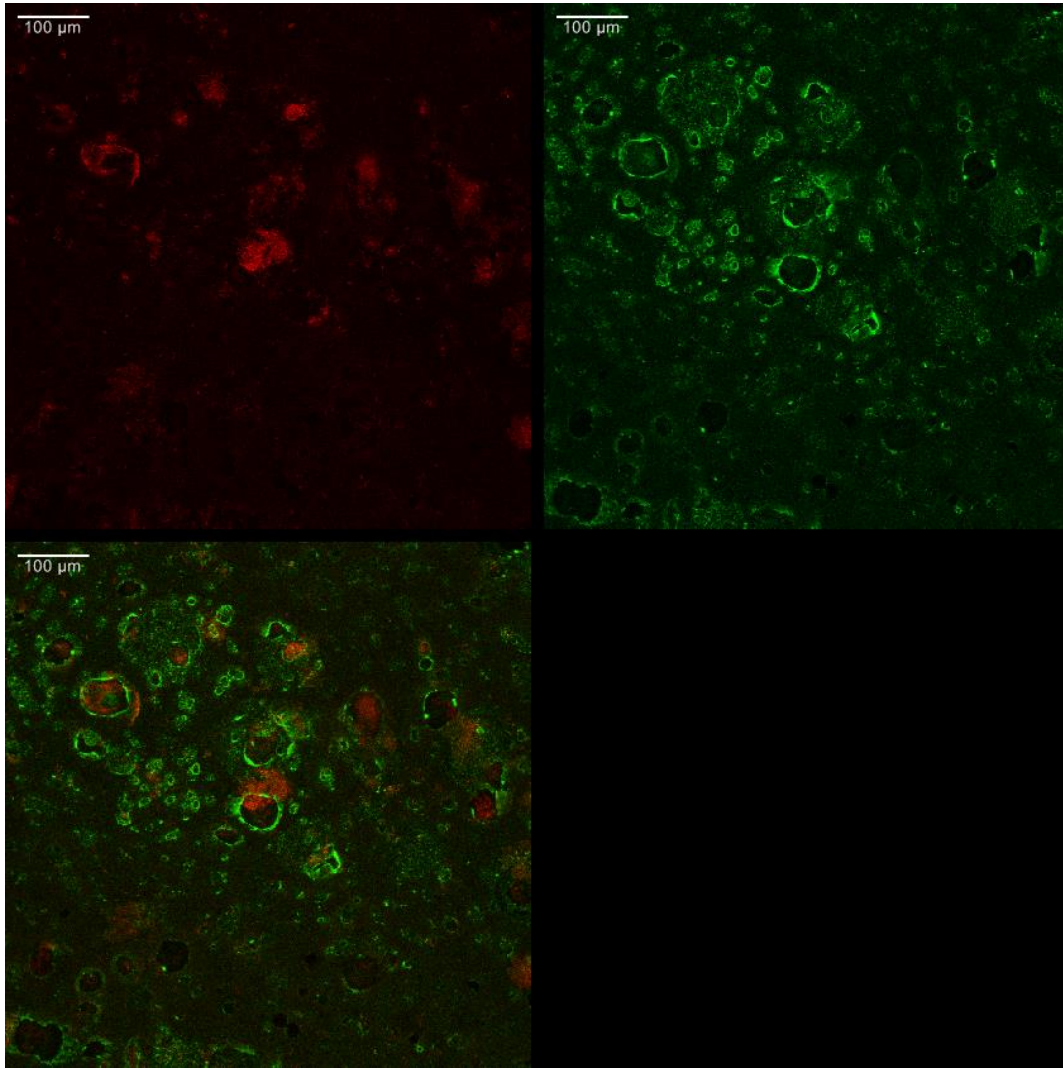
Numunelerin yüzeyinde oluşmuş *S. mutans* ve *L.casei* biyofilmlerinin CLSM görüntüleri Şekil 4-8 ve 4-13 arasında gösterilmiştir. Görüntülerdeki **yeşil renk canlı** ve **kırmızı renk cansız bakterileri** ifade etmektedir. Analiz sonuçlarında, tüm gruplarda canlı ve cansız *S. mutans* ve *Lactobacillus* hücreleri gözlenmiştir. Tüm gruplar karşılaştırıldığında, **kontrol grubunda daha fazla miktarda boyalı alan** ve böylece daha **fazla biyofilm üretmesi** olduğu görülmektedir.



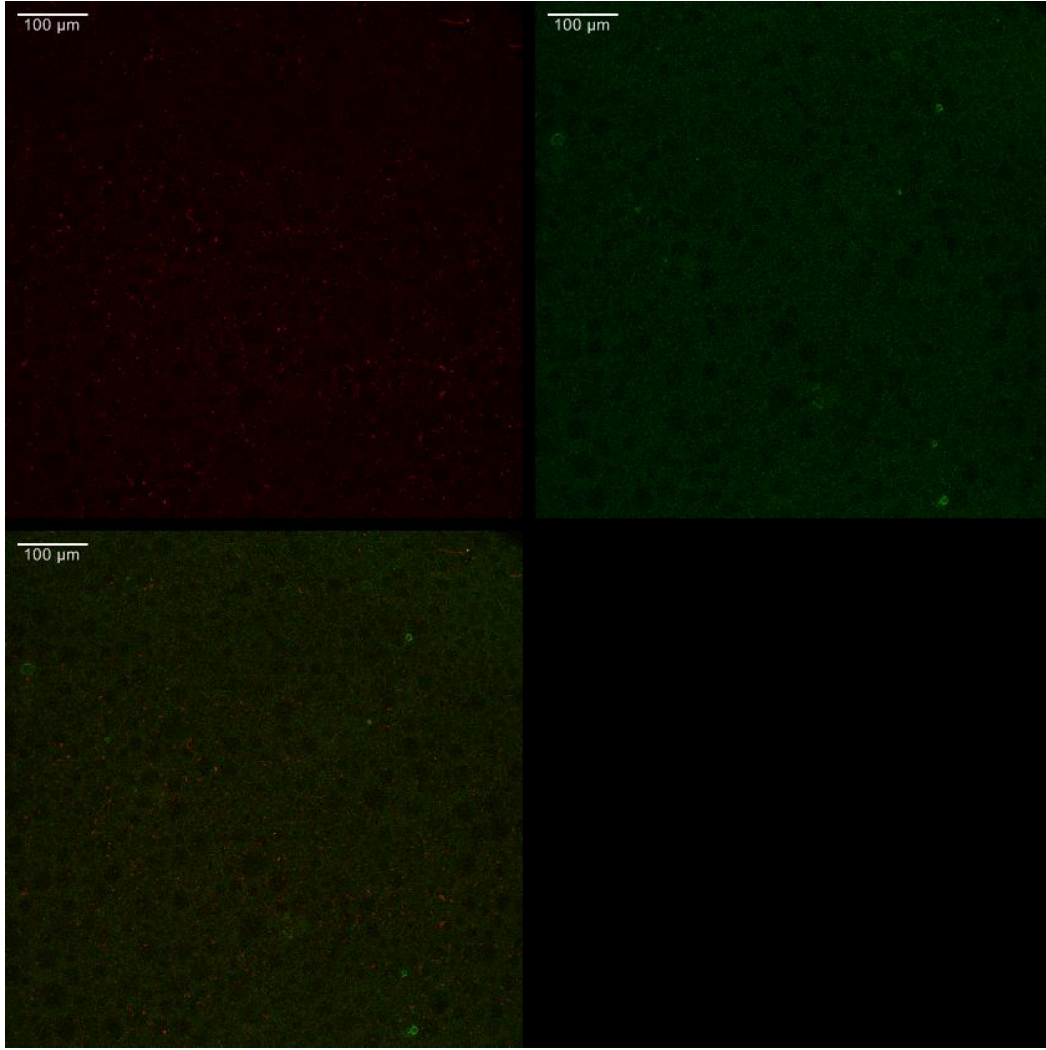
Şekil 4-8: K grubuna ait CLSM görüntüsü



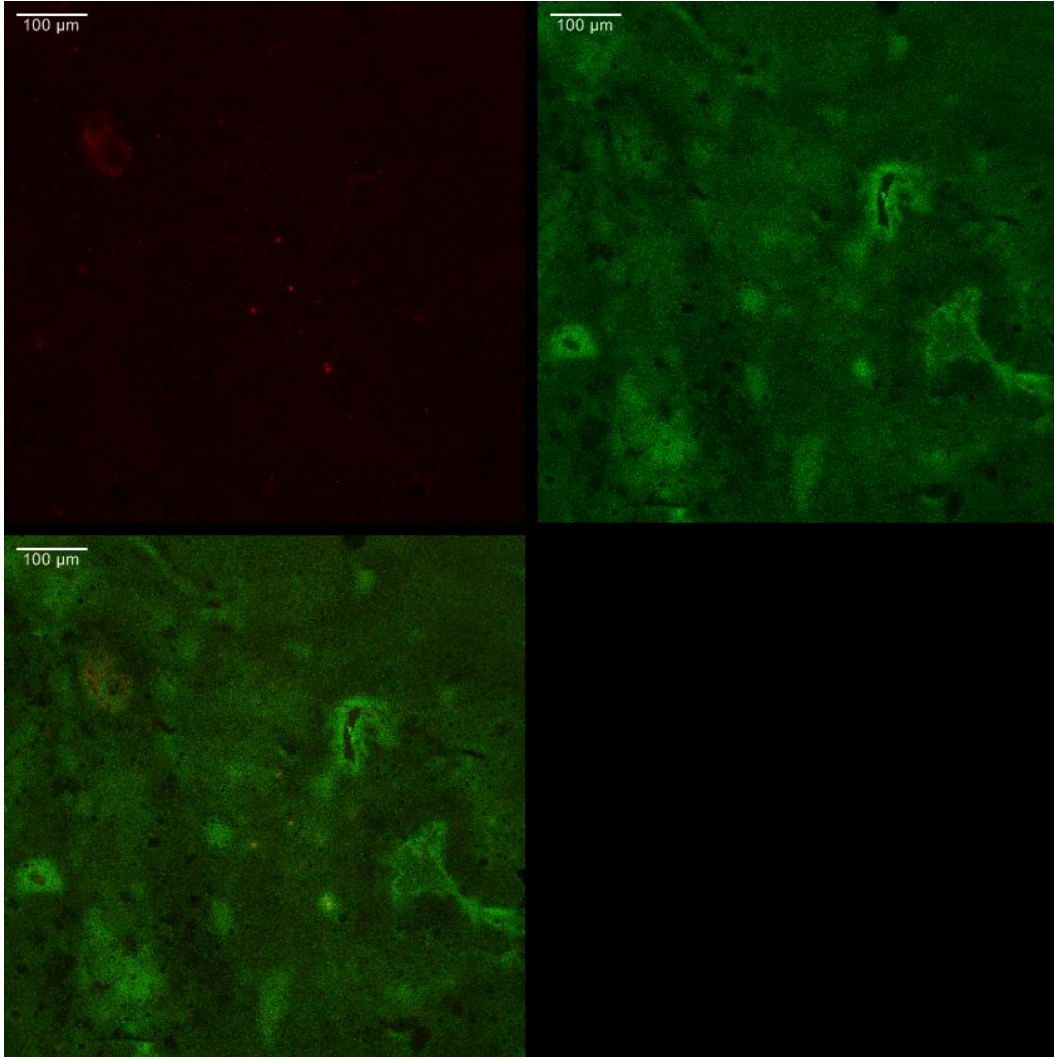
Şekil 4-9: P grubuna ait CLSM görüntüsü



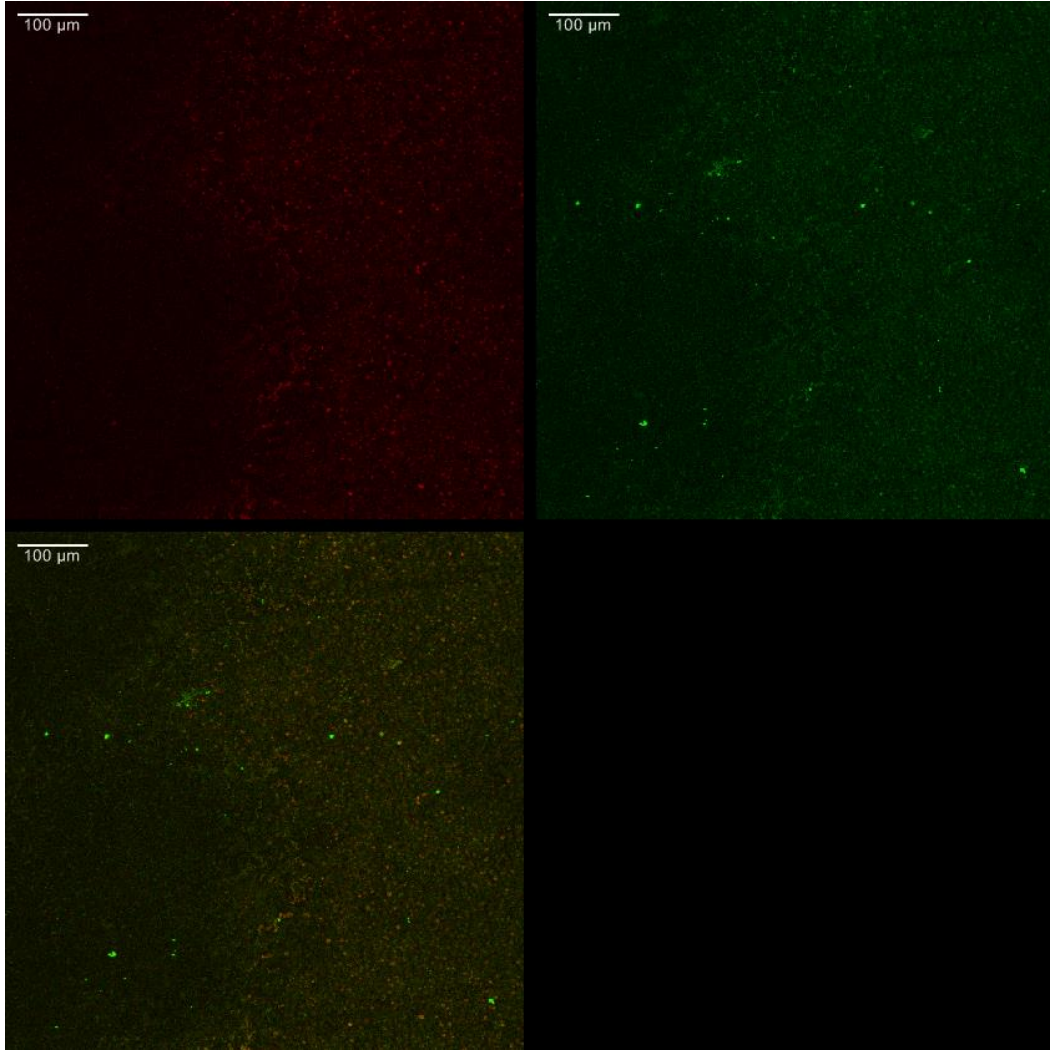
Şekil 4-10: M grubuna ait CLSM görüntüsü



Şekil 4-11: C grubuna ait CLSM görüntüsü



Şekil 4-12: E grubuna ait CLSM görüntüsü



Şekil 4-13: RS grubuna ait CLSM görüntüsü

Grupların **toplam biyokütle** ve **canlı biyokütle** ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4-5'te verilmiştir.

Tablo 4-5: Toplam biyokütle ve canlı biyokütle ortalama ve standart sapma değerleri

	Toplam biyokütle ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Canlı biyokütle ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)
Kontrol (K)	255,33 $\pm$ 41,32 ^A	119,33 $\pm$ 19,21 ^a
NaF (P)	71,75 $\pm$ 23,22 ^E	14,09 $\pm$ 4,70 ^e
CPP-ACP (M)	117,76 $\pm$ 16,56 ^{CD}	36,03 $\pm$ 4,13 ^d
TCP (C)	109,03 $\pm$ 27,59 ^{DE}	47,45 $\pm$ 17,31 ^{cd}
CXP (E)	172,40 $\pm$ 36,67 ^{BC}	51,37 $\pm$ 9,55 ^c
SDF/KI (RS)	160,21 $\pm$ 25,70 ^B	77,45 $\pm$ 12,73 ^b

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkları belirtmek amacıyla kullanılmıştır. (Büyük harfler toplam biyokütle, küçük harfler canlı biyokütle için)

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için öncelikle varyans ve normalite testleri uygulanmıştır. Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre $p < 0,05$ bulunmuştur. **Gruplar arası fark anlamlı bulunduğundan**, Post hoc analizi olarak Dunn's test kullanılmıştır. Toplam biyokütle ve canlı biyokütlenin gruplar arası çoklu karşılaştırmasına ait analizler Tablo 4-6 ve 4-7'de gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Toplam biyokütlenin gruplar arası karşılaştırılması

(I)Vernik	(J)Vernik	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	p değeri
K (Kontrol)	P	183,579*	17,916	,000
	M	137,569*	16,632	,001
	C	146,304*	18,780	,000
	E	82,929*	20,884	,024
	RS	95,120*	18,395	,005
P (NaF)	K	-183,579*	17,916	,000
	M	-46,010*	10,474	,016
	C	-37,275	13,630	,196
	E	-100,650*	16,409	,001
	RS	-88,459*	13,094	,000
M (CPP-ACP)	K	-137,569*	16,632	,001
	P	46,010*	10,474	,016
	C	8,735	11,892	,999
	E	-54,640	14,996	,070
	RS	-42,449*	11,273	,045
C (TCP)	K	-146,304*	18,780	,000
	P	37,275	13,630	,196
	M	-8,735	11,892	,999
	E	-63,375*	17,348	,045
	RS	-51,184*	14,253	,046
E (CXP)	K	-82,929*	20,884	,024
	P	100,650*	16,409	,001
	M	54,640	14,996	,070
	C	63,375*	17,348	,045
	RS	12,191	16,930	1,000
RS (SDF/KI)	K	-95,120*	18,395	,005
	P	88,459*	13,094	,000
	M	42,449*	11,273	,045
	C	51,184*	14,253	,046
	E	-12,191	16,930	1,000

Toplam biyokütle gruplar arası karşılaştırıldığında,

- **Kontrol grubunda oluşan toplam biyofilmin, diğer deney gruplarından anlamlı derecede fazla olduğu,**
- **Tüm gruplar içinde en az biyokütlenin, P grubunda görüldüğü ancak C ile arasında anlamlı fark gözlenmediği ($p < 0,05$),**
- Deney grupları arasında **en fazla biyokütlenin RS grubunda saptandığı, ancak E ile arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p < 0,05$),**
- C grubunda, E grubundan anlamlı olarak daha az biyofilm bulunduğu ($p < 0,05$),
- C ile M ve M ile E grupları arasındaysa anlamlı fark olmadığı ($p > 0,05$) görülmüştür.

Tablo 4-7: Canlı biyokütlenin gruplar arası karşılaştırılması

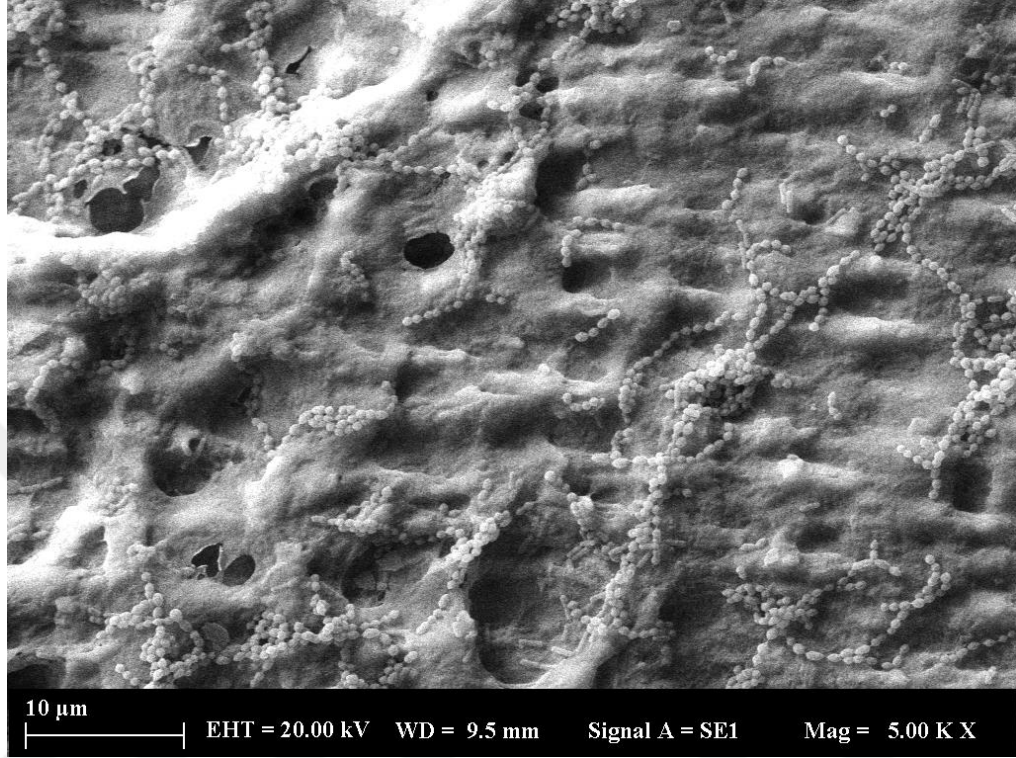
(I)Vernik	(J)Vernik	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	p değeri
K (Kontrol)	P	105,233*	7,476	,000
	M	83,295*	7,401	,000
	C	71,873*	9,775	,000
	E	67,955*	8,025	,000
	RS	41,875*	8,712	,008
P (NaF)	K	-105,233*	7,476	,000
	M	-21,938*	2,280	,000
	C	-33,361*	6,781	,019
	E	-37,279*	3,851	,000
	RS	-63,359*	5,131	,000
M (CPP-ACP)	K	-83,295*	7,401	,000
	P	21,938*	2,280	,000
	C	-11,422	6,698	,728
	E	-15,340*	3,702	,036
	RS	-41,420*	5,021	,001
C (TCP)	K	-71,873*	9,775	,000
	P	33,361*	6,781	,019
	M	11,422	6,698	,728
	E	-3,918	7,382	1,000
	RS	-29,998*	8,124	,043
E (CXP)	K	-67,955*	8,025	,000
	P	37,279*	3,851	,000
	M	15,340*	3,702	,036
	C	3,918	7,382	1,000
	RS	-26,080*	5,902	,014
RS (SDF/KI)	K	-41,875*	8,712	,008
	P	63,359*	5,131	,000
	M	41,420*	5,021	,001
	C	29,998*	8,124	,043
	E	26,080*	5,902	,014

Canlı biyokütle gruplar arasında karşılaştırıldığında,

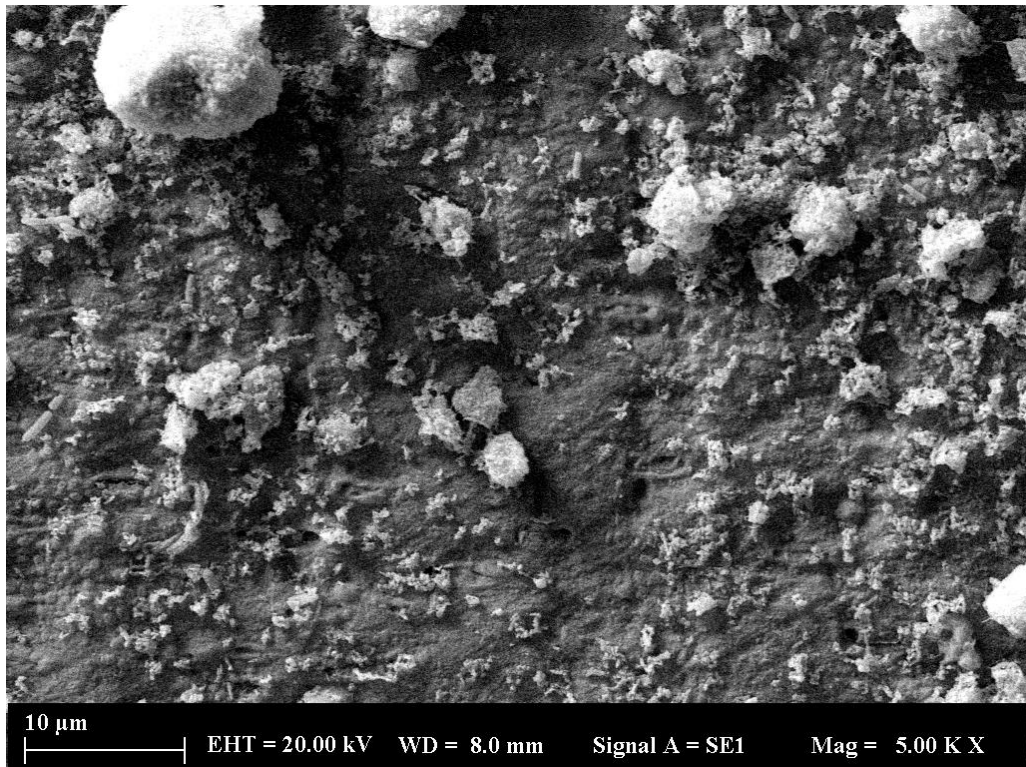
- Kontrol grubunda oluşan canlı biyofilmin, diğer deney gruplarından anlamlı derecede fazla olduğu ($p<0,05$),
- **En az canlı biyokütlenin**, diğer gruplardan anlamlı fark ile **P grubunda** gözleendiği ($p<0,05$),
- Deney grupları arasında **en fazla canlı biyokütlenin RS grubunda** saptandığı ($p<0,05$),
- M grubunda, E grubundan anlamlı olarak daha az canlı biyofilm bulunduğı ($p<0,05$),
- C ile E ve C ile M grupları arasındaysa anlamlı fark olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür.

4.4. SEM Görüntülemelerine Ait Bulgular

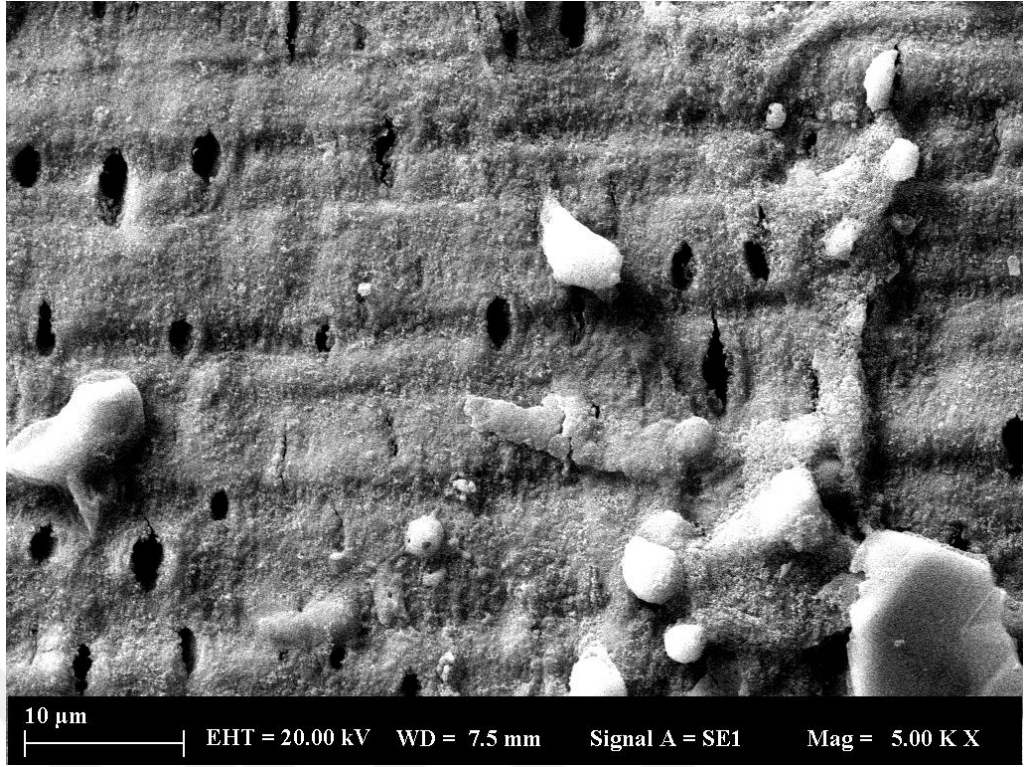
Numunelerin yüzeyinde oluşmuş *S. mutans* ve *L. casei* biyofilmlerinin X5000 büyütmedeki SEM görüntüleri Şekil 4-14 ile 4-19 arasında gösterilmiştir.



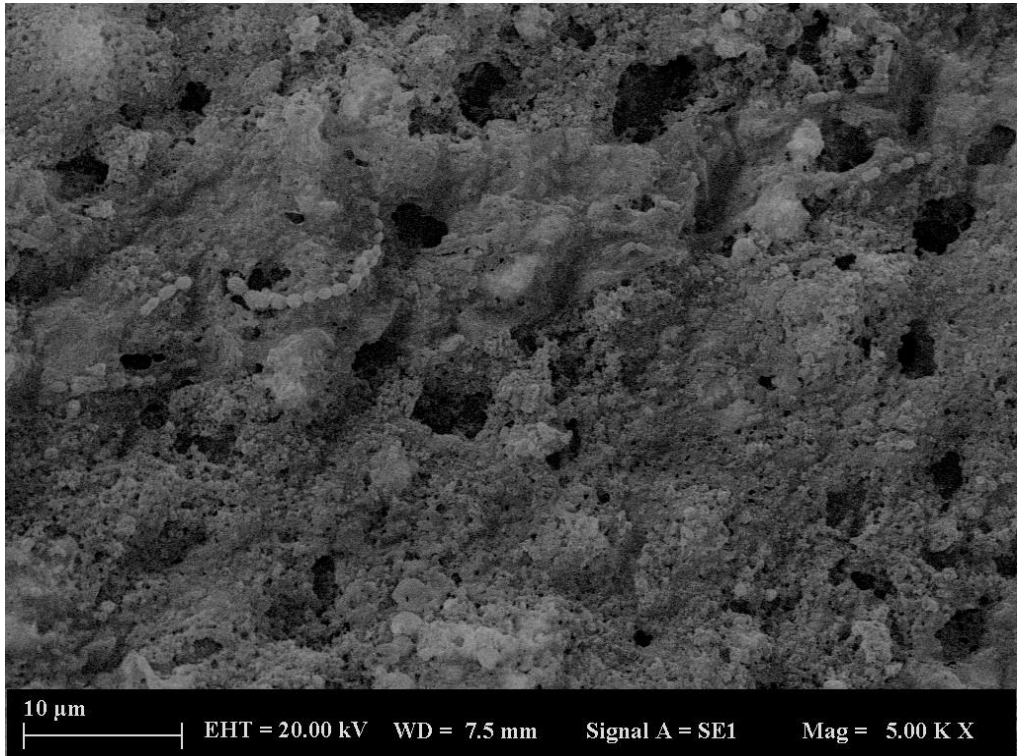
Şekil 4-14: K grubuna ait SEM görüntüsü



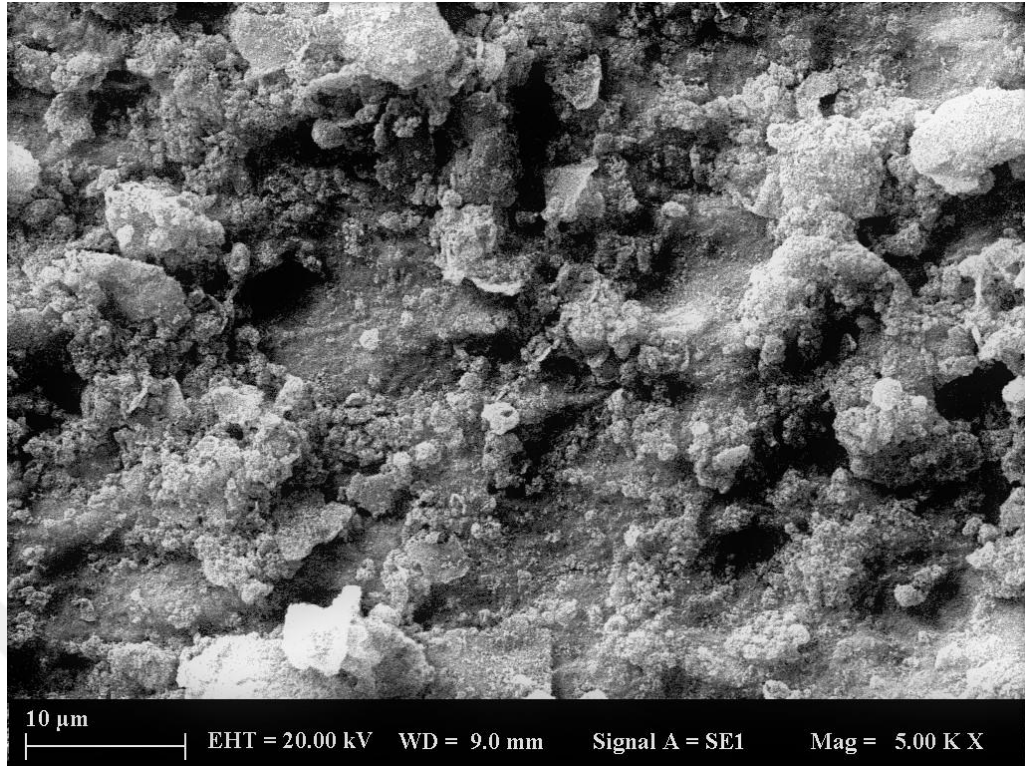
Şekil 4-15: P grubuna ait SEM görüntüsü



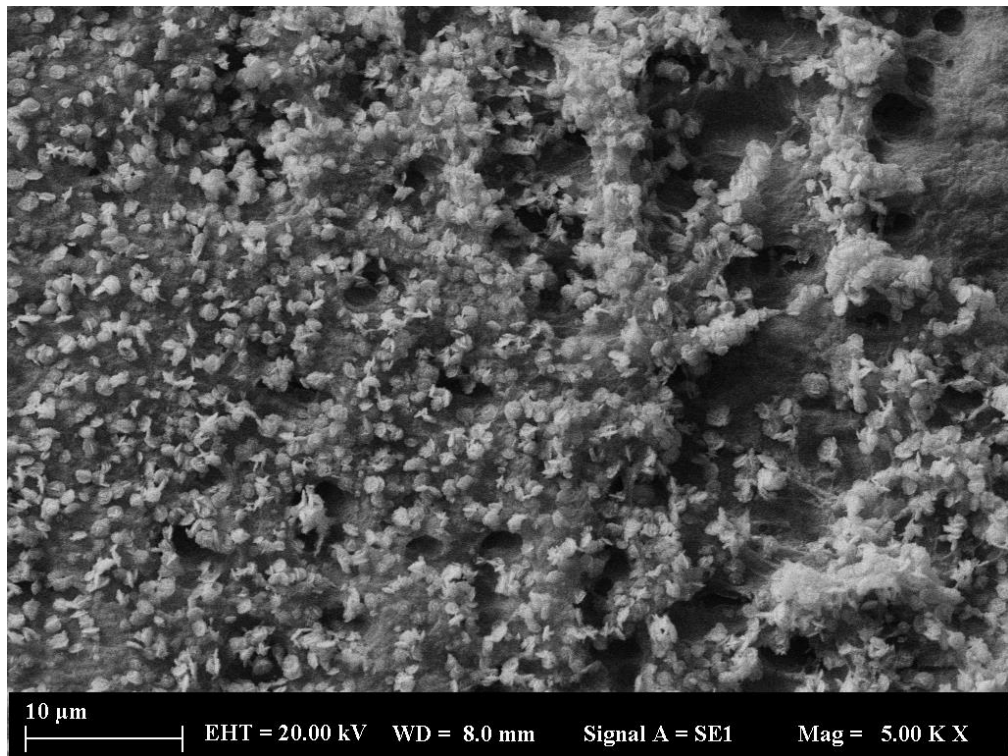
Şekil 4-16: M grubuna ait SEM görüntüsü



Şekil 4-17: C grubuna ait SEM görüntüsü



Şekil 4-18: E grubuna ait SEM görüntüsü



Şekil 4-19: RS grubuna ait SEM görüntüsü

SEM görüntüleri incelendiğinde, kontrol (K) grubunda yaygın kok kolonileri ve çomaklardan oluşan biyofilm çok net iken, çalışma gruplarında çoğunlukla vernik kalıntıları gözlenmekte olup, net biyofilm belirlenememiştir.



5. TARTIŞMA

Dünya üzerinde ileri yaşlardaki nüfus giderek artmaktadır. 2050 yılına gelindiğinde, 65 yaşın üzerindeki bireylerin dünya nüfusuna oranının %12'den yaklaşık %22'ye yükselmesi beklenmektedir [216]. Gelişmiş toplumlarda yaşam süresinin artması, koruyucu diş hekimliği programlarının yaygınlaştırılması ve flor içeren koruyucu preparatların uzun süredir gündemde olması, kişilerin doğal dişlerini ağızda tutma istekleri, restoratif materyallerdeki gelişmeler, ağız içinde korunan diş sayısını artırmakla birlikte, özellikle ileri yaşlarda servikal çürük lezyonlarının görülme sıklığında bir azalma olmamıştır [3, 217].

İleri yaşlardaki hastalarda özellikle çürük riski de bulunuyorsa, kök yüzeyinde remineralizasyonu sağlayabilecek koruyucu programların uygulanması büyük önem taşımaktadır. Demineralizasyonu önlemek ve remineralizasyonu sağlayabilmek için sürekli yeni materyaller geliştirilmekte ve kullanılmaktadır.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, kök çürüğü lezyonlarının gelişiminin engellenmesi için klinik kullanıma sunulmuş olan, sodyum florür içerikli vernik ve sodyum florürün yanında CPP-ACP, TCP, CXP ilaveli preparatlar ve gümüş diamin florür/potasyum iyodür vernik kombinasyonunun, demineralizasyonu inhibe etme kapasitelerinin değerlendirilmesi ve bunun yanı sıra, bu ajanların kök çürüklerinde rol oynayan başlıca mikroorganizmalar olarak düşünülen *S. mutans* ve *L. casei*'nin birlikte oluşturdukları ikili biyofilm üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntemin tartışılması

Demineralizasyon süreci, erken evrelerde kalsiyum, fosfat ve flor geri alımıyla tersine dönebilmektedir. Flor, kalsiyum ve fosfatın dişe difüzyonunda katalizör olarak görev yaparak remineralizasyona büyük ölçüde yardımcı olur. Yeni oluşan ve florapatit kristalleri sert dokuyu asit ataklarına daha dirençli hale getirir [14].

Koruyucu diş hekimliğinde florun hem sistemik hem topikal uygulamaları mevcuttur. Ancak florun remineralizasyona olan etkisinin, esas olarak topikal uygulanması ile olduğu belirtilmektedir [97]. Profesyonel topikal flor uygulamaları solüsyon, jel, profilaksi patı ve verniklerden oluşur [218].

Vernikler, florun yüksek konsantrasyonda uygulanabilmesi ve uzun süreli olarak etkinliğini sürdürebilmesi açısından uygun tedavi şekilleri olabilmektedir; özellikle ileri yaşlarda kişisel bakım uygulamalarında sorun yaşayabilecek hastalarda klinik uygulama açısından kolaylık sağlayabilirler. Bu ürünler, alkol gibi organik bir solvent içinde çözünmüş halde bulunan reçine esaslı preparatlardır. Florürlü ajanların uygulanmasının ardından dişte CaF_2 ve benzeri oluşumlar sayesinde remineralizasyon gerçekleşir [219].

Günümüzde uygulanan klasik florür tedavileriyle çürük prevalansı azaltılabilse de, tam olarak önlenememektedir. Bu yüzden florürlerin etkinliğini artırmaya yönelik, remineralizasyonu artıran ve demineralizasyonu önleyen alternatif ürünler geliştirilmektedir [11].

Çalışmamızda kullanılan %5'lik sodyum florürlü vernik ve ayrıca sodyum florüre ilave olarak CPP-ACP veya TCP gibi ajanlarla hazırlanmış olan preparatlara yönelik, mine dokusunda yapılmış araştırmalar mevcuttur. Ancak bu ajanların kök çürüklerindeki etkisini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır [144]. Bunun dışında bildiğimiz kadarıyla CXP™ ajanının kök yüzeylerinde kullanımıyla ilgili yapılmış herhangi bir araştırma yoktur.

SDF, ülkemizde klinik kullanım açısından yaygınlaşmamasına rağmen, yapılan araştırmaların sonuçlarında yazarlar tarafından kök çürüğü profilaksisi ve/veya durdurulması açısından kullanımını önerilen oldukça etkili bir üründür [4, 104]. Klinik kullanım açısından dezavantajı olan siyah tondaki renklenme nedeniyle kullanımı çekincelere sebep olmuştur. Bu problemin üstesinden gelmek için üretilen, SDF'nin ardından potasyum iyodür (KI) uygulamasını da içeren iki aşamalı vernik Riva Star piyasaya çıkmıştır. Ancak KI ilavesinin, etkinliği ne yönde etkilediği henüz kesinlik kazanmamıştır.

Kök çürüklerinin tedavisinde kullanılan materyallerin etkisi in situ [220], in vivo [221] ve in vitro [222] yöntemlerle değerlendirilebilmektedir. Ancak in vivo ve in situ çalışmalarda beslenme alışkanlıkları, tükürük, kişisel ağız bakım uygulamaları gibi bireysel etkenler lezyonun remineralizasyon sürecine etki edebilmektedir [104]. İn vitro çalışmaların diğer yöntemlere göre maliyetinin düşük olması, kısa sürede sonuç alınabilmesi, tekrarlanabilir ve standardize edilebilir olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca in vivo ve in situ çalışmalardaki etik problemler de elimine

edilebilir[158]. Bu sebeplerle çalışmamızda materyallerin etkisinin değerlendirilmesinde, in vitro yöntem kullanılması tercih edilmiştir.

Araştırmalarda kullanılan insan dişlerinde, çatlak gibi defektlerin bulunabilmesi, örneklerin kalitesi ve kantitesini azaltır. Toplanan dişlerin kaynak ve yaşı gibi kontrol edilemeyen faktörler standardizasyonu olumsuz etkiler. İnsan dişlerinin boyutları ve sahip olduğu yüzey topografyası eşit kalınlıkta ve özellikte düz yüzeyler elde etmeyi zorlaştırabilir. Ayrıca enfeksiyon riskinin ve etik farkındalığın da artmasıyla insan dişine alternatif kaynak materyal arayışı ortaya çıkmıştır [223].

İn vitro ortamda gerçekleştirilen remineralizasyon çalışmalarında insan dişleri kullanılabildiği gibi [224], primat [225], domuz [226], koyun ve at [227] gibi hayvan dişleri de kullanılabilmektedir. Sığır dişleriyse diğerlerine nazaran daha sık tercih edilmektedir [141, 154, 228].

İnsan ve sığır kök dentini üzerinde yapılan mikrobiyolojik analizler, mikrosertlik ve polarize ışık mikroskobu incelemeleri sonucunda, çürük gelişimi ve inhibisyonu ve oluşan biyofilmin kompozisyonu bakımından anlamlı farklılıklar bulunmamıştır [229].

Kök dentininin fırçalama karşısında gösterdiği aşınma direnci de, yine sığır ve insan dişlerinde benzer bulunmuştur [230]. Ayrıca sığır dentininde oluşturulan yapay çürük lezyonunun, insan dişlerindeki doğal çürükle benzer mikrosertlik değerlerinde olduğu bildirilmiştir [231].

İnsan ve sığır kök dentininin transvers mikroradyografiyle incelenmesi sonucu, çürük gelişimiyle ilgili mekanik araştırmalar için uygun olduğu belirtilmiştir [232]. Çalışmamızda, insan dişlerine nazaran daha homojen kompozisyonu, geniş ve düz yüzeyli örneklerin oluşturulmasına imkan veren kök yapısı, daha az etik sorun oluşturmaları ve kolay temini nedeniyle sığır dişleri tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak olan dişlerin çekimi sonrasında, araştırmaya başlayıncaya kadar geçen zamanda hem dezenfeksiyonunu sağlamak, hem de dehidratasyonunu önlemek için çeşitli solüsyonlar içinde tutulması önerilmektedir. Bu amaçla distile su ve salin içine etanol, formol, timol, sodyum hipoklorit, glutaraldehit gibi antimikrobiyal maddeler eklenebilmektedir [233]. Bizim çalışmamızda çekilen dişler deney süresine kadar % 0,1 timol içeren deiyonize su içerisinde bekletilmiştir [234].

Yapay çürük lezyonlarının oluşturulduğu çalışmalarda kimyasal modeller, uygulama kolaylığı, düşük maliyeti, zamandan tasarruf sağlaması, tekrarlanabilir ve stabil olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir [159].

Kimyasal modellerde oluşturulacak ortam koşulları kadar, substratın özellikleri de büyük önem taşır. Kronal başlangıç çürüğü lezyonlarında hipermineralize bir yüzey tabakası mevcuttur. Kök çürüklerindeyse, bu tabaka çoğunlukla demineralize olmuştur. Bazı doğal kök çürüğü lezyonlarında sement hala mevcutsa, ince bir hipermineralize yüzeyel sement katmanı bulunabilir [235]. Bu bakımdan doğal kök çürükleri, yapay lezyonlardan farklı olabilir. Ancak doğal kök çürük lezyonları özgün olduklarından standardize edilememektedir [236]. Smith ve ark., çalışmalarında sement tabakasının kaldırılmasının daha güvenilir sonuçlar verdiğini bildirmiştir [237]. Bizim çalışmamızda da, deneyler öncesinde sement aşındırılıp, uygulamanın başlangıcında demineralizasyon standardize edilmiştir.

Çürüğün gelişimini önlemeye yönelik koşullar seçilen pH döngüsü uygulamalarında, öncesinde yüzey altı yapay dentin çürükleri hazırlanmaktadır. Bu tür dentin lezyonları, çalışmalarda sıklıkla kullanılmasına rağmen, başlangıç demineralizasyon protokollerinde bazı farklılıklar göze çarpmaktadır.

Basit çürük indüksiyonunda, laktik asit ya da asetik asit gibi orta pH'ya sahip organik asitler ya da asit tamponları kullanılır [159]. Demineralizasyon için metil selüloz jel [238], florür içermeyen asetik asit solüsyonu [232] veya florür ilaveli asetik asit solüsyonu [144] kullanılmasıyla, sonuçlarda farklılıklar oluşabilmektedir. Asit tampon solüsyonlarının, jel sistemlerden daha hızlı sonuç verdiği bildirilmiştir [237]. İnorganik asitlerin meydana getirdiği lezyonlarla kıyaslandığında, orta pH'daki asitlerin oluşturduğu lezyonlar, doğal çürüğe daha fazla benzerlik göstermektedir. pH belirlenirken, birçok deneyde, 4,4 – 5 aralığı optimal değer olarak kabul edilmiştir [159].

Kök yüzeylerinde kimyasal çürük lezyonu oluşturulurken, 37°C sıcaklıkta, oda sıcaklığında oluşan lezyona göre, daha fazla demineralizasyon gerçekleşmiştir ve aynı çalışmada, lezyonun başlangıçtaki mineral içeriğinin, sonrasında remineralizasyonu etkilediği, daha yüksek oranda mineral kazanımı olduğu bildirilmiştir [237]. Yüzey altı lezyonların farklı olması, hem florürün hem de asitlerin farklı difüzyonuna sebep olabilmektedir [144].

Bizim çalışmamızda da, yapay çürük oluşturma aşaması için, kök çürüklerinin mineye göre yüksek kritik pH'da çözünmesi göz önünde bulundurulmuş; Cai ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemle, tüm örnekler pH'sı 5 olan, 50 mM asetik asit, 1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM KH_2PO_4 solüsyonunda, 37°C sıcaklıkta, 5 gün süreyle etüv içerisinde bekletilmiştir [234].

Verniklerin uygulanmasından sonra, remineralizasyon kapasiteleri değerlendirilecek örnekler pH döngüsü uygulanmıştır. Bu model, nötr ortamın periyodik olarak asit atakları ile kesintiye uğradığı bir döngüye dayanarak, ağız içinin dinamik değişimini taklit etmeyi amaçlamaktadır [160]. pH döngüsü modellerinin, klinik uygulamalardan daha duyarlı olduğu ve küçük örneklem şartlarında bile yüksek düzeyde bilimsel kontrol sağlanabildiği belirtilmektedir [161].

pH döngüsü uygulamalarıyla yapılan çalışmalar, çürük gelişimini önleme (demineralizasyon modeli) ve başlangıç çürüklerinin remineralizasyonu (remineralizasyon modeli) olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Bu doğrultuda, sağlam ya da yapay çürük oluşturulmuş diş dokuları kullanılabilmektedir [160].

pH döngüsü protokollerinde demineralizasyon dönemlerinde, örnekler asidik solüsyonların uygulanma aşaması, ağız ortamındaki asit saldırısının dişin yüzey ve yüzey altı dokularında oluşturduğu yıkıcı etkileri taklit etmek için tasarlanmıştır. Remineralizasyon dönemleri ise, tükürüğün koruyucu ve onarıcı etkilerini simüle eder [239].

Bu modelde, test gruplarının a) doğal olarak meydana gelen remineralizasyon sürecini geliştirmesi ve b) aynı anda devam etmekte olan asit saldırılarına karşı koruma sağlaması beklenmektedir [160].

pH döngüsü modellerinde uygulanacak solüsyonların içeriği, pH'sı, uygulama süre ve aralıkları, araştırmanın odak noktasına göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin, çalışmanın amacı ajanların remineralizasyon üzerine etkisini ölçmek ise, örneklerin yüksek pH'da solüsyona uzun süreli maruziyeti önerilmektedir [161].

Uygulama aralıklarına bakıldığında ise, bazı araştırmacılar, günlük 16/8, 10/14 saat gibi periyotlar uygularken [34, 240], bazıları günde 5- 6 defa gibi değişen sayılarda demineralizasyon-remineralizasyon döngüsü olacak şekilde saatlik uygulamaları tercih etmektedirler [144, 241].

Remineralizasyon ajanlarının diş sert dokularına etkisini inceleyen çalışmalarda daha çok remineralizasyon ağırlıklı (net-remineralization) model kullanılmaktadır [242, 243]. Bu yöntemde örneklerin yüksek pH solüsyonlarda tutulma süresi fazla olduğundan, kontrol gruplarında bile remineralizasyon gözlenmektedir. Ancak ağız ortamı genelde aralıklı demineralizasyon koşullarında seyretmektedir. Bu yüzden bizim çalışmamızda örnekler Mei ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları yöntemde olduğu gibi, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle demineralizasyon; 10 dakika süreyle remineralizasyon solüsyonunda bekletilerek, gün içerisinde 6 kere pH değişimine tabi tutulmuş, ardından gece boyunca +4°C’de deiyonize su içerisinde bekletilmiştir. Bu döngü 8 gün boyunca tekrarlanmıştır [244]. Böylece ağızda gün içinde saat aralıklarıyla gerçekleşen asit saldırıları simüle edilerek, oldukça agresif koşullarda demineralizasyonu önleme kapasitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

Klinik olarak remineralizasyon ajanlarının profesyonel uygulamaları, etkili, uygun maliyetli ve zaman tasarrufu sağlayabilen bir yöntem olarak düşünülmektedir. Araştırmalar yavaş salınım yapan verniklerin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir [245].

En yaygın olarak kullanılan verniklerden birisi, %5’lik sodyum florürdür [246]. Ancak, bu tip verniklerin çeşitli formülasyonlarının, anti-çürük etkinliklerine yönelik son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu, başlangıç mine çürükleri ile ilgilidir.

Kazein fosfopeptidin (CPP) amorf kalsiyum fosfat (ACP) ile kombine edilmesiyle ortaya çıkan CPP-ACP teknolojisi (Recaldent™) çürük gelişimini önlemek amacıyla düşünülmüştür. Mekanizması, ACP’nin mine ve dentindeki hidroksiapatite bağlanması, aynı zamanda da, dental biyofilme de difüze olarak diş yüzeylerini demineralizasyondan koruması şeklindedir [137].

Clinpro™ ticari isimli ajan, β -TCP ın modifikasyonu ile oluşturulan işlevselleştirilmiş β -TCP (fTCP) ve sodyum florür içerir. Üretici firma, üründeki koruyucu fumarik asit bariyeri sayesinde, kalsiyumun flor ile erken etkileşimini önleyerek, F ve Ca iyonlarının daha etkin ve yararlı olduğunu ileri sürmektedir [143].

Yakın dönemde geliştirilen CXP™ (xylitol-coated calcium and phosphate) ajanının %5 sodyum florüre ilave edilmesiyle Embrace Vernik piyasaya sürülmüştür. Üretici firma, ürünün zaman-salınımlı özelliği sayesinde, 4 saati geçen süre sonrası, en sık kullanılan vernik markalarından 10 kat fazla flor salabildiğini ileri sürmektedir.

Milburn ve ark., yaptıkları bir araştırmada bu verniğin uygulanmasıyla, ilk dört saat süresince diğer ürünlere göre on katından fazla flor salınımı oluşabildiğini gösterilmişlerdir; ancak bu sürenin sonunda ürünün flor rezervi tükenmektedir [247]. Klinik kullanım prosedürü, ürünün avantajları dikkate alınarak planlanmalıdır.

SDF güçlü etkileriyle bilinen, yüksek miktarda flor ve gümüş iyonu konsantrasyonuna sahip, hem koruyucu hem terapötik özellikleri bulunan bir ajandır [111, 248] SDF'nin klinik uygulanması sonrası oluşan siyah renklenme en büyük dezavantajı sayıldığından, potasyum iyodür (KI) ile kombine kullanımı önerilmiştir [112]. Bu amaçla piyasaya sürülmüş olan Riva Star (SDI Limited, Avustralya), SDF ve KI içeren iki aşamalı bir preparattır.

Diş dokularındaki demineralizasyon ve remineralizasyon değişimlerinin incelenmesinde LF, PLM, FTIR, OCT, SEM gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da bu yöntemler içinden iki spektral analiz olan LF ve FTIR-ATR yöntemleri seçilmiştir.

Lazer floresans yöntemi, remineralizasyon ajanlarının etkinliğinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmıştır. Literatürde DIAGNOdent cihazlarıyla yapılmış pek çok klinik, in situ ve in vivo araştırma bulunmaktadır.

2020 yılında yapılmış bir klinik çalışmada, nanopartikül içerikli yeni bir preparatın sealer olarak kullanılmasıyla kök çürüklerini baskılama etkinliği DIAGNOdent Pen kullanılarak değerlendirilmiştir [249]. Başka bir randomize klinik çalışmada farklı diş macunlarının etkinliği, DIAGNOdent ile kaydedilerek hesaplanmıştır [250]. Yazıcıoğlu ve ark. çalışmalarında, CPP-ACFP'nin mine lezyonlarındaki etkisini DIAGNOdent cihazı kullanarak incelemişlerdir [251].

İn situ çalışmalar olarak, p11-4'ün yapay çürük lezyonları üzerindeki uygulamalarının DIAGNOdent ile değerlendirilmesi [252] ve ozonun mine üzerindeki etkisinin DIAGNOdent ile ölçüldüğü araştırma [253] gösterilebilir.

2019 yılında yapılmış bir in vitro çalışmada, CPP-ACP ve TCP'nin mine üzerine etkisinin incelenmesinde DIAGNOdent Pen yöntemi tercih edilmiştir [219]. MI Paste plus ve Reminpro ajanlarının sağlıklı mine dokusunda demineralizasyonu önleme etkileri de DIAGNOdent ile incelenmiştir [254].

Kök yüzeylerinde oluşan demineralizasyonunun in vitro ortamda floresans prensibi ile değerlendirildiği ilk çalışma, 1996 yılında van der Veen ve ten Bosch tarafından yapılmıştır. Bu yöntem kullanılarak ölçülen mineral kaybı, TMR analiziyle yüksek korelasyon göstermiştir ($r=0.91$) [255].

DIAGNOdent ile düz yüzeylerde yapılan bir çalışmada, cihazın ölçümleri ile lezyon derinliğini gösteren histolojik inceleme sonuçları arasında 0,85 korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca dentin çürüklerinin teşhisinde, sensitivite 0,75 ve spesifite 0,96 olarak bulunmuştur [256].

DIAGNOdent'in in vivo ortamda, kök yüzeylerinde kullanımına bakıldığında sağlam kök yüzeylerinin çürük yüzeylerden daha düşük değerler verdiği kaydedilmiştir [7]. DIAGNOdent'in kök çürüklerini nasıl değerlendirdiği tam olarak anlaşılamasa da, büyük olasılıkla çürük sürecinde kök dokularının organik bileşenindeki değişiklikler ile ilgili olduğu düşünülmektedir [174, 257]. Zhang ve ark.nın araştırmasında ayrıca, görsel ve dokusal muayenede inaktif olduğu kabul edilen kök çürüklerinde, aktif çürüklerden daha düşük DIAGNOdent değerleri elde edilmiştir. Bu duruma inaktif lezyonların daha az organik materyal içermesinin neden olabileceği belirtilmiştir [7].

İn vitro çalışmalarda DIAGNOdent cihazlarının tekrarlanılabilirliği oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Aljehani ve ark., düz yüzeylerde cihazlarıyla elde edilen sonuçları karşılaştırmışlar ve her iki uygulayıcı tarafından ikişer kez elde edilen veriler, dişlerin histopatolojik analiziyle kıyaslanmıştır. Her iki cihaz da, çok yüksek gözlemci içi uyum ve kabul edilebilir gözlemciler arası uyum göstermiştir. Sonuçlar, DIAGNOdent için gözlemci içi uyum bakımından 0,99 ve 0,97, DIAGNOdent Pen için 0,99 ve 0,96 olarak belirlenmiş ve gözlemciler arası uyum ise DIAGNOdent'te 0,72 ve 0,67, DIAGNOdent Pen'de 0,66 ve 0,69 olarak bildirilmiştir. Histolojik değerlendirme sonuçlarıyla olan korelasyonlar ise, 0,47 ve 0,57 aralığında değişirken, iki cihazın birbiriyle olan korelasyonu oldukça yüksek bulunmuştur [258].

Çalışmamızda kullanılmış olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), farklı bir karakterizasyon yöntemi olarak, materyallerde bulunan fonksiyonel grupların ve kimyasal bileşiklerdeki olası moleküler bağların saptanmasında oldukça güçlü bir yöntemdir. Genel olarak, IR spektroskopisi geniş bir yelpazede malzemenin kalitatif ve kantitatif analizleri için kullanılabilir [259].

Son zamanlarda, ATR tekniği, yüzey titreşim frekanslarına erişimi nedeniyle daha fazla ilgi görmektedir [178]. Konvansiyonel FTIR analizlerinde, numunenin kazınması, ince tozlara dönüştürülmesi, kurutulması ve KBr (potasyum bromür) ile karıştırılması gibi basamaklar bulunur. Bu adımlar sebebiyle, yüzeydeki küçük değışiklikler, daha az etkilenmiş yüzey altı bölge tarafından maskelenebilmektedir. ATR ünitesi numune hazırlığına gerek duyulmadan, işlem öncesi ve sonrası aynı yerlerden tekrarlı ölçüm yapmaya izin verir [260–262].

Bu yüzden çalışmamızda her bir numunenin pH siklüsü öncesi ve sonrası analizleri için ATR tekniği tercih edilmiştir.

FTIR analizi, sert dokular için uygun bir inceleme yöntemidir [263]. Son yıllarda, çürük lezyonlarının sert dokularda yarattığı değışiklikler de FTIR analiziyle incelenmektedir [165, 264–266]. Ayrıca derin dentin çürüklerine sahip bireylerin kan, diş eti oluğu sıvısı ve serum örneklerinin FTIR analizlerinde de önemli değışiklikler saptanmıştır [267].

FTIR ile mineral kaybı ya da kazancı, organik bileşiklerin ve bağların değışimi gözlenebilmektedir. Beyazlatma ajanlarının sert dokulara etkisinin incelenmesi [261, 268], minedeki erozyon miktarının tespiti [269], restorasyonların altında kalan dentin dokusunun özelliklerinin değerlendirilmesi [270] gibi çeşitli araştırmalarda FTIR kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, remineralizasyon ajanlarının etkinliğini ölçmek için bu yöntemin uygulandığı pek çok çalışma mevcuttur.

Leal ve ark., 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, deneysel diş macununun kök çürükleri üzerindeki etkisini araştırmışlar ve pH döngüsü uygulaması sonrası FTIR analizini tercih etmişlerdir [271].

2020 yılında yayınlanan bir başka çalışmada ise, demineralize dentin üzerine CPP–ACP ve tripolifosfat (TPP) uygulaması yapılmış, tedavi öncesi ve sonrasında, ATR-FTIR cihazıyla ölçümler yapılmıştır [272].

Bijle ve ark.nın yaptıkları bir araştırmada, arjinin ve florür içeren diş macunlarının etkinliği, FTIR ile değerlendirilmiştir [273].

Biyoaktif camların, dentinin remineralizasyonu üzerine etkinliğinin incelendiği bir araştırmada , ATR-FTIR kullanılmış ve mineral / matriks oranındaki etkilenmeler hesaplanarak yorumlanmıştır [274].

FTIR analizinde her radikalın bir titreşim modu bulunmaktadır ve her modun bir absorbands değeri vardır. Diş hekimliği literatüründeki makalelerin çoğunda örnekler kızılötesi bölgenin ortasında değerlendirilmiştir (yaklaşık 4000 ile 400 cm^{-1}). IR radyasyonu altında moleküler titreşimlerin absorbands birimleri fonksiyonel grupların miktarı ile orantılıdır [275].

Titreşim bantlarının absorbandsının ölçülmesinde, genellikle iki yöntem kullanılmaktadır. Bir tanesi, piklerin maksimum yüksekliğinin ölçülmesi şeklindedir. Diğeri ise, pikler arası alanın hesaplanması şeklinde uygulanır [276]. Bizim çalışmamızda da, belirli piklerin altında kalan alan hesaplanarak, oranların üzerinden yorum yapılmıştır.

Dentinin kimyasal karakterizasyonunda, FTIR kullanımıyla mineralize dokudaki değişiklik ve patolojilerin değerlendirilmesi, referans piklerin birbirine oranı üzerinden yapılabilmektedir. En sık kullanılan yöntemler, Fosfat/Amid I ve Karbonat/Amid I oranlarının hesaplanmasıdır [275].

Karbonat ve fosfat kızılötesi bantları, sert dokuların temel bileşeni olan karbonlanmış hidroksiapatitle ilgilidir. Biyolojik apatitin saflığı ve yapısı, çözünürlüğünü etkiler. Bu açıdan fosfatın karbonatla ilişkisinin analizi, tedavi sonrası sert dokuların kristallliği ve yapısı hakkında bilgi verir [71, 277]. Ayrıca amid I, II and III içeriği, sert dokuların organik matriksindeki kollajen ile ilişkilidir. Bu bantların analizi, moleküllerin yapısı ve denaturasyonu ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır [270, 278].

Bizim araştırmamızda, bu metodu kullanan diğer bazı çalışmalarda olduğu gibi [261,272,274] ATR-FTIR grafikleri üzerinden Fosfat/Amid I oranlarının hesaplamalarıyla bulgular elde edilmiştir.

Remineralizan etkili ajanların remineralizasyon gücü kadar, oral ortamdaki karyojen mikroorganizmalar üzerine olan etkileri de önemlidir. Bizim çalışmamızda, klinik kullanıma sunulmuş olan çeşitli verniklerin, kök çürükleri üzerinde en etkili bakterilerden olduğu düşünülen *S. mutans* ve *Lactobacillus* ile oluşturulan ikili biyofilm üzerindeki etkinlikleri değerlendirilmiştir.

S. mutans çürük başlangıcı ve ilerlemesinden sorumludur [279]. *Lactobacillus* ise tek başına diş sert dokusu üzerinde plak oluşturmaz. Kolonizasyon için başta

Streptokoklar olmak üzere diğer karyojen mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler polisakkaritlere gereksinimleri vardır. *Lactobacillus*'un biyofilm oluşturma kapasitesi *S. mutans* varlığında artar [280]. Her iki bakteri de laktik asit üretir ve yüksek asidik ortamda yaşayabilir [279].

Çalışmamızda kullanılan in vitro ikili karyojenik biyofilm, göreceli stabil ve kontrolü kolay bir modeldir. Tek türle oluşturulan biyofilmle karşılaştırıldığında, ikili biyofilm, türlerin etkileşimi sayesinde daha kompleks bir mikrobiyal ekosistem anlamına gelmektedir [281].

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında bakterilerin bir yüzeye tutunmaları gerekir. Çekilmiş dişler, hidroksiapatit diskler, cam çubuklar, polistiren yüzeyler veya akrilik diskler gibi farklı yüzeylerde biyofilm oluşumu incelenmiştir [282]. Bu substratlar benzer biyofilmler göstermiş olsalar da, bizim çalışmamızda diş dokusu tercih edilmiş ve ağız ortamına yakın bir adezyon mekanizmasının oluşturulması amaçlanmıştır.

Ağız içindeki bakterilerin dental biyofilm oluşturabilmeleri için yapışma diğer bir önemli basamaktır. Bakterilerin yapışma ve kolonizasyonu için tükürük bileşenleri ve pelikül tabakası gereklidir [283]. Oral mikroorganizmaların hücre çeperleri üzerinde bulunan adezin adı verilen proteinli bileşenler sayesinde bakteriler, stereokimyasal olarak spesifik bir doku üzerindeki tamamlayıcı moleküllere veya dokunun yüzeyindeki reseptörlere tutunabilirler [284].

Çalışmamızda, doğal tükürüğün yapay tükürükten daha iyi kıvam ve yapışma sağlaması ve içerik olarak da daha uygun olması nedeniyle bir gönüllüden toplanan tükürük örneği filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Biyofilm oluşturulmasından önce numuneler steril tükürük ile kaplanmıştır.

Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM), biyofilmlerin yapısını ve zaman içerisindeki gelişimini anlamaya yönelik çok amaçlı ve etkili bir yaklaşımdır. CLSM, floresan bir prob ile kombine olarak kullanıldığında, çeşitli hücresel ve hücre dışı biyofilm bileşenleri üç boyutlu olarak görüntülenebilmekte ve ayrıntılı nicel bilgi elde edilebilmektedir [285]. Bu şekilde, CLSM tarafından kaydedilen üç boyutlu ve nicel sonuçlar, karyojenik bakterilerin oluşturduğu biyofilmleri anlamak, kontrol etmek ve modellemek açısından oldukça yararlıdır.

Literatürde, remineralizasyon ajanlarının biyofilm üzerine etkisini incelemek amacıyla CLSM nin kullanıldığı birçok araştırma mevcuttur [286–288].

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemeleri de, biyofilm topografisinin değerlendirildiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [288, 289].

Bulguların Tartışılması

Çalışmada kullanılmış olan farklı remineralizasyon materyallerine ait etkilerin spektral analizlerine ait bulgular değerlendirildiğinde; LF yöntemiyle tüm deney gruplarında demineralizasyonun önlenemediği, ancak SDF/KI'nın tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek remineralizasyon sağladığı, FTIR-ATR'de ise SDF/KI dışındaki vernik gruplarında demineralizasyonun, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaltılabildiği, SDF/KI grubunda ise kimyasal yapının tamamen değiştiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen FTIR-ATR grafikleri yorumlanırken, Bachmann ve ark.'nın [290] insan minesini, insan dentini, sığır minesini ve sığır dentinini inceledikleri araştırma referans olarak alınmıştır. O çalışmada, insan ve sığır sert dokularında oluşan pik değerlerinin değişmediği, yalnızca yoğunluklarında değişim gözlemlendiği, ancak hem insan hem sığır dişlerinde mine ve dentin arasında belirgin farklar olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızdaki analizlerin sonucunda oluşan pik değerleri ve şiddetleri Şekil 4-2 ve 4-7 arasındaki grafiklerde gösterilmiştir.

pH döngüsü öncesi elde edilen pikler tüm gruplarda 3300, 1635, 1550, 1450, 1240 ve 1030 cm^{-1} civarında yoğunlaşmaktadır. pH döngüsü sonrasında ise, SDF/KI grubu dışında, bu piklerin yoğunluklarının değiştiği gözlemlenmiştir. SDF/KI grubunda ise ekstra bantlar ve pik noktaları ortaya çıkmıştır. SDF/KI grubundaki tüm örneklerde en güçlü piklerin, 1738, 1435, 1366, 1228, 1217, 1206 cm^{-1} civarında oluştuğu izlenmektedir.

Spektrum 4000 ve 400 cm^{-1} aralığında 4 absorpsiyon bandı, su (H_2O) molekülü ile ilişkilidir [291]. Bu bölgede en yoğun bant ν_1 , $2\nu_2$ ve ν_3 modlarının toplamıyla ilişkili 3320 cm^{-1} civarında izlenir. Diğer bant ise dentinde 1660 cm^{-1} de gözlemlenen ν_2 modudur. Dentin dokusundaki bu bant kollajen bandıyla çakıştığından, pozisyonunda kayma meydana gelir.

Mine ve dentin dokularındaki kristalize yapı, en dış yüzeyden iç alanlara doğru gidildikçe azalmakta, karbonat içeriği de artmaktadır; bu arada fosfat/C-H oranı ve Fosfat/Amid I oranı gibi mineral yapının organik matrikse olan oranı da azalmaktadır. Fosfat/Amid I oranındaki azalma, istatistiksel olarak anlamlıdır. Fosfat/Karbonat oranında görülen azalma da bölgesel olarak anlamlılık göstermektedir [71, 292].

Sert dokunun yapısında bulunan hidroksil (OH^-), karbonat (CO_3^{-2}) ve fosfat (PO_4^{-3}) bileşenleri kızılötesi spektrumda tanımlanabilirler. Mine dokusunda yüksek derecede kristalizasyon nedeniye hidroksil (OH^-) radikali 3570 cm^{-1} de, ν_1 ve 749 cm^{-1} de ν_2 modunda gözlenirken [293], sağlıklı dentin dokusunda bu bantlar çok zayıftır. Demineralize dentinde ise, 3312 cm^{-1} 'de (OH^-) piki olduğu bildirilmiştir [272]. Çalışmamızda da, SDF/KI grubunun pH döngüsü sonrası grafikleri dışında, pik noktası 3300 cm^{-1} civarında konumlanmış geniş bantlar gözlenmiştir.

Fosfat (PO_4^{-3}) radikalleri normalde dört vibrasyon modu gösterir, fakat kızılötesi spektrumda iki tanesi gözlenir. Bunlardan birincisi ν_3 bandıdır ve bu bant hem minede hem de dentinde geniş ve yoğundur. Absorbans değeri $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ arasındadır. İkinci bant ν_4 bandı olup, dentinde $603, 563\text{ cm}^{-1}$ ve 575 cm^{-1} civarındadır [290].

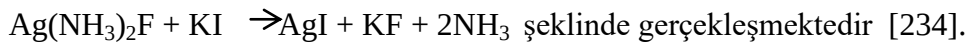
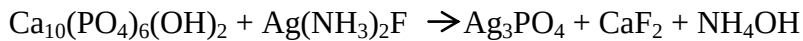
Çalışmamızda 1030 cm^{-1} civarında pik gösteren bant fosfat bandı olarak belirlenmiştir. Demineralizasyon modeli uyguladığımız pH döngüsü sonrası, fosfat piklerinin yoğunluklarında çeşitli oranlarda azalma gözlenmiştir. Kontrol grubunda bu düşüş en fazla görülürken, SDF/KI dışındaki deney gruplarında ise anlamlı olarak daha az düşüş olmuştur. Bu durum **remineralizasyon ajanlarının demineralizasyona karşı oluşturduğu direncin, kontrol grubuna göre çok daha fazla sağlanabildiğini** göstermektedir. SDF/KI grubunda ise, 1092 cm^{-1} civarında küçük bir pik ortaya çıkmıştır.

Karbonat (CO_3^{-2}) radikallerinin tayin edildiği absorbsiyon bantları, hem mine hem dentinde iki bölgede gözlenir. ν_3 bandı dentinde 1530 ve 1380 cm^{-1} de izlenir. Dentin dokusunda 1540 cm^{-1} den 1420 cm^{-1} ye kadarki karbonat bantlarında, aynı bölgedeki organik materyal de absorbe edilir. Bu bölgede insan ve sığır dişi arasında bazı değişiklikler bildirilmiştir. ν_2 modundaki iki bant ise, dentinde $880 - 870\text{ cm}^{-1}$ de gözlenmektedir. Bu iki bandın pozisyonu çok yakın olduğundan ayırt edilmesi için yüksek çözünürlük gerekir [290]. Çalışmamızda bazı örneklerde 880 cm^{-1} pikinin olduğu görülmüştür.

Dentin dokusunda organik matriks miktarı mineye oranla çok daha yüksektir. Dentinde organik matriks temel olarak kollajen, daha az oranda ise mukopolisakkarit, protein, peptid, keratin, sitrik asit, lipid, gibi bileşenlerden oluşur. Bu yüzden kızılötesi spektrumda dentin organik matriksi, güçlü bantlar oluşturmaktadır [290].

Dentinde ilk bant, 3115–2860 cm⁻¹ de oluşsa da, bu bölgede amid A, amid B ve C-H modları geniş su bantları tarafından maskelenir [294]. Dentin spektrumunda organik matriksle ilgili absorpsiyon bantları, 1660 cm⁻¹ de başlayıp 1200 cm⁻¹ de sonlanır. 1645 cm⁻¹ yakınında gözlenen su bandı ve 1655 cm⁻¹ deki amid I bandı oluşumu sonucunda 1660 cm⁻¹ pozisyonunda ortak bir bant meydana gelir. Daha küçük dalga sayılarında karbonat bantları, 1525 cm⁻¹ civarında amid II bantları ve 1445 civarındaki C-H yakın alanda gözlenir. Üçüncü bölgede ise diğer bantlarla çakışmayan 1240 cm⁻¹ de amid III bantları ve 1310 cm⁻¹ de C-H modu gözlenir [295]. Bu bantlar çalışmamızın grafiklerinde de izlenebilmektedir.

pH döngüsü sonrası SDF/KI grubu ise, farklı absorpsiyon bantları vermiştir. Bunlardan en belirgin olanı, pik noktasını 1738 cm⁻¹ de oluşturan C=O gerilme bandıdır. 1738 cm⁻¹ karbonil grubu referans aralığındadır. Bu bandın, hem SDF/KI'nın dentin dokusundaki kollajenin amino gruplarıyla olan reaksiyonu, hem de pH döngüsünde kullanılan solüsyonlarla etkileşimi sonucu oluşmuş olabileceği kanısındayız. SDF/KI'nın diş sert dokularıyla yaptığı reaksiyon,



KI sayesinde, SDF'nin lezyon alanında oluşturduğu renklenme azaltılıyor olsa da, örneklerimizde bir miktar renklenmenin olduğu gözlenmiştir. Renklenme olgusu, iyonize gümüşün metalik gümüşe dönüşmesi esnasında meydana gelen oksidasyon tepkimesiyle oluşmaktadır [296]. FTIR grafiğinde ortaya çıkan pik, tüm bu reaksiyonlar sonucu meydana gelmiş olabilir. Literatür taramasında, SDF/KI'ün dentin yüzeylerinde, pH döngüsüne tabi tutulup FTIR ile değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak kök kanal dentinine epoksi reçine esaslı kanal patı uygulaması sonrasında, çalışmamızdakine benzer şekilde 1738 cm⁻¹ piki ortaya çıkmıştır [297].

Bu çalışmada, remineralizasyon etkisinin incelendiği ilk materyal NaF'dür. NaF'ün profesyonel uygulamaya yönelik solüsyon ve verniklerinin kök yüzeylerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar uzun yıllardır yapılmaktadır. 1982 yılında Tveit ve Halse, %2 NaF ve %0,7 NaF içeren poliüretan vernik uygulanan kök dentin yüzeylerini, aside maruz bıraktıktan sonra mikroradyografi ile değerlendirmişlerdir. Vernik tedavisinin anlamlı derecede daha az derinlikte demineralize alan oluşmasına yol açtığı bildirilmiştir [298].

%5'lik NaF, genellikle yeni formülasyonların etkilerinin araştırılmasında deney grubu olarak çalışmalara dahil edilmektedir [144, 242, 243]. Bu yüzden diğer ajanların karşılaştırılmasında sıklıkla bahsedilecektir.

Diğer bir test materyalimiz olan CPP-ACP'nin mine üzerinde oluşturduğu değişiklikler mikroradyografi ile değerlendirmiş, bu ajanın hidroksiapatit yapısındaki karbonat miktarını azaltarak etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır [299].

CPP-ACP'nin kök çürükleri üzerindeki etkisini DIAGNOdent ile in vitro olarak inceleyen bir çalışmada, bu ajanın remineralizasyonu artırdığı sonucuna varılmıştır [222].

İn vitro bir çalışmada, CPP-ACP içerikli MI Paste ajanının dentin remineralizasyonu ve demineralizasyonuna etkisi micro MIR-FTIR (Fourier transformance micro multiple internal reflectance infrared spectroscopy) ile araştırılmış ve bu ajanın remineralizasyonu kontrol grubuna göre %74,4 artırdığı, demineralizasyonu ise %30,2 azalttığı bildirilmiştir [138].

CPP-ACP içeren MI Paste'in sağlıklı ve yapay çürük oluşturulmuş dentine uygulandıktan sonra, 10 günlük pH döngüsü protokolü sonrası FTIR ile incelendiği bir çalışmada, CPP-ACP'nin dentin üzerinde remineralize edici etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır [300]. Çalışmamızın sonuçları da, CPP-ACP'nin dentinde kalsiyum ve fosfat rezervuarı olarak görev yapabildiğini destekler niteliktedir.

Yapılan bir çalışmada, CPP-ACP içerikli verniğin etkinliği, demineralize ve sağlıklı dentin yüzeylerinde demineralizasyon modeliyle tasarlanan pH siklüsü sonrasında, NaF ile karşılaştırılarak incelenmiş ve daha fazla mineral kazanımı elde edildiği transvers mikroradyografi yöntemiyle belirlenmiştir [144].

Bizim çalışmamızda da CPP-ACP, NaF'e göre, Lazer Floresans ölçümlerinde daha küçük değerler vererek daha etkili bulunsa da, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Diğer çalışmadaki bulguların bizim çalışmamızın sonuçlarından farklı olmasının sebebi olarak, kullandıkları solüsyonun pH'sı, süresi ve analiz yöntemi gibi olası faktörler düşünülebilir.

Kök çürükleri üzerine yapılan bir ex-vivo çalışmada, başlangıç ve tedavilerden sonraki 45. günde, X-ray mikrotomografi ölçümleri yapılmıştır. Sonuçta, yalnızca 1450 ppm diş macunu uygulanan grupta %22, yalnızca %5 flor vernik uygulanan grupta %25 ve CPP-ACP+F grubunda %31 mineral artışı olduğu bildirilmiştir [301].

CPP-ACP ile sağlıklı mine üzerinde yapılmış bir çalışmada, NaF ile karşılaştırıldığında, daha fazla mineral kazanımı olduğunu ifade edilirken [242], bir diğer çalışmada, demineralize minede etkinliğinin az olduğunu bildirilmiştir [243].

CPP-ACP ve NaF içerikli ajanların demineralize minedeki etkinliklerini inceleyen bir başka araştırmada, mikrosertlik, EDX, ATR-FTIR analizleri kullanılmış ve her iki ajanın da remineralizasyonu sağladığı, ancak NaF'ün daha iyi ve uygulanabilir bir seçenek olduğu ifade edilmiştir [302].

Çalışmamızda, TCP içerikli ajanın, kontrol grubuna göre daha etkili olduğu görülürken, diğer deney gruplarından farklı bulunmamıştır. TCP uygulamasını da içeren bir pH döngüsü çalışmasında, dentin yüzeyinde kontrol grubuna göre daha fazla mineral kazanımı sağlanmıştır. Ancak NaF ile kıyaslandığında, hem TCP, hem de NaF grubunda, sağlıklı ve demineralize dentin yüzeylerindeki mineral kaybı ve lezyon derinliği değişimi açısından, olumlu yönde anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu durumun nedeni olarak da, TCP'nin yüzeyde oluşturduğu oldukça mineralize tabakanın, minerallerin çökmesini yavaşlatması olabileceği ifade edilmiştir [144].

Çalışmamızda da, Lazer Floresans ölçümlerinde TCP, NaF'e göre daha yüksek değerler vererek daha az etkili bulunsa da, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

TCP, insan minesinde kontrol grubuna göre daha fazla mineral kazanımı sağlamıştır [242, 243]. Ancak NaF ile kıyaslandığında, mine araştırmalarının sonuçları farklılıklar göstermektedir. Remineralizasyon etkisinin NaF'ün altında kaldığını [242],

NaF kadar etkili olduğunu [243] ya da daha üstün olduğunu [303] bildiren çalışma bulguları mevcuttur.

Diğer bir kapsamlı araştırmada sığır mine yüzeylerine, aralarında bizim de çalışmamıza dahil ettiğimiz %5'lik NaF, CPP-ACP ve ayrıca TCP ilaveli %5'lik NaF de içeren 15 ayrı vernik uygulanarak pH döngüsüne tabi tutulmuşlardır. Tüm gruplar içinde CPP-ACP içerikli MI vernik hem ilk 4 saatte, hem de 24 saatin sonunda en fazla flor salınımı yapmıştır. Kümülatif flor salınımı ve pik florür konsantrasyonunda da, yine MI vernik öne çıkmaktadır. Minedeki florür alımının ise, %5 NaF ve NaF+TCP gruplarında, NaF+CPP-ACP'ye göre daha fazla olduğu görülmüştür [304].

CXP ajanıyla yapılan araştırmaların sayısı ise oldukça azdır. 2015 yılında yapılmış bir çalışmada, yeni piyasaya sürülmüş Embrace (CXP) verniği; EnamelPro (ACP), Duraphat (NaF) ve Vanish (TCP) vernikle karşılaştırdıklarında gruplar arası anlamlı farklar olduğu görülmüştür. Ortalama kümülatif florür salınımı ilk 4 saat içinde Embrace™ >Enamel Pro®>Duraphat®=Vanish™ olarak bulunmasına rağmen, florür deplezyon oranı sıralamasının Embrace™>Duraphat®=EnamelPro®=Vanish™ şeklinde olduğu ve tüm test grupları içinde en az kalıcılık gösteren vernik etkinliğinin de, Embrace™ ile olduğu bildirilmiştir [247].

2016 yılında yapılan in vitro bir araştırmada, insan mine örnekleri üzerine Duraphat (NaF), MI vernik (CPP-ACP), Embrace (CXP), EnamelPro vernik (ACP) ve Clinpro vernik (TCP) uygulaması sonrası örnekler pH döngüsüne tabi tutulmuştur. En yüksek remineralizasyonun Duraphat grubunda görüldüğü, Clinpro'nun ise Duraphat'a benzer etki gösterdiği bildirilmiştir [243]

Diğer bir çalışmada ise, %5 sodyum florür (FV), reçine modifiye cam iyonomer bazlı kalsiyum fosfat içerikli florürlü vernik (CV) ve CXP karşılaştırılmıştır. Dördüncü hafta sonunda, pH döngüsü uygulanan mine örneklerinin yüzey pürüzlülükleri kontrol>FV=CXP>CV, kalsiyum ve fosfor oranları CV>FV=CXP>kontrol ve flor içeriği CV=CXP>FV olarak bildirilmiştir [305].

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer ajan olan SDF/KI ile, Lazer Floresans ölçümlerinde diğer gruplardan anlamlı derecede daha fazla remineralizasyon değerleri elde edilmiştir. SDF'nin KI ile kombine kullanılması ve demineralizasyon-remineralizasyon dengesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği araştırmalar sayıca azdır.

Göstemeyer ve ark., sığır kök dentini üzerine çeşitli vernik ve gargaralar uygulamalar, daha sonra *Lactobacillus rhamnosus* biyofilm modeliyle demineralizasyona maruz bırakmışlardır. Çalışmada vernik olarak SDF/KI, %35 klorheksidin, %5 NaF ve plasebo, gargara olarak ise 500 ppm NaF ve % 0,1 klorheksidin seçilmiştir. 12. günün sonunda transvers mikroradyografi ile mineral kaybı ölçülmüş, klorheksidin verniğin günlük florür gargarasıyla kullanımının kök çürüklerinin önlenmesinde en başarılı sonucu verdiği belirtilmiştir [306].

Zhao ve ark., SDF ve SDF/KI'nın cam iyonomer restorasyonlarda sekonder çürüğün önlenmesi ve diş renklenmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Tedavilerin uygulanmasından sonra karyojenik biyofilme maruz bırakılan örneklerin demineralizasyonu FTIR ve mikro-BT ile analiz edilmiştir. Hem FTIR sonuçlarındaki amid I/hidrojen fosfat oranı, hem de lezyon derinliği, SDF<SDF/KI<negatif kontrol olarak bulunmuştur. Sonuçta SDF/KI, sekonder çürük oluşumunu önlemiş, ancak SDF kadar etkili bulunmamıştır [270].

Buradaki sonuçların bizim bulgularımızdan farklı olmasında, hem bakteriyolojik model tercihi, hem de analiz yöntemi etkili olmuş olabilir.

Yapılan literatür taramasında, çoğunlukla SDF ajanının antibakteriyel özelliklerinin çeşitli bakteriyel modellerle incelendiği, ancak demineralizasyona karşı koruyucu etkisinin kimyasal modeller kullanılarak değerlendirildiği çalışmaların az sayıda olduğu görülmüştür.

2018 yılında Wierichs ve ark. tarafından pH döngüsü modeli uygulanan bir araştırmada, NaF, NaF+TCP, NaF+CPP-ACP ve SDF verniklerinin sağlıklı ve yapay çürük oluşturulmuş dentin yüzeyleri üzerindeki çürük önleyici etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre tüm vernikler, yüzeylerin daha fazla demineralize olmasını engellemiş, ancak yalnızca NaF+CPP-ACP ve SDF grupları remineralizasyon sağlayabilmiştir [144].

2020 yılında yapılan bir çalışmada, SDF ve CPP-ACP'nin mine üzerindeki etkilerini DIAGNOdent ile değerlendirmek amacıyla demineralize mine dokusu üzerine ajanlar uygulanmış ve remineralizasyon sonrası 3, 7 ve 14. günlerde lazer floresans ölçümleri yapılmıştır. SDF'nin maksimum remineralizasyon değerleri gösterdiği bildirilmiştir [307]. Bu çalışma ile bizim elde ettiğimiz lazer floresans bulguları ile oldukça uyumludur.

SDF'nin sağlıklı mine dokusu üzerine olan etkisinin, pH döngüsü uyguladıktan sonra değerlendirildiği bir çalışmada, NaF vernik grubunda, plasebo ve SDF grubuna göre daha az demineralizasyon olduğu, plasebo ve SDF arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür [308]. Sağlıklı mine üzerine olan etkisi yetersiz bulunmuş olmasına rağmen, SDF'deki florürün dentin kanallarına kolayca penetre olabildiği başka bir çalışmada belirlenmiştir [309].

Mei ve ark., 38% SDF, %10 sodyum florür ve 42% gümüş nitrat solüsyonu uygulaması sonrası dentin bloklarını pH döngüsüne maruz bırakmışlar ve oluşan lezyonları değerlendirmişlerdir. XRD analizinde, SDF örneklerinde gümüş klorür ve metalik gümüş tespit edilmiştir. Mikro-BT ve FTIR analizi sonuçları, SDF'nin demineralizasyonu baskılayabildiğini göstermiştir [244].

Yu ve ark., 2018 yılında, *S. mutans* ile oluşturulan modelde, %38 SDF ve %5 NaF'ün ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının, dentin çürüklerinin durdurulmasına yönelik etkisi karşılaştırmıştır. Lezyon derinliği, kristal karakterizasyonu ve kollajen/mineral oranı analiz edilmiş, SDF'nin tek başına ya da NaF ile kullanımının dentin demineralizasyonunu azalttığı bildirilmiştir [224].

Mei ve ark., bakteriyolojik yöntemle oluşturulmuş dentin örneklerini, %38 SDF uygulanması sonrası 21 gün süreyle yapay çenede inkübe etmiş ve fiziko-kimyasal özelliklerini, mikrosertlik testi, EDS ve FTIR ile değerlendirmiştir. Test grubunda, su uygulanan kontrol grubuna göre daha yüksek mikrosertlik değerleri ve Ca/P oranı, FTIR sonuçlarında ise, daha az kollajen ekspozu olduğu tespit edilmiştir [287].

2018 yılında Yu ve ark.nın yaptıkları bir diğer çalışmada, %25 gümüş nitrat (AgNO_3) ve işlevselleştirilmiş tri-kalsiyum fosfat (fTCP) içeren %5'lik NaF'ün dentin çürükleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Demineralize dentin yüzeyleri, su ve remineralizasyon ajanları uygulaması sonrasında *S. mutans* biyofilmine maruz bırakılmış ve daha sonra FTIR, Mikro-BT ve XRD analizleri yapılarak, amid I/fosfat oranı ve lezyon derinlikleri tespit edilmiştir. Deney gruplarında gümüş klorür oluşumu gösterilmiş ve sonuç olarak AgNO_3 ve NaF+ fTCP'ın uygulanmasıyla karyojenik biyofilm ile oluşan dentin çürüğü lezyonundaki yıkımın azaltılabildiği bildirilmiştir. [288]

Mei ve ark., dentin bloklarında bakteriyolojik yöntemle çürük lezyonları oluşturmuş, daha sonra deney grubu için SDF, kontrol grubu için su uygulamışlardır.

SDF grubunda, demineralize dentin yüzeylerinin FTIR sonuçları, Amid I/ fosfat oranının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir. XRD'ye göre, SDF grubunda, hidroksisapatit kristal yapısının çözünmesiyle oluşan dentine ait kristal yapısı kaybı daha az görülmüştür [281].

Chu ve ark., demineralize dentin bloklarında ayrı ayrı *S. mutans*, ve *A. naeslundii* biyofilmi oluşturmuşlar ve deney gruplarında SDF uygulamışlardır. Çürük lezyonları daha sonra mikrosertlik, EDX ve FTIR analizleriyle incelenmiştir. SDF uygulanması sonrası lezyonların yüzey sertliğinin arttığı ve matrix/fosfat oranının azaldığı, *S. mutans* grubunda, Ca ve P değerlerinin yükseldiği bildirilmiştir. Sonuçta SDF'nin dentin demineralizasyonunu azalttığı ve karyojenik biyofilme yönelik antibakteriyel etki oluşturduğu gösterilmiştir [286].

Çalışmamızda kullanılan verniklerin remineralizasyon etkinliklerinin kimyasal yapılarıyla olduğu kadar adezyon özellikleriyle de ilgili olduğu düşünmekteyiz.

Wierichs ve ark.nın çalışmalarında da bahsedildiği gibi, kullanılan ajanların uzaklaştırılması, kuvvetli bir şekilde fırçalanması ve pH döngüsü uygulanmasından sonra bile bazı gruplarda yüzeyel olarak hala vernik kalabilmektedir [144].

Çalışmanın bir diğer parametresi olan, remineralizasyon ajanlarının biyofilm üzerine etkilerinin değerlendirilmesi aşamasına ait CLSM bulguları doğrultusunda, *S. mutans* ve *Lactobacillus* biyofilmi üzerindeki toplam ve canlı biyokütle yapısının, gruplar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Deney gruplarına ait SEM sonuçları da, kontrol grubunda gözlenen net biyofilm tabakasından oldukça farklı görüntüler ortaya koymuştur.

Literatürlere bakıldığında, bizim çalışmamızda test materyali olarak kullanılmış olan tüm ajanları birbirleriyle kıyaslayan herhangi bir araştırmaya rastlanılmasa da, çeşitli analiz yöntemleri ve preparatların kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Özellikle *S.mutans* ve remineralizasyon ajanları arasındaki ilişkinin incelenmesine yönelik pek çok araştırma mevcuttur.

Çalışmamıza dahil edilen tüm vernikler flor içermektedirler. Yüksek konsantrasyonlardaki florun biyofilm oluşumunu önlediği bilinmektedir [287]. Flor bakterilerde hücresel enzimlere direkt etki ederek ya da farklı yapılara bağlanarak inhibisyon sağlar ve asit üretimini engeller [93]. Ayrıca hidrojen florür (HF) formuyla,

bakterinin hücre membranının protona karşı olan geçirgenliğini artırır [94]. Glikoliz süreci ve intrasellüler polisakkarit yapımı da inhibe olur. Böylece makromoleküllerin sentezi ve hücre dışına salınımı önlenir [93].

Antibakteriyel etkisiyle bilinen diğer bir güçlü ajan ise gümüşdür. Gümüş, bakteriler, protozoa, mantar ve virüsler gibi biyolojik organizmalarda hücre membranı, organeller, çekirdek gibi hücre içi elemanlar ile hücre metabolizması ve replikasyonu üzerinde etkili olarak, bakteriyel adezyonu ve karyojen bakterinin büyümesini engellemektedir. Ayrıca gümüş nanopartikülleri mine ve dentin dokularının demineralizasyonunu önleyebilmektedir. Çürük lezyonunun gelişmesini engelleyici ve hapsedici bir etkinlik gösterirler [310, 311].

Hidroksiapatit diskleri üzerinde oluşturulmuş *S.mutans* biyofilmi üzerine çeşitli remineralizasyon ajanlarının uygulandığı, daha sonra kantitatif kültür teknikleri ve CLSM ile değerlendirildiği bir çalışmada, CPP-ACP içerikli ajanın biyofilm üzerine etkili olduğu bildirilmiştir [312].

CPP-ACP verniğin antibakteriyel etkisinin disk difüzyon testiyle değerlendirildiği bir araştırmada, *S.mutans*'a karşı etkili olduğu gösterilmiştir [313].

2021 yılında yapılmış bir in vitro çalışmada ise CPP-ACP içerikli ajanın *S.mutans* biyofilmi üzerine etkisi, ATP canlılık değerlendirmesi, CFU sayımı, kristal viyole boyama, CLSM ve SEM gibi yöntemlerle incelenmiş, biyofilm oluşumunu azalttığı rapor edilmiştir [314].

Tüm bu çalışmaların sonuçları, CPP-ACP ile ilgili olarak bizim bulgularımızla uyumludur.

Farklı remineralizasyon ajanlarının tükürükteki *S.mutans* sayısına etkileri, bir klinik araştırmada incelenmiş ve 1., 2. ve 4. hafta sonunda yapılmış olan CFU sayımlarında, TCP ve CPP-ACP+F'ün, *S.mutans* seviyesini düşürebildiği bildirilmiştir [315]. Bizim çalışmamızda da, TCP ve CPP-ACP biyofilm üzerinde etkili bulunmuştur.

2018 yılında Yu ve ark.'nın yaptıkları araştırmada demineralize dentin örneklerine %25 gümüş nitrat (AgNO_3) ve %5 NaF + fTCP (Grup 1), % 25 AgNO_3 ve %5 NaF (Grup 2), %25 AgNO_3 (Grup 3) ve su (Grup 4) uygulanmıştır. Tedavi sonrası örnekler *S. mutans* biyofilmine maruz bırakılmış, 7. günün sonunda grupların biyofilm CFU sonuçları 1, 2, 3 < 4 olarak sıralanmıştır. SEM ve CLSM analizlerinde Grup 1, 2

ve 3 te daha az biyofilm gözlenirken, CLSM ile ölçülen ölü/canlı mikroorganizma oranları ise sırasıyla $1,44 \pm 0,62$, $1,39 \pm 0,73$, $1,43 \pm 0,25$ ve $1,51 \pm 0,04$ olarak belirlenmiştir [288].

Çalışmamızda ise toplam biyokütle miktarı, en az NaF'de görülürken, fTCP ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Canlı biyokütle bakımındansa en etkili olan ajan NaF olmuştur.

Ksilitolün *S. mutans* üzerine etkisi bilinmekle birlikte [126], ksilitol kaplı kalsiyum ve fosfat (CXP) ajanının biyofilm üzerine etkisinin tam olarak açıklığa kavuşmasını sağlayacak yeterli araştırma bulunmamaktadır.

2020 yılında Almaz ve ark. tarafından yayınlanan klinik çalışmada, şiddetli erken çocukluk çağı çürükleri bulunan hastalarda farklı flor verniklerinin antibakteriyel etkisini araştırılmıştır. NaF+TCP grubunda tükürük *S. mutans* ve *Lactobacilli* sayılarında en yüksek düşüş gözlenirken, NaF grubunda da başlangıç seviyesine göre azalma olmuştur. CXP ise bakteri seviyesinde azalmayı sağlayamamıştır [316].

Bizim çalışmamızda ise CXP grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az toplam ve canlı biyokütle oluşumu görülürken, NaF ajanı biyofilm canlılığı açısından TCP'ye göre daha etkili bulunmuştur.

SDF'ye KI ilavesinin biyofilm üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar ise az sayıdadır. Konuyla ilgili yapılmış olan ilk in vitro çalışmada, SDF/KI kombinasyonunun uygulanması sonucu oluşan bakteriyel üremenin, yalnızca SDF'ye göre daha az olduğu, ancak bu farkın anlamlı olmadığı bildirilmiştir [112].

2009 yılında yapılan başka bir çalışmada, SDF/KI uygulanmış dentin örneklerinde *S. mutans* sayısının azaldığı ve dentinin demineralizasyona direncinin arttığı bildirilmiştir [317].

2015 yılında CLSM ile yapılan bir in vitro çalışmada, SDF/KI ajanının enfekte olmuş dentin kanallarındaki *S. mutans* sayısını azalttığı gösterilmiştir [318].

2018 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise *S. mutans* biyofilminde kalitatif kültür teknikleriyle sayım yapılmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, *S. mutans* sayısındaki düşüş, SDF için yedi kattan fazla, SDF + Satüre potasyum iyodür grubu için dört kattan fazla olarak bulunmuştur [319].

2019 yılında yapılmış bir başka araştırmada, SDF ve SDF/KI ajanları uygulanarak, in vitro ve in vivo antibakteriyel test yöntemleri uygulanmıştır. İn vitro çalışmada, *S. mutans* için en geniş inhibisyon alanı SDF ile görülürken, SDF/KI için bu alan anlamlı derecede düşmüştür. İn vivo çalışmanın sonuçlarında ise, beş hastadan dördünde SDF ve SDF/KI'ün *S. mutans* üremesini tamamen inhibe ettiği, anaerob mikroorganizmaların sayısında da yaklaşık %90'dan fazla azalma sağlandığı bildirilmiştir [221].

2020 yılında yapılan bir in situ çalışmada, SDF ve SDF/KI preparatlarının anti-plak etkileri, propidium monoazid (PMA) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirilmiş, %38 SDF ve %31,3 SDF ardından KI uygulamalarının antibakteriyel etkileri arasında anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir [320].

Diğer bazı çalışmalarda ise KI uygulaması olmadan, çeşitli oranlarda SDF solüsyonlarının kullanımı tercih edilmiştir. SDF ve NaF'ün ayrı ayrı ve kombine kullanımının demineralize dentin blokları üzerinde oluşturulan *S. mutans* biyofilmi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, CFU sayılarına göre en yüksek antibakteriyel etki SDF grubunda görülürken, NaF varlığında SDF'nin antibakteriyel etkisinin azaldığı gözlenmiştir. SEM ve CLSM görüntüleri de bu bulguları desteklemiştir [224].

Chu ve ark. ise demineralize dentin bloklarının 16 tanesinde *S. mutans*, 16 tanesinde de *A. naeslundii* biyofilmi oluşturmuş ve her gruptan 8 numuneye SDF ya da su uygulamışlardır. Biyofilm morfolojisi, mikrobiyal kinetik ve canlılık incelemeleri amacıyla SEM, CFU ve CLSM yöntemleri kullanılmıştır. SDF'nin her iki bakteri türünde de biyofilmi azalttığı gözlenmiştir [286].

İki ya da daha fazla türün oluşturduğu biyofilmlerde farklılıklar gözlenmektedir. Cowan ve ark., ikili biyofilmlerdeki kommensal ilişkilerin, adaptasyon stratejileri geliştirerek, hayatta kalma oranlarını arttırabildiğini belirtmişlerdir [321].

İkili biyofilmlerdeki artmış antimikrobiyal toleransın mekanizması tam olarak açıklanamasa da, bu konudaki görüşler hücreler arası iletişimin bu sonuçlarda rolü olabileceği yönündedir [322]

Birden fazla bakteri türünün birarada bulunmasının, ekstrasellüler polisakkarit içerikli matriksin viskozite ve kompozisyonunda artışa sebep olabileceği ve antimikrobiyal ajanın biyofilm içine penetrasyonunun azalıyor olabileceği düşünülmüştür [323]. İki tür arasında kongugatif plazmidlerin veya tamamlayıcı enzimlerin paylaşılmasıyla, çevresel koşullara dayanıklılık için gerekli fizyolojik değişimler gerçekleşebilir [322][324].

Mei ve ark. *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus* ile oluşturulan ikili biyofilm modeliyle dentin bloklarında çürük lezyonları oluşturmuşlar, daha sonra deney grubu için SDF, kontrol grubu için su uygulamışlardır. Sonuçta kontrol grubunda CFU sayısının SDF grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, SEM ve CLSM incelemelerinde ise kontrol grubunda konfluent biyofilm gözlenirken SDF grubunda görülmediği bildirilmiştir.[281]

Mei ve ark.'nın bir başka çalışmasında, dentin yüzeylerinde beş karyojenik bakteri olan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Actinomyces naeslundii*'den oluşan karyojenik bir biyofilm kullanılarak yapay çürük oluşturulmuştur. % 38 SDF uygulaması sonrası 21 gün süreyle yapay çenede inkübe edilmiş, ardından biyofilm CFU, SEM, CLSM ile değerlendirilmiştir. Test grubunda, su uygulanan kontrol grubuna göre CFU sonuçlarında daha düşük değerler, SEM ve CLSM ile de ise daha az bakteri üremesi ve daha az konfluent karyojenik biyofilm gözlenmiştir. [287]

Gümüş diamin florürün tek başına *S. mutans* biyofilmi ile [286] incelendiği çalışma ile *S. mutans* ve *L. Acidophilus*' un ikili biyofilm olarak etkinliğini inceleyen çalışma [281] karşılaştırıldığında, ikili biyofilm kullanılmasıyla antimikrobiyal direncin arttığı görülmektedir.

SDF ile tedavi edilen örneklerde, *S. mutans* CFU sayısı sifıra yakinken, ikili modelde bu değer artmaktadır. İki türden oluşan daha kompleks ortamlarda, bakteriler daha güçlü bir şekilde hayatta kalıyor gibi görünmektedir [281].

Bu görüşler, Kara ve ark.nın uyguladığı *S. mutans* ve *Veillonella parvula* içeren biyofilimde, klorheksidine karşı olan duyarlılığın tek türe göre daha az olduğu şeklindeki bulgularla da uyumludur [325].

Tüm bu araştırmalarda kullanılan farklı deney tasarımları ve analiz yöntemlerinin sonuçlar üzerinde doğrudan etkili olduğu açıktır. Ayrıca bizim çalışmamız da kendi içinde değerlendirildiğinde, kullanılan verniklerin biyofilm üzerindeki etkinliklerinin yanı sıra, ajanların dış yüzeylerinde oluşturdukları film kalınlıkları ve tutunma yeteneklerinin de sonuçları etkileyebileceği düşünölmektedir.

Çalışmamızda, CLSM görüntüleri üzerinden kantitatif analiz yapabilmek için gerekli olan renk ve alanların ayrıştırılması için bilgisayar yazılımından faydalanılmıştır. Ancak sonuçlar, biyofilmin farklı kalınlıklarında bakteri miktarındaki istenmeyen dağılımlardan etkilenebilmektedir. Ayrıca görüntülerin kalitesinin parlaklık, kontrast, beyaz dengesi gibi koşullardan etkilenebildiği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu yüzden diğer biyofilm inceleme teknikleriyle de analiz edilip, sonuçların birlikte değerlendirilerek yorumlanması daha uygun olacaktır.

Çalışmamız süresi kısa tutulan in vitro bir araştırma olduğundan, materyallerin etkinliklerinin karşılaştırılmasında farklı zaman aralıklarında ölçümlerin yapılacağı in vitro ve klinik çalışmalarla desteklenmesi ve doğrulanması uygun bir yaklaşım olacaktır.

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir;

- Çalışmada kullanılan tüm materyallerin kök çürük lezyonlarının demineralizasyona direncini arttırabildiği, araştırmada kullanılan her iki spektral analiz yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu nedenle ajanların dentin çürük lezyonlarının durdurulmasında kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir.
- Bu çalışmada tüm remineralizasyon ajanları bir kez tatbik edilmiştir. Elde edilen bulgular, materyallerin tek doz uygulamasının bile dentin dokusundaki demineralizasyonun ilerlemesini önleyebildiğini göstermektedir.
- LF değerleri incelendiğinde D2-D3 lazer floresans farkları bakımından kontrol grubuyla tedavi grupları arasında, tedavi grupları lehine anlamlı farklılık bulunmuştur. Tüm remineralizasyon ajanlarının, LF değerlerinde artışı önlediği görülmektedir.
- D2-D3 lazer floresans farkları bakımından SDF/KI grubu pH döngüsü sonrası elde edilen en düşük lazer floresans değerleriyle, diğer tüm gruplardan anlamlı farklılık göstermiştir. Bu sonuç SDF/KI'ün demineralizasyonu engellemede oldukça etkili bulunmakla birlikte, remineralizasyonu da sağlayabildiğini göstermektedir.
- D2-D3 lazer floresans farkları bakımından NaF, CPP-ACP, TCP, CXP arasında ise anlamlı farklılık bulunmamış, benzer etkilere neden olmuşlardır.
- FTIR-ATR analizinde pH döngüsü sonrası fosfat/amid I oranındaki düşüş NaF, CPP-ACP, TCP, CXP gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az bulunmuştur.
- FTIR-ATR analizinde pH döngüsü sonrası SDF/KI grubu ise, ajanın dentin dokuları ve ortamla çeşitli kimyasal reaksiyonlara girdiğini işaret eden grafik oluşturmuştur.
- Çalışmada kullanılan materyallerin, biyofilme etkisi CLSM ile değerlendirildiğinde, hem toplam hem de canlı biyokütle bakımından tüm remineralizasyon ajanlarının, oluşturulan *S. mutans* ve *L. casei*'den oluşan

biyofilm üzerinde etkili olduğu görölmüştür. Bununla birlikte, tüm materyaller arasında en etkili ajan %5 NaF olarak bulunmuştur.

- SEM görüntülemelerinde kontrol grubunda yaygın kok kolonileri ve çomaklardan oluşan biyofilm çok net iken, çalışma gruplarında belirlenememiştir.
- Kök çürüklerinin ilerlemesinin önlenmesi veya tedavi edilmesinde daha etkili ajanların geliştirilebilmesi için farklı yöntemlerin kullanıldığı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızın bu amaçla yapılacak başka in vitro ve in vivo çalışmalara yol gösterebileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Slayton RL, Urquhart O, Araujo MWB, Fontana M, Guzman-Armstrong S, Nascimento MM. ve ark. Evidence-based clinical practice guideline on nonrestorative treatments for carious lesions: A report from the American Dental Association, *J Am Dent Assoc* 2018; **149**: 837-849.
2. Masood M, Newton T, Bakri NN, Khalid T, Masood Y. The relationship between oral health and oral health related quality of life among elderly people in United Kingdom. *J Dent* 2017; **56**: 78–83.
3. Pentapati KC, Siddiq H, Yeturu SK. Global and regional estimates of the prevalence of root caries – Systematic review and meta-analysis. *Saudi Dent J* 2019; **31**: 3–15.
4. Oliveira BH, Cunha-Cruz J, Rajendra A, Niederman R. Controlling caries in exposed root surfaces with silver diamine fluoride: A systematic review with meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2018; **149**: 671-679.
5. Sampaio AA, Souza SE, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA, Cavalcanti YW, Cury JA. *Candida albicans* increases dentine demineralization provoked by *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res* 2019; **53**: 322–331.
6. Zhang J, Sardana D, Li KY, Leung KCM, Lo ECM. Topical fluoride to prevent root caries: Systematic review with network meta-analysis. *J Dent Res* 2020; **99**: 506–513.
7. Zhang W, McGrath C, Lo ECM. A comparison of root caries diagnosis based on visual-tactile criteria and DIAGNOdent in vivo. *J Dent* 2009; **37**: 509–513.
8. Neel EAA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM ve ark. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone, *Int J Nanomedicine* 2016; **11**: 4743–4763.
9. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: The dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 1997; **13**: 41–75.
10. Cai J, Palamara JEA, Manton DJ, Burrow MF, Status and progress of treatment methods for root caries in the last decade: a literature review. *Aust Dent J* 2018; **63**: 34–54.
11. Demir G. Remineralizasyon materyalleri ve teknolojilerine güncel bakış. *7tepe Klin. Derg* 2019; **16**: 81–94.

12. Scannapieco FA, The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. *Clin Microbiol Newsl* 2013; **35**: 163–169.
13. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. *Dental caries*, Lancet 2007; **369**: 51–59.
14. Featherstone JDB. The continuum of dental caries - Evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004; **83**: 39–42.
15. Wefel JS, Clarkson BH, Heilman JR. Natural root caries: a histologic and microradiographic evaluation. *J Oral Pathol Med* 1985; **14**: 615–623.
16. Clarkson BH, Hall DL, Heilman JR, Wefel JS. Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro. *J Oral Pathol Med* 1986; **15**: 423–429.
17. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; **27**: 31–40.
18. Cagetti MG, Bontà G, Cocco F, Lingstrom P, Strohmenger L, Campus G. Are standardized caries risk assessment models effective in assessing actual caries status and future caries increment? A systematic review. *BMC Oral Health* 2018; **18**: 1–10.
19. Roberson TM, Heymann HO, Swift EJ. Clinical significance of dental anatomy, histology, physiology, and occlusion. C. Sturdevant editör. *Art Science Operative Dentistry*, 5. baskı, 17–64, 2006.
20. Klimuszko E, Orywal K, Sierpinska T, Sidun J, Golebiewska M. Evaluation of calcium and magnesium contents in tooth enamel without any pathological changes: in vitro preliminary study. *Odontology* 2018; **106**: 369–376.
21. Fejerskov O, Nyvad B. Root Surface Caries - Rationale behind Good Diagnostic Practice. *Monogr Oral Sci* 2017; **26**: 43–54.
22. Stamm JW, Banting DW, Imrey PB. Adult root caries survey of two similar communities with contrasting natural water fluoride levels. *J Am Dent Assoc* 1990; **120**: 143–149.
23. Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of caries on root surface. *Monogr Oral Sci* 2017; **26**: 15–25.
24. Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries Res* 2016; **50**: 422–431.
25. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I ve ark. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res* 2001; **80**: 1828–1833.

26. Ev LD, Damé-Teixeira N, Do T, Maltz M, Parolo CCF. The role of *Candida albicans* in root caries biofilms: An RNA-seq analysis. *J Appl Oral Sci* 2020; **28**: 1–10.
27. AlQranei MS, Balhaddad AA, Melo MAS. The burden of root caries: Updated perspectives and advances on management strategies. *Gerodontology* 2020; **00**: 1–18.
28. Hoppenbrouwers PMM, Driessens FCM, Borggreven, JMPM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res* 1986; **65**: 955–958.
29. Shellis RP, Formation of caries-like lesions in vitro on the root surfaces of human teeth in solutions simulating plaque fluid. *Caries Res* 2010; **44**: 380–389.
30. Ricard-Blum S, The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; **3**: 1–19.
31. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; **55**: 1531–1546.
32. Erkli H, Ersöz E. Matrix metalloproteinases: Effects on dental tissues and caries. *Cumhur Dent J* 2011; **14**: 246–257.
33. Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Histopathology of root surface caries. *J Dent Res* 1990; **69**: 1195–1204.
34. Kawasaki K, Featherstone JDB. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997; **76**: 588–595.
35. Lee RC, Darling CL, Staninec M, Ragadio A, Fried D. Activity assessment of root caries lesions with thermal and near-IR imaging methods. *J Biophotonics* 2017; **10**: 433–445.
36. Manesh SK, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomography for the nondestructive assessment of the remineralization of dentin, *J Biomed Opt* 2009; **14**: 044002.
37. Lee C, Darling CL, Fried D. Polarization-sensitive optical coherence tomographic imaging of artificial demineralization on exposed surfaces of tooth roots. *Dent Mater* 2009; **25**: 721–728.
38. Yang V, Fried D. Measurement of the shrinkage of natural and simulated lesions on root surfaces using CP-OCT. *J Dent* 2019; **90**: 103213.
39. Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Human root caries: histopathology of

- initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol Med* 1989; **18**: 146–156.
40. Goldberg M. Enamel and dentin carious lesions. *JSM Dent* 2020; **8**: 1120.
 41. Smith KA. Louis Pasteur, the father of immunology? *Front. Immunol* 2012; **3**: 1–10.
 42. Sumney D L, Jordan HV. Characterization of bacteria isolated from human root surface carious lesions. *J Dent Res* 1974; **53**: 343–351.
 43. Do T, Damé-Teixeira N, Naginyte M, Marsh PD. Root surface biofilms and caries. *Monogr Oral Sci* 2017; **26**: 26–34.
 44. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS One* 2013; **8**: e67919.
 45. Rüdiger SG, Dahlén G, Carlén A. Protein and bacteria binding to exposed root surfaces and the adjacent enamel surfaces in vivo. *Swed Dent J* 2015; **39**: 11–22.
 46. Jones GW, Isaacson RE. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit Rev Microbiol* 1982; **10**: 229–260.
 47. Zeng L, Burne RA. Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *J Bacteriol* 2013; **195**: 833–843.
 48. Yalçın Çakır F, Gürgab S, Attar N. Çürük Mikrobiyolojisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Derg* 2010; **34**: 78–91.
 49. Ellen RP, Banting DW, Fillery ED. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. *J Dent Res* 1985; **64**: 1245–1249.
 50. Brown LR, Billings RJ, Kaster AG. Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganisms cultured from noncarious and carious root and coronal tooth surfaces. *Infect Immun* 1986; **51**: 765–770.
 51. Emilson C, Klock B, Sanford CB. Microbial flora associated with presence of root surface caries in periodontally treated patients. *Eur J Oral Sci* 1988; **96**: 40–49.
 52. Newbrun E. *Cariology*, 3 rd edition, 1989.
 53. Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. *Oral Dis* 2002; **8**: 207–217.
 54. Aparna A, Hegde M, Shetty V. Evaluation of microflora of root carious lesions in

- different age groups: A microbiological study. *Eur J Gen Dent* 2013; 2: 130–133.
55. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2015–2021.
 56. Dame-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T. *Actinomyces spp.* gene expression in root caries lesions. *J Oral Microbiol* 2016; **8**, 32383.
 57. Zaremba ML, Stokowska W, Klimiuk A, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D *et al.* Microorganisms in root carious lesions in adults. *Adv Med Sci* 2006; **51**: Suppl 1, 237–240.
 58. Nudelman F, Pieterse K, George A, Bomans PHH, Friedrich H, Brylka LJ *et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater* 2010; **9**: 1004–1009.
 59. Schwarcz HP, Abueidda D, Jasiuk I. The ultrastructure of bone and its relevance to mechanical properties. *Front Phys* 2017; **5**.
 60. Yu L, Wei M. Biomineralization of collagen-based materials for hard tissue repair. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 1–17.
 61. Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs* 2007; **186**: 70–77.
 62. Martinez EF, da Silva LAH, Furuse C, de Araújo NS, de Araújo VC. Dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in developing human teeth. *Braz Dent J* 2009; **20**: 365–369.
 63. Goldberg M. Dentin structure composition and mineralization. *Front Biosci* 2011; **E3**: 711–735.
 64. Almeida E Silva JS, Baratieri LN, Araujo E, Widmer N. Dental erosion: Understanding this pervasive condition. *J Esthet Restor Dent* 2011; **23**: 205–216.
 65. Braly A, Darnell LA, Mann AB, Teaford MF, Weihs TP. The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. *Arch Oral Biol* 2007; **52**: 856–860.
 66. Wiegand A, Attin T. Occupational dental erosion from exposure to acids - A review. *Occup Med* 2007; **57**: 169–176.
 67. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991; **15**: 1–201.
 68. Ren YF. Dental Erosion: Etiology, Diagnosis and Prevention. *Regist Dent*

- Hygenist* 2011; 75–84.
69. Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci* 2006; **20**: 66–76.
 70. Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *Int J Biomater* 2009; 698547.
 71. Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *J Mater Sci* 2012; **47**: 8035–8043.
 72. Cummins D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent* 2013; **41**: S1–S11.
 73. Arifa MK, Ephraim R, Rajamani T. Recent advances in dental hard tissue remineralization : A review of literature. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; **12**: 139–144.
 74. Rios D, Honório HM, Francisconi LF, Magalhães AC., Machado MA de AM, Buzalaf MAR. In situ effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *J Dent* 2008; **36**: 152–157.
 75. Low IM, Alhuthali A. In-situ monitoring of dental erosion in tooth enamel when exposed to soft drinks. *Mater Sci Eng C* 2008; **28**: 1322–1325.
 76. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries. *Pediatr Clin North Am* 2000; **47**: 1001–1019.
 77. Douglass JM, Douglass AB, Silk HJ. A practical guide to infant oral health. *Am Fam Phys* 2004; **70**: 2113–2120.
 78. Hardie JM. The microbiology of dental caries. *Dent Update* 1982; **9**: 199–208.
 79. Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci* 1996; **104**: 199–206.
 80. Dowd FJ. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999; **43**: 579–97.
 81. Kleinberg I. A new saliva-based anticaries composition. *Dent Today* 1999; **18**: 98–103.
 82. Twetman S. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy?. *Braz Oral Res* 2012; **26**: 64–70.
 83. Wu CC, Lin CT, Wu CY, Peng WS, Lee MJ, Tsai C. Inhibitory effect of

- Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* 2015; **30**: 16–26.
84. Keller MK, Larsen IN, Karlsson L, Twetman S. Effect of tablets containing probiotic bacteria (*Lactobacillus reuteri*) on early caries lesions in adolescents: A pilot study. *Benef Microbes* 2014; **5**: 403–407.
 85. Lee SH, Kim YJ. A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol* 2014; **196**: 601–609.
 86. Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris, S. Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol* 2014; **59**: 1384–1390.
 87. Saha S, Tomaro-Duchesneau C, Rodes L, Malhotra M, Tabrizian M, Prakash S. Investigation of probiotic bacteria as dental caries and periodontal disease biotherapeutics. *Benef Microbes* 2014; **5**: 447–460.
 88. Wen ZT, Burne RA. LuxS-Mediated Signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J Bacteriol* 2004; **186**: 2682–2691.
 89. Ahmed A, Dachang W, Lei Z, Jianjun L, Juanjuan Q, Yi X. Effect of Lactobacillus species on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Pak J Pharm Sci* 2014; **27**: 1523–1528.
 90. Savaş S, Küçükyılmaz E. Diş hekimliğinde kullanılan remineralizasyon ajanları ve çürük önleyici ajanlar. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekim. Fakültesi Derg* 2014; **9**: 113–125.
 91. Pollick H. The Role of fluoride in the prevention of tooth decay. *Pediatr Clin North Am* 2018; **65**: 923–940.
 92. Clarkson JJ, McLoughlin J. Role of fluoride in oral health promotion. *Int Dent J* 2000; **50**: 119–128.
 93. Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res* 2008; **20**: 17–21.
 94. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, ten Cate J.M. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011; **22**: 97–114.
 95. Liao Y, Brandt BW, Li J, Crielaard W, Van Loveren C, Deng DM. Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review. *J Oral Microbiol* 2017; **9**: 1344509.

96. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik A. Fluoride: a review of use and effects on health. *Mater Socio Medica* 2016; **28**: 133–137.
97. Cury JA, Tenuta LMA. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res* 2008; **20**: 13–16.
98. Other Fluoride Products, <https://www.cdc.gov/fluoridation/basics/fluoride-products.html>, 28 Şubat 2021.
99. Ercan E, Bağlar S, Çolak H. Diş Hekimliğinde Topikal Florür Uygulama Metotları. *Cumhur Dent J* 2010; **13**: 27–33.
100. Jensen ME, Kohout F. The effect of a fluoridated dentifrice on root and coronal caries in an older adult population. *J Am Dent Assoc* 1988; **117**: 829–832.
101. Ekstrand KR, Poulsen JE, Hede B, Twetman S, Qvist V, Ellwood RP. A randomized clinical trial of the anti-caries efficacy of 5,000 compared to 1,450 ppm fluoridated toothpaste on root caries lesions in elderly disabled nursing home residents. *Caries Res* 2013; **47**: 391–398.
102. Srinivasan M, Schimmel M, Riesen M, Ilgner A, Wicht MJ, Warncke M. High-fluoride toothpaste: A multicenter randomized controlled trial in adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 2014; **42**: 333–340.
103. Ekstrand KR. High fluoride dentifrices for elderly and vulnerable adults: Does it work and if so, then why?. *Caries Res* 2016; **50**: 15–21.
104. Wierichs RJ, Meyer-Lueckel H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. *J Dent Res* 2015; **94**: 261–271.
105. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008; **42**: 88–97.
106. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver diamine fluoride: A caries “silver-fluoride bullet” *J Dent Res* 2009; **88**: 116–125.
107. Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ, Oerther DB. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Sci Technol* 2007; **55**: 413–419.
108. Lansdown ABG. Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use interactions between skin and biofunctional metals. *Curr Probl Dermatol* 2006; **33**: 17–34.
109. Oppermann RV, Johansen JR. Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper,

- silver and tin on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Eur J Oral Sci* 2007; **88**: 476–480.
110. Horst JA. Silver fluoride as a treatment for dental caries. *Adv Dent Res* 2018; **29**: 135–140.
 111. Chu CH, Lo ECM. Promoting caries arrest in children with silver diamine fluoride: a review. *Oral Health Prev Dent* 2008; **6**: 315–321.
 112. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2005; **50**: 242–245.
 113. Zhang W, McGrath C, Lo ECM, Li JY. Silver diamine fluoride and education to prevent and arrest root caries among community-dwelling elders. *Caries Res* 2013; **47**: 284–290.
 114. Li R, Lo ECM, Liu BY, Wong MCM, Chu CH. Randomized clinical trial on arresting dental root caries through silver diammine fluoride applications in community-dwelling elders. *J Dent* 2016; **51**: 15–20.
 115. Tan HP, Lo ECM, Dyson JE, Luo Y, Corbet EF. A randomized trial on root caries prevention in elders. *J Dent Res* 2010; **89**: 1086–1090.
 116. Schwendicke F, Göstemeyer G. Cost-effectiveness of root caries preventive treatments. *J Dent* 2017; **56**: 58–64.
 117. Gibson G, Jurasic MM, Wehler CJ, Jones JA. Supplemental fluoride use for moderate and high caries risk adults: A systematic review. *J Public Health Dent* 2011; **71**: 171–184.
 118. Gluzman R, Katz RV, Frey BJ, McGowan R. Prevention of root caries: a literature review of primary and secondary preventive agents. *Spec Care Dent* 2013; **33**: 133–140.
 119. Twetman S, Keller MK. Fluoride rinses, gels and foams: An update of controlled clinical trials. *Caries Res* 2016; **50**: 38–44.
 120. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010; **89**: 1187–1197.
 121. Banting DW, Papas A, Clark DC, Proskin HM, Schultz M, Perry R. The effectiveness of 10 % chlorhexidine varnish treatment on dental caries incidence in adults with dry mouth. *Gerodontology* 2000; **17**: 67–76.

122. Baca P, Clavero J, Baca AP, González-Rodríguez MP, Bravo M, Valderrama MJ. Effect of chlorhexidine-thymol varnish on root caries in a geriatric population: A randomized double-blind clinical trial. *J Dent* 2009; **37**: 679–685.
123. Hedberg M. Sugar fermentation in probiotic bacteria – an in vitro study. *Oral Microbiol Immunol* 2008; **23**: 482–485.
124. Mäkinen KK, Saag M, Isotupa KP, Olak J. Similarity of the effects of erythritol and xylitol on some risk factors of dental caries. *Caries Res* 2005; **39**: 207–215.
125. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J* 2000; **45**: 235–245.
126. Bahador A, Lesan S, Kashi N. Effect of xylitol on cariogenic and beneficial oral streptococci : a randomized , double-blind crossover trial. *Iran J Microbiol* 2012; **4**: 75–81.
127. Ritter A, Leo MC, Permanente K, Amaechi BT, Holland J. Tooth-surface-specific effects of xylitol : Randomized trial results. *J Dent Res* 2013; **92**: 512-517.
128. Wijeyeweera RL, Kleinberg I. Arginolytic and ureolytic activities of pure cultures of human oral bacteria and their effects on the pH response of salivary sediment and dental plaque in vitro. *Arch Oral Biol* 1989; **34**: 43–53.
129. ten Cate JM, Cummins D. Fluoride toothpaste containing 1.5% arginine and insoluble calcium as a new standard of care in caries prevention. *J Clin Dent* 2013; **24**: 79–87.
130. Souza MLR, Cury JA, Tenuta LMA, Zhang YP, Mateo LR, Cummins D. Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride to a dentifrice containing 1450 ppm fluoride alone in the management of primary root caries. *J Dent* 2013; **41**: S35–S41 .
131. Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H. Anti-caries effect of arginine-containing formulations in vivo: A systematic review and meta-analysis. *Caries Res* 2015; **49**: 606–617.
132. Riley P, Lamont T, Riley P, Lamont T. Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2013; CD010514.
133. Vered Y, Zini A, Mann J, Devizio W, Stewart B, Zhang YP. Comparison of a dentifrice containing 0.243% sodium fluoride, 0.3% triclosan, and 2.0%

- copolymer in a silica base, and a dentifrice containing 0.243% sodium fluoride in a silica base: a three-year clinical trial of root caries and dental crowns among adults. *J Clin Dent* 2009; **20**: 62–65.
134. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology?. *Caries Res* 2004; **38**: 247–253.
 135. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MCM. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. *J Dent* 2015, **43**: 1470–1475.
 136. Buzalaf MAR, Pessan JP. New Preventive Approaches Part I: Functional Peptides and Other Therapies to Prevent Tooth Demineralization. *Monogr Oral Sci* 2017; **26**: 88–96.
 137. Nongonierma AB, Fitzgerald RJ. Biofunctional properties of caseinophosphopeptides in the oral cavity. *Caries Res* 2012; **46**: 234–267.
 138. Rahiotis C, Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *J Dent* 2007; **35**: 695–698.
 139. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res* 2009; **21**: 25–29.
 140. Mazzaoui SA, Burrow MF, Tyas MJ, Dashper SG, Eakins D, Reynolds EC. Incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass-ionomer cement. *J Dent Res* 2003; **82**: 914–918.
 141. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Kurokawa H. Ultrasonic determination of the effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste on the demineralization of bovine dentin. *Caries Res* 2007; **41**: 204–207.
 142. Karlinsey RL, Mackey AC. Solid-state preparation and dental application of an organically modified calcium phosphate. *J Mater Sci* 2009; **44**: 346–349.
 143. Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride plus functionalized β -TCP: a promising combination for robust remineralization. *Adv Dent Res* 2012; **24**: 48–52.
 144. Wierichs RJ, Stausberg S, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Esteves-Oliveira M. Caries-preventive effect of NaF, NaF plus TCP, NaF plus CPP-ACP, and SDF varnishes on sound dentin and artificial dentin caries in vitro. *Caries Res* 2018; **52**: 199–211.
 145. Kirkham J, Firth A, Vernalis D, Boden N, Robinson C, Shore RC. Self-

- assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res* 2007; **86**: 426–430.
146. Brunton PA, Davies RPW, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes, SJ. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides-A clinical safety trial. *Br Dent J* 2013; **215**: 1–6.
 147. de Sousa JP, Carvalho RG, Barbosa-Martins LF, Torquato RJS, Mugnol KCU, Nascimento FD. The self-assembling peptide p11-4 prevents collagen proteolysis in dentin. *J Dent Res* 2019; **98**: 347–354.
 148. George A, Bannon L, Sabsay B, Dillon JW, Malone J, Veis A. 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**: 32869–32873.
 149. Zheng W, Ding L, Wang Y, Han S, Zheng S, Guo Q. 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**: 2280800019827798.
 150. Liang, K, Xiao S, Shi W, Li J, Yang X, Gao Y. 8DSS-promoted remineralization of demineralized dentin in vitro. *J Mater Chem B* 2015; **3**: 6763–6772.
 151. Jawale K, Kamat S, Patil J, Nanjannawar G, Chopade R. Grape seed extract: An innovation in remineralization. *J Conserv Dent* 2017; **20**: 415-418.
 152. Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent* 2008; **36**: 900–906.
 153. Pavan S, Xie Q, Hara AT. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin-rich. *Caries Res* 2011; **45**: 443–447.
 154. Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *J Dent* 2011; **39**: 391–396.
 155. Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *J Mater Sci Mater Med* 2012; **23**: 733–742.
 156. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin

- interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater* 2015; **31**: 759–777.
157. ten Cate JM. Models and role models. *Caries Res* 2015; **49**: 3–10.
 158. 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**: 1-8.
 159. Yu OY, Mei ML, Zhao IS, Lo ECM, Chu CH. Effects of fluoride on two chemical models of enamel demineralization. *Materials (Basel)* 2017; **10**: 1245.
 160. Amaechi BT. Protocols to study dental caries in vitro: pH cycling models. *Methods Mol. Biol* 2019; **1922**: 379–392.
 161. Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM., Delbem ACB. Ph-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: Strengths and limitations. *J Appl Oral Sci* 2010; **18**: 316–334.
 162. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *J Dent* 2003; **31**: 161–171.
 163. Bowen WH. Rodent model in caries research. *Odontology* 2013; **101**: 9–14.
 164. Sung YH, Kim HY, Son HH, Chang J., How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. *Restor Dent Endod* 2014; **39**: 164-171.
 165. Ro JH, Bang JJ, Kim YI, Lee DJ, Ko CC, Garcia-Godoy F, Kwon YH. Spectral characteristics of caries autofluorescence obtained from different locations and caries severities. *J Biophotonics* 2020; **13**: 1–11.
 166. Korkut B, Tağtekin DA, Yanıkoğlu FÇ. Diş çürüklerinin erken teşhisi ve teşhiste yeni yöntemler: QLF, Diagnodent, elektriksel iletkenlik ve ultrasonik sistem. *Ege Üniversitesi Diş Hekim. Fakültesi Dergisi* 2011; **32**: 55–67.
 167. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; **71**: 924–928.
 168. Longbottom C, Huysmans MCDNJM. Electrical measurements for use in caries clinical trials. *J Dent Res* 2004; **83**: 77-79.
 169. Gündüz K, Çelenk PP. Mine çürüklerinin remineralizasyonunun elektronik çürük monitörü ile in vitro değerlendirilmesi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Derg* 2006; **30**: 18–24.
 170. Pretty IA. Caries detection and diagnosis: Novel technologies. *J Dent* 2006; **34**:

727–739.

171. Shakibaie F, George R, Walsh L. Applications of Laser induced Fluorescence in dentistry. *Int J Dent Clin* 2011; **3**: 38–44.
172. Amaechi BT. Emerging technologies for diagnosis of dental caries: The road so far. *J Appl Phys* 2009; **105**: 102047.
173. Hibst R, Paulus R, Lussi A. Detection of occlusal caries by laser fluorescence: basic and clinical investigations. *Med Laser Appl* 2001; **16**: 205–213.
174. Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: An optical method for caries detection. *J Dent Res* 2004; **83**: 80–83.
175. Stookey, GK. Optical methods—Quantitative Light Fluorescence. *J Dent Res* 2004; **83**: 84–88.
176. Oldenbourg R. Polarized light microscopy: Principles and practice. *Cold Spring Harb Protoc* 2013, 1023–1036.
177. Sreedhar H, Varma VK, Nguyen PL, Davidson B, Akkina S, Guzman G. High-definition fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic imaging of human tissue sections towards improving pathology. *J Vis Exp* 2015; **95**: e52332.
178. Mohamed MA, Jaafar J, Ismail AF, Othman MHD, Rahman MA. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, Elsevier B.V. 2017.
179. Bruker Optics, What is ATR or Attenuated Total Reflectance?, <https://www.bruker.com/content/bruker/int/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
180. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W. Optical coherence tomography. *Science* 1991; **254**: 1178–1181.
181. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MAR. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: Hardness and mineral content correlation. *Caries Res* 2013; **47**: 162–170.
182. 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**: 65–70.
183. Mitropoulos P, Rahiotis C, Stamatakis H, Kakaboura A. Diagnostic performance of the visual caries classification system ICDAS II versus radiography and micro-computed tomography for proximal caries detection: An in vitro study. *J Dent* 2010; **38**: 859–867.

184. Kamburoğlu K, Barenboim SF, Antürk T, Kaffe I. Quantitative measurements obtained by micro-computed tomography and confocal laser scanning microscopy. *Dentomaxillofacial Radiol* 2008; **37**: 385–391.
185. Neves A de A, Coutinho E, Vivan Cardoso M, Jaecques SV, Van Meerbeek B. Micro-CT based quantitative evaluation of caries excavation. *Dent Mater* 2010; **26**: 579–588.
186. O Konez, Manyetik Rezonans görüntüleme: Temel bilgiler. http://www.konez.com/MRG_goruntu_olusturulmasi.htm
187. McBain AJ, Chapter 4 *In Vitro Biofilm Models. An Overview*. 1. baskı, Elsevier Inc., 2009.
188. Vert M, Doi Y, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa, P. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl Chem* 2012; **84**: 377–410.
189. Flemming HC, Wingender J., The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 623–633.
190. Adetunji VO, Odetokun IA. Assessment of biofilm in E. coli O157:H7 and Salmonella Strains: Influence of cultural conditions. *Am J Food Technol* 2012; **7**: 582–595.
191. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2612–2617.
192. Coetser SE, Cloete TE. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit Rev Microbiol* 2005; **31**: 213–232.
193. Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-FlynnH, Caballero J, Sandoval J. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *Res Rev J Eng Technol* 2017; **6**: 1–25.
194. Swanton EM, Curby WA, Lind HE. Experiences with the Coulter Counter in bacteriology. *Appl Microbiol* 1962; **10**: 480–485.
195. Zhang W, McLamore ES, Garland NT, Leon JVC, Banks MK. A simple method for quantifying biomass cell and polymer distribution in biofilms. *J Microbiol. Methods* 2013; **94**: 367–374.
196. Müller S, Nebe-Von-Caron G. Functional single-cell analyses: Flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol. Rev*

- 2010; **34**: 554–587.
197. Kanev MO, Gökalp Muranlı DF. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Der* 2016; **20**: 33–38.
 198. Murphy DB, Davidson MW. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, 2nd edition. 2012
 199. Choi YC, Morgenroth E. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci Technol* 2003; **47**: 69–76.
 200. Wimpenny JWT, Colasanti R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton model. *FEMS Microbiol Ecol* 1997; **22**: 1–16.
 201. Schumacher BA. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. Ecological Risk Assessment Support Center Office of Research and Development Cincinnati, 01 I., 2002.
 202. Popescu A, Doyle RJ. The gram stain after more than a century. *Biotech. Histochem* 1996; **71**: 145–151.
 203. Beveridge TJ. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem* 2001; **76**: 111–118.
 204. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; **11**: 127–152.
 205. Chollet R, Ribault S. Use of ATP Bioluminescence for rapid detection and enumeration of contaminants: The milliflex rapid microbiology detection and enumeration system. *Biolumin - Recent Adv Ocean Meas Lab Appl* 2012.
 206. Shimoda T, Yano R, Nakamura S, Yoshida M, Matsuo J, Yoshimura S ve ark. ATP bioluminescence values are significantly different depending upon material surface properties of the sampling location in hospitals Health Services Research. *BMC Res Notes* 2015; **8**: 807.
 207. McElroy WD. The energy source for bioluminescence in an isolated system, *Proc Natl Acad Sci* 1947; **33**: 342–345.
 208. Arnold JW, Bailey GW. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci* 2000; **79**: 1839–1845.
 209. Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y. Simple

- observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express* 2015; **5**: 1–9.
210. Friedman PL, Ellisman MH. Enhanced visualization of peripheral nerve and sensory receptors in the scanning electron microscope using cryofracture and osmium-thiocarbohydrazide-osmium impregnation. *J Neurocytol* 1981; **10**: 111–131.
 211. Sönnergren HH, Polesie S, Strömbeck L, Aldenbor F, Johansson BR, Faergemann J. Bacteria aerosol spread and wound bacteria reduction with different methods for wound debridement in an animal model. *Acta Der Venereol* 2015; **95**: 272–277.
 212. Holling N, Dedi C, Jones CE, Hawthorne JA, Hanlon GW, Salvage JP. Evaluation of environmental scanning electron microscopy for analysis of *Proteus mirabilis* crystalline biofilms in situ on urinary catheters. *FEMS Microbiol Lett* 2014; **355**: 20–27.
 213. Conzuelo F, Schulte A, Schuhmann W. Biological imaging with scanning electrochemical microscopy. *Proc R Soc A Math Phys Eng Sci* 2018; **474**: 20180409.
 214. Beech IB, Smith JR, Steele AA, Penegar I, Campbell SA. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2002; **23**: 231–247.
 215. Bodelón G, Montes-Garcia V, Lopes-Puente V, Hill EH, Hamon C, Sanz-Ortiz MN *et al*. Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Nat Mater* 2016; **15**: 1203–1211.
 216. World Health Organization, WHO | Ageing, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
 217. Usuga-Vacca M, Marin-Zuluaga DJ, Castellanos JE, Martignon S. Association between root/coronal caries and individual factors in institutionalised elderly using ICDAS severity and activity. *BMC Oral Health* 2021; **21**: 1–11.
 218. Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides - mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2012; **122**: 1030–1042.
 219. Varma V, Hegde KS, Bhat SS, Sargod SS, Rao HA. Comparative evaluation of remineralization potential of two varnishes containing CPP-ACP and Tricalcium

- Phosphate: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; **12**: 233–236.
220. de Amoêdo Campos Velo MM, Agulhari MAS, Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Wang L. Root caries lesions inhibition and repair using commercial high-fluoride toothpastes with or without tri-calcium phosphate and conventional toothpastes containing or not 1.5% arginine CaCO₃: an in situ investigation. *Clin Oral Investig* 2020; **24**: 2295–2304.
 221. Karched M, Ali D, Ngo H. In vivo antimicrobial activity of silver diammine fluoride on carious lesions in dentin. *J Oral Sci* 2019; **61**: 19–24.
 222. Mohammadi N, Rikhtegaran S, Kimyai S, Rahbar M, Pirzadeh T, Asdaghi S. The effect of photodynamic therapy and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on the remineralization rate of non-cavitated root: an in-vitro study. *MAEDICA – a J Clin. Med* 2019; **4**: 357–362.
 223. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 2011; **53**: 273–282.
 224. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Caries-arresting effects of silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *J Dent* 2018; **78**: 65–71.
 225. Poole DFG, Shellis RP, Tyler JE. Rates of formation in vitro of dental caries-like enamel lesions in man and some non-human primates. *Arch Oral Biol* 1981; **26**: 413–417.
 226. Lopes FM, Markarian RA, Sendyk CL, Duarte CP, Arana-Chavez VE. Swine teeth as potential substitutes for in vitro studies in tooth adhesion: A SEM observation. *Arch Oral Biol* 2006; **51**: 548–551.
 227. Edmunds DH, Whittaker DK, Green RM. Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res* 1988; **22**: 327–336.
 228. Lodha E, Hamba H, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Effect of different desensitizers on inhibition of bovine dentin demineralization: Micro-computed tomography assessment. *Eur J Oral Sci* 2014; **122**: 404–410.
 229. Hara AT, Queiroz CS, Leme AFP, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003; **37**: 339–344.
 230. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute in

- abrasion studies?. *Clin Oral Investig* 2010; **14**: 201–205.
231. Rehder-Net FC, Menezes M de, Chimello DT, Serra MC. Development of caries-like lesions in human and bovine dentin compared to natural caries. *Rev odontol UNESP* 2010; **39**: 163–168.
 232. Lippert F, Churchley D, Lynch RJ. Effect of lesion baseline severity and mineral distribution on remineralization and progression of human and bovine dentin caries lesions. *Caries Res* 2015; **49**: 467–476.
 233. Tosun G, Şener Y, Şengün A. Kompozit rezinin mineye bağlanma dayanımı üzerine farklı saklama solüsyonlarının etkisi. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Derg* 2005; **29**: 2–6.
 234. Cai J, Burrow MF, Manton DJ, Tsuda Y, Sobh EG, Palamara JEA. Effects of silver diamine fluoride/potassium iodide on artificial root caries lesions with adjunctive application of proanthocyanidin. *Acta Biomater* 2019; **88**: 491–502.
 235. Nyvad B, Fejerskov O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J* 1982; **32**: 311–326.
 236. Arnold WH, Heidt BA, Kuntz S, Naumova EA. Effects of fluoridated milk on root dentin remineralization. *PLoS One* 2014; **9**: e104327.
 237. Smith PW, Preston KP, Higham SM. Development of an in situ root caries model. A. In vitro investigations. *J Dent* 2005; **33**: 253–267.
 238. ten Cate JM, Buijs MJ, Damen JJM. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci* 1995; **103**: 362–367.
 239. 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**: 379-392.
 240. Zander V, Chan D, Sadr A. Microcomputed tomography evaluation of root dentin caries prevention by topical fluorides and potassium iodide. *Sensors* 2019; **19**: 874.
 241. Gonçalves FMC, Delbem ACB, Gomes LF, Emerenciano NG, dos Passos Silva M, Cannon ML, Danelon M. Combined effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and sodium trimetaphosphate on the prevention of enamel demineralization and dental caries: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2020; **5**: 2811-2820.

242. Tuloglu N, Bayrak S, Tunc E Sen, Ozer F. Effect of fluoride varnish with added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on the acid resistance of the primary enamel. *BMC Oral Health* 2016; **16**: 1–7.
243. Mohd Said SNB, Ekambaram M, Yiu CKY. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int Paediatr Dent* 2017; **27**: 163–173.
244. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent* 2013; **41**: 809–817.
245. Nguyen TM, Tonmukayakul U, Warren E, Cartwright S, Liew D, A Markov. Cost-effective analysis of biannual fluoride varnish for preventing dental caries in permanent teeth over a 70-year time horizon. *Heal Promot J Aust* 2020; **31**: 177–183.
246. Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev* 2013.
247. Milburn JL, Henrichs LE. Substantive fluoride release from a new fluoride varnish containing CXP. *Dentistry* 2015; **5**: 1000350.
248. Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow MF, Duangthip D, Mei ML. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J* 2018; **68**: 67–76.
249. Miyaji H, Kato A, Tanaka S. Suppression of root caries progression by application of nanoseal®: A single-blind randomized clinical trial. *Dent Mater J* 2020; **39**: 444–448.
250. Badiie M, Jafari N, Fatemi S, Ameli N, Kasraei S, Ebadifar A. Comparison of the effects of toothpastes containing nanohydroxyapatite and fluoride on white spot lesions in orthodontic patients: A randomized clinical trial. *Dent Res J* 2020; **17**: 354–359.
251. Yazıcıoğlu O, Yaman BC, Güler A, Koray F. Quantitative evaluation of the enamel caries which were treated with casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate. *Niger J Clin Pract* 2017; **20**: 686–692.
252. Jablonski-Momeni A, Korbmacher-Steiner H, Heinzl-Gutenbrunner M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P. Randomised in situ clinical trial

- investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. *Sci Rep* 2019; **9**: 1–10.
253. Samuel SR, Dorai S, Khatri SG, Patil ST. Effect of ozone to remineralize initial enamel caries: in situ study. *Clin Oral Investig* 2016; **20**: 1109–1113.
 254. Leila B, Nemati S, Neda H, Khanehmasjedi M. The effect of MIpaste Plus and Reminpro on incipient caries using DIAGNOdent and SEM: An in vitro study. *J Natl Med Assoc* 2017; **109**: 192–197.
 255. van der Veen MH, ten Bosch JJ. A fiber-optic setup for quantification of root surface demineralization. *Eur J Oral Sci* 1996; **104**: 118–122.
 256. Shi XQ, Tranæus S, Angmar-Månsson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. *Caries Res* 2001; **35**: 21–26.
 257. Buchalla W, Lennon ÁM, Attin T. Comparative fluorescence spectroscopy of root caries lesions. *Eur J Oral Sci* 2004; **112**: 490–496.
 258. Aljehani A, Yang L, Shi XQ. In vitro quantification of smooth surface caries with DIAGNOdent and the DIAGNOdent pen. *Acta Odontol Scand* 2007; **65**: 60–63.
 259. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* 2008; **43**: 134–179.
 260. Grdadolnik J. ATR-FTIR spectroscopy: Its advantages and limitations. *Acta Chim Slov* 2002; **49**: 631–642.
 261. Jiang T, Ma X., Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. *J Dent Res* 2007; **86**: 1040–1045.
 262. Zohdi V, Whelan DR, Wood BR, Pearson JT, Bambery KR, Black MJ. Importance of tissue preparation methods in FTIR micro-spectroscopical analysis of biological tissues: “Traps for new users”. *PLoS One* 2015; **10**: 1–11.
 263. Aminzadeh A, Shahabi S, Walsh LJ. Raman spectroscopic studies of CO₂ laser-irradiated human dental enamel. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 1999; **55**: 1303–1308.
 264. Insiyanda DR, Haryanto F. Diagnosis Of Caries Teeth On The Enamel Surface Using FTIR-ATR. *13th Asia-Oceania Congr Med Phys 11th South-East Asian Congr Med Phys* 2016.
 265. Almhöjd US, Norén JG, Arvidsson A, Nilsson Å, Lingström P. Analysis of carious dentine using FTIR and ToF-SIMS. *Oral Health Dent Manag* 2014; **13**:

- 735–744.
266. Ali Al-Naimi AM, Makdad Chakmakch A, Taqa AA. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of Remaining Dentine after Caries Removal with Newly Prepared Experimental Chemomechanical Caries Removal Agent. *Int J Enhanc Res Med Dent Care* 2017; **4**: 2349–1590.
 267. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut J. Spectroscopic signature of the pathological processes of carious dentine based on FTIR investigations of the oral biological fluids. *J Biomed Opt Express* 2019; **10**: 4050.
 268. Sa Y, Wang Z, Ma X, Lei C, Liang S, Sun L. Investigation of three home-applied bleaching agents on enamel structure and mechanical properties: an in situ study. *J Biomed Opt* 2012; **17**: 035002.
 269. Kim IH, Son JS, Min BK, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. A simple, sensitive and non-destructive technique for characterizing bovine dental enamel erosion: Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Int J Oral Sci* 2016; **8**: 54–60.
 270. Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo ECM, Chu CH. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide treatment on secondary caries prevention and tooth discolouration in cervical glass ionomer cement restoration. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 340.
 271. Leal AMC, Dos Santos MVB, da Silva Filho EC, de Carvalho ALM, Tabchoury CPM, Vale GC. Development of an experimental dentifrice with hydroxyapatite nanoparticles and high fluoride concentration to manage root dentin demineralization. *Int J Nanomedicine* 2020; **15**: 7469–7479.
 272. Zhou Z, Ge X, Bian M, Xu T, Li N, Lu J, Yu J. Remineralization of dentin slices using casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate combined with sodium tripolyphosphate. *Biomed Eng Online* 2020; **19**: 1–13.
 273. Bijle MNA, Ekambaram M, Lo EC, Yiu CKY. The combined enamel remineralization potential of arginine and fluoride toothpaste. *J Dent* 2018; **76**: 75–82.
 274. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF ve ark. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes *J Dent* 2011; **39**: 746–756.
 275. Lopes C de CA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform

- infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Appl Spectrosc Rev* 2018; **53**: 747–769.
276. Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 30223–30250.
 277. Farlay D, Panczer G, Rey C, Delmas PD, Boivin G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab* 2010; **28**: 433–445.
 278. Boskey A, Pleshko Camacho N. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* 2007; **28**: 2465–2478.
 279. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: An alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**: 108–125.
 280. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 111.
 281. Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo ECM. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; **18**: 824–831.
 282. Fikai D, Fikai A. *Prevention of biofilm formation by material modification*. Elsevier Ltd, 159-179 2016.
 283. Gibbons RJ. Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *J Dent Res* 1989; **68**: 750–760.
 284. Di Martino P. Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiol* 2018; **4**: 563–566.
 285. González-Machado C, Capita R, Riesco-Peláez F, Alonso-Calleja C. Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of salmonella agona biofilms at different stages of development. *PLoS One* 2018; **13**: e0200011.
 286. Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo ECM. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces*

- naeslundii* biofilms. *Int J Paediatr Dent* 2012; **22**: 2–10.
287. Mei ML, Li QL, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; **12**: 1–7.
 288. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Effect of silver nitrate and sodium fluoride with tri-calcium phosphate on *Streptococcus mutans* and demineralised dentine. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 1288.
 289. Liu BY, Mei L, Chu CH, Lo ECM. Effect of silver fluoride in preventing the formation of artificial dentinal caries lesions in vitro. *Chinese J Dent Res* 2019; **22**: 273–280.
 290. Bachmann L, Diebolder R, Hibst R, Zezell DM. Infrared absorption bands of enamel and dentin tissues from human and bovine teeth. *Appl Spectrosc Rev* 2003; **38**: 1–14.
 291. Bayly JG, Kartha VB, Stevens WH. The absorption spectra of liquid phase H₂O, HDO and D₂O from 0.7 μ m to 10 μ m. *Infrared Phys* 1963; **3**: 211–222.
 292. Seyedmahmoud R, McGuire JD, Wang Y, Thiagarajan G, Walker MP. The interrelationship of microstructure and hardness of human coronal dentin using reference point indentation technique and micro-Raman spectroscopy. *Dent Mater* 2017; **33**: 1069–1074.
 293. Dahm S, Risnes S. A comparative infrared spectroscopic study of hydroxide and carbonate absorption bands in spectra of shark enameloid, shark dentin, and a geological apatite. *Calcif Tissue Int* 1999; **65**: 459–465.
 294. Lazarev YA, Lazareva AV, Shibnev VA, Esipova NG. Infrared spectra and structure of synthetic polytripeptides. *Biopolymers* 1978; **17**: 1197–1214.
 295. Termine JD, Eanes ED, Greenfield DJ, Nylen MU, Harper RA. Hydrazine-deproteinated bone mineral. *Calcif Tissue Res* 1973; **12**: 73–90.
 296. Peng JJY, Botelho MG, Matinlinna JP. Silver compounds used in dentistry for caries management: A review. *J Dent* 2012; **40**: 531–541.
 297. Neelakantan P, Sharma S, Shemesh H, Wesselink PR. Influence of irrigation sequence on the adhesion of root canal sealers to dentin: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy and push-out bond strength analysis. *J Endod* 2015; **41**: 1108–1111.
 298. Tveit AB, Halse A. The effect of a naf solution and a fluoride varnish on the acid

- resistance of root dentin. *Acta Odontol Scand* 1982; **40**: 35–43.
299. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004; **38**: 551–556.
 300. Salem G, Shalaby HA, Khafagi M. Efficiency of two remineralization pastes on demineralized enamel and dentine of deciduous teeth. *Egypt Dent J* 2015; **61**: 4623–4631.
 301. Sleibi A, Tappuni AR, Davis GR, Anderson P, Baysan A. Comparison of efficacy of dental varnish containing fluoride either with CPP-ACP or bioglass on root caries: Ex vivo study. *J Dent* 2018; **73**: 91–96.
 302. Lei J, Guo J, Fu D, Wang Y, Du X, Zhou L, Huang C. Influence of three remineralization materials on physicochemical structure of demineralized enamel. *J Wuhan Univ Technol Mater Sci Ed* 2014; **29**: 410–416.
 303. Alamoudi SA, Pani SC, Alomari M. The effect of the addition of tricalcium phosphate to 5% sodium fluoride varnishes on the microhardness of enamel of primary teeth. *Int J Dent* 2013; 486358.
 304. Al Dehailan L, Martinez-Mier EA, Eckert GJ, Lippert F. An in vitro investigation of anticaries efficacy of fluoride varnishes. *Oper Dent* 2019; **44**: E234–E243.
 305. Jain A, Suprabha BS, Shenoy R, Natarajan S, Rao A. Remineralising effectiveness of two fluoride varnishes containing additives: An in vitro study. *Oral Health Prev Dent* 2019; **17**: 385–393.
 306. Göstemeyer G, Kohls A, Paris S, Schwendicke F. Root caries prevention via sodium fluoride, chlorhexidine and silver diamine fluoride in vitro. *Odontology* 2018; **106**: 274–281.
 307. Vinod D, Gopalakrishnan A, Subramani SM, Balachandran M, Manoharan V, Joy A. A comparative evaluation of remineralizing potential of three commercially available remineralizing agents: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2020; **13**: 61–65.
 308. Delbem ACB, Bergamaschi M, Sasaki KT, Cunha RF. Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride solution on enamel demineralization: pH-cycling study. *J App. Oral Sci* 2006; **14**: 88–92.
 309. Willershausen I, Schulte D, Azaripour A, Weyer V, Briseno B, Willershausen B.

- Penetration potential of a silver diamine fluoride solution on dentin surfaces. An ex vivo study. *Clin Lab* 2015; **61**: 1695-1701.
310. Butrón Téllez Girón C, Hernández Sierra JF, Dealba-Montero I, Urbano Peña M de los A, Ruiz F. Therapeutic Use of Silver Nanoparticles in the Prevention and Arrest of Dental Caries. *Bioinorg Chem Appl* 2020, 8882930.
 311. Yin IX, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Yu OY, Chu CH. Use of silver nanomaterials for caries prevention: A concise review. *Int J Nanomedicine* 2020; **15**: 3181–3191.
 312. Erdem AP, Sepet E, Avshalom T, Gutkin V, Steinberg D. Effect of CPP-ACP and APF on *Streptococcus mutans* biofilm: A laboratory study. *Am J Dent* 2011; **24**: 119–23.
 313. Attiguppe P, Malik N, Ballal S, Naik SV. CPP-ACP and Fluoride: A Synergism to Combat Caries. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019; **12**: 120–125.
 314. Sionov RV, Tsavdaridou D, Aqawi M, Zaks B, Steinberg D. Shalish M. Tooth mousse containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate prevents biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *BMC Oral Health* 2021; **21**: 1–10.
 315. Samuel V, Ramakrishnan M, Halawany HS, Abraham N, Jacob V, Anil S. Comparative evaluation of the efficacy of tricalcium phosphate, calcium sodium phosphosilicate, and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate in reducing *streptococcus mutans* levels in saliva. *Niger J Clin Pract* 2017; **20**: 1404–1410.
 316. Erkmén Almaz M, Akbay Oba A. Antibacterial activity of fluoride varnishes containing different agents in children with severe early childhood caries: a randomised controlled trial. *Clin Oral Investig* 2020; **24**: 2129–2136.
 317. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS., Gully NJ. Inability to form a biofilm of *Streptococcus mutans* on silver fluoride- and potassium iodide-treated demineralized dentin. *Quintessence Int* 2009; **40**: 155–61.
 318. Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide on residual bacteria in dentinal tubules. *Aust Dent J* 2015; **60**: 80–87.
 319. Vinson LA, Gilbert PR, Sanders BJ, Moser E, Gregory RL. Silver diamine fluoride and potassium iodide disruption of in vitro *Streptococcus mutans* biofilm

- J Dent Child* 2018; **85**: 120–124.
320. Abdullah N, Marzooq FAl, Mohamad S, Rahman NA, Rani, Aghila KG. The antibacterial efficacy of silver diamine fluoride (SDF) is not modulated by potassium iodide (KI) supplements: A study on in-situ plaque biofilms using viability real-time PCR with propidium monoazide. *PLoS One* 2020; **15**: e0241519.
 321. Cowan SE, Gilbert E, Liepmann D, Keasling JD. Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compound. *Appl Environ. Microbiol* 2000; **66**: 4481–4485.
 322. Behnke S, Camper AK. Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm and planktonic cells. *Biofouling The J Bioadhesion Biofilm Res* 2012; **28**: 635–647.
 323. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 3916–3923.
 324. Shu M, Browngardt CM, Chen Y M, Burne RA. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infect Immun* 2003; **71**: 7188–7192.
 325. Kara D, Luppens SBI, Ten Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 58–63.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU METNİNDE BULUNMASI GEREKENLER

“Bu gereklilikleri yerine getirirken, araştırmanın amacı ve yöntemine göre gönüllü olur formunun gerektiğinde hastaların yanı sıra çocuklar, kısıtlılar ve bilinci kapalı bireyler gibi onam yeteneği olmayan ya da kısıtlı olanlar, hasta yakınları, ve sağlıklı kişiler için ayrı ayrı ve dili tıbbi kelimelerden arındırılarak, katılımcıların anlayabileceği şekilde hazırlanmasına özen gösterilmelidir”

I-Araştırmayla İlgili Bilgi Verilmesi;

“Farklı remineralizasyon ajanlarının kök çürüklerine etkisinin in vitro olarak incelenmesi” konulu, sığır dişleri üzerine uygulanan çeşitli ajanların remineralize edici ve antibakteriyel etkileri araştırılacak olan çalışmaya dahil edilmek istediğinizi belirtir onam belgesidir.

Araştırmadaki biyofilm değerlendirmeleri için sistemik olarak herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan, rastgele seçilmiş, 3 ay öncesine kadar herhangi bir ilaç almamış, aktif çürüğü ve periodontal hastalığı bulunmayan tek bir donörden tükürük örneği toplanacaktır. Tükürük toplanmadan önce 1,5 saat bir şey yiyip içilmemelidir. Dişler 2 dakika boyunca sadece su ile çalkalanacak ve 15 dakika boyunca uyarılmamış tükürük toplanacaktır.

İşlemi takiben herhangi bir olumsuz etki gerçekleşmesi beklenmemektedir.

Bu çalışmanın çıktıları neticesinde günümüz diş hekimliğinin önemli konularından birisi konumunda kök çürükleri ile ilgili klinisyenlere önemli bir katkı sağlanması, elde edilen veriler ışığında remineralizasyon etkilerinin tespit edilmesi hedeflenmektedir.

II-Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Verilmesi

Araştırma yönteminde kullanılan yöntem rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Tedavi gereksiniminiz bulunduğu için hali hazırda gerçekleştirilecek bir tedavi yönteminin uzman diş hekimlerince periyodik olarak incelenip kayıt altına alınması neticesinde bilimsel olarak klinik diş hekimliğine katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

Çalışmaya katılım tamamen hür iradeniz doğrultusunda gerçekleştirilecektir. Bu çalışmaya katılmamanız size yapılacak olan tedavinin olumsuz olarak seyretmesine yol açmayacaktır. Çalışmaya katılma kararı verdikten itibaren istediğiniz zaman gerekçe belirtmeksizin çalışma sürecinden kendi rızanız doğrultusunda çekilebilirsiniz. Bu durum da yine tedavinizi olumsuz olarak etkilemeyecektir.

Çalışma süresince gerçekleştirilecek olan işlemlerden doğacak olan maliyet hiçbir şekilde size veya sosyal güvenlik kurumunuza yansıtılmayacaktır. Bu masraflar çalışma bütçesi tarafından size aksettirilmeden karşılanacaktır.

Çalışma kapsamında elde edilecek tüm verilen yine aynı çalışma içerisinde kullanılacak, başka kişiler veya farklı çalışmalar için kullanılmayacaktır. Kayıt altına alınan kimlik bilgileriniz tamamen gizli bir şekilde dökümente edilip saklanacaktır. Üçüncü şahıslarla paylaşılmayacaktır.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

(Bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

Sayın Doç. Dr. Ayşe Dina Erdilek tarafından İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı'nda in vitro bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar

verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte Doç. Dr. Ayşe Dina Erdilek, 440 00 00 numaralı telefondan ve İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı adresinden arayabileceğimi ve ulaşabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

**Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının
Adı-soyadı/ İmzası/ Tarih**

**Gerekliyse olur işlemine tanık olan kişinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi
(varsa telefon no., faks no,...)**

**Gerekliyse yasal temsilcisinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon
no., faks no,...)**

ETİK KURUL KARARI



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı :429

11.07.2019

Konu :Doç.Dr.Ayşe Dina Erdilek

Sayın Doç.Dr.Ayşe Dina Erdilek
Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı

İlgili: İÜ Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalının 28/06/2019 gün ve 129019 sayılı yazısı.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2019/63 dosya nolu "Farklı Remineralizasyon Ajanlarının Kık Çürüklerine Etkisinin İn-Vitro Olarak İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 11/07/2019 tarih ve 88 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş ve tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. Faruk Haznedaroğlu
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik
Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Eki: İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı remineralizasyon ajanlarının kök çürüklerine etkisinin in-vitro olarak incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2019/63

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08.07.2019	2019/63	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNCÜLLÜ OLUR FORMU	08.07.2019	2019/63	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	SİGORTA	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐
	E.A.N	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
	SONUÇ RAPORU	☐
	GÜVENLİLİK DİLDİRİMLERİ	☐
	DİĞER:	☒

KARAR BİLGİLERİ

Karar No:429 Tarih: 11.07.2019

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri cükkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına teyidatya kınılar etik kurul aye tam sayısının sağı gıgınlığı ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kuramı'ndan izin alınması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF. DR. FARUK HAZNEDAROĞLU

İsminin:Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Faruk Haznedaroğlu	Endodonti	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi(BASKAN)	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Gamze Aras	Pedodonti	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi(BASKAN Y.)	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Levent Ertugrul	Fizyoloji	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H X	E ☐	H X	
Prof. Dr. Mustafa Demirci	Restoratif Dış Tedavi	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. İlknur Özcan	Ağız, Dış ve Çene Radyolojisi	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H X	E ☐	H X	
Prof. Dr. Fanda Yalçın	Periodontoloji	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Nil Cera	Ortodonti	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H X	E ☐	H X	
Prof. Dr. Fatma Gölbaşar Işık	Protetik Dış Tedavi	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Yusuf Emes	Ağız, Dış Çene Hastalıkları Cerrahisi	İ.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Op. Dr. Ahmet Kocakuşak	Genel Cerrahi	S.B. Haseki Eğitim	E X	K ☐	E ☐	H X	E ☐	H X	
Prof. Dr. Nurey Özgüllner	Halk Sağlığı	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	

Prof. Dr. Faruk Haznedaroğlu
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer alınmadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı remineralizasyon ajanlarının kök çürüklerine etkisinin in-vitro olarak incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2019/63

Doç.Dr.Güçlü Akyürek	Hukuk	MEF.Ü.Hukuk Fak	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Doç.Dr.Zeyha Paşa Kuru	Farmakoloji	I.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☐	KX	E ☐	H X	E X	H ☐	
Neçdet Eldoğan	Eğitim Fakültesi	Onsekili	E ☐	KX	E ☐	H X	E X	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Faruk Haznedaroğlu
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmamalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve	Soyadı	ŞAHİN
Doğ.Yeri		Doğ.Tar.	
Email		Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	-	-
Yük.Lis.	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2015
Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2015
Lise	Gaziantep Fen Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzmanlık öğrencisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2017
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce					

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Adobe Photoshop	Orta