

Farklı Remineralizasyon Ajanlarının Lazer ve Ozon Tedavisi ile Kombine Kullanımının Başlangıç Çürüklerine Etkisinin İn-Vitro Olarak İncelenmesi

An In-Vitro Investigation of the Effects of Different Remineralization Agents Combined with Laser and Ozone Therapy on the Initial Caries Lesions

Emine TAŞTAN^a, Eda GÜLER^b, Fatma AYTAÇ BAL^c

^aÖzel Denthol Dış Polikliniği, Tokat, TÜRKİYE

^bOndokuz Mayıs Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Restoratif Dış Tedavisi ABD, Samsun, TÜRKİYE

^cBeykent Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Restoratif Dış Tedavisi ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Bu in vitro çalışmanın amacı, başlangıç mine çürüğü olan dişler üzerinde florür, kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP), novamin ile lazer uygulaması ve ozon uygulamasının tek başına veya birlikte kullanımının, remineralizasyon etkinliğini değerlendirmektir. **Gereç ve Yöntemler:** Bu amaçla sıgır dişleri toplanarak, başlangıç çürüğü elde edilmiştir. Her grupta 15 diş olacak şekilde 11 grup (florür, CPP-ACP, novamin, lazer, lazer+florür, lazer+CPP-ACP, lazer+novamin, ozon, ozon+florür, ozon+CPP-ACP, ozon+novamin) oluşturulmuştur. Tedavi etkinliği mikrosertlik ölçümü, taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) mineral analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, tek yönlü ve 3 yönlü varyans analizi kullanılarak yapılmıştır ($p<0,05$). **Bulgular:** Mikrosertlik verileri karşılaştırıldığında en yüksek değer lazer+florür grubunda izlenirken, en düşük ozon grubunda gözlemlenmiştir. EDX analiziyle kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) oranları değerlendirildiğinde en yüksek Ca değeri lazer+novamin grubunda izlenirken, en yüksek P değeri novamin, lazer+CPP-ACP, lazer+novamin ve ozon+novamin gruplarında bulunmuştur. SEM değerlendirmesi sonucunda, tüm grupların mine yüzeyleri sağlam ve demineralize örneğe göre morfolojik değişimler göstermiştir. **Sonuç:** Çalışmamızın sonuçlarına göre Er:YAG lazer ve kombine remineralize edici ajan uygulaması, başlangıç çürüğünün remineralizasyonunda etkili bir metod olarak bulunmuştur. Ozon uygulamasının başlangıç çürüğünün remineralizasyonundaki etkinliği ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.

ABSTRACT Objective: This in vitro study aimed to evaluate effectiveness of remineralization alone or combined use of fluoride, casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate (CPP-ACP), novamin, laser and ozone application on enamel initial caries. **Material and Methods:** For this purpose, bovine teeth were collected and obtained initial caries lesions. 11 groups (fluoride, CPP-ACP, novamin, laser, laser+fluoride, laser+CPP-ACP, laser+novamin, ozone, ozone+fluoride, ozone+CPP-ACP, ozone+novamin) each group to be 15 teeth were established. Effectiveness of treatment was evaluated by micro-hardness measurement, scanning electron microscopy (SEM) images and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Statistical analysis of the resulting data was performed ($p<0.05$). **Results:** When compared microhardness data, the laser+fluoride group observed the highest value and the ozone group observed the lowest group. When compared the EDX analysis of calcium (Ca) and phosphate (P) ratio, the highest Ca value was observed in the laser+novamin group, the highest P value was observed in the novamin group, the laser+CPP-ACP group, the laser+novamin group and the ozone+novamin group. As a result of SEM evaluation, enamel surfaces of the entire groups showed morphological changes based on sound and demineralized sample. **Conclusion:** According to our results, combined Er:YAG laser and remineralizing agents application was found to be an effective method for the remineralization of initial caries. Remineralization effectiveness of the application of ozone in the initial caries should be investigated in the future studies.

Anahtar Kelimeler: Demineralizasyon; mine, lazer; mine; ozon; remineralizasyon

Keywords: Demineralization; enamel; lazer; ozone; remineralization

Ağızdaki mikroflora ile konak biyolojisi arasındaki dengenin bozulmasıyla karyojenik mikroorganizmaların, fermente olabilen karbonhidratları

kullanarak oluşturdukları organik asidin, demineralizasyona sebep olmasıyla diş sert dokularındaki minerallerin çözünmesiyle çürük oluşur.¹

Correspondence: Eda GÜLER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Restoratif Dış Tedavisi ABD, Samsun, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: edaguler@omu.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

Received: 04 Mar 2020

Received in revised form: 23 Jul 2020

Accepted: 02 Aug 2020

Available online: 17 Dec 2020

2146-8966 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Kavitasyon oluşmamış başlangıç mine lezyonlarında, mine prizmaları içindeki orijinal kristal ağın büyük bölümü asitten etkilenmiş, ancak tamamen yok olmamış kristalitler remineralizasyon için çekirdeklenme bölgesi olarak görev yapmaktadırlar. Remineralizasyon önleyici tedavi ile restoratif tedavi arasındaki boşluğu kapatabilecek bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır.² Tükürükteki kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) iyonlarının çökmesi ile remineralizasyon süreci başlar, remineralizasyon ile başlangıç lezyonları geri döndürülebilir ve bu durumda mineyi daha sağlam bir duruma getirir.³

Başlangıç çürüklerinin remineralizasyonu amacıyla kullanılan, çeşitli remineralizasyon ajanları bulunmaktadır. Florür, bu amaçla en çok kullanılan ve uygulama sonrası kalsiyum florür (CaF₂) oluşturarak remineralizasyon etkinliği sağladığı rapor edilen bir ajandır.⁴ Kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP), CPP'nin Ca ve P'yi sabitleyerek etki ettiği bir ajandır ve diş minesini üzerinde remineralizasyon oluşturduğunu rapor eden birçok çalışma bulunmaktadır.^{5,6}

Diğer bir ajan olan novamin, mine yüzeyinde yüksek konsantrasyonlarda Ca ve P birikimini sağlar ve doğal diş minerallerine kimyasal olarak benzer bir mineral olan hidroksikarbonat apatit tabakası oluşturur. Bu partiküller diş yüzeyine bağlanarak, mine ve dentinin remineralizasyonu sağlamaktadır.^{7,8} Lazerin, diş hekimliği uygulamasına girmesinden bu yana çürük önleme üzerine olan etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve sağlıklı diş dokularının korunmasında ve hastalıklı dokuların tamamının ortadan kaldırabilmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir.⁹ Yapılan çalışmalarda, lazer ve asitlendirilmiş fosfat florür (APF) jelinin kombinasyonu tek başına lazer uygulamasına göre daha etkin bulunmuştur.¹⁰ Lazer uygulaması ve CPP-ACP kombinasyonu yapılan çalışmalarla araştırılmıştır.¹¹ Literatürde, çürük önlemeye yönelik olarak lazer ve novamin kombine tedavi yönteminden bahseden bir çalışma henüz yoktur.

Ozon uygulamasının remineralizasyon etkinliği yapılan çalışmalarla araştırılmıştır ve çürük lezyonundaki proteinleri kaldırarak, Ca, P ve flor iyonlarının çürük lezyonuna difüzyonu ile remineralizasyonu sağladığı rapor edilmiştir.¹²⁻¹⁴ Literatür incelendi-

ğinde, ozon ve florür ajanını kombine uygulanmasını araştıran çalışmalar bulunmasına rağmen çürük önlemeye yönelik olarak ozon ve CPP-ACP ile ozon ve novamin kombine tedavi yöntemini araştıran çalışma bulunmamaktadır.^{15,16}

Bu çalışmanın hipotezi diş minesini üzerinde, lazer ve ozonun remineralizasyon ajanlarıyla kombine kullanımının bu ajanların remineralizasyon etkinliğini artırabileceğidir.

Çalışmamızın sonuçlarının, günümüzde klinik kullanıma girmiş olan lazer ve ozon gibi modern sistemlerin, remineralizasyon ajanlarının etkinliğine katkısının değerlendirilmesine yardımcı olacağını ve konservatif diş hekimliğinde önemli bir yerde bulunan çürükten korunma stratejilerinin geliştirilmesi, toplum ağız-diş sağlığının iyileştirilmesi konusunda klinisyenlere ışık tutacağını düşünmekteyiz.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, yeni çekilmiş çürüksüz, kırık ve malformasyonu olmayan 165 adet sıgır kesici dişi dâhil edildi. Dişlerin kökleri su soğutması altında, elmas bir separe yardımıyla kron kısmından ayrıldı. Dişlerin kronlarının, labial yüzlerinden su soğutması altında düşük hızlı mikrotom cihazı (Isomet, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, ABD) ile çift taraflı kesen elmas ince bıçak kullanılarak, bukkolingual yönde 2 mm kalınlığında mine örneği elde edildi. Daha sonrasında elmas diskler kullanılarak, yaklaşık 9x4x2 mm (uzunlukxgenişlikxkalınlık) boyutlarında olacak şekilde mine örnekleri hazırlandı. Yüzeyler, öncelikle su soğutması altında alüminyum oksit cila diskleri (Sof-Lex Extra Thin, 3M ESPE, St. Paul, USA) kullanılarak kalından inceye doğru aşındırıldı ve sonrasında 320, 600 ve 1.200 grit silikon karbid zımpara kağıtları yardımıyla su irrigasyonu altında düzeltildi.¹⁷ Cilalama sonrasında örnekler, distile su ile yıkayıp kurutuldu. Böylece minenin en dış tabakası cilalanarak, hem düz hem de kontamine olmamış bir yüzey elde edildi. Mine yüzeyi dışındaki tüm diş yüzeyleri aside dirençli tırnak cilası yardımıyla kaplandı. Ayrıca örnek yüzeyi 3 bölüme ayrılıp, üst yüzeylerinin yaklaşık yarısı (1/3) ve yapay çürük oluşturulduktan sonra da kalan yüzeyin yarısı tırnak cilası ile kaplandı (Şekil 1).

DEMİNERALİZASYON SOLÜSYONUNUN HAZIRLANMASI

Demineralizasyon solüsyonu Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD’de 1 lt cam şişede 2,2 mM CaCl₂, 2,2 mM NaH₂P, 50 mM asetik asit olacak şekilde ve pH 4,4 oluncaya kadar KOH eklenerek hazırlandı.¹⁸ Hazırlanan örnekler demineralizasyon solüsyonunda ve 37 °C’de etüv içerisinde 4 gün bekletilerek yapay çürük lezyonları oluşturuldu. Minede oluşturduğumuz başlangıç çürük lezyonunun yapısının incelemesi için taramalı elektron mikroskopu (SEM) cihazıyla mine örneklerinin yüzey analizi ve görüntüsü elde edildi.

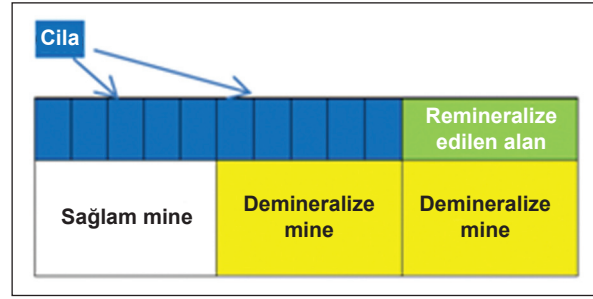
Demineralizasyonu takiben yapay çürük oluşturulan mine örneklerinin, demineralize edilen bölümlerinin yarısı da tırnak cilası ile yeniden kapatılarak örnek yüzeylerinin 2/3’ü örtülü, 1/3’ü temas alanı olarak bırakıldı.

Tedavi amacıyla remineralizasyon ajanları, mine örneğinin son 1/3 kısmına uygulandıktan sonra örneklerin üzerindeki tırnak cilası, kullanılan bir kesici uçlu spatülle mine yüzeylerine temas etmeyecek şekilde soyularak dikkatlice temizlendi.

Çalışma gruplarında florür içeren remineralizasyon ajanı olarak, %1,23’lük APF (Gelato APF, Mycone Dental Supply Co., ABD) jeli kullanıldı. Bu jel, %1,23 sodyum florür içerir ve pH’si 3,5’tir.

Çalışma gruplarında CPP-ACP içeren remineralizasyon ajanı olarak, %10’luk CPP-ACP içeren MI Paste (Recaldent TM; GC Corp., Japonya) kullanıldı.

Çalışma gruplarında novamin içeren remineralizasyon ajanı olarak, Dr. Collins Restore toothpaste



ŞEKİL 1: Diş örneğine laboratuvar işlemlerinin uygulama yönteminin şematik olarak gösterilmesi.

(Dr. Collins Inc, Orange County, Kaliforniya) kullanıldı. Kullanılan remineralizasyon ajanları ve içerikleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Lazer gruplarında uygulanmak üzere Er:YAG lazer (KaVo K-E-Y Laser3⁺ 1343, Almanya) 10 hertz frekans, 0,8 W güç ile su soğutması altında 30 sn süreyle uygulandı.¹⁹

Ozon gruplarında uygulanmak üzere ozon cihazı (OzonyTron XP, MIO International ozonytron, Almanya), üretici firmanın talimatına uygun olacak şekilde başlangıç mine çürükleri için kullanılan prosedür olan 60 µg ozon 30 sn boyunca uygulandı.

ÖRNEKLERİN GRUPLARA AYRILMASI VE TEDAVİLERİN UYGULANMASI

Mine örneğinin ilk kısmına hiçbir şey uygulanmayarak sağlam mine (negatif kontrol grubu), örneğin 2. kısmı ise demineralizasyondan sonra üzeri kapatılıp sadece demineralizasyon solüsyonuna maruz bırakılarak (pozitif kontrol grubu), her bir grubun kendi içerisinde oluşturuldu.

TABLO 1: Remineralizasyon ajanları ve üretici firmalara göre verilen içerikleri.

Materyal	İçeriği
APF jeli (Gelato APF, Mycone Dental Supply Co., ABD)	Sodyum florid, hidroflorik asit, sitrik asit monohidrat, magnezyum alüminyum silikat, fosforik asit, polisorbitat 20, sodyum benzoat, sodyum sakarin, su, ksantan sakızı, ksilitol, tatlandırıcı
CPP-ACP krem (MI Paste, Recaldent, GC Corp., Japonya) (% 10 CPP-ACP)	Saf su, gliserol, CPP-ACP, D-sorbitol, CMC-Na, propilen glükol, silikon dioksit, titanyum dioksit, ksilitol, fosforik asit, tatlandırıcı, sodyum sakarin, etil p-hidroksibenzoat, magnezyum oksit, propil p-hidroksibenzoat, butil p-hidroksibenzoat.
Dr. Collins restore remineralizing paste (Dr. Collins Inc, Orange County, Kaliforniya)	Novamin (kalsiyum sodyum fosfosilikat), gliserin, amorf silika, PEG 400, sodyum lauril sülfat, tatlandırıcı, karbomer, potasyum acesülfam, titanyum dioksit

APF: Asitlendirilmiş fosfat florid; CPP-ACP: Kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat; CMC: Karboksimetil selüloz.

Ön hazırlık işlemi biten örnekler, her grupta 15 diş olacak şekilde rastgele 11 gruba ayrıldı. Gruplara ayrıldıktan sonra mine örneğinin son kısmına tedavi protokolleri aşağıdaki şekilde uygulandı:

Grup 1: Florür içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra APF jeli uygulanan grup.

Grup 2: CPP-ACP içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra CPP-ACP kremi uygulanan grup.

Grup 3: Novamin içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra Dr. Collins Restore toothpaste uygulanan grup.

Grup 4: Lazer uygulama: Demineralizasyon siklusundan sonra lazer uygulanan grup.

Grup 5: Lazer+Florür içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce lazer sonra APF jeli uygulanan grup.

Grup 6: Lazer + CPP-ACP içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce lazer sonra CPP-ACP kremi uygulanan grup

Grup 7: Lazer+Novamin içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce lazer sonra Dr. Collins Restore toothpaste uygulanan grup.

Grup 8: Ozon uygulama: Demineralizasyon siklusundan sonra ozon uygulanan grup.

Grup 9: Ozon+Florür içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce ozon sonra APF jeli uygulanan grup.

Grup 10: Ozon+CPP-ACP içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce ozon sonra CPP-ACP kremi uygulanan grup.

Grup 11: Ozon+Novamin içeren remineralizasyon ajanı: Demineralizasyon siklusundan sonra, önce ozon sonra Dr. Collins Restore toothpaste uygulanan grup.

REMINERALİZASYON AJANLARININ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Minede oluşturduğumuz başlangıç çürük lezyonunun yapısı ve tedavi sonrasında oluşan değişikliklerin belirlenebilmesi amacıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Karadeniz İleri Teknik Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan SEM cihazıyla mine örneklerinin yüzey analizi ve görüntüsü elde edildi. Tüm örnekler havasız bir ortamda vakum cihazı (Quorum SC7620, Quorum Technologies Ltd, İngiltere) ile 20 mA akım şiddetinde, numunenin üzerine altının püskürtülmesiyle oluşan ince bir filmle kaplandı ve SEM cihazı (Jeol JSM-7001F, Japonya) ile $\times 2.500$ büyütme altında görüntüler elde edildi.

Ayrıca uygulanan tedavi ajanlarının, mine örneklerinin mineral düzeyinde oluşturduğu değişiklikler enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX)-SEM (Jeol Jsm-7001f, Japonya) kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir gruptan 5 adet mine örneğinin mineral analizi SEM-EDX kullanılarak yapıldı. Her bölgeye ait yüzey element analizi yapılarak %Ca ve %P değerleri kaydedildi.

Mine örneklerinin tırnak cilası ile kaplanan kısımları, ince uçlu bir spatül yardımıyla yüzeye zarar vermeden çıkarıldı. Her kısmın ayrı ayrı sertlik değerleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında bulunan Barcol yüzey sertlik ölçüm cihazı (GYZJ 935, Sheen, İngiltere) ile ölçüm yapıldı. Cihazın keskin 1 mm çapındaki ucu yüzeye temas edecek şekilde örnek üzerine yerleştirildi. Cihaz üzerindeki skalada uygulanan kuvvet 0-100,25 arasında olup, örnek yüzeyinden üçer adet olacak şekilde ölçüldü ve ortalamaları alınarak kaydedildi.

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen değerler, başlangıç, demineralizasyondan sonra ve tedavi aşamalarından sonra istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Veriler, ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmaktadır. Sürekli değişkenler yönünden 3 grup arasında farklılık arandığında, tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Bağımlı değişkenler açısından grup ve yöntem grupları arasındaki farklılık, tekrarlı ölçümlerde 3 yönlü varyans analizi kullanılarak yapıldı. Nicel değişkenler aritmetik ortalama \pm standart sapma biçiminde gösterildi. p değerleri 0,05'ten küçük olarak hesaplandığında (p<0,05) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hesaplamalar hazır istatistik yazılımı ile yapıldı (IBM SPSS Statistics 19, SPSS inc., an IBM Co., Somers, NY).

BULGULAR

ENERJİ DAĞILIMLI X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ VERİLERİ İLE DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışmamızda, sağlam mine örnekleri demineralize edildikten sonra Ca ve P oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmiştir ($p<0,05$).

Çalışmamızdaki demineralize edilen örneklerle karşılaştırıldığında, tüm remineralizasyon gruplarında Ca değerinde artış gözlenmiştir. Ca değerinde en fazla artış 43,5 değeriyle lazer+novamin grubunda izlenmiştir ($p<0,05$).

Çalışmamızdaki demineralize edilen örneklerle karşılaştırıldığında, ozon dışındaki tüm remineralizasyon gruplarında P değerinde artış gözlenmiştir. P değeri novamin, lazer+CPP-ACP, lazer+novamin ve ozon+novamin gruplarında istatistiksel olarak diğer gruplardan anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Flor, CPP-ACP ve novamin grubu birbiriyle karşılaştırıldığında en fazla Ca artışı, flor ve novamin grubunda izlenirken, 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). En az Ca artışı, CPP-ACP grubunda izlenmiştir ($p<0,05$).

Lazerin tek başına uygulandığı grupta Ca ve P değerleri demineralize edilen örneğe göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Lazer+flor grubunda, Ca ve P değerleri tek başına flor uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). Lazer+CPP-ACP grubunda Ca ve P değerleri tek başına CPP-ACP uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır ($p<0,05$). Lazer+novamin grubunda Ca değeri tek başına novamin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır ($p<0,05$). P değeri novamin grubuyla benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

Ozon grubunda Ca değeri çok az artış göstermiştir ($p<0,05$), P değeri ise demineralize edilen grupla benzer değerler göstermiştir ($p>0,05$). Ozon+flor grubunda Ca değeri, tek başına flor uygulanan gruba göre çok az artış göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). P değeri ise artış göstermiştir ($p<0,05$). Ozon+CPP-ACP grubunda Ca ve P değeri tek başına CPP-ACP uygula-

TABLO 2: Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi değişkenlerinin gruplara göre dağılımı (her bir değişken için gruplar arası karşılaştırma (tek yönlü varyans analizi)) (a,b,c,d,e,f,g,h,i).

	Ca	P
	Ortalama±SS	Ortalama±SS
Sağlam	35,58±0,19 (g)	18,56±0,23 (e)
Demineralize	32,08±0,36 (i)	17,22±0,13 (f)
Flor	41,24±0,22 (c)	19,56±0,27 (d)
CPP-ACP	37,2±0,16 (e)	20,4±0,2 (bc)
Novamin	41,42±0,24 (c)	21,5±0,2 (a)
Lazer	36,38±0,22 (f)	19,54±0,15 (d)
Lazer+flor	42,44±0,24 (b)	20,5±0,2 (bc)
Lazer+CPP-ACP	38,42±0,22 (d)	21,5±0,16 (a)
Lazer+novamin	43,5±0,29 (a)	21,58±0,19 (a)
Ozon	32,88±0,08 (h)	17,5±0,22 (f)
Ozon+flor	41,5±0,23 (c)	20,22±0,4 (c)
Ozon+CPP-ACP	37,32±0,28 (e)	20,7±0,16 (b)
Ozon+novamin	42,04±0,33 (b)	21,6±0,19 (a)

Ca: Kalsiyum; P: Fosfat; CPP-ACP: Kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

nan gruba göre çok az artış göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Ozon+novamin grubunda Ca değeri tek başına novamin uygulanan gruba göre çok az artış göstermiştir, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). P değeri novamin grubuyla benzer bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 2).

SERTLİK VERİLERİ İLE DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışmamızda mine örneklerinin sağlam, demineralize ve remineralize edildikten sonra sertlik değerleri her örnekten 3 kez ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir.

Sağlam mine sertlik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Demineralize edilen tüm gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Remineralizasyon yöntemlerine göre tüm gruplar anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Flor, CPP-ACP ve novamin ajanları tek başına uygulanan örneklerin sertlik değerleri birbiriyle karşılaştırıldığında flor uygulanan grup en yüksek sertlik değeri gösterirken, CPP-ACP en düşük değeri göstermiştir ($p<0,05$).

Lazer uygulama sonrası mine örneklerinin sertlik değeri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$). Lazer ve remineralizasyon ajanlarının birlikte uygulandığı tüm kombine gruplarda sertlik değerleri, remineralizasyon ajanlarının tek başına uygulandığı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

Ozon uygulanan grupta sertlik değerindeki artış, diğer gruplara göre en düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ozon+flor ve ozon+CPP-ACP kombine gruplarında sertlik değerleri, remineralizasyon ajanlarının tek başına uygulandığı gruplara göre çok az artış göstermesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$), ancak ozon+novamin grubu için bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 3).

Uygulama sonrası grupların SEM verileri ile değerlendirme bulguları Resim 1’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Çekilmiş dişler üzerinde yapay çürük lezyonu oluşturularak, çeşitli materyallerin remineralizasyon etkinliğinin incelendiği pek çok in vitro çalışma mevcuttur.²⁰⁻²⁵ Bu çalışmada da modern tanı yöntemleri kullanarak, günümüzde klinik uygulamaya girmiş ve dental piyasada bulunan remineralizasyon materyallerinin etkinliklerinin değerlendirilmesi ile

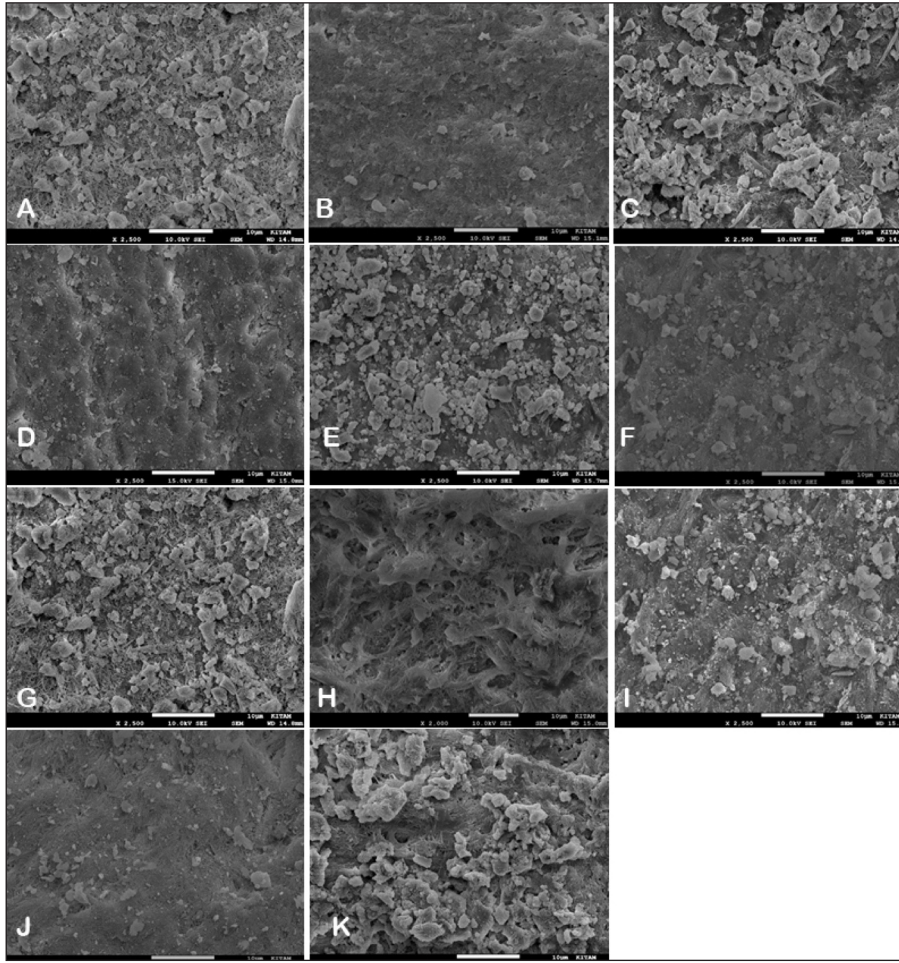
koruyucu diş hekimliğine katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Bu amaçla florür, CPP-ACP, novamin içeren remineralizasyon ajanları ile lazerin ve ozonun tek başına veya remineralizasyon ajanlarıyla beraber kullanımının, mine üzerindeki remineralizasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Test edilen hipotez diş minesinde, lazer ve ozonun remineralizasyon ajanlarıyla kombine kullanımının, bu ajanların remineralizasyon etkinliğini artırabileceğidir. Çalışmamızın sonucunda, remineralizasyon ajanlarının lazerle kombine kullanımı remineralizasyon etkinliğini artırırken, ozonla kombine kullanımı bu etkiyi artırmamıştır. Sonuç olarak hipotez, kısmen kabul edilmiştir.

Başlangıç çürük lezyonlarına CO₂ lazer, Nd:YAG lazer ve florür ile tedavi uygulanması sonrası meydana gelen değişimlerin incelendiği in vitro çalışmada SEM kullanılmıştır. Chin-Ying ve ark.nın lazerin minenin florür alımına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, lazer+florür uygulamasında 2-4 µm boyutlarında CaF₂ benzeri küresel depolar gözlenmiş ve ayrıca bazı depoların, kümeleşerek yüzeyi düzensiz gibi gösterdikleri belirlenmiştir.²⁶ Sadece florür tedavisi yapılan grupta ise benzeri depolar lazer uygulanmış yüzeydekine oranla daha düşük bulunmuştur. Lazer uygulanan yüzeydeki florür miktarının artmasının 2 olası nedeni belirtilmiştir. Lazerin termal etkisiyle florür alımını desteklenmekte veya

TABLO 3: Grup ve yöntem faktörüne göre ölçümlerin dağılımı.

Gruplar	Sağlam (Ortalama±SS)	Deminerlizasyon (Ortalama±SS)	Remineralizasyon (Ortalama±SS)
Flor	96,88±0,6 (A,n)	52,42±0,44 (B,x)	86,98±0,2 (C,c)
CPP-ACP	96,87±0,25 (A,n)	52,38±0,49 (B,x)	79,09±0,32 (C,f)
Novamin	96,91±0,2 (A,n)	52,36±0,53 (B,x)	85,07±0,26 (C,e)
Lazer	96,90±0,2 (A,n)	52,33±0,47 (B,x)	75,2±0,28 (C,g)
Lazer+flor	96,92±0,2 (A,n)	52,24±0,51 (B,x)	92,56±0,35 (C,a)
Lazer+CPP-ACP	96,91±0,2 (A,n)	52,36±0,5 (B,x)	85,02±0,34 (C,ej)
Lazer+novamin	96,92±0,2 (A,n)	52,4±0,42 (B,x)	89,89±0,35 (C,b)
Ozon	96,91±0,2 (A,n)	52,42±0,44 (B,x)	56,16±0,79 (C,h)
Ozon+flor	96,89±0,2 (A,n)	52,38±0,43 (B,x)	87,33±0,45 (C,ci)
Ozon+CPP-ACP	96,91±0,2 (A,n)	52,29±0,42 (B,x)	79,2±0,25 (C,fk)
Ozon+novamin	96,90±0,2 (A,n)	52,38±0,52 (B,x)	86,09±0,47 (C,d)
Total	96,88±0,27 (M)	52,36±0,46 (N)	82,54±8,34 (O)

CPP-ACP: Kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat; (A,B,C): Satır olarak her bir grupta yöntemler arası karşılaştırma; (n): Sağlam gruplar arası karşılaştırma; (x): Deminerlizasyonda gruplar arası karşılaştırma; (a,b,c,d,e,f,g,h,i,k): Remineralizasyonda gruplar arası karşılaştırma; (c): gruplar arası karşılaştırma; (M,N,O) yöntemler arası karşılaştırma. Farklı harflendirme istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.



RESİM 1: A) Flor grubu taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (x2.500); B) Kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat (CPP-ACP) grubu SEM görüntüsü (x2.500); C) Novamin grubu SEM görüntüsü (x2.500); D) Lazer grubu SEM görüntüsü (x2.500); E) Lazer+flor grubu SEM görüntüsü (x2.500); F) Lazer+CPP-ACP grubu SEM görüntüsü (x2.500); G) Lazer+novamin grubu SEM görüntüsü (x2.500); H) Ozon grubu SEM görüntüsü (x2.500); I) Ozon+flor grubu SEM görüntüsü (x2.500); J) Ozon+CPP-ACP grubu SEM görüntüsü (x2.500); K) Ozon+novamin SEM görüntüsü (x2.500).

lazer uygulandığında yüzey morfolojisi değişerek, pürüzlülük ve birtakım mikroboşluklardan florür alınımı artmaktadır. Çalışmada, lazer florür kombinasyonunun, minenin yüzey özelliklerini tek başına lazer uygulamasından daha fazla değiştirdiği belirtilmektedir. Lazer uygulanmış yüzeyde mikroporlar ve mikroçatlaklar mineye florür girişini kolaylaştırabilir, ancak çalışma sonuçlarında belirgin derecede artmış mikropor veya mikroçatlaklar gözlenmemektedir ve bunun dışında florür benzeri depoların varlığı belirtilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak, çalışmamızda da başlangıç mine çürüğü oluşturulduktan sonra florür uygulanan örnek yüzeylerinde CaF_2 akümüasyonu meydana gelmiş ve bazı bölgelerde birikmiştir, sonuç olarak mine yüzeyi düzensiz

görülmektedir. Yine çalışmamızda, başlangıç mine çürüğüne lazer+florür uygulanan grupta CaF_2 depolarının tek başına APF jeli uygulanan gruptan daha fazla olduğu izlenmiştir (Resim 1). Çalışmamızın lazer grubu, APF grubu ve L+APF grubunun bulgularıyla, Chin-Ying ve ark.nın bulguları uyumluluk göstermektedir.²⁶

Asl-Aminabadi ve ark.nın yaptığı çalışmada, lazer ve CPP-ACP uygulaması sonrası mine görüntüleri SEM ile incelenmiş ve lazer uygulanan grubun SEM görüntülerinde, irregüler pürüzlü bir yüzey gözlenmiştir.²⁷ Tipik erime görüntüsü izlenirken, az rastlanan şekilde çatlak, devamsızlık, globül ve çukurların kaynaşmasına rastlanmıştır. Irregüler görüntüden sorumlu kaviteasyon ve kraterler mevcuttur.

Yine aynı araştırmacılar CPP-ACP uygulanan grubun SEM görüntülerinde, mine yüzeyine sayısız granüler partikül ve amorf kristalleri izlenirken, bu partiküllerin homojen olduğu ve açık interkristalin boşlukların hiç olmadığı belirtilmiştir. Lazer+CPP-ACP uygulanan grubun SEM görüntüsünde, diğer tedavilere göre nispeten daha düz ve daha homojen bir görüntü izlenmiştir. Mine yüzeyinde daha az kırık gözlenmiştir. Mine yüzeyinde, devamlı şekilde birçok granüler ve globüler oluşum ve amorf homojen kristaller izlenmiştir. Çalışmamızda da lazer ve CPP-ACP uygulanan mine yüzeyinin SEM görüntüsü incelendiğinde, tek başına CPP-ACP uygulanan mine örneğine göre daha yoğun kalsiyum fosfat depozitleri ile yüzeyi örten bir tabaka izlenmiştir (Resim 1).

Nie ve ark., başlangıç çürük lezyonu olan dişlere distile su, florür ve ozon tedavisi uygulamıştır.²⁸ Lezyonların floresans görüntüleri değerlendirildiğinde deiyonize ve ozon grubunda anlamlı bir farklılık izlenmezken, florür uygulanan grup en etkili yöntem olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda da ozon uygulanması sonrası açıkta kalan çukurcukların olduğu ve bazı interkristalin boşlukların kapandığı gözlenmiştir. Remineralizasyonu işaret eden yoğun çökeltmeler gözlenmemiş ve mine yüzeyinde herhangi bir film tabakası oluşmamıştır (Resim 1).

EDX, bir numunenin element analizi veya kimyasal karakterizasyonu için SEM ile birlikte kullanılabilen analitik bir tekniktir.²⁹ EDX'in, in vitro çürük çalışmalarında mineral içeriğindeki değişiklikleri nicel olarak değerlendirmek için etkili bir yol olduğu bulunmuştur.³⁰

Lei ve ark.nın çalışmalarında novamin, CPP-ACPF ve florür remineralizasyon potansiyellerini karşılaştırdıkları çalışmanın EDX analizi sonuçlarında %Ca-Ca/P oranı, florür uygulanan grupta önemli derecede daha yüksek bulunmuştur.³¹ Kontrol ve deney gruplarında %P oranlarının arasında bir farklılık izlenmemiştir. Gjorgievska ve Nicholson, CPP-ACP ve novamin içeren ajanların mine remineralizasyon potansiyellerini karşılaştırdıkları çalışmada EDX analiziyle mineral içeriğini analiz etmişler ve demineralizasyon grubunda Ca=36,89, P=20,55 iken, CPP-ACP grubunda Ca=39,66, P=23,22, novamin grubunda Ca=39,93, P=23,26 olarak bulunmuş-

tur.³² Narayana ve ark.nın çalışmalarında, novamin, florür, CPP-ACP ve CPP-ACPF ajanların remineralizasyon etkinliği EDX ile değerlendirilmiştir.³³ EDX analizinde demineralize edilen grupta Ca=31,14, P=13,24 olarak bulunurken, novamin grubunda Ca=39,99, P=14,00; florür grubunda Ca=32,31, P=14,93; CPP-ACP grubunda Ca=35,08, P=15,89 ve CPP-ACPF grubunda Ca=37,61, P=14,01 olarak bulunmuştur. EDX analizinde en yüksek Ca ve P değerleri novamin grubunda izlenirken, daha sonra sırasıyla CPP-ACPF, CPP-ACP, florür ve kontrol grubunda izlenmiştir. Çalışmamızda, EDX analizine göre demineralize edilen mine örneğinde; Ca=32,58, P=17,22, florür ile remineralize edilen mine örneğinde; Ca=41,24, P=19,56, CPP-ACP ile remineralize edilen mine örneğinde; Ca=37,2, P=20,4 ve novamin ile remineralize edilen mine örneğinde; Ca=41,42, P=21,5 olarak bulunmuştur. Narayana ve ark.nın yaptığı çalışmaya benzer olarak çalışmamızda en fazla Ca artışı novamin grubunda izlenmiştir.³³

CPP-ACP'nin, başlangıç çürüğünün remineralizasyonu ve demineralizasyonun önlenmesi üzerine etki gösterdiği ve bu etkinin de CPP'nin Ca ve P'yi diş yüzeyinde stabilize etme kabiliyetinden kaynaklandığı birçok çalışmada rapor edilmiştir.^{20,34-36} CPP-ACP, florürsüz remineralize ajan olarak üzerinde en çok çalışılan materyal olabilir. Birçok klinik çalışma CPP-ACP'nin, florür içeren ürünlere göre daha iyi mineralizasyon sağladığını göstermiştir.³⁷ CPP-ACP'nin antikaryojenite mekanizması, koloidal kalsiyum fosfat kompleksleridir ki bunlar plak Ca ve P seviyesini artırarak, mine demineralizasyonunu bas-kılamakta ve remineralizasyonu artırmaktadır.³⁸ CPP-ACP dental plak ve diş yüzeyinde bulunarak, bir Ca ve P rezervuarı olarak görev yapmaktadır. Plak Ca ve P seviyesi ile çürük oluşumu arasında ters bir ilişkinin olması da CPP-ACP'nin, bu mekanizmasının demineralizasyonu önlemede ideal bir mekanizma olduğunu göstermektedir.³⁹ Yapılan çalışmalarda, kazinin triptik peptidlerinin intraoral plağa dâhil olarak, plak Ca ve P miktarını artırdığı bulunmuştur.⁴⁰ Çalışmamızda CPP-ACP uygulanan grup, demineralize mineden daha fazla sertlik değerleri göstermiştir. CPP-ACP uygulama sonrası ajan içerisindeki Ca ve P iyonlarının yüzeye çökerek mikrosertlikte artışa sebep olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda tercih edilen lazer tipi Er:YAG lazerdir ve çürük önleme konusunda bu lazerle ilgili literatürde birçok çalışma yer almaktadır.⁴¹⁻⁴³ Er:YAG ve UV lazer ile mine ve dentin yüzeylerinin mineral yapısı, su ve proteinlerin uzaklaştırılması ile ekspozel olur ve florürün yapıya girmesini artırır.⁴⁴

Çürük önlemede lazerin etkisi, yüzeyde ısı oluşumuna rağmen minede meydana gelen kimyasal, fiziksel ve kristalin değişikliklere dayanmaktadır.⁴⁵ Çürüğün önlenmesi için lazerin diş sert dokularının çözünürlüğünün veya kompozisyonunun değiştirilebilmesi gerekmektedir. Bu yüzden lazer ışığının, güçlü bir şekilde absorbe edilmesi ve etkili bir ısıya çevrilerek alttaki ya da çevresel dokulara zarar vermeden, dokunun sadece kimyasal yapısını değiştirmesi beklenmektedir.⁴⁶

Çeşitli lazerler kullanılarak, minedeki yüzey altı demineralizasyon lezyonlarının azaltılabildiği bildirilmesine rağmen lazerin çürük önleme üzerinde gerçek etki mekanizması hâlâ tam olarak bilinmemektedir.⁴⁷ İlk yapılan tanımlamada, minenin yüzey mikroyapısının fiziksel füzyonundan dolayı mine geçirgenliğinin azaldığı ileri sürülmüştür.⁴⁸ Lazer uygulama sonrası meydana gelen çeşitli mekanizmalar, organik matriks ve karbonat içeriğinde kayıp, mine komponentlerinin polarizasyonunda değişiklikler, florür retansiyonunda artış ve minenin çözünmesi için kritik pH'nin 5,5'ten 4,8'e düşmesi olarak söylenebilir.⁴⁹ Sonraki çalışmalar demineralizasyona karşı mine direncinin artmasında, mine yüzeyinin erimesi ve füzyon sürecinin etki ettiğini, aynı zamanda minenin ultrastrüktür yapısının değiştiğini ileri sürmektedir.

Er:YAG lazer ve florür jel uygulamasının remineralizasyon etkinliği en yüksek bulunmuştur. Bu kombinasyon, mine başlangıç çürüğünü etkili bir şekilde durdurabilmektedir.

Ozonun, çürük lezyonundaki bakteri popülasyonuna ciddi bir yıkıcı etki sağladığı ve karyojenik bakterileri yok ettiği, böylece dengenin remineralizasyon yönüne kaymasını sağlandığı bilinmektedir. Böylece lezyonda asit üretimi engellenmiş olmaktadır. Bu bakımdan, çürük lezyonunda bakteri eliminasyonunda ozonun etkisi in vitro olarak çalışılmamıştır. Diğer taraftan ozon, güçlü oksidasyon özellikleri sayesinde

lezyondaki asit ve karbonhidratları azaltarak, remineralizasyon sağlaması da muhtemeldir. Ayrıca ozon çürük lezyonundaki organik materyalleri uzaklaştırabilir ve Ca ve P iyonların lezyon içerisine difüze olmasını sağlayabilir.⁵⁰ Çalışmamızda da ozon uygulanması, in vitro koşullarda uygulanmıştır böylece ozonun, mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkinliği gösterilemediği için muhtemel remineralizasyon etkisi gözlenememiş olabilir.

Bu çalışmanın limitasyonu, çalışma periyodunun kısa süreli olması ve in vitro koşullarda ağız ortamını tam taklit edememesidir. Demineralize minenin korunması üzerine bu tip tedavilerin, etkilerinin belirlenmesi ve aynı zamanda bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda iyi tasarlanmış, randomize ve klinik kontrollü çalışmalar, in vivo şartlarda veya ağız şartlarının taklit edildiği ortamlar sağlanarak yapılması gerekmektedir.

SONUÇ

Modern diş hekimliği anlayışında, sağlam diş dokusunun korunması ve demineralize alanların madde kaybı olmaksızın remineralize edilebilmesi ön plana çıkmıştır. Bunun için remineralizasyona yönelik ilgi artmış ve en etkin yöntem araştırılmaktadır. Bu amaçla planlanan, bu çalışmanın sonuçlarına göre lazer ile florür veya CPP-ACP veya novamin uygulamaları tek başına uygulamalardan daha etkili bulunmuştur. Başlangıç çürüğüne ozon ile flor veya CPP-ACP uygulamaları tek başına uygulamalardan daha etkili bulunmamıştır. Ozon ile novamin uygulaması tek başına uygulamadan daha etkili bulunmuştur.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üye-

liği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Emine Taştan, Eda Güler; **Tasarım:** Emine Taştan, Eda Güler; **Denetleme/Danışmanlık:** Emine Taştan, Eda

Güler, Fatma Aytaç Bal; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Emine Taştan, Eda Güler, Fatma Aytaç Bal; **Analiz ve/veya Yorum:** Emine Taştan, Eda Güler, Fatma Aytaç Bal; **Kaynak Taraması:** Emine Taştan, Eda Güler, Fatma Aytaç Bal; **Makalenin Yazımı:** Emine Taştan, Eda Güler, Fatma Aytaç Bal; **Eleştirel İnceleme:** Emine Taştan, Eda Güler, Fatma Aytaç Bal.

KAYNAKLAR

1. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res.* 2000;14:40-7. [Crossref] [PubMed]
2. Gjorgjevska ES, Nicholson JW, Slipper IJ, Stevanovic MM. Remineralization of demineralized enamel by toothpastes: a scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray analysis, and three-dimensional stereo-micrographic study. *Microsc Microanal.* 2013;19(3):587-95. [Crossref] [PubMed]
3. Roberson TM. Cariology: the lesion, etiology, prevention, and control. In: Roberson TM, Heymann H, Swift EJ, Sturdevant CM, eds. *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry.* 5th ed. St.Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2006. p.65-135.
4. Retief DH, Bradley EL, Holbrook M, Switzer P. Enamel fluoride uptake, distribution and retention from topical fluoride agents. *Caries Res.* 1983;17(1):44-51. [Crossref] [PubMed]
5. Ambarkova V, Gorseta K, Jankolovska M, Glavina D, Škrinjarić I. [Effect of the fluoride gels and varnishes comparing to CPP-ACP complex on human enamel demineralization/remineralization]. *Acta Stomatologica Croat.* 2013;47(2):99-110. [Crossref]
6. Peric TO, Markovic DL, Radojevic VJ, Heineemann RM, Petrovic BB, Lamovec JS, et al. Influence of pastes containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on surface of demineralized enamel. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12(3):234-9. [Crossref] [PubMed]
7. Azarpazhooh A, Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(7):915-24; quiz 994-5. [Crossref] [PubMed]
8. Mohanty P, Padmanabhan S, Chitharanjan AB. An in vitro evaluation of remineralization potential of Novamin® on artificial enamel sub-surface lesions around orthodontic brackets using Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX). *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):ZC88-91. [Crossref] [PubMed] [PMC]
9. Gutknecht N, Franzen R, Vanmeersch L, Lamperet F. Lasers in pediatric dentistry- a review. *J Oral Laser Applications.* 2005;5:207-18. [Link]
10. Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er, Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Res.* 2012;46(5):441-51. [Crossref] [PubMed]
11. Heravi F, Ahrari F, Mahdavi M, Basafa S. Comparative evaluation of the effect of Er:YAG laser and low level laser irradiation combined with CPP-ACPF cream on treatment of enamel caries. *J Clin Exp Dent.* 2014;6(2):e121-6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
12. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology.* 2003;20(2):106-14. [Crossref] [PubMed]
13. Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent.* 2004;17(1):56-60. [PubMed]
14. Knežević A, Tarle Z, Mandić VN, Prskalo K, Pandurić V, Janković B, et al. [Primary fissure carious lesion reversal using ozone]. *Acta Stomatol Croat.* 2007;41(1):31-8. [Link]
15. Duggal MS, Nikolopoulou A, Tahmassebi JF. The additional effect of ozone in combination with adjunct remineralisation products on inhibition of demineralisation of the dental hard tissues in situ. *J Dent.* 2012;40(11):934-40. [Crossref] [PubMed]
16. Johansson E, van Dijken JW, Karlsson L, Andersson-Wenckert I. Treatment effect of ozone and fluoride varnish application on occlusal caries in primary molars: a 12-month study. *Clin Oral Investig.* 2014;18(7):1785-92. [Crossref] [PubMed]
17. Avşar A, Tuloglu N. Effect of different topical fluoride applications on the surface roughness of a colored compomer. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(2):171-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
18. İttahagarun A, King N, Cheung YM. The effect of nano-hydroxyapatite containing toothpaste on artificial enamel carious lesion progression: an in vitro pH cycling study. *Hong Kong Dental J.* 2010;7(2):61-6. [Link]
19. Bayrak S, Yılmaz El. Çürük direncinin artırılmasında lazer ve kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfatın birlikte kullanımının etkisinin değerlendirilmesi. *J Dent Fac Atatürk Uni.* 2018;28(1):23-32. [Crossref]
20. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997;76(9):1587-95. [Crossref] [PubMed]
21. Burwell AK, Litkowski LJ, Greenspan DC. Calcium sodium phosphosilicate (NovaMin): remineralization potential. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):35-9. [Crossref] [PubMed]
22. Faller RV, Eversole SL, Yan J. Anticaries potential of a stabilized stannous-containing sodium fluoride dentifrice. *Am J Dent.* 2010;23 Spec No B:32B-38B. [PubMed]
23. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE, Blanken DD, Flaig SM, Walker ER. In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: a pilot study. *J Dent Oral Hyg.* 2011;3(2):22-9. [PubMed] [PMC]
24. Huang Y, Duan Y, Qian Y, Huang R, Yang Z, Li Y, et al. Remineralization efficacy of a toothpaste containing 8% arginine and calcium carbonate on enamel surface. *Am J Dent.* 2013;26(5):291-7. [PubMed]
25. Chen CC, Huang ST. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):447-52. [Crossref] [PubMed]
26. Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO2 laser on fluoride uptake in enamel. *J Dent.* 2004;32(2):161-7. [Crossref] [PubMed]
27. Asl-Aminabadi N, Najafpour E, Samiei M, Erfanparast L, Anoush S, Jamali Z, et al. Laser-casein phosphopeptide effect on remineralization of early enamel lesions in primary teeth. *J Clin Exp Dent.* 2015;1;7(2):e261-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
28. Nie L, Li X, Hu DY. [Effect of ozone on the remineralization of enamel in vitro]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2007;42(2):102-5. [PubMed]
29. Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. *J Dent.* 2004;32(8):591-602. [Crossref] [PubMed]

30. Hegde MN, Moany A. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning electron microscopy: an in vitro study. *J Conserv Dent*. 2012;15(1):61-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Lei J, Guo J, Fu D, Wang Y, Du X, Zhou L, et al. Influence of three remineralization materials on physicochemical structure of demineralized enamel. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed*. 2014;29(2):410-16. [[Crossref](#)]
32. Gjorgievska ES, Nicholson JW. A preliminary study of enamel remineralization by dentifrices based on Recalden (CPP-ACP) and Novamin (calcium-sodium-phosphosilicate). *Acta Odontol Latinoam*. 2010;23(3):234-9. [[PubMed](#)]
33. Narayana SS, Deepa VK, Ahamed S, Sathish ES, Meyappan R, Satheesh Kumar KS, et al. Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an in-vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2014;32(1):19-25. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Rose RK. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol*. 2000;45(7):569-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
35. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res*. 2001;80(12):2066-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, Inage H, Watanabe T, Irokawa A, et al. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. *J Oral Sci*. 2007;49(2):115-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Heravi F, Ahrari F, Tanbakuchi B. Effectiveness of MI paste plus and remin pro on remineralization and color improvement of postorthodontic white spot lesions. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018;15(2):95-103. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, et al. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res*. 1995;74(6):1272-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res*. 2003;82(3):206-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
40. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist*. 1998;18(1):8-16. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent*. 2004;32(1):41-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
42. Cecchini RC, Zezell DM, de Oliveira E, de Freitas PM, Eduardo C de P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. *Lasers Surg Med*. 2005;37(5):366-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
43. Bevilacqua FM, Zezell DM, Magnani R, da Ana PA, Eduardo C de P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med Sci*. 2008;23(2):141-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Chang NN, Jew JM, Simon JC, Chen KH, Lee RC, Fried WA, et al. Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4 µm on surface morphology, permeability, and acid resistance. *Lasers Surg Med*. 2017;49(10):913-27. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
45. Liu Y, Hsu CY, Teo CM, Teoh SH. Subablative Er:YAG laser effect on enamel demineralization. *Caries Res*. 2013;47(1):63-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Zezell DM, Ana PA, Albero FG, Cury JA, Bachmann L. Effect of infrared lasers on chemical and crystalline properties of enamel. *Caries Res*. 2009;43:192. [[Link](#)]
47. Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Norén JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent*. 2010;38(1):72-81. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Lasers effects on enamel for caries prevention. *Laser Physics*. 2006;16(5):865-75. [[Crossref](#)]
49. Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res*. 1972;51(2):455-60. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
50. Tahmassebi JF, Chrysafi N, Duggal MS. The effect of ozone on progression or regression of artificial caries-like enamel lesions in vitro. *J Dent*. 2014;42(2):167-74. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]