

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KATKISIZ VE GÜMÜŞ KATKILI NANOHİDROKSİAPATİTİN
SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE DENTİN TÜBÜLLERİNDE
KAPLAMA MALZEMESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

ÜMİT ERDEM

HAZİRAN 2019

Fizik Anabilim Dalında Ümit ERDEM tarafından hazırlanan KATKISIZ VE GÜMÜŞ KATKILI NANOHİDROKSİAPATİTİN SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE DENTİN TÜBÜLLERİNDE KAPLAMA MALZEMESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Saffet NEZİR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa B. TÜRKÖZ

Prof. Dr. Saffet NEZİR

Ortak Danışman

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan (Danışman) : Prof. Dr. Saffet NEZİR

Üye (Ortak Danışman) : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa B. TÜRKÖZ

Üye : Prof. Dr. Hakan GÜNGÜNEŞ

Üye : Doç. Dr. Ayşegül Ülkü METİN

Üye : Doç. Dr. Erdem YAŞAR

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Serdar BAĞLAR

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin TECİMER

... / ... /

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

KATKISIZ VE GÜMÜŞ KATKILI NANOHİDROKSİAPATİTİN SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE DENTİN TÜBÜLLERİNDE KAPLAMA MALZEMESİ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ERDEM, Ümit

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Saffet NEZİR

Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa B. TÜRKÖZ

Haziran 2019, 168 sayfa

Bu tez çalışmasında, dentin hassasiyet tedavilerinde dentin yüzeyi kaplama malzemesi olarak kullanılmak üzere çöktürme yöntemiyle nano boyutta katkısız hidroksiapatit (HAp) ve (% 0,05, % 0,20, % 0,40) gümüş iyonu katkılanmış hidroksiapatit (Ag(I)-HAp) sentezlenmesi amaçlanmıştır. Dentin yüzey kaplama işlemi öncesinde katkısız ve gümüş katkılı hidroksiapatit örneklerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. Kimyasal yapı ve kristalografik inceleme için XRD, yüzey morfolojisi incelemesi için SEM, elementel analiz için SEM-EDS ve ICP-OES, tane boyut incelemesi için Zetasizer ve SEM, Ca/P oranının belirlenmesi için SEM-EDS ve ICP-OES, bileşen gruplarının belirlenmesi için FTIR ve malzeme yoğunluklarının belirlenmesi için Archimed yöntemi kullanılarak fizikokimyasal karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

Antibakteriyel etki elde etmek için gümüş varlığı pozitif bir düşünce olsa da Ag (I) iyonlarının hidroksiapatit yapısından biyolojik, fiziksel ve kimyasal etkilerin bir sonucu olarak salınıp toksik bir etkiye neden olup olmadığını belirlemek için bu çalışmada % 0,05, % 0,20, % 0,40 gümüş iyonu katkılanmış hidroksiapatit biyomalzemelerinin gümüş salım tayini de yapılmıştır. Eşlenik vücut sıvısı (SBF)

içerisinde belirli zaman dilimlerinde (1/2 – 1 – 3 – 5 – 10 – 20 – 30 gün) bekletilen örneklerin muamele sonundaki Ag (I) konsantrasyonları zamanın bir fonksiyonu olarak ICP-OES ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bununla beraber eşlenik vücut sıvısıyla 20 hafta süreyle yapılan degradasyon çalışmasıyla malzemenin bozunması kontrol edilmiştir. Olası bozulma sonucunda Ag(I)-HAp biyomalzemeden Ag (I) salımı oluşup oluşmadığını belirlemek için degradasyona tabi tutulan katı örnekte ve degradasyon sıvısında sitotoksitesite analizi yapılmış ve tüm ürünlerdeki gümüş iyonu salım değerleri 20 – 35 ppb aralığında gözlenmiştir. Aynı zamanda üretilen malzemelerin bozulmadığı ve % 70'den fazla hücre canlılığı değerleri sağladığı sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında fiziksel ve kimyasal karakterizasyon ile salım tayinini çalışmaları sonrasında, HAp ve % 0,40 Ag(I)-HAp partikülleriyle açık dentin tübül yüzeyleri kapatılmaya çalışılarak yüzeyin yeniden mineralleşmesine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, HAp ve % 0,40 Ag(I)-HAp biyomalzemeleri dentin yüzeyleri üzerine çöktürme yöntemiyle kaplanarak hem HAp ve % 0,40 Ag(I)-HAp tozlarının hem de kaplanmış dentin disklerinin antibakteriyel özellikleri dişlerde çürümeye en fazla neden olan *S. Mutans*, *C. Albicans* ve *E. Coli* bakterilerine karşı belirlenmiştir. Aynı zamanda HAp esaslı partiküllerin dentin yüzeylerinde bozulma olasılığı da araştırılmıştır. Bozunma işleminin sonucunda dentin örneklerinin morfolojik ve yapısal değişiklikleri SEM ve FTIR analizleri ile, toksik etkisi Sitotoksitesite analizleri ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak, hem HAp hem de % 0,40 Ag(I)-HAp partiküllerinin dentin yüzeylerini büyük bir oranda kapladığı görülmüştür. Bu kaplama işlemi sonucunda yüzeyde uygulanan degradasyon işleminin numunelerde herhangi yapısal ve morfolojik değişime ve toksik etkiye neden olmadığı görülmüştür. Bununla beraber yapılan antibakteriyel analize göre kaplama malzemelerinin antibakteriyel bir etki sağlayacağı görülmüştür. Sonuç olarak diş tedavilerinde HAp ve Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin özellikle dentin hassasiyeti giderme amaçlı uygulanan dentin tübül tıkama uygulamalarında kullanılabilecek bir malzeme olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Dentin hassasiyeti, Dentin tübül kaplama, Hidroksiapatit Gümüş, Antibakteriyel etki

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF PURE AND SILVER DOPED NANO HYDROXYAPATITE AND INVESTIGATION OF USABILITY ON DENTIN SURFACE AS A COATING MATERIAL

ERDEM, Umit

Kirikkale University

Institute of Science and Technology

Department of Physics, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Saffet NEZİR

Co-Supervisor: Dr. Lecturer M. Burak TÜRKÖZ

June 2019, 168 pages

In this thesis dissertation, it was aimed to synthesize pure hydroxyapatite (HAp) and 0.05 %, 0.20 %, 0.40 % silver doped hydroxyapatite (Ag(I)-HAp) by precipitation method to be used as dentin surface coating material in dentin sensitivity treatments. Physical, chemical and biological properties of pure and silver doped hydroxyapatite samples were investigated before dentin surface coating process. XRD analysis was used to determine chemical structure and crystallographic examination. SEM analysis was used to investigate surface morphology and also SEM-EDS and ICP-OES analysis were used to determine elemental distribution. FTIR analysis was used to indicate the functional group. Zetasizer and SEM analysis were used to determine particle size values, SEM-EDS and ICP-OES were used to determination of the Ca / P ratio, and Archimedes method was used to define material densities.

Although the presence of silver to obtain an antibacterial effect is a positive idea, it is important to determine whether the presence of Ag (I) has a toxic effect as it can be released from the hydroxyapatite structure of Ag (I) ions as a result of biological, physical and chemical effects and may cause a toxic effect. For this purpose, silver

release of 0.05 %, 0.20 % and 0.40 % silver doped hydroxyapatite biomaterials were also investigated in this study. Ag (I) concentrations at the end of treatment of samples kept in simulated body fluid (SBF) in specific time periods (1/2 - 1 - 3 - 5 - 10 - 20 - 30 days) were determined by ICP-OES as a function of time. Also, the degradation of the material was controlled by the degradation study with SBF for 20 weeks. In order to determine whether Ag (I) release occurs from the Ag(I)-HAp biomaterial as a result of possible deterioration, the study of the cytotoxicity were carried out for both degraded liquid and the degraded sample. According to the analysis, the release values in all products were observed at ppb level. At the same time, it was concluded that the materials produced did not degraded and provided more than 70 % cell viability values. It was concluded that this product was a non-degradable product and was a biocompatible material that could be used for treatment in dentistry.

In this study, HAp and 0,40 % Ag(I)-HAp biomaterials were coated on the dentin surfaces by the precipitation method. The antibacterial properties of both HAp and 0,40 % Ag (I)-HAp powders as well as coated dentin discs were investigated against to *S. Mutans*, *C. Albicans* and *E. Coli* bacteria, which are the most common cause of tooth decay. Also in this study, the possibility of degradation of HAp based particles on dentin surfaces was investigated. Morphological and structural changes of dentin samples were investigated with FTIR and SEM analyzes. Also cytotoxicity analysis was used to determine toxicological changes. Both the HAp and 0.40 % Ag(I)-HAp particles were found to had a large coating on the dentine surfaces. It was observed that the degradation process applied on the surface did not cause any structural and morphological changes in the samples and did not cause toxic effect. However, according to the antibacterial analysis, it was observed that the coating materials would provide an antibacterial effect. As a result, it was concluded that HAp and 0.40 % Ag(I)-HAp biomaterials can be an advantageous material for dentin-tubule occlusion in the treatment of dentin hypersensitivity.

Keywords: Dentine hypersensitivity, Dentinal tubule occluding, Hydroxyapatite, Silver, Antibacterial effect

TEŞEKKÜR

Bu yolculuğu başarılı bir şekilde sonuca ulaştırmam için yardımcı olan güzide insanlara bu vesileyle şükranlarımı sunmak isterim.

Tez danışmanım Prof. Dr. Saffet NEZİR'e sadece bu tez çalışması için değil öğrencilik ve iş hayatımın en önemli noktalarına yaptığı eşsiz dokunuşlar nedeniyle öncelikle teşekkürlerimi arz ediyorum. Tez çalışmam boyunca engin bilgilerinden istifade edebilmem için yardımları, sabrı ve kıymetli önerileri için teşekkür ediyorum.

Tez Eş danışmanım Dr. Mustafa B. TÜRKÖZ'e çalışmanın ilk anından son anına kadar ki süreçteki bilimsel rehberliği için teşekkür ediyorum. Bu araştırma çalışması boyunca durmaksızın cesaretlendirmesi, yapıcı rehberliği ve motivasyon sözleri için ayrıca teşekkür ediyorum. Tez çalışması için işbirliği yapma taleplerimizi geri çevirmeyen ve laboratuvarında çalışma imkânını ve kütüphanesini bize açan değerli hocamız Prof. Dr. Zafer EVİS'e teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasının tamamlanmasını sağlamak için sağladığı ilham için Doç. Dr. Ayşegül Ülkü METİN'e teşekkür ediyorum. Kendisinin alanındaki uzmanlığı, fikirleri, tartışma ve sonuç kültürü ve çözüm odaklılığı içinde ayrıca teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmasının içeriğinde mevcut biyoyoumluluk test çalışmalarında gösterdiği özverili çalışma ve destek için Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, tez çalışmam boyunca yardımcı önerileri ve deneysel çalışmalarda gösterdiği büyük destek için Dr. Mustafa DOĞAN'a ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Hilal TOPBAŞ'a ayrıca teşekkür ediyorum.

Tüm içten duaları, maddi ve manevi destekleri için bey babam Atalay Atuf ERDEM'e ve şefkat kahramanı annem Emine ERDEM'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Canyoldaşım, sevgili eşim ve can oğullarıma da tarifi mümkün olmayacak bir samimiyetle ve içtenlikle benimle birlikte oldukları için teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Literatür Özeti	6
1.1.1. Biyolojik Apatit	8
1.1.2. Sentetik Hidroksiapatit.....	18
1.1.3. HAp Sentez Yöntemleri	28
1.1.4. İyon Katkılı HAp	32
1.1.5. Dentin Tübül Tıkama Çalışmalarında HAp.....	36
1.1.6. HAp' nin Karakterizasyon Parametreleri.....	37
1.2. Tezin Amacı	40
2. MATERYAL VE YÖNTEM	43
2.1. Giriş	43
2.2. Hidroksiapatit Tozlarının Üretimi.....	43
2.3. Hidroksiapatit Tozlarının Karakterizasyonu	46
2.3.1. HAp Tozlarının Fizikokimyasal Karakterizasyonu	46
2.3.2. HAp Tozlarının Biyolojik Karakterizasyonu.....	54
2.4. Ag(I)-HAp Tozlarından Gümüş Salım Tayini	59
2.5. HAp Tozlarının Dentin Tübüllerine Kaplanması	60
2.5.1. Dentin Disklerinin Hazırlanması ve Kaplama işlemi	62
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	65
3.1. Giriş	65
3.2. HAp Tozlarının Fiziksel ve Kimyasal Analizi	66

3.2.1.	Faz Tanımlama ve Faz Safsızlığı İncelemesi.....	66
3.2.2.	Bileşen Grupları İncelemesi.....	71
3.2.3.	Yüzey Morfolojisi İncelemesi	76
3.2.4.	Yoğunluk Tayini	86
3.2.5.	Tane Boyutu Tayini.....	88
3.3.	Ag(I) Katkılı Hidroksiapatit' ten Gümüş Salımının <i>In Vitro</i> Koşullarda İncelenmesi	93
3.4.	Hidroksiapatit ve % 0,40 Ag(I) Katkılı Hidroksiapatit ile <i>In Vitro</i> Dentin Tübülü Tıkama Çalışması.....	110
3.4.1.	<i>In Vitro</i> Antibakteriyel Aktivite Testi	112
3.4.2.	<i>In Vitro</i> Dentin Tübül Kaplama	116
4.	SONUÇLAR.....	141
5.	KAYNAKLAR	147
	EKLER.....	167
	ÖZGEÇMİŞ.....	168

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 İnsan Kemiği Kimyasal Bileşimi	11
Çizelge 1.2 İnsan kemliği mekanik özellikleri	12
Çizelge 1.3 Kalsiyum Fosfatlar ve Formülleri	19
Çizelge 1.4 HAp'nin fiziksel, kimyasal özellikleri	21
Çizelge 1.5 HAp mekanik özellikleri	22
Çizelge 1.6 HAp birim hücreleri için kafes koordinatları	26
Çizelge 1.7 Sentezlenen HAp kimyasal gruplarının soğurma bantları	27
Çizelge 1.8 Analiz Parametreleri	38
Çizelge 2.1 HAp üretiminde kullanılan materyaller	44
Çizelge 2.2 ASTM, Numara 9-432, HAp	47
Çizelge 2.3 Sitotoksosite analizi süreçleri	57
Çizelge 3.1 HAp FTIR sonuçları	75
Çizelge 3.2 Ca / P değerleri.....	83
Çizelge 3.3 Katkısız HAp, ICP-OES Sonucu	84
Çizelge 3.4 Yoğunluk Ölçüm Sonuçları	86
Çizelge 3.5 Tane boyut ölçümleri, SEM.....	90
Çizelge 3.6 Ag(I)-HAp gümüş salımı	96
Çizelge 3.7 Ag(I)-HAp reaktif oranları.....	98
Çizelge 3.8 Degradasyon öncesi ve sonrası hücre canlılıkları.....	106
Çizelge 3.9 Degradasyon öncesi ve sonrası degradasyon sıvısı hücre canlılıkları ..	108
Çizelge 3.10 Antibakteriyel analiz sonuçları	112
Çizelge 3.11 Degradasyon Yüzdeleri.....	120
Çizelge 3.12 Degradasyon çalışması F ve t Testi karşılaştırılması.....	123
Çizelge 3.13 Degradasyon öncesi FTIR spektrumları	130
Çizelge 3.14 Sitotoksosite Analiz Sonuçları.....	135
Çizelge 3.15 Degradasyon Sıvıları Sitotoksosite Analizi Sonuçları.....	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Kemik Doku ve Kemikleşme Aşamaları	10
Şekil 1.2 Dişin genel yapısı	13
Şekil 1.3 Dentin kanallarının yapısı	15
Şekil 1.4 Dentin tübüleri mikroskop ve şematik gösterimi	16
Şekil 1.5 Odontoblastlar ve dentin tübüleri	17
Şekil 1.6 HAp Kristal Yapısı	25
Şekil 1.7 Reaksiyon 1, HAp üretim şeması.....	29
Şekil 2.1 Reaksiyon 1, HAp üretim şeması.....	44
Şekil 2.2 Çözeltilerin a) Karıştırma, b) Çöktürme ve c) Süzme işlemi.....	45
Şekil 2.3 a) Isıl işlem, b) öğütme ve c) nihai ürün	45
Şekil 2.4 SHIMADZU 6000 model XRD cihazı	47
Şekil 2.5 a) FEI / Quanta 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu, b) Polaron Altın kaplama cihazı.....	49
Şekil 2.6 Malvern Mastersizer S Zetasizer cihazı.....	51
Şekil 2.7 ICP-OES Cihazı.....	52
Şekil 2.8 Archimed prensibine göre yoğunluk ölçüm sistemi	53
Şekil 2.9 Bruker Vertex V70 FTIR Cihazı.....	54
Şekil 2.10 a) Dentin tübüleri, b,c) Dentin tübül ağzlarının açık olduğu durum	60
Şekil 2.11 Dentin hassasiyeti temsili görsel	61
Şekil 2.12 Dentin Tübül Kaplama İşlemi a) Tübül Kaplama b) Kaplanmış Dentin Tübülü c) Kaplanmış Tübül Kanalı İç i	61
Şekil 2.13 Dentin Disk Modeli Uygulaması	63
Şekil 3.1 HAp XRD sonucu	67
Şekil 3.2 Ag(I)-HAp XRD sonucu.....	69
Şekil 3.3 HAp FTIR Spektrumu	72
Şekil 3.4 Ag(I)-HAp FTIR Spektrumları.....	73
Şekil 3.5 HAp SEM Görüntüsü.....	78
Şekil 3.6 Ag(I)-HAp SEM görüntüleri.....	80

Şekil 3.7 Katkısız HAp, SEM-EDS Spektrumu.....	81
Şekil 3.8 Ag(I)-HAp, SEM-EDS Spektrumları.....	82
Şekil 3.9 HAp ve Ag(I)-HAp yüzey haritalandırması	85
Şekil 3.10 Katkısız HAp Zetasizer Analiz Sonucu	90
Şekil 3.11 Ag(I)-HAp Zetasizer Sonuçları	91
Şekil 3.12 Ag(I)-HAp gümüş salımı	96
Şekil 3.13 % 0,05 Ag(I)-HAp salım kinetiği	100
Şekil 3.14 % 0,20 Ag(I)-HAp salım kinetiği	100
Şekil 3.15 % 0,40 Ag(I)-HAp salım kinetiği	101
Şekil 3.16 a) Degradasyon ve b) pH çalışması.	104
Şekil 3.17 Degradasyon sırasında ve sonrasında Ag(I)-HAp'ler.....	105
Şekil 3.18 Degradasyon öncesi ve sonrası hücre canlılıkları.	107
Şekil 3.19 Degradasyon öncesi ve sonrası degradasyon sıvısı hücre canlılıkları. ...	108
Şekil 3.20 Antibakteriyel analiz, <i>Staphylococcus mutans</i>	113
Şekil 3.21 Antibakteriyel analiz, <i>Escherichia coli</i>	114
Şekil 3.22 Antibakteriyel analiz, <i>Candida albicans</i>	115
Şekil 3.23 Dentin tübül kaplama çalışması SEM görüntüsü.....	117
Şekil 3.24 Antibakteriyel Analizi, <i>Escherichia coli</i>	119
Şekil 3.25 Antibakteriyel Analizi, <i>C. Albicans</i>	119
Şekil 3.26 Antibakteriyel Analizi, <i>S. Mutans</i>	119
Şekil 3.27 Degradasyon Yüzdeleri ve pH değişimleri	122
Şekil 3.28 Kontrol diş dentin tübül görüntüsü	125
Şekil 3.29 HAp kaplı diş dentin tübül görüntüsü	126
Şekil 3.30 Ag(I)-HAp kaplı diş dentin tübül görüntüsü.....	127
Şekil 3.31 HAp (a) ve Ag(I)-HAp (b) kaplı diş yan kesit SEM görüntüsü.....	129
Şekil 3.32 Degradasyondan önceki FTIR spektrumu	131
Şekil 3.33 Degradasyondan sonraki FTIR spektrumu	132
Şekil 3.34 Sitotoksosite Sonuçları	136

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(α/β) -TCP	(Alfa/Beta-) Üç Kalsiyum Fosfat
Å	Angström
ACP	Amorf Kalsiyum Fosfat
Ag	Gümüş
Ag (I)	Gümüş iyonu
Ag(I)-HAp	Gümüş Katkılı Hidroksiapatit
ALP	Alkali Fosfat
ASTM	American Society for Testing and Materials
ASTM F1185	Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants, American Society for Testinand Materials, 2003
ASTM E2149	Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions.
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectrometry
BCP	Bifazik Kalsiyum Fosfat
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
°C	Derece Selsiyus
Ca	Kalsiyum
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroksiapatit
Ca^{2+}	Kalsiyum iyonu
CaO	Kalsiyum Oksit
CaCO_3	Kalsiyum Karbonat
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Kalsiyum Nitrat
Ca/P	Kalsiyum / Fosfor oranı

CaP	Kalsiyum Fosfat
CDHAp	Kalsiyum eksiltmeli Hidroksiapatit
ClAp	Klorapatit
CO ₂	Karbondioksit
CO ₃ ²⁻	Karbonat
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamanyum hidrojen fosfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
(EDS)	Enerji dağılım spektrometresi
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
FAp	Florapatit
HAp	Hidroksiapatit
HPO ₄ ²⁻	Hidrojen Fosfat
ICP-OES	İndüktif olarak çiflenmiş plazma optik emisyon spektrometresi
ICDD	Uluslararası Kırınım Data Merkezi
ISO 10993	Medical Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi
ISO 14887	Sample Preparation - Dispersing Procedures for Powders in Liquids, International Standards Organisation, 2000
ISO 13779-1	Implants for Surgery – Hydroxyapatite-Part 1: Ceramic Hydroxyapatitel, International Standards Organisation, 2000.
JCPDS	Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi
KBr	Potasyum Bromür
w/v	Ağırlık / Hacim
NaAp	Sodyumapatit

OH ⁻	Hidroksil
PBS	Fosfat tampon solüsyon
PO ₄ ³⁻	Fosfat
PO ₄ ³⁻	Ortofosfatlarla
P ₂ O ₇ ⁴⁻	Metafosfatlarla
<i>S. Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. Mutans</i>	<i>Staphylococcus mutans</i>
SBF	Eşlenik Vücut Sıvısı
SD	Standart sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
<i>S.Epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TGA	Termogravmetrik analiz
XRD	X-ışını difraktometresi

1. GİRİŞ

Kemik, protein kollajenlerinden oluşan organik yapı ile hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) içeren inorganik bir yapıya sahiptir. Bu iki yapının bir arada olduğu biyomineral yapının % 65-70 kemik, % 5-8 su ve kalan kısmı da organik fazdır [1]. Dişin üzerinde mineralleşmeyi ve kalsifikasyonu sağlayan HAp, diş minesinin % 95'inden fazlasını oluşturmaktadır [1, 2]. Dişin dentin bölümü ise organik kalsifiye kollajen lifleri ve en az % 90'ı hidroksiapatit olan inorganik bir yapıdan oluşmaktadır [2]. HAp sıkıca paketli düzenlenmiş hegzagonal kristal yapıya sahip mikro yapısı sayesinde mine ve dentin tabakalarının yüksek fiziksel mukavemete ve aşınma önleyici özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır [3]. Ayrıca dişin inorganik yapısı içinde bulunan HAp kollajen liflerinin bozunmasına da engel olmaktadır [4]. HAp, kollajen liflerinin bozunmasına karşı güçlü desteğine rağmen bakteriyel metabolizmalardan ve/veya diyet faktörlerinden kaynaklanan asit saldırıları ile diş sert dokularındaki mineralleri eritip hidroksiapatit yapısını bozarak dentin ve/veya mine üzerinde dişlerin çürümesine neden olan lezyonlara sebep olmaktadır [5–8].

1970'lerden günümüze kadar çürüklerin tedavilerinde, canlı dokularla ve biyolojik sıvılarla bütünleşme özelliklerine sahip, biyolojik tepkilere duyarlı, malzeme ve canlı yapı arasındaki bağlantıyı bozmayacak biyouyumlu metal veya seramik biyomalzemeler kullanılmaktadır [9]. Bu biyomalzemeler, kullanım yerindeki mekanik zorlayıcı kuvvetler gibi fiziksel, vücut sıvısı gibi kimyasal ve dokularla etkileşim gibi biyolojik etkilere de cevap verebilmelidir. Doğal kemik yapısına benzeyen kristalografik yapısı, yüzey morfolojisi ve mineralizasyon işlemine yardımcı olan biyoaktif özelliklerinden dolayı hidroksiapatit diş hassasiyeti, dentinin yeniden mineralleştirilmesi ve dentin tübül tıkama gibi çürük tedavi çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır [6–10]. Günümüzdeki araştırmalar ise çoğunlukla bu lezyonların yeniden mineralleşmesi ile hidroksiapatit, iyon katkılı hidroksiapatit, amorf kalsiyum fosfat, biyoaktif cam gibi çeşitli biyomalzemelerin kullanılmasıyla çürüklerin önlenmesine ve tedavisine odaklanmaktadır [9–11].

Dişin inorganik bileşenlerinden olan hidroksiapatitin vücut dışı reaksiyonlarla yani sentetik olarak üretilebilmesi bu biyomalzemelerin diş hekimliğinde tedavi amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmaları arttırmıştır [12, 13]. Sentetik HAp, toksik olmadığından biyouyumlu bir malzemedir ve diş yapısındaki biyolojik hidroksiapatit ile benzer özelliklere sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle klinik tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır [4, 14, 15]. Sentetik HAp çöktürme, hidrotermal, hidroliz ve Sol-Jel teknikleri kullanılarak üretilebilmektedir [7].

Biyoaktif bir malzeme olan HAp, klinik tedavilerde kullanılmasına rağmen bakterilere karşı direnci sınırlıdır [11, 16]. HAp'nin iyonik bağ yapabilen molekül yapıları bulundurması nedeniyle uygulama yerinde antimikrobiyal etkinliğini arttırmak için farklı elementlerle katkılama da yapılabilmektedir [3, 11]. Bu amaçla en çok kullanılan iyon antimikrobiyal özelliği nedeniyle gümüş iyonudur (Ag (I)). Ag(I) iyonları, insan sert dokularının cerrahi tedavilerinde, yara üzeri kapatma ve kırık tedavilerinde antibakteriyel katkıları nedeniyle kullanım avantajı sağladığından yaygın olarak kullanılmaktadır [16–20]. Dentin üzerine bakteri yapışmasının kolayca gerçekleşebildiği ve bakterinin kolayca çoğalabildiği bilinmektedir [21]. Bu nedenle araştırmacılar, Ag(I) iyonu katkılı hidroksiapatitin (Ag (I)-HAp) [22] antibakteriyel özelliklerini kullanarak diş çürümesini önlemeyi ve dişlerin hayatta kalmasını sağlamayı amaçlamaktadırlar [23, 24]. Türköz ve arkadaşları [11] tarafından yapılan bir çalışmada Ag(I)-HAp'in antibakteriyel etkisi gösterilmiştir.

HAp'ye Ag(I) iyonu katkılanması belirli bir konsantrasyona kadar sadece antibakteriyel aktiviteyi arttırmakla kalmamakta aynı zamanda dokudaki hücre canlılığını da arttırmaktadır [19, 23, 24]. HAp'deki Ag(I) iyonları, minerallerini kaybetmiş dentin yüzeyini kaplamak için pozitif bir elektrostatik etki oluşturmaktadır [24]. Ag(I)-HAp partikülleri ile dentin arasında oluşacak güçlü elektrostatik etkileşim, güçlü bir antibakteriyel etkiyi oluşturmada kullanılabilir. Bununla birlikte diş tedavilerinde, tedavi edilen bölgelerde meydana gelebilecek bakteriyel enfeksiyonlar, ilk tedavi aşaması sırasında elimine edilebilir [17, 23]. Ayrıca, Ag(I) iyonları içeren bu biyomalzemenin, okul öncesi çocuklarda koronal çürükleri ve yaşlılarda ise kök çürüklerini önlediği gösterilmiştir [23, 25]. Aynı zamanda diş hekimliğinde yapılan klinik çalışmalarla Ag(I) katkılı hidroksiapatit ürünlerin, dentin remineralizasyonu üzerindeki olumlu etkisi de gösterilmiştir [6, 24–26].

Sentetik ya da biyolojik olarak üretilen HAp'lere katkılanan gümüş iyonu; antimikrobiyal etki elde etmek için pozitif bir düşünce olsa da katkılanan Ag(I) iyonlarının kullanım yerinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkiler nedeniyle, yapıdan salınarak toksik bir etki ortaya çıkarıp çıkarmadığının tespiti de önemli bir konudur. Çünkü kemik ve diş tedavilerinde kullanılan malzemenin biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan özellikler içermesi sağlık açısından önem arz etmektedir. Kullanılan biyomalzemenin kemik ve diş tedavilerinde iyileşmeye katkı sağlaması ve bakteriyel enfeksiyonları önlemesi beklenmektedir [27]. Antibakteriyel elementler, kritik bir düzeye kadar biyolojik uyumluluğunu arttırabilir. Uygulama esnasında gerçekleşecek gümüş salım değerleri ortam toksisitesini belirli bir değerin üzerine çıkarmamalıdır. Örneğin, memeli hücrelerinin temel metabolik hücresel fonksiyonlarının bozulmaması için 1,6 ppm seviyesinden daha yüksek Ag(I) iyonu konsantrasyonu toksik olarak bildirilmiştir [28]. Bu nedenle, tıbbi uygulamalarda kritik kabul edilen bu değerin aşılması gereklidir.

Hidroksiapatite katkılanan Ag(I) iyonları çöktürme metodunda yaklaşık 900-1200°C sinterleme sıcaklığında yapıya yerleştiği için katkılama oranı az bile olsa hegzagonal yapıya kolaylıkla tutunabilir [29–31]. Ag(I) iyonlarındaki gibi başka ilaç ve antibakteriyel ajanlar HAp parçacıkları ile bu şartlarda fiziksel olarak birleştirilebilir. Ag(I) katkılı HAp'nin çöktürme yöntemiyle sentezlenmesinin, Ag(I) iyonlarının hidroksiapatit kristal kafesine dâhil edilmesini kolaylaştırdığı ve antibakteriyel özellik ve biyouyumluluk için gerekli olan kısa sürede büyük miktarlarda Ag(I) salımını önlediği de bildirilmiştir [32, 33]. Sinterlenmiş HAp partikülleri, gümüş partiküllerini yapıdan kolaylıkla serbest bırakmaz ve moleküler yapıda tutar. Buna rağmen, Ag(I)-HAp'den gümüş iyonunun salımı kontrol edilmelidir. Bu doğrultuda, hidroksiapatit'den farklı ortamlarda gümüş iyonu salımının incelendiği çeşitli çalışmalar literatürde kaydedilmiştir [34–45]. Örneğin, Yikai Chen ve arkadaşları, eşlenik vücut sıvısı içerisinde yapılan salım tayininde farklı uygulama zamanlarında maksimum 2 ppm Ag(I) iyon konsantrasyonu rapor etmişlerdir [46]. Baoye Li tarafından yapılan başka bir çalışmada [35] ICP-OES ile deiyonize su içinde nano-titanyum/gümüş kaplamalı malzemeden Ag(I) salım değerininin 28. günün sonunda 18 ppm olduğu bildirmiştir.

HAp uygulamalarında gümüş salımı gibi toksik etki oluşturabilecek bir negatif etkinin yanında, bu biyomalzemenin vücut içi sıvılardan kaynaklanacak biyolojik etkilere dayanabilen biyobozunur olmayan özelliklerde olması gereklidir. Biyomalzemelerin biyouyumluluklarının yanı sıra, canlı sistemi içerisinde bozunma süresi ve oluşan bozunma ürünlerinin miktarı da çok önemlidir. Bu amaçla, bozunma ürünlerinin *in vivo* ortamlar taklit edilerek belirlenmeye çalışılması gereklidir. Bu amaçla eşlenik vücut sıvıları ya da yapay tükürük içerisinde malzemelerin belirli süre ve sıcaklıklarda tutulduğu degradasyon tayini çalışmaları da yapılmaya başlanmıştır [47]. Bu çalışmaların sonunda biyomalzemenin biyobozunurluğu test edilmektedir.

Fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik gereklilikleri sağlayan HAp, diş tedavilerinde rahatlıkla kullanılabilir. FDA, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından tanımlı kristalografik, morfolojik, tane boyutu, bileşen grupları gibi fizikokimyasal ve biyouyumluluk, biyobozunurluk ve bakteriyel direnci gibi biyolojik gereklilikleri sağlayan HAp, dişin kaybedilmesinde en etkili faktörlerden biri olan mineral kaybının önlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır [48, 49].

Dişde gerçekleşecek mineral kaybı, dentini etkilediğinde organik kollajen kısmının koruyucusu olan kalsiyum apatitin koruyucu kalkanında gevşemeler başlayacaktır. İlerleyen evrelerde kollajen fibrillerinin parçalanmasına ve dentinin bütün olarak fizikokimyasal ve mekanik özelliklerinin zayıflamasına, dentin tübüllerinin ağızlarının açılmasına neden olacaktır. Bu şekilde gerçekleşen zayıflama ile açılan tübül ağızları diyet kaynaklı bakteriyel bulaşmalara ve sıvı akışlarına müsait hale geleceğinden dişin tamamen kaybına neden olabilecektir [50]. Bu denli çürüklerin ortadan kaldırılması için diş hekimliğinde mikro boyutlarda kazıma tekniği ve dentin tübüllerinin tıkanması tekniği uygulanmaktadır. Ancak bu kazıma işlemi mikro boyutlarda yapılmaktadır [51]. Sonuç olarak bu işlem, gözle görülemeyen enfekte olmuş bir tabakanın kalmasına neden olmaktadır [51, 52]. Bu şekilde görülemeyen boyutlarda kalan tabaka, kollajen lif-hidroksiapatit arasındaki bağlanma kuvvetinin zayıflamasına ve ileride dişin kaybına neden olabilmektedir [50–53]. Bu bağ kuvvetini yeniden kazanmak için kollojen matrisine fizyolojik olarak yeniden mineral kazandırılması gereklidir [54]. Bu şekilde, mineral kaybetmiş dentin, yeniden minerallendirilerek diş çürüğünü kontrol edilebilecektir [24, 26].

Enfekte olmuş dentinin remineralizasyonu, diş hekimliği araştırmacıları için en çok ilgi duyulan alanlardan birisidir [55]. Dişin tedavisi için uygulanacak kazıma tekniğinin yanı sıra o bölgenin yeniden mineral kazanmasını sağlamak adına hidroksiapatit gibi bir biyomalzeme kullanılmaktadır [24, 55]. Aynı zamanda antibakteriyel özelliğe sahip iyon katkılı bir hidroksiapatit kullanılarak hem yeniden mineralizasyon hem de antibakteriyel bir alan oluşturulabilir.

Bu tez çalışmasında, diş yüzeyinin onarılması çalışmalarında kullanılmak üzere çöktürme yöntemiyle nano boyutta hidroksiapatit sentezlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, çöktürme metoduyla [11] sentezlenen nano boyutlu HAp'ye, % 0,05, % 0,20, % 0,40 (ağırlık (w)/hacim(v)) oranlarında Ag(I) iyonu katkılanmıştır. Katkısız ve gümüş katkılı örneklerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmiştir.

Üretilen HAp tozlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır:

- Faz safsızlığı incelemesi için; X-Işınları Difraktometresi (XRD)
- Elementel analiz işlemleri için; Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) – Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS), İndüktif Olarak Çiflenmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES)
- Yüzey morfolojisi inceleme için; SEM
- Tane boyut analizi için; Zetasizer
- Ca/P oranının belirlenmesi için; ICP-OES, SEM-EDS
- Bileşen gruplarının belirlenmesi için; Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR)
- Yoğunluk değeri için; Archimed yöntemi

Biyolojik özelliklerinin belirlenmesi için ise aşağıdaki analizler yapılmıştır:

- Toksiklik durumunun incelenmesi için; Sitotoksisite deneyi
- Antibakteriyel etki için; *Staphylococcus mutans*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* bakterilerine karşı Antimikrobiyal analizi
- Biyo bozunurluk tayini için; Degradasyon deneyi

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonun ardından gümüş katkılı nano hidroksiapatitten (Ag(I)-HAp) gümüş iyonunun salımı incelenmiştir. Bu amaçla, SBF içerisinde belirli zaman dilimlerinde (1/2–1–3–5–10–20–30 gün) bekletilen örneklerin muamele sonunda ICP-OES ile Ag(I) konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak biyolojik uygulama yerinin taklit edildiği bir ortamda biyomalzemenin bozunup bozunmadığının kontrol edildiği degradasyon çalışması yapılmıştır. Eşlenik vücut sıvısıyla hızlandırılmış koşullarda 20 hafta süreyle yapılan degradasyon çalışmasında malzemenin bozunması kontrol edilmiştir. Olası bozulma sonucunda Ag(I) salımı ile toksik bir etkinin oluşup oluşmadığını belirlemek için degradasyona tabi tutulan katı örnekte ve degradasyon sıvısında sitotoksosite tayini yapılmıştır. Bu işlemle beraber degradasyon tayini yapılan katı örneklerin hem degradasyon öncesinde hem de degradasyon sonrasında toksikliği de kontrol edilmiştir. Degradasyon işleminde kullanılan sıvı toksik olmadığından, bu yolla degradasyon sonucunda malzeme toksikliğin değişimi rahatlıkla izlenmiştir.

Hem fiziksel ve kimyasal hem de biyolojik olarak değerlendirilen hidroksiapatitin dentin tübül tıkama ve dentin hassasiyeti giderme amacıyla dentin disk modeli kullanılarak dentin tübüllerinin kaplanmasına çalışılmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada tıkama kabiliyetinden elde edilen sonuçlarla katkısız HAp ve Ag(I) katkılı HAp ile yeniden mineralleşme sağlanıp sağlanmadığı da belirlenmeye çalışılmıştır. Kaplama malzemesi olarak kullanılan HAp ve Ag(I)-HAp'nin, dentin yüzeyinde yapışma kabiliyeti de karakterize edilmeye çalışılmıştır. HAp kaplı dentin numunelerinin sitotoksosite testi ile toksikolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu malzemelerin kaplama ve yeniden mineralleşme kabiliyetlerini değerlendirmek için eşlenik vücut sıvısı içerisinde biyo bozunurluğu da test edilmiştir. Kaplanan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla, biyo bozunma işleminden önce ve sonra FTIR ve SEM çalışmaları da yapılmıştır.

1.1. Literatür Özeti

Ağız hijyeni bilinci ve etkili çürük önleyici uygulamaların yaygın olarak kullanılması, dişlerin çürük olmadan ağızda kalmasını arttırmaktadır [56]. Ancak hem ağız hijyeni bilincinin eksik olması hem de yeme ve içme alışkanlıklarından

kaynaklanan asit atakları ve bakteriyel metabolizmadan kaynaklanan asit saldırıları diş sert dokularında mineral erimesine neden olabilir ve diş sağlığını olumsuz etkileyebilir [6–8] . Bu olumsuz etkilerin sonucunda dişte gerçekleşen yıpranmalar ve aşınmalar diş tübül yüzeylerinin açılmasına sebep olarak diş çürüklerinin oluşması gibi sıkıntılara yol açabilir [58, 59].

Diş tübüllerinin açıldığı lezyonları olan kişiler, soğuk, sıcak veya dokunsal gibi uyarıcılardan kaynaklanan ağrılara maruz kalacaktır [60–62]. Dentin tübüllerindeki açıklıktan kaynaklan ağrılarla ortaya çıkan şikâyet, ilk olarak 1964 yılında Brannstrom tarafından ifade edilen “dentin hassasiyeti” tanısı konulmuştur [63]. Bu tanının tedavisi için diş hekimliğinde kullanılan yaygın iki yöntem vardır. Birincisi potasyum iyonları içeren kimyasal ajanların uygulandığı sinir hassaslaştırıcı yöntemdir. İkincisi ise dentin geçirgenliğini azaltarak dentin içinde sıvı akışlarının önlenmeye çalışıldığı tübül tıkama yöntemidir [12, 13]. Tübül tıkama yönteminde hidroksiapatit (HAp), stronsiyum tuzları (klorür, asetat), kalsiyum sodyum fosfosilikat, kalsiyum karbonatlı ajanlar, oksalatlar, florür bileşikleri ve çeşitli fonksiyonelleştirici moleküller içeren nanopartiküller kullanılmaktadır [12, 58, 59, 64–68].

Açığa çıkan dentin tübüllerin fonksiyonel açıklıklarını önemli ölçüde bloke edebilen veya kısmen azaltabilen ve daha sonra tübüller içine sıvı akışını azaltabilen biyoaktif potansiyeli olan materyaller geliştirmeye büyük ilgi duyulmaktadır [59–62]. Diş dentin tabakasının %95'inden fazlası HAp kristallerinden oluşmaktadır [66]. Dentindeki dikkate değer HAp mineral oranı dentin tübüllerinin tıkanması çalışmalarında HAp'yi diğer biyomalzemelerin önüne geçirmektedir [69].

HAp ve diğer ilgili kalsiyum fosfat mineralleri diş ile ortopedi tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. HAp, toksik olmayan özellikte olması, lifli bir yapısının olmaması, enfektif bir etkisinin olmaması ve immünolojik reaksiyonların olmaması gibi biyolojik özellikleri nedeniyle tercih edilen ve kullanılabilen bir biyomalzemedir [10]. HAp, insanın doğal kemik yapısıyla özdeş bir kimyasal yapıya, kimyasal bileşime ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir [70].

HAp'nin bu özelliği ile vücut içerisinde yapılacak uygulamalarda, vücuttaki fizyolojik sıvılar ile temas ettiğinde fizyolojik çevre ile çözünme, çökme ve iyon

değişimi gibi gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar sonucunda vücut için zararlı olabilecek reaksiyon ürünleri ortaya çıkarmamaktadır. Bu durum HAp'nin kemik hücresiyle etkileşip, kemik dokusuna bağlanma yeteneği olabilen ve doğal dokunun kendi kendini tamir ettiği yapıyı taklit edebilen dinamik bir biyomalzeme olarak adlandırılmasını sağlamaktadır. Kimyasal ve fiziksel yapısından kaynaklı biyoaktif özellikleri ile mineralizasyon sürecine de katkı sağlamaktadır [10, 70]. Mineral bileşenlerinin insan kemiğine ve dişlerine benzemesi, HAp'nin diş hekimliğinde özellikle dentin hassasiyeti gidermek için kullanılan dentin tübül tıkama uygulamalarında avantajlı bir malzeme olarak tercih edilmesini sağlamaktadır [10].

Bu bilgiler ışığında bu bölümün kalan kısımda öncelikle doğal insan kemiği ve dişin genel yapısı ile dentin tübülleri açıklanmaya çalışılacaktır. Daha sonrasında tıbbi amaçla uygulaması amaçlanan HAp anlatılmaya çalışılacaktır. HAp'ye ilişkin avantaj ve dezavantajlı durumlar açıklandıktan sonra sentezleme yöntemleri hakkında bilgiler verilecektir.

1.1.1. Biyolojik Apatit

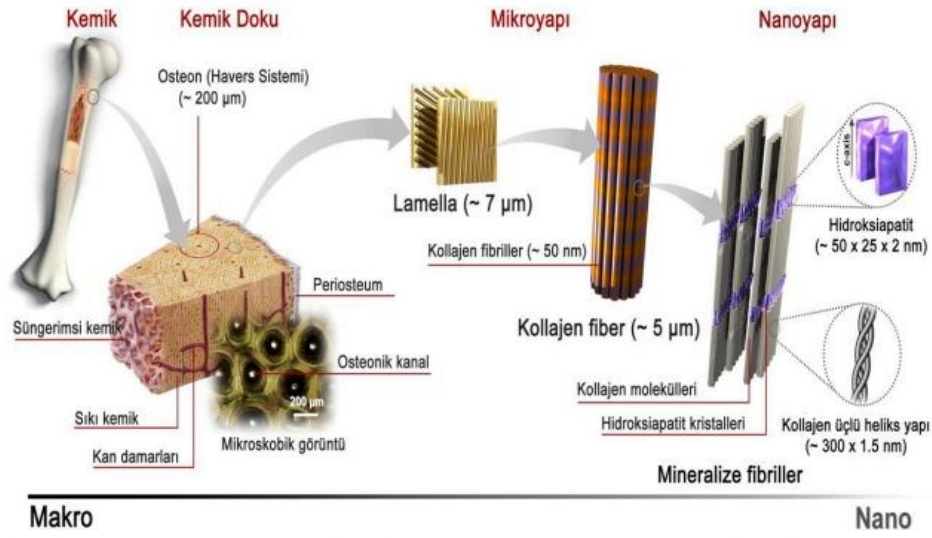
1.1.1.1. Doğal Kemik

Doğal insan kemiğinin fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerine dair kesin bilgiye sahip olmak kemik benzeri materyallerin gelişimi ve kullanımı için kritik öneme sahiptir. İnsan kemiği ve içindeki inorganik yapı olan HAp hakkında geniş çaplı yapılan araştırmalar ve elde edilen bilgiler doğal insan kemiğinin yapısının kolaylıkla anlaşılmasını sağlamaktadır. Kemik, sialoprotein, osteosalsin, osteonektin, osteopontin ve proteoglikanlar gibi yaklaşık %28'i tip I kollajen ve %5'i kollajen olmayan yapısal matriks proteini olan büyüme faktörü ve serum proteinlerini içinde bulundurmaktadır [71]. Organik matrise ek olarak, kalan %67'lik kısım kemiği oluşturan inorganik kısım olan HAp'dir. Bu HAp mineralleri, çoğu kolajen fibrillerinin deliklerine ve gözeneklerine yerleşmiş küçük taneler/plakalar şeklindedir [70, 71].

Kemiğin morfolojik durumu ve kimyasal kompozisyonu, organik matris oluşumunda yer alan hücrelerin aktivitesini yansıtır. Farklı anatomik bölgelerde kemik yapısında gelişim evrelerinde, biyokimyasal özelliklerinde kollajen olan ve kollajen olmayan bileşenlerde çok az farklılıklar gözlenmektedir [70, 71]. Bu çok az farkı da kollajen olmayan matris proteinlerindeki farklılıklar doğurmaktadır. İnsan anatomisinde, bu proteinlerin azlığına ya da bolluğuna sahip bölgeler dışın dış yapısal formundaki farklılıkları ortaya çıkarmakta ve ayak, diz, kol, diş vb. gibi kemiğin bölgesel adını belirlemektedir [71].

Kemiğin dış formlarının çeşitliliğine rağmen, kemiğin içyapısı nispeten tutarlıdır. Kemik yapısı farklı uzunluk ölçeklerinde yapısal farklılıkları olan bir hiyerarşi ile düzenlenmiştir. Bu hiyerarşiyi erişkin bir insan kemiğinde sürekli seviye (seviye 0), doku seviyesi (seviye 1), hücresel seviye (seviye 2) ve moleküler seviye (seviye 3) olmak üzere dörde ayrılır [72]. İnsan kemiğinde tarif edilen hiyerarşik yapısal organizasyon aşağıdaki Şekil 1.1 'de gösterildiği gibi sırasıyla makro yapı (kemik), mesost yapı (kemik doku), mikro yapı ve nanoyapı olarak tarif edilmektedir [72, 73].

Makro yapı; kemik yapısının 5 mm ve daha yüksek gözenekliliğine sahip olduğu yapı olarak tanımlanmıştır. Makro yapı da kortikal (veya kompakt) kemik ve trabeküler (veya süngerimsi) kemik olarak sınırlandırılmaktadır. Kortikal kemik ise %5 ile %10 arasında değişen bir gözenekliliğe sahiptir ve genellikle uzun kemiklerdir. Kortikal kemik eklemlerde ve omurlarda trabeküler kemiğin etrafındaki dış kabuğu oluşturmaktadır [74–76]. Trabeküler kemik ise %75-%95 arasında değişen bir gözenekliliğe sahiptir. Genellikle kübik şekilli (örneğin omurlar), düz (örneğin pelvis) ve uzun kemiklerdir [75]. Trabeküler kemik içindeki mineralize olmayan alanlar, kan damarları, sinirler ve çeşitli hücre tiplerinden oluşan bir doku olan kemik iliğini içermektedir. Kortikal kemik, toplam iskelet kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır, trabeküler kemik ise iskelet hacminin %70'ini oluşturmaktadır [74–76].



Şekil 1.1 Kemik Doku ve Kemikleşme Aşamaları [73]

Mesost yapıda; kortikal ve trabeküler yapılar için doku seviyesinde 100 µm-1 mm arasındaki ölçeklerde yapısal farklılıklar tarif edilir [72, 73]. Kortikal kemik, 150-300 µm çapında ve 3-5 mm uzunluğunda osteonlar ve osteonlar içinde bulunan kemiğin uzun eksen boyunca ilerleyen 40-50 µm kalınlığında Haversian kanallarından oluşur [72–74, 77]. Trabekül kemik ise yaklaşık 1 mm uzunlukta ve her biri yaklaşık 50 µm kalınlığında plakalardan oluşmaktadır [74–77].

Mikro yapı; hücresel düzeyde, 5-50 µm arasında bir ölçekte tarif edilen bir yapıdır. Bu yapıda dokunmuş/örülmüş kemik ve lamel (ince tabakalı) kemik olmak üzere iki tip kemik bulunabilmektedir [71]. Örgülü kemik, zayıf bir dokudur ve genellikle olası kırık sonrası yaralanma kaynaklı olarak erişkinlerde bulunabilir [72, 73]. Kemiğin gelişimi ile dokunmuş/örülmüş kemik, lamel (ince tabakalı) kemiğe dönüşür. İnce tabakalı kemik, 3-7 µm kalınlığında, mineral kristaller ve kolajen liflerinin anizotropik bir matrisini oluşturan bantlar veya katmanlardan oluşmaktadır [74–76]. Makro ve mesost yapılarda bulunan trabeküler paketler ve osteolar, lamellerden (ince tabakalardan) oluşmaktadır. Kalınlıkları yaklaşık 1-5 µm arasındadır [74–76, 78].

Nano yapı; ise moleküler düzeyde, 100 nm ve daha küçük ölçekli, biyolojik apatit kristallerinin, kollajenlerin ve kollajen olmayan organik proteinlerin bulunduğu bir

yapıdır [73–77]. Bu yapıda bulunan apatit kristalleri plaka şeklindedir [73, 77]. Kemikteki plaka benzeri biyolojik apatit kristalleri, kolajen fibrillerinin boşlukları içinde meydana gelir [79, 80]. Buda, kristallerin büyümesiyle ilgili bir sınırı oluşturmaktadır. Kemik sialo-proteinleri mineralizasyonu ve kemik osteo-pontin proteinleri kristal büyümesini (boyutunu) düzenlemektedir [71]. Mineral kristaller belirli bir kristalin yönelimiyle büyürler [73, 74, 77, 80]. Plakaların ortalama uzunlukları ve genişlikleri 50 x 25 nm'dir. Kristal kalınlığı 2–3 nm'dir [72–74].

İnsan kemiği ile ilgili bölüm içeriğinde yapılan tanımlardan kemiğin hücrelerden oluşan canlı bir mekanizma olduğunu, kendini yenileme özelliğine sahip, dinamik bir yapı olduğunu, kalsiyum ve fosfat içeren bir mineral deposu olduğunu ve kolajen ana faz içerisinde HAp kristalleriyle desteklenmiş doğal kompozit bir yapı olduğunu öğrendik. Bu yapıya sahip olan insan kemiği, aşağıdaki Çizelge 1.1’de özetlenmeye çalışıldığı gibi kimyasal bir bileşime sahiptir.

Çizelge 1.1 İnsan Kemiği Kimyasal Bileşimi [80]

Bileşim	% Ağırlıkça	Bileşim	% Ağırlıkça
Kalsiyum	34,80	Flor	0,03
Fosfor	15,20	Klor	0,13
Sodyum	0,90	Pirofosfat	0,07
Toplam organikler	25,00	Toplam inorganikler	5,72
Potasyum	0,03	Magnezyum	0,72
Karbonat	7,40	Su	10,00

Bu çizelgeden anlaşılacağı üzere kemiğin mineral fazının ana yapısı kalsiyum, fosfat ve oksijen atomlarından oluşturmaktadır [79, 80]. Kemiğin sahip olduğu organik ve inorganik yapıdan inorganik yapı kemiğe sertliğini veren HAp’ye sahiptir. Kemiğin sertliğini ve mukavemetini sağlayan HAp kemiğin belirli bir mekanik dayanım değerlerine ulaşmasını sağlamaktadır. Aşağıdaki Çizelge 1.2’de ise kemiğin mekanik özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.2 İnsan kemiği mekanik özellikleri [79]

Mekanik Özelliği	Kemiğin eksen	
	Paralel	Dik
Çekme gerilimi (MPa)	124-174	49
Basma gerilimi (MPa)	170-193	133
Burma gerilimi (MPa)	160	-
Kesme gerilimi (MPa)	54	-
Young Modülü (GPa)	17- 18,9	11.5

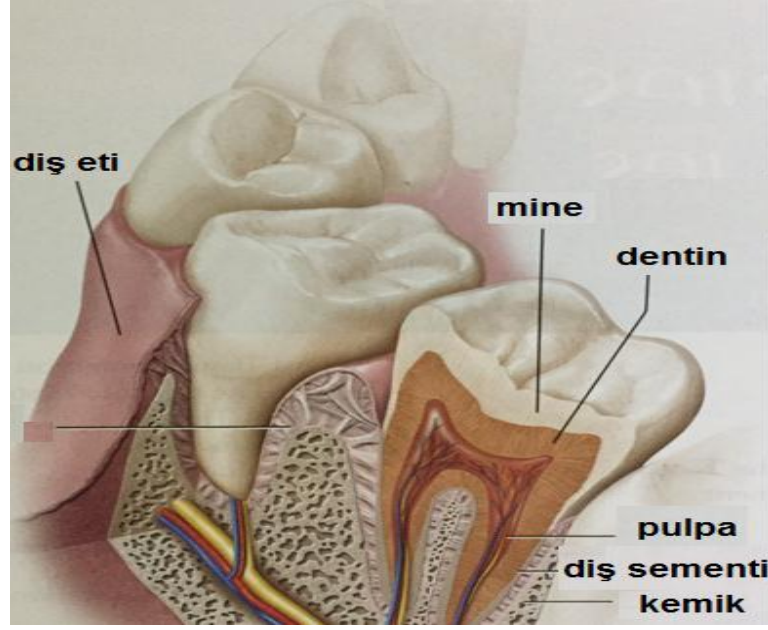
Çizelgede 1.2’de gösterilen değerler insan kemiği üzerinde yapılması gereken çalışmalar için bir kısıtlama oluşturmaktadır. Mekanik kontroller sonucunda elde edilen bu değerler çekme, basma, bükme, çentik darbe gibi bazı mekanik deneyler yapılarak elde edilmiştir [81, 82]. Bu mekanik değerlerin sağlanması için tıbbi amaçlı kullanım amacıyla üretilen HAp’lere metalik, polimerik vb. katkılamalar ile bu değerler sağlanmaya çalışılmaktadır [82].

Özet olarak, insan kemiği içerisinde mevcut olan inorganik yapı yani mineralli kısım kemiğin dört ana ögesinden nano yapı içerisinde bulunmaktadır. İnorganik yapı, HAp ve klorapatit (ClAp), fluorapatit (FAp), sodyum içeren apatit (NaAp) ve diğer mineralli fazlarınkine benzeyen kalsiyumdan ve fosfattan oluşmaktadır. Bu bilgiyle beraber aşağıdaki bölümde dişin temel yapısı, dentinin kimyasal bileşimi, yapısı, dentin tübülleri ve dentin hassasiyeti açıklanmaya çalışılacaktır.

1.1.1.2. Dişin Genel Tanımı

İnsan dişleri, yiyecekleri yutmaya ve sindirmeye hazırlanırken mekanik olarak kesme, ezme ve parçalama işlevi gören vücudumuzdaki en sert maddelerden biridir. İnsanlarda her biri belirli bir işlevi olan kesici, köpek, premolar ve azı dişleri olmak üzere dört tür diş vardır. İnsan dişi çiğneme için gerekli olmanın yanı sıra, konuşma içinde gereklidir. İnsanların en belirgin ve en uzun ömürlü vücut parçalarından olan diş, insanlarda ilk set (bebek, süt, birincil) olarak bilinen diş seti ile ikinci set (kalıcı, yetişkin) olarak bilinen diş seti ile tanımlanmaktadır [71]. İnsanların genellikle 20

tane ilk set dişi ve 32 adet kalıcı dişi vardır [71]. Aşağıdaki şekil 1.2’de görüldüğü gibi insan dişlerinin mine, dentin, sementum, pulpa ve diş eti olmak üzere temel yapı elemanları vardır.



şekil 1.2 Dişin genel yapısı [83]

Mine tabakası, vücudun en sert ve en yüksek mineralize maddesidir. Dentin, sementum ve diş özü ile birlikte dişi oluşturan dört ana dokudan biridir [83]. Mine tabakasının %96’sı mineral, %4’lük kalan kısmı su ve organik maddelerden oluşturmaktadır. Minenin normal rengi açık sarıdan grimsi beyaza kadar değişmektedir [71]. Minenin birincil minerali, kalsiyum fosfat olan HAp’dır [71], [83]. Mine içerisindeki çok miktarda mineral, mukavemetçe yüksek dayanıma sahip olmasını gösterse de kırılgan bir yapıya sahip olduğunu da göstermektedir [71]. Daha az mineralleşmiş ve daha az kırılgan olan dentin, minenin bu kırılgan halini telafi edebilecek bir elastikiyettedir [71]. Dentin ve kemiğin aksine, mine kollajen içermez. Mine gelişiminde dikkat çeken proteinler, Sheathlin veya Amelin olarak da bilinen Ameloblastin, mine gelişimi için önemli bir protein olan Amelogenin, Enam olarak bilinen Enamelin ve diş minesinde bulunan glikoprotein olarak bilinen Tuftelin proteinleridir [84, [85].

Dentin, mine ve pulpa odası arasındaki maddedir [83]. Gözenekli, sarı renkli malzeme ağırlıkça %70 inorganik malzemeler, %20 organik malzemeler ve %10 sudan oluşur. Organik kısmın %92'si kollajendir ve ana maddesi mukopolisakkarittir. Kalanını ise nonkollajenöz protein büyüme faktörleri ve proteoglikanlar oluşturmaktadır. İnorganik kısmın büyük bir bölümü ise HAp kristallerinden meydana gelmiştir. Dentinin su içeriği lokalizasyonla birlikte değişmekle beraber, su içeriğinin %8-16 arasında olduğu bilinmektedir [71]. Mineden daha yumuşak olduğu için daha hızlı bir şekilde çürüme eğilimindedir [83]. Dentin, organik bir kolajen protein matrisine sahip mineralize bağ dokusudur. Pulpa boşluğundan mine sınırına kadar içeriden dışarıya doğru uzanan mikroskobik kanallara dentin tübülleri adı verilmektedir [83]. Bu tübüllerin çapları iç kısmında 2,5 µm, orta kısımda 1,2 µm ve dentin-mine sınırı yakınında 900 nm aralığındadır. Küçük yan dallara sahip olmalarına rağmen, tübüller birbirleriyle kesişmez [71].

Pulpa (diş eti), yumuşak bağ dokusu ile doldurulmuş dişin merkezi kısmıdır. Bu doku, diş kök ucundaki delikten giren kan damarlarını ve sinirleri içerir. Pulpadaki diğer hücreler fibroblastları, preodontoblastları, makrofajları ve T lenfositlerini içermektedir. Dişin "sinir ucu" olarak adlandırılır [71, 83].

Tezin içeriğinde üretilen HAp'leri dentin tübüllerini tıkama işlemi için kullanılacağından dentinin ve dentin tübüllerinin genel özellikleri devam eden bölümde açıklanacaktır. Bu bölüm içeriğinde ayrıca dentin açıklığı sonucunda meydana gelen dentin hassasiyetleri hakkında da bilgiler verilecektir.

1.1.1.3. Dişin Temel Yapısı

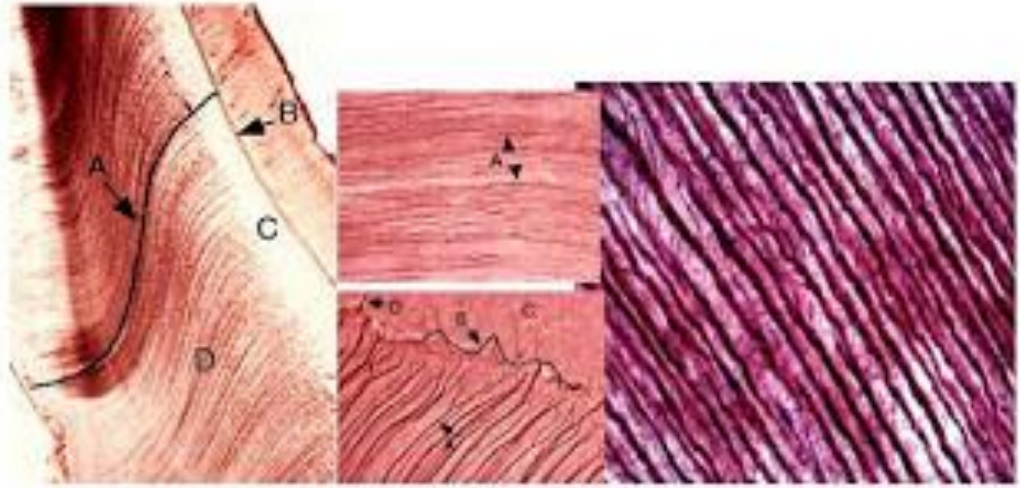
Dentin inorganik, organik ve histolojik bileşen olmak üzere 3 temel yapıdan meydana gelmektedir (Şekil 1.3).

İnorganik Bileşenler: Dentinin yapısında kalsiyum fosfat ve kalsiyum hidroksit bileşimindeki HAp bulunur. Dentindeki HAp kristalleri minedekinden daha küçük yapıdadır. Böylelikle dentin dokusunda hacimce daha çok toplam yüzey alanı işgal

ederler. Bunun sonucu olarak da asitle daha çabuk erirler ve dentin çürüğü minedekine oranla daha hızlı ilerler [71].

Organik Yapı: Jel ezelliğinde bir madde ve içinde bulunan lifsi bir protein olan kollajenden ibarettir. Kollajen fibriller 0,05–0,20 µm çapındadır ve 640 Å aralıklarla tekrarlanan periyodik enine çizgilenmeler gösterirler [71, 83]. Kollajen lifler birbirleriyle çok sıkı temasta olan demetlere sahiptir [83].

Histolojik Yapı: Dentin dokusunun yapı elemanları; dentin kanalları, dentin dokusunu oluşturan odontoblast hücreleri ve bunların uzantıları olan Tomes lifleri intertübüler dentindir. Dentin kanalları bir “S” harfi izercesine dalgalanarak uzanırlar [71, 83].



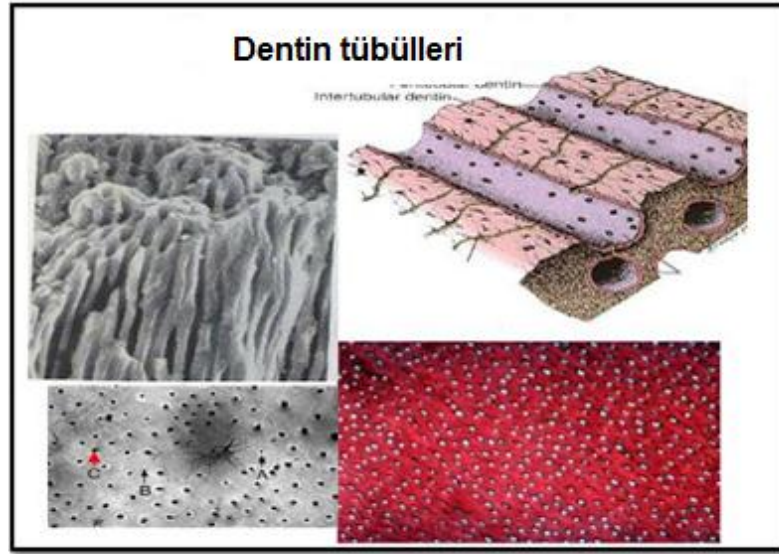
şekil 1.3 Dentin kanallarının yapısı [71]

Dişin gelişiminde primer ve sekonder dentin olmak üzere 2 tip dentin vardır [71]. Dişin sürmesinden önce oluşan orijinal tübüler primer dentinleridir [83] ve yaklaşık olarak 150 µm genişliğindedir [71, 83]. Bu hücreler ideal olan mineralizasyondan daha az mineralizasyona neden olacak şekilde daha kısa odontoblast uzantılarına sahiptirler. Sekonder dentin primer dentin gibi pulpa çevresindeki dentindir ve kök oluşumunun tamamlanmasından sonra oluşmaktadır [71]. Primer ve sekonder dentin arasındaki en büyük farklılık, sekonder dentinin

primer dentine göre oldukça yavaş oluşmasıdır. Her iki tip dentini de aynı odontoblastlar oluşturduğu için, tübüllerin devamlılığı korunur [71, 83].

Dentin Tübülleri

Dişin koronal kısmındaki dentin tübülleri mineden pulpaya doğru uzanır ve 2,5–3,5 mm uzunluğundadır [71]. Her bir dentin tübülü (Şekil 1.4 ve Şekil 1.5) en geniş boyutu pulpada, en küçük boyutu mine-dentin birleşiminde olan ters çevrilmiş koni gibidir. Gençlerde dentin kanalları pulpa odası yakınlarında 3-4 μm çapında iken mine-dentin sınırında bu çap 2 μm 'ye kadar düşmektedir. Dentin kanallarının mine-dentin sınırında veya sement yakınında mm^2 deki sayısı 70000–90000 arasında iken pulpaya yakın bölgelerde 30000–75000 arasında değişmektedir [71, 83].

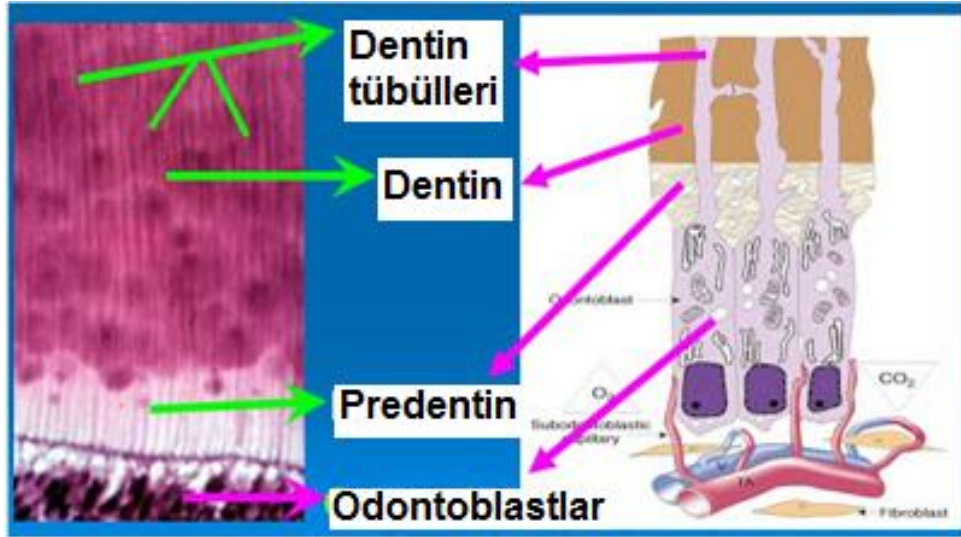


Şekil 1.4 Dentin tübülleri mikroskop ve şematik gösterimi [71]

Dentin kanallarının içini, gövdesi pulpanın çeperlerine sıralanmış olan odontoblast hücrelerine ait bir uzantı doldurur [71]. Şekil 1.3'de görüldüğü gibi bu uzantılar dentin tübüllerinin toplam uzunluklarının ortalama %25-30'una kadar ilerlemektedir [83]. Kimyasal, bakteriyel, fiziksel, ısısal ve travmatik uyarılar dentin kanalları vasıtasıyla pulpaya iletilmektedir. Bu dentin kanallarının üzeri diş çürümesi ve

kırılması olduğunda açılmaktadır [71, 83]. Sonuç olarak dişte hassasiyet ve ağrı meydana gelmektedir.

Tez çalışması içeriğinde hedeflenen de bu dentin tübül ağzlarının biyo aktif bir malzeme ile kapatılarak dış etkilere karşı kanalın korunmasını sağlamaktır.



Şekil 1.5 Odontoblastlar ve dentin tübülleri [71]

Dentin Hassasiyeti

Dentin hassasiyeti dişte herhangi bir dental hasar veya patoloji olmadığı halde sıcak ve/veya soğuk sıvı teması, dokunma veya kimyasal uyarılara cevap olarak artan, açık dentin yüzeyinde oluşan kısa süreli ve keskin ağrı reaksiyonu olarak tanımlanabilir [71]. Dentin aşırı hassasiyeti oluşumunda mine kaybı ve diş eti çekilmesi iki önemli etkindir. Dentin yüzeyinin açığa çıkması ile dentin tübüllerinin oral kavite ve pulpaya doğru açık olması bu dış etkilere karşı savunmayı zorlaştıracaktır. Bu açıklığın kapatılarak tübüllerdeki sıvı akışını azaltmak ve pulpadaki sinir iletimi üzerinde etkiyi azaltmak diş hekimliğinde tedavilerde tercih edilen yöntemlerdir [71], [83]. Yapılan çalışmalarda hassas dentinde hassas olmayan dentine göre daha geniş ve daha fazla açık dentin tübülü olduğu saptanmıştır [86–88]. Bu çalışmalarda hassas kök yüzeyinde hassas olmayan dişe göre, 8 kat daha fazla tübül gözlenmiştir.

Benzer olarak hassas dentinde tübül çapı hassas olmayan dentine göre 2 kat daha fazladır (hassas dentin tübül çapı 0,83 µm hassas olmayan dentin tübül çapı 0,40 µm) [87]. Bu bulgular, dentin yüzeyinde daha fazla ve daha geniş dentin tübülünün uyarı iletimi olasılığını ve ağrı iletimini arttırdığını göstermiştir.

Bu bilgiler ışığında dentin hassasiyetinin tedavisi için genel olarak dentin tübüllerindeki sıvı akışını azaltma ve sinir iletimini bloke eden ajanların kullanımın gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Dentin tübüllerindeki sıvı akışını azaltmak için HAp, stronsiyum klorit, silika ve kalsiyum içeren fiziksel ve kimyasal ajanlar tedavi sırasında smear tabakası oluşumunu veya tübüllerin tıkanmasını sağlamaktadır [83–85].

Dişin ana yapısı içerisinde olan dentinde yoğun bir şekilde HAp bulunması tezin içeriğinde HAp'nin ayrıntı olarak ele alınmasını gerekli kılmaktadır. Devam eden bölümde HAp'nin genel özellikleri, üretim metodları ve karakterizasyonu ile kullanım yerleriyle ilgili bilgiler verilecektir.

1.1.2. Sentetik Hidroksiapatit

Önceki bölümlerde değinildiği gibi kemik, yaşayan ve gelişen bir yapıya sahiptir. Aynı zamanda kemiğin ve/veya dişin doku esnekliği sağlayan organik bileşenleri içeren kollajenlerin yanında mekanik özelliklerini sağlayan kristallenmiş HAp'lerden oluşmaktadır. Dişin inorganik bileşenlerinden olan tri-kalsiyum fosfat, oktakalsiyum fosfat ve HAp gibi minerallerin vücut dışı reaksiyonlarla yani sentetik olarak üretilmesi, bu biyomalzemelerin tedavi amaçlı kullanımına yönelik çalışmaları arttırmıştır [11]. HAp, kalsiyum ve fosfat gruplarından oluşan bir biyomalzemedir [89, 90]. Kalsiyum fosfatlar (CaP), ortofosfatlarla (PO_4^{3-}), metafosfatlarla ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) ve bazen de hidrojen (H^+) veya hidroksit (OH^-) iyonlarıyla birlikte kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) içeren bir mineral grubudur [90]. Bileşimlerine bağlı olarak, sentetik kalsiyum fosfatların büyük çoğunluğu Ca/P oranlarına göre aşağıdaki Çizelge 1.3'de görüldüğü gibi formüle edilirler.

Çizelge 1.3 Kalsiyum Fosfatlar ve Formülleri [91, 92]

Adı	Ca / P Oranı	Formülü
Monocalcium phosphate monohydrate	0,50	$\text{Ca}_2(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$
Monocalcium phosphate anhydrous	0,50	$\text{Ca}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)$
Dicalcium phosphate dihydrate, mineral brushite	1,00	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Dicalcium phosphate anhydrous, mineral monetite	1,00	CaHPO_4
Octacalcium phosphate (OCP)	1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
α -Tricalcium phosphate (α -TCP)	1,50	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
β - Tricalcium phosphate (β -TCP)	1,50	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA)	1,50 -1,67	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)^{6-}_x(\text{OH})^{2-}$
Hydroxyapatite	1,66	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

HAp normal şartlarda $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ formülü ile doğal olarak oluşan bir mineral olmasına karşılık genellikle kristal birim hücrenin iki molekül içerdiğini belirtmek için $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formülü ile yazılmaktadır [89, 90]. HAp, genel olarak M5 (ZO_4) 3X formülüne sahip olan bir apatit ailesinden bir mineraldir; burada M, Ca^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+} veya Mg^{2+} , ZO_4 'de PO_4 olabilir; CO_3 veya SO_4 ve X de, OH^- , F^- , Cl^- veya CO_3^{2-} 'dir [92, 93]. HAp kemiğin mineral içeriğine en çok benzeyen kimyasal bileşimi ile doğal olarak oluşmaktadır [93, 94].

1.1.2.1. HAp' nin Fizikokimyasal, Mekanik ve Biyolojik Özellikleri

Tedavi amaçlı kullanılan HAp'ler biyoyumlu ve biyoaktif olmanın yanında bazı mekanik özelliklere de sahip olması gerekmektedir. Mekanik yüklere dayanabilecek HAp'ler için belirli bir tane şekli ve tane boyutu tarifi vardır. Bu biyomalzemeler için bal peteği desenli olarak Hall-Petch formülüne göre [95] ince taneli bir yapıda olması gerekmektedir.

$$\delta = \delta_0 + b\delta^{-1/2} \quad (1.1)$$

Tane yapısıyla ilgili bu formülde malzeme için karakteristik ve sabit olan δ_0 ve b ile beraber d tane büyüklüğü değeriyle mekanik mukavemet belirlenmektedir. Buna göre d tane boyutu arttıkça mukavemete karşı dayanımını gösteren δ değeri azalmaktadır. Bu nedenle vücut içi uygulamalar için kullanılacak olan bu biyomalzeme küçük taneli ve mukavemeti eşit paylaştırmayı sağlayacak bal peteği desenine sahip olması gerekmektedir.

Kalsiyum fosfatlar, amorf veya kristal yapıların oluştuğu sinterleme (1100-1300°C) adı verilen bir işlemle oluşturulur. Sinterleme koşulları ve reaksiyonun safsızlığı, nihai CaP'nin tipini, yapısını ve kompozisyonunu belirleyebilir [96]. HAp'nin Ca/P oranı 1,5–2,0 arası olan yapıları biyoseramik kaplama yapacak şekilde diş tedavilerinde ve ortopedik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. safsızlık ve tek fazlılık için yani stokiyometrik olarak HAp, ideal Ca/P oranı 1,667 ve teorik yoğunluğu 3.156 g/cm³ olarak bilinen [95, 96], biyoaktif ve biyouyumlu olduğundan kemik ve diş tedavilerinde kullanılabilen kalsiyum fosfat bazlı bir biyomalzemedir [97, 98]. Yüksek yoğunluklu HAp için ayırt edici temel özellikler, eğilme mukavemeti, gerilme mukavemeti ve kırılma dayanıklılığı ile belirlenmektedir. HAp için fiziksel, kimyasal, mekanik olarak gereklilikleri aşağıdaki Çizelge 1.4' te ve Çizelge 1.5' de gösterilmiştir.

Bu tane yapısının belirlenmesiyle ilgili işlemlerde SEM ile morfoloji, Zetasizer ile tane boyutu belirlenmektedir. Yapılan çalışmalarda bu iki yöntem kullanılarak tane yapısı hakkında bilgiler elde edilebilmektedir. Bununla beraber bu çizelgede erime sıcaklığının belirlenmesinde TGA (Termogravimetrik analiz), Ca/P oranının belirlenmesinde SEM-EDS, ICP-OES gibi analizler kullanılırken gözeneklilik tayininde BET (Yüzey Alanı Ölçümü) cihazı kullanılmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri için HAp üretim metodlarının hepsinde genel gereklilikleri sağlasa da mekanik özellikler için durum pek de öyle değildir. Gözlenen değerler için fizikokimyasal gerekliliklerde aralıklar darken aşağıdaki Çizelge 1.5'den de görüleceği üzere mekanik özelliklerde aralıkların geniş olduğu görülmektedir. Mekanik özelliklerle ilgili kısıtlamalar ortopedi alanındaki uygulamaları önemli ölçüde kısıtlasa da, metalik protezlerin kaplanması veya küçük kemik hasarlarının onarılması için mükemmel bir aday olmaya devam etmektedir [10].

Çizelge 1.4 HAp'nin fiziksel, kimyasal özellikleri [96, 97, 104]

Kimyasal Formül	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Kimyasal yapı	Hegzagonal
Ca/P oranı	1,666...7
Yoğunluk	3,00 – 3,22 g/cm ³
Gözeneklilik	0,1 - 3 %
a örgü sabiti	9,432 – 0,9418 nm
b örgü sabiti	6,881 – 0,6884 nm
Kristallik indeksi	33 - 37
Kristal boyutu	0,0250 x 0,0030 (nm)
Bozunma sıcaklığı	> 1200 (°C)
Erime noktası	1614 (°C)
Isıl iletkenlik	0,013 (W/cmK)
Isı kapasitesi (1100 °C'de sinterlenmiş ve oda sıcaklığında ölçülmüş)	180,16 J/molK
Uzay grupları	P63/m (hekzagonal) P21/b (monoclinic)
Kafes parametreleri	a=9,41-9,44 Å c=6,84-6,94 Å

Çizelge 1.5'den görüleceği üzere HAp'nin eğilme, basma ve çekme dayanımı değerleri sırasıyla 100-120, 350-450 ve 38-48 MPa aralığında belirlenmiştir [95, 96]. Burada dikkat çeken aralıklı geniş dağılım, artık mikroporozite, tane boyutu ve iyon katkılarının sonucunda meydana gelen etkilerden olmaktadır [95–97]. Bununla birlikte kemiğin mekanik özellikleri büyük ölçüde kemiğin insan vücudu içindeki yeri ile ilgilidir [99, 100].

Doğal kemik tane boyutu yaklaşık 20 nm çap ve 50 nm uzunluk değerlerine sahip HAp'lerle inorganik/organik kompozit yapıdan oluştuğundan, bu tane boyut değerlerine benzer bir büyüklüğe sahip olan HAp tanelerinin biyolojik ya da sentetik olarak üretilmesi konuları güncelliğini korumaktadır [102]. MgO-CaO-P₂O₅-Na₂O gibi katkılarla sentetik HAp seramiğin yoğunluğunu, sertliğini, basma ve çekme mukavemetini geliştirmeye yönelik çalışmalar mevcuttur [103]. HAp içerisine kalsiyumdan ya da fosfattan eksilterek bazı iyonların eklenerek yapılan çalışmalarda, aynı koşullar altında yapılan Vickers mikro sertlik tayininde katkısız HAp, iyon katkılı grupların sertlik değerlerinden % 40'tan daha az bir sertlik değeri gösterdiği sonucu elde edilmiştir [93, 100, 101, 103]. Bir polimer içine HAp katılması, materyalin bir bütün olarak kuvvetlendirilmesinin yanı sıra, gerilme mukavemetinin çoğunlukla attığı sonucunu elde etmişlerdir [103].

HAp klinik uygulamalar için kullanılması için sadece mekanik özelliklerle değerlendirmek yeterli değildir. Aynı zamanda, HAp vücut içi etkileşimler sebebiyle gerçekleşecek biyolojik etkilere karşı da dayanabilen biyouyumlu özellikte olmalıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda HAp biyoaktifliği, biyouyumluluğu, hücresel uygunluğu ve kemik iletkenliği yüksek, biyo bozunması düşük olan bir biyomalzeme olarak da tanımlanmıştır [103, 105].

Çizelge 1.5 HAp mekanik özellikleri [95–97]

Çekme mukavemeti	38 - 48 MPa
Elastik modülü	7 - 13 GPa
Eğilme mukavemeti	100 - 120 MPa
Basma mukavemeti	350 - 450 MPa
Kırılma tokluğu, KIC	<1,0 MPa/m ²

HAp'nin klinik uygulamalar için kullanmaya yönelik ilk girişimi 1920'de tavşanlardaki cerrahi kemik hasarlarını onarmak için yapay bir mineral kaynağı üretmek şeklinde denemelerle başlamıştır [91, 92]. Ancak insanlarda ortopedik

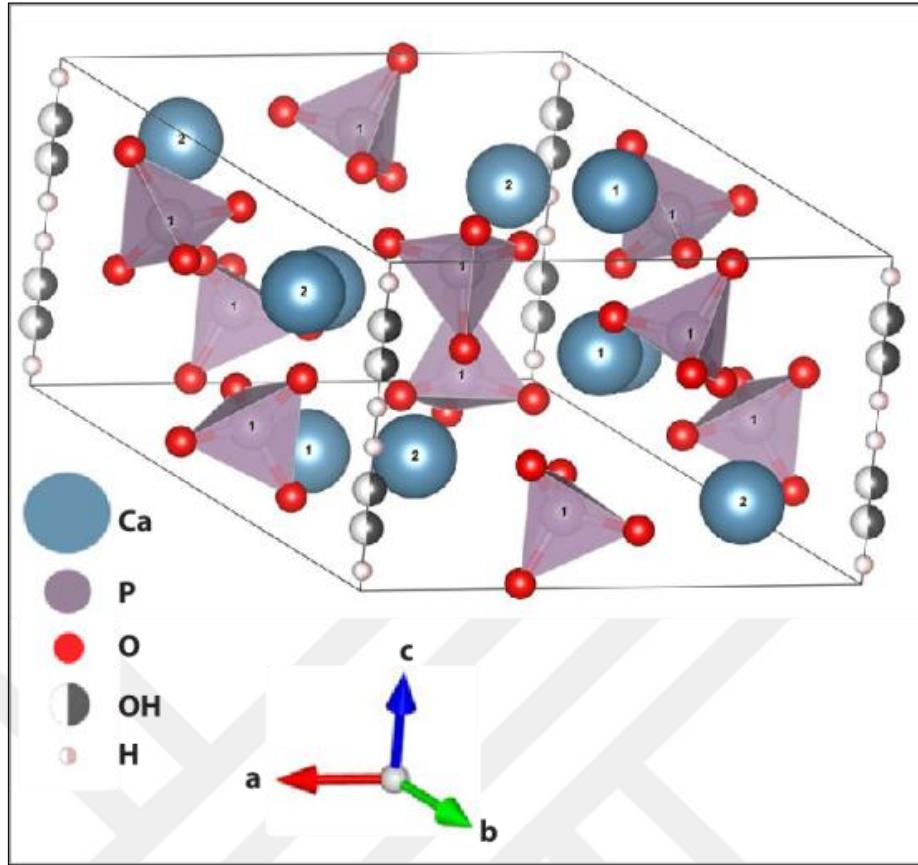
uygulamalar için kullanımı ve tanıtımı 1970'lerin başlarında başlamıştır [92]. Monroe ve arkadaşları 1971 yılında HAp'in kemik ve diş implant malzemesi olarak kullanılabileceğini önermesini [106], 1974 yılında Hubbard tarafından HAp ortopedik implant malzemesi olarak kullanımı önerisi takip etmiştir [107]. Bu çalışmaları diş hekimliğinde perodontik tedavi amaçlı olarak Nery ve arkadaşları tarafından 1975 yılında yapılan çalışma takip etmiştir [108]. En önemli çalışmalardan birisini de 1977 yılında Jarcho ve arkadaşları tarafından HAp'in kemik bağlanmasını açıkladığı çalışmadır [109]. Daha sonra HAp biyouyumluluğunu, biyoaktifliğini açıklayan kemik gelişimi anlatan çalışmalar takip etmiştir [110]. İlerleyen yıllarda *in vitro* çalışmaları *in vivo* çalışmalar da takip etmiştir. Daha sonraları HAp, protein safsızlaştırma, DNA izolasyonu, enzimlerin ve nükleik asitlerin safsızlaştırılması gibi çalışmalarda kullanılmıştır [111]. Devam eden bu çalışma akışı, sentetik HAp'nin insan kemiğinin mineral kısmına benzer özellikler taşıdığı, yüzeyinde kemik oluşumuna izin veren osteoiletkenlik özelliğe sahip olduğu sonuçlarını ortaya çıkararak ortopedik tedavilerde ve diş tedavilerinde kullanılmaya başlayan bir ürün haline gelmesini sağlamıştır [112, 113].

1.1.2.2. HAp'nin Fizikokimyasal, Mekanik ve Biyolojik Özellikleri

HAp'nin sitokiyometrisi onun kristal yapısını açıklamak için önemli bir parametredir. Tam sayılarla temsil edilemeyen elementel bileşime sahip ve kesin bir oranda birleştirilmemiş elementlere sahip hafif sitokiyometriye sahip HAp altıgen uzay grubu P63/m ve örgü parametreleri $a=9.422$ ve $c=6.880$ nm olduğu kabul edilmektedir [102, 114, 115]. Stokiyometrik HAp ise monoklinik P21/b ile ifade edilmektedir [114–116]. Bununla birlikte, sitokiyometrik HAp'de OH^- iyonlarına bağlanması bozuksa ya da OH^- iyonları yeterli değilse H_2O veya farklı iyonlardan dolayı yapı sitokiyometrik değil denilse de yapı altıgen olabilir [114–116]. HAp'nin monoklinik formu daha düzenli ve termodinamik olarak kararlı bir yapıdadır. HAp için iki ana kristal form olarak tanımlanan altıgen form monoklinik formdan daha stabildir. Bu nedenle biyolojik amaçlı biyomateryal olarak kullanım için daha çok tercih edilmektedir [117, 118].

HAp'nin altıgen formunun, 25°C ila 100°C'de aşırı doymuş çözeltilerden çökeltilmesiyle oluştuğu ve HAp'nin monoklinik formunun, 850°C'de ısıtılmasıyla oluştuğu önerisi kabul gören bir açıklamadır [115–117]. Bununla birlikte yapılan başka bir çalışmada [118], HAp için ısıtılma işlem parametrelerine göre altıgen ve monoklinik yapıların elde edilebileceği açıklanmıştır. Ancak bir diğer çalışmada [119] P63/m veya P63 altıgen yapısal modellerin P21/b simetrisine veya yeni önerilen monoklinik P21 yapısal modeline dayanan bir modelle karşılaştırıldığında ısıtılma işlem sonucunda bunun gerçekleşmesinin elverişsiz bir durum olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca, bir başka çalışmada da standart referans numunesinden XRD modellerinin Rietveld analizinden, HAp (SRM-2910)'nin % 23 P21/b ve % 77 P21 monoklinik fazların bir karışımı içinde kristalleştiği sonucu açıklanmıştır [114-115]. Altıgen ve monoklinik HAp'nin genel XRD modelleri hemen hemen aynıdır. Bununla birlikte, monoklinik HAp desenleri, en güçlü altıgen HAp desenlerinin %1'inden daha az olan ek zayıf hatlara sahip olarak tanımlanmaktadır [115, 120]. Aşağıdaki Şekil 1.6'da HAp'ye ait kristal yapısı görülmektedir.

HAp'nin kristal yapısı birim hücrenin iskeletinde P-O arasında oluşan tetrahedral fosfat düzenlemesi (PO_4^{3-}) ile oluşmaktadır. Bu fosfat diziliminde oksijenlerin ikisi c eksenine ile ve diğer ikisi yatay düzlemde hizalanmaktadır [121–123]. Kafes hücrelerinde iki tür kalsiyum iyonu konumu vardır. Bu konumlar tip I, Ca(I) ve tip II, Ca(II) olarak adlandırılmaktadır [117, 118]. Birbirine göre 60° derece döndürülmüş iki eşkenar üçgenden oluşan ve fosfat grubu oksijen atomları ve hidroksil tarafından kalsiyum iyonlarının çevrelendiği durum tip II, Ca (II) olarak adlandırılır. Yani, altıgen kalsiyum iyonları (veya altı kalsiyum iyonları) fosfat grubu oksijenleri ve hidroksil iyonlarıyla ilişkilidir. Bu grubun dışında kalan toplam 4 kalsiyum iyonu da tip I, Ca (I) olarak adlandırılır [122, 123]. HAp'nin birim hücreleri için kafes koordinatları aşağıdaki Çizelge 1.6' da görülmektedir.



Şekil 1.6 HAp Kristal Yapısı [120]

Ca (I) pozisyonlarındaki dört Ca atomu ile altı oksijen atomu arasında güçlü bağlar vardır. Sonuç olarak, Ca (I) iyonları c eksenini boyunca kuvvetli bir bağ yapacak ve c eksenini boyunca altıgen bir düzen oluşturacaktır [118]. Ca (I) bölgelerindeki metal-oksijen etkileşimlerinde herhangi bir bozulma olursa HAp kristal yapısını değiştirilebilir ve bu nedenle Ca (I) bölgeleri yalnızca Ca'dan daha küçük olan (veya muhtemelen biraz daha büyük olan) iyonların yer değiştirmesini tolere edebilir [118, 119]. Buda kalsiyumdan eksiltme yapılarak farklı iyon katkılarları için bir kısıtlama oluşturmaktadır. Tip (II), Ca(II) grubu genel kristal yapıyı etkilenmezken, daha büyük katyonlarla katkılama yapılarak ancak yapı üzerinde etki edebilir [118].

Çizelge 1.6 HAp birim hücreleri için kafes koordinatları [99], $\alpha = 90^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$

Atom	x/a	y/b	z/c
Ca(I)	1/3	2/3	0,0010
Ca(II)	0,2464	0,9938	1/4
P	0,3999	0,3698	1/4
O(I)	0,3272	0,4837	1/4
O(II)	0,5899	0,4666	1/4
O(III)	0,3457	0,2595	0,0736
OH ⁻	0,0000	0,0000	0,1930

1.1.2.3. HAp Bileşen Grupları

HAp'nin karakterizasyonu için birçok analiz yöntemi vardır. Bu yöntemler arasında en önemli iki analiz XRD ve FTIR analizleridir [11]. Yüzey morfolojisi, tane büyüklüğü ve yapısı ürünün kullanım yerindeki etkinliğine göre her uygulama için farklı tercih edilebilir. Antibakteriyel ve toksik özellikleri katkısız HAp haliyle ya da iyon katkılanmış haliyle her bakteri için farklı sonuçlar verebilir. Ancak HAp sentezi sonucunda sentezlenen ürünün yapısının araştırılmasında XRD ve FTIR yöntemleri en önemli analizlerdir. Ürünün kullanım yerinde ki hedeflerine göre ürün özelliklerinde değişim istense de her ürün için kristalografik ve bileşen grup yapısı değişmemelidir. Bu nedenle yapılan bütün sentez çalışmaları içinde XRD ve FTIR kesinlikle uygulanmaktadır [11].

FTIR, sentezlenen HAp biyomalzemesinin yapısal karakteristik grupların ve titreşim bağlarının varyasyonlarını belirlemeye yarayan bir yöntemdir [124]. FTIR spektroskopisi, birçok malzemenin kimyasal yapısını belirleme de kullanıldığı gibi, CaP ürünlerinin de kimyasal analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu analiz sonucunda elde edilen spektrum piklerin konum, yoğunluk, genişlik ve dalga sayısı gibi bilgileri göstererek, ürünün fonksiyonel gruplarının yorumlanmasında katkı sağlamaktadır [11, 124]. Bununla birlikte FTIR hem faz kompozisyonunu belirlemek için kullanılan çok hassas bir tekniktir hem de nispeten sonuç alması hızlı ve uygulaması kolay bir analizdir [3].

HAp temel olarak Ca, P, OH den oluşan bir biyomalzemedir. Bununla beraber biyolojik bir HAp genellikle kalsiyum eksikliğine sahiptir ve her zaman bir karbonat ile bu eksiklik ortadan kalkmaktadır. Bu karbonat grupları OH⁻'nin CO₃²⁻ ile CO₃²⁻↔2OH⁻ şeklinde bağlanma ile ifade edilen A-tipi bağlanma ve PO₄³⁻ tetrahedral grubun CO₃²⁻ bağlanması ile belirtilen B tipi bağlanmalarıdır. Bu nedenle bileşen gruplarının belirlenmesinde PO₄³⁻, OH⁻, CO₃²⁻, HPO₄²⁻ gruplarının varlığı tespit edilmelidir [124].

PO₄³⁻ grubu, 560 ve 600 cm⁻¹'de ve 1000-1100 cm⁻¹'de yoğun IR soğurma bantları oluşturmaktadır. Adsorbe edilmiş su bandı 3600 ila 2600 cm⁻¹'de geniş bir pik alanına sahiptir. 3570 cm⁻¹ ve 630 cm⁻¹'de daha zayıf bir pik vermektedir. CO₃²⁻ grubu ise 870 ila 880 cm⁻¹ arasında zayıf pik tepeleri vardır. Bununla birlikte 1460 ila 1530 cm⁻¹ arasında daha yoğun pik tepe noktalarına sahiptir [124]. FTIR'da yapılan bazı analizler sonucunda sentezlenen HAp'nin spektrumları Çizelge 1.7'de verilmiştir.

Çizelge 1.7 Sentezlenen HAp kimyasal gruplarının soğurma bantları

Kimyasal Grup	Soğurma Bandı	Tanımı
CO ₃ ²⁻	873; 1450; 1640 [124] 1650 [11]	PO ₄ ³⁻ tetrahedral grubun CO ₃ ²⁻ bağlanması ile belirtilen B tipi karbonat
PO ₄ ³⁻	460 [124] 474 [11]	Bükme titreşimi (v ₂)
	560 ve 600 [124] 571 ve 604 [11]	O–P–O bükme titreşimi (v ₄)
	960 [124] 961 [11]	Simetrik gerilme titreşimi (v ₁)
	1020 ve 1120 [124] 1046 ve 1090 [11]	Asimetrik gerilme titreşimi (v ₃)
OH ⁻	630 ve 3540 [124] 631 ve 3572 [11]	Sallanma (v ₁) ve gerilme (v _s) titreşimi
HPO ₄ ²⁻	875 [124]	Kalsiyum eksikliğini ifade eden titreşim
Soğurulan Su	3600 [124] 3600 [11]	Isıl işlem kaynaklı kalan su

1.1.3. HAp Sentez Yöntemleri

Sentetik HAp üretmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılan yöntem hangisi olursa olsun üretim sonundaki nihai ürünün karakteristik olarak uygunluğu üretimde kullanılan hammaddelere büyük ölçüde bağlıdır [11, 25]. Ham maddelerin safsızlığı nihai ürünün özellikleri üzerinde keskin bir etkiye sahiptir [25]. Sentetik seramik HAp tozlarının üretimi aşağıdaki başlıklar altında sınıflandırılmaktadır.

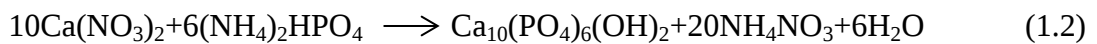
- Yaş Kimyasal Sentez (Çöktürme, Hidrotermal, Hidroliz ve Sol Jel Teknikleri)
- Kuru Kimyasal Sentez (Katı Hal Reaksiyonları, Mekanik Kimyasal Sentez)
- Buhar fazı reaksiyonları

Çöktürme metodundaki ana avantaj reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkacak yan ürünlerin öncelikle sudan oluşması ve işleme sırasında kirlenme olasılığının çok düşük olmasıdır. Düşük işlem maliyetleri ve aynı koşullar altına tekrar üretilebilirliğinin yüksek olması çöktürme metodu için avantaj kabul edilen durumlar arasındadır. Bu yöntem için sıklıkla not edilen dezavantaj ise kurutma işleminde, öğütme aşamalarında ve uzun ısıtma işlemlerinde yüksek kirlenme olasılığının var olmasıdır. Buna rağmen çöktürme yönteminin yüksek tekrarlanabilirlik gösterdiği bilinen bir gerçektir [70, 97]. Tezin içeriğinde üretimi planlanan HAp biyomalzemeleri için laboratuvar şartlarında üretim süreçleri daha kolay yönetilebilen ve tekrarlanabilirliği yüksek olan çöktürme metodu tercih edildiğinden bu kısımda diğer üretim metodlarına genel bir bakış sunulup, çöktürme metodu daha detaylı anlatılmaya çalışılmıştır.

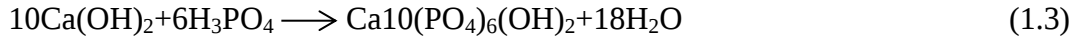
1.1.3.1. Çöktürme Yöntemi

Çöktürme metodunda HAp tozları inorganik oksit çözeltilerinin kimyasal reaksiyonundan elde edilmektedir [125]. HAp'nin çöktürmesinde kullanılan iki reaksiyon aşağıdaki gibidir [70, 125].

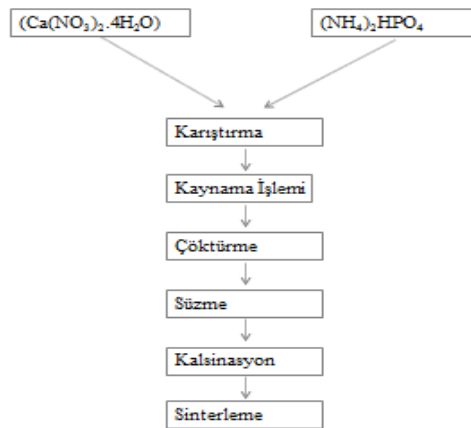
Reaksiyon 1;



Reaksiyon 2;



Reaksiyon 1, basit, üretim maliyeti ucuz ve büyük ölçekli endüstriyel uygulamalarda tekrarlanabilirliği çok yüksek olan bir yöntemdir. Reaksiyon hammaddeleri nihai ürün üzerinde etkili olmakla beraber safsızlık oluşturacak kirletici etkileri azdır. Yüksek sinterleme sıcaklığı da nihai ürün üzerinde olabilecek kirlenmeleri ortadan kaldırma da avantajlı bir durum olarak değerlendirilmektedir. Buna karşılık, Reaksiyon 2'nin üretim maliyeti yüksektir. Reaksiyonlar sonucu nihai üründe doğal kirlenmeler oluşmaktadır. Bu kirleticilerin nihai üründen tekrar uzaklaştırılması zaman ve maliyet açısından dezavantaja neden olmaktadır. Reaksiyon 2 sonucu elde edilen ürünün kalitesi reaksiyon 1 sonucu elde edilen üründen çok farklı değildir. Sadece zaman ve maliyet açısından dezavantaj oluşturan durum olduğundan çoğu çalışmada reaksiyon 1 tercih edilmektedir. Tezin içeriğinde aşağıda reaksiyon akış şeması (Şekil 1.7) verilen reaksiyon 1 tercih edilmiştir.



Şekil 1.7 Reaksiyon 1, HAp üretim şeması [11]

Reaksiyon 1'de reaksiyona giren ana girdilerin kalitesi katkısız HAp elde edilmesine doğrudan etkilidir. Reaksiyona giren kimyasalların safsızlığı, süreç parametrelerinin düzgün uygulanması ile karışım esnasında ki karıştırma hızı, karıştırma oranı, pH ve reaksiyon sıcaklığı gibi parametreler HAp' nin kristallik, kristalit boyutu, morfolojisi,

parçacık boyut dağılımı, yoğunluk ve yüzey alanı gibi özelliklerine doğrudan etki etmektedir [10, 70]. Reaksiyon 2'yi kullanarak yapılan bir çalışmada, reaksiyon sıcaklığının, reaksiyona giren madde miktarlarının, karıştırma oranının ve karışımda kalma süresinin üretilen HAp'nin genel özelliklerini etkileyebileceğini bulmuşlardır [10, 70]. Ayrıca yine bu çalışmada ortam pH değerlerindeki değişimin nihai üründe elde edilecek fazlar üzerinde etkili olduğu sonucu bildirilmiştir.

Kalsiyum nitrat çözeltisine diamonyum fosfat ekleyerek Reaksiyon 1 gibi geleneksel bir yöntemle 1.50-1.67 Ca/P molar oranı sahip HAp, Raynaud ve arkadaşları tarafından üretilmiştir [126]. Üretimde elde edilen bu değer diş hekimliği ve ortopedi tedavilerinde kullanımı düşünülen HAp için istenen bir Ca/P değeridir. Türköz ve arkadaşları da bu amaçla ürettikleri HAp için benzer Ca/P oranıyla beraber bal peteği desenine benzeyen, HAp taneleri arasında mikroorganizmaların giremeyeceği kadar küçük boşluklarda ve Ca, P ve OH bileşen gruplarının tümünü içeren ürün elde etmişlerdir [11]. Her iki çalışma tekrar üretilebilirlik açısından da kontrol edilmiş ve reaksiyon 1'in etkinliği gösterilmiştir. Reaksiyon 1 ya da reaksiyon 2 ile uygulanan çöktürme yönteminde başlangıç reaktif konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon atmosferik çevresi, karıştırma hızı ve sıcaklığı, ilk kaynama sıcaklığı, çöktürme süresi, kalsinasyon sıcaklığı ve süresi, sinterleme sıcaklığı ve süresi nihai ürün kalitesi üzerinde doğrudan etkilidir. Bu nedenle süreç adımları dikkatle takip edilmelidir.

Çöktürme yöntemiyle elde edilen HAp'lerde sitokiyometrik olmayan apatitler [127] ısıtma sırasında ayrışır ve TCP veya CaO olarak karakterizasyon aşamasında belirlenebilmektedir. Ca/P molar oranı 1,67'yi aşarsa, yani fazla Ca varlığı CaO oluşmasına neden olacaktır. Ca/P molar oranı 1,67'nin altında kalırsa yani fazla P varlığı TCP fazı oluşmasına neden olacaktır [128]. Bu nedenle başlangıç reaktif konsantrasyonu dikkatle ayarlanmalıdır.

Reaksiyon sıcaklığı da nihai ürünün kristallenmesine ve faz farklılıklarına neden olmakla beraber, kristalin boyutuna da etki etmektedir. Ayrıca reaksiyon sıcaklığı malzemenin yüzey alanını da etkilemektedir [128]. Bu nedenle karıştırma, çökeltme, kurutma ve sinterleme aşamalarında reaksiyon sıcaklığının kontrol edilmesi ve kararlı bir noktada sabitlenmesine dikkat edilmelidir [129]. Reaksiyon sıcaklıklarındaki değişimler malzemenin kristallenme yüzdelere etki etmektedir.

Tampieri, A. ve arkadaşları farklı sıcaklıklar kullanarak üretim yapmışlar ve elde edilen morfoloji için iki farklı kristallenme elde etmişlerdir [129]. Bununla beraber başka çalışmalarda yüksek sıcaklıkla uygulanan sinterleme işlemiyle HAp tozlarının kristallenmesinin arttığını ve tanelerin küresel bir morfolojiye dönüştüğünü gözlemişlerdir [11, 18, 127]. Elde edilen sonuçların morfolojik incelemesi için SEM, bileşen gruplarının belirlenmesi için ise FTIR kullanılmışlardır.

Çöktürme yönteminde nihai ürün üzerinde etkili olan bir diğer parametre ise reaksiyona giren ana ürünlerin karıştırma hızıdır. Karıştırma sürecinin, HAp tozlarının safsızlığı üzerinde etkili olduğu sonucu bilinmektedir [130]. Guilletti ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada deney koşullarının kristalin şekli, saflığı, kristalliliği ve hatta oluşan fazları da etkilediği bildirilmiştir [131]. Yüksek kristallilik ve saflık ile tane boyutu büyük malzeme istendiğinde karıştırma yüksek hızda ve çöktürme uzun sürede yapılmalıdır [130, 131]. Karıştırma hızı, HAp'nin homojen olarak çökmesi için yeterince yüksek olmalıdır. Çözeltilerin yavaş karıştırılmasıyla Ca/P oranı düşük olan ve biyolojik uygulamalar için tercih edilmeyen hem Monetit hem de Brushit fazları ortaya çıkmaktadır [131, 132].

Reaksiyon parametreleri arasında nihai ürün üzerinde etki eden bir diğer faktör atmosferik ortamdır. Çözeltilerin karıştırıldıktan sonra gerçekleşen çöktürme aşamasında atmosferik CO₂ emmesi meydana gelebilir. CO₂ emilimi CO₃²⁻'nin anyon formunda HAp kristal kafesine eklenebilmesi sonucunu ortaya çıkarabilir. Buda HAp kristal kafesinin az da olsa bozulması ile sonuçlanmaktadır [133]. Bununla birlikte, Azot (N₂) kontrollü ortamlarda, daha küçük CO₃²⁻ kirlenme yüzdeleri ortaya çıkmıştır [132, 133]. Bu nedenle filtrelenen inert gazın çökeltme işlemi sırasında sürekli olarak kullanılması tavsiye edilmektedir [132-134].

Üretim düzeneği ve üretim koşulları bakımından genel bir değerlendirme yapıldığı zaman çöktürme yöntemi, üretim süreçleri dikkatle takip edildiği zaman, küçük parçacık boyutu ve yüksek saflıkta HAp tozlarının üretilebildiği bir yöntem olarak ifade edilebilir. Çöktürme yönteminde çöktürme için karar verilen süre, çözelti konsantrasyonları, pH, asit ekleme oranı, karıştırıcı hızı, sıcaklık, reaksiyon süresi ve reaksiyon atmosferi nihai ürün kalitesi için dikkatle takip edilmesi gereken parametrelerdir [70]. Bununla beraber HAp içinde safsızlığa olumsuz katkı yapan kirlilik seviyelerini kontrol etmek ve azaltmak önemlidir. Bu kirlilikler yapı içinde

bir yerlere kimyasal olarak bağlanabileceğinden üretilen HAp'de ek faz ya da fazların olmasına neden olabilir [11, 18, 70]. Ancak bu kirliliklerin HAp'de kristolografik olarak farkların doğmasına az miktarda neden olsa da malzemenin genel biyouyumluluk özelliğini değiştirmediği sonucu elde edilmiştir [11, 20].

HAp üretimi, bu biyomalzemenin kullanım yerindeki amaca göre farklılaştırılabilir. Biyo aktifliğini arttırmak amacıyla iyon katkılarını yapma fikri biyolojik olarak aktif ve biyolojik olarak uyumlu bir malzemenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu farklı iyon katkılama işlemi kemik dokusu yenilenmesinde, antibakteriyel bölge oluşturma çalışmalarında sıklıkla kullanılmıştır. Reaksiyon 1 ya da reaksiyon 2'de Ca'dan ya da P'den eksilterek farklı iyonlar eklenerek üretimler yapılabilir. HAp'nin farklı iyonlarla katlanması, araştırmacılar tarafından son yıllarda odaklanılan bir konu olduğundan iyon katkılama yöntemleri, avantajları ve dezavantajları dikkatlice incelenmelidir.

1.1.4. İyon Katkılı HAp

Kemik mineralinde birçok eser element bulunabilmektedir. Bu elementlerden yola çıkılarak, HAp üretiminde yapı içerisine farklı iyon katkılama çalışmaları yapılmaktadır. Bu katkılarının sonunda HAp'nin kimyasal yapısının değişme olasılığı tartışılan bir konu olsa da biyolojik amaçlar için HAp'ye farklı iyon katkılmasıyla ilgili çalışmalar artmaktadır [96, 135, 136]. Kemik dokusunda Ca-P iyonlarına ilaveten çok az değerlerde de olsa K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cl^- ve F^- gibi iyonların varlığı tespit edilmiştir [135, 136]. Bu iyonların varlığının kan dolaşımında [137] bir tampon görevi gördüğü veya osteoblast hücrelerinin çoğalmasındaki aktiviteyi etkilediği gösterilmiştir [138, 139].

HAp'nin biyolojik uygulamalarında sıklıkla iyon katkılarını tercih edilmektedir. Tedavi sonucunda ortaya çıkabilecek olası enfeksiyon, ortopedi ve diş hekimliğinde nadir görülen ancak ciddi olarak sınıflandırılan bir sorundur. Bu olası sorunun çözümü için bakterilere karşı direnç sağlayabilecek elementlerin HAp'ye katkılандığı çalışmalar vardır [140]. Gümüş iyonlarının kalsiyum fosfat seramikleri içerisine dâhil edilmesi umut verici sonuçlar veren olası bir çözüm olarak

araştırılmıştır [141–143]. Gümüşün gram pozitif ve gram negatif bakteri, virüs ve mantarlara karşı yok edici olarak antimikrobiyal özellikleri uzun zamandan beri bilinmektedir [144–146]. Gümüş çok düşük konsantrasyonlarda bile (35 ppb) memelilerin hücreler üzerinde etkilidir [144, 145]. Mikroorganizmaların gümüşe karşı bağışıklık kazanma kabiliyetinin nispeten zayıf olması da gümüşün çalışmalarda tercih edilen bir iyon olmasını sağlamıştır [5, 25]. Geniş antimikrobiyal aktivite spektrumundan ve yüksek verimliliğinden dolayı gümüş katkılı HAp en çok çalışılan iyon katkılı HAp malzemelerinden biri olmuştur. Tezin içeriğinde hem antibakteriyel alan oluşturma hem de ilk andaki güçlü salım özelliğinden dolayı HAp'ye Ag(I) iyonunun katkılanacağından bu katkılama işleminin nasıl yapılacağı burada açıklanacaktır.

İyonlar ve özellikle Ag(I) iyonu HAp yapısına aşağıdaki yöntemlerden biriyle dâhil edilebilir:

- (i) Tüm öncüllerin suda çözündüğü ve aynı anda çöktüldüğü ıslak çökeltme yöntemi [147]
- (ii) Önceden hazırlanmış katkısız HAp ile HAp'nin tuz çözeltisine batırılarak metal tuz çözeltisi arasında iyon değişimi [148]
- (iii) Monomerlerden bir koloidal çözeltinin oluştuğu ve bütünleşmiş iyonlar ve seramik kristalleri ağı için öncül olarak görev yapacak Sol-Jel yöntemi [149]
- (iv) Metallerin nanopartiküller üzerine biriktirilmesiyle yapılan ultrasonik püskürtme pirolizi [150]
- (v) Mikrodalga yöntemi [151]

Kullanılan teknikler incelendiğinde kirlenme etkilerini en aza indirebilecek, elde edilen malzemenin nihai yapısını ve kristal boyutunu [146–148] düzenleyebilecek kurutma ve sinterleme gibi ısı işlemlerin aynı anda olduğu çöktürme metodu (i) tercih edilmiştir.

Ag(I) iyonunun hücrelerle etkileşime girmesi ve antimikrobiyal olarak aktif olması aşağıdaki iki madde ile açıklanabilir. Bunlar;

- HAp yüzeyindeki gümüş iyonlarının mikroorganizmaların hücre duvarı ile doğrudan etkileşimidir.
- Mikroorganizmayı çevreleyen HAp'nin içyapısından ortama gümüş iyonlarının salınması ve antibakteriyel etkinliğinin uygulanmasıdır [147].

Gümüşün bilinen antimikrobiyal etkisine rağmen, uygulamalarda katkı oranı çok yüksekse toksik olarak ifade edilmektedir [148–150]. Bu amaçla yapılan çalışmaların birinde % 1,0 ila 1,5 oranında Ag(I) iyonu eklenmiş HAp hücre çoğalmasında katkılama yapılmamış HAp'ye göre dikkate değer bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [147]. Bu nedenle antibakteriyel etkileri saplamak ve toksik etkilerden kaçmak için HAp'ye katkılanan gümüş yüzdesinin eşiğinin belirlenmesi önemlidir.

Ag(I)-HAp umut verici antimikrobiyal özellikler gösterdiği bilinmesine rağmen toksikolojik etkileri önlemek için yapıdan salım yapabilen gümüş iyonlarının konsantrasyonu belirlenmelidir. Antibakteriyel etki elde etmek amacı düşünülürken yapıdan biyolojik ve kimyasal etkilerle salım yapabilen gümüş iyonları belli bir değer üzerinde toksik etki gösterebilir. Bu salım karakterizasyonu için AAS, ICP-OES gibi cihazlarda gün/salım değeri (ppm) olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır [28–32]. Bu çalışmalardan birinde gümüş katkılamanın yanında SrO'nunda katkılanmasıyla, Ag (I)-HAp'ın sitotoksik etkilerini, antimikrobiyal etkisinden ödün vermeksizin etkin bir şekilde telafi edebileceği bildirilmiştir [142]. Samani ve arkadaşları [147], Zn'nin ikinci bir katkı olarak eklenmesinin antimikrobiyal etkiyi arttırdığını bildirmiştir. Bu çalışmalarda gümüşün salım olasılığı değerlendirilmemiştir. Oysaki gümüşün yapıdan salım riski toksik etki doğurabileceğinden çalışma içeriklerinde salım değerleri ve salım kinetiği belirlenmelidir.

Ag(I) katkılı HAp ile ilgili yapılan bir başka çalışmada 20 ppm'lik AgNO₃ çözeltisine HAp daldırarak iyon değişimi ile HAp'ye Ag(I) ilavesi yapılmaya çalışılmıştır. Elde edilen ürünün *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas Aeruginosa*, *S. Aureus* ve *S. Epidermidis*'e karşı katkılama yapılmayan HAp'ye göre antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışma içeriğinde literatür bilgilerini destekleyen sonuç ise antimikrobiyal etkinin gözlenmesi için bir kritik

değerin varlığıdır. Bu kritik değer altında katkılanmış HAp, katkılanmamış HAp ile aynı sonucu vermiştir [148].

Çöktürme metoduyla yapılan üretimle elde edilen HAp tozlarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, üretim süreçlerindeki değişimlerle farklılaşabilmektedir. Bu özelliklerdeki değişimler HAp'nin sahip olması gereken genel özelliklerini değiştirebilmektedir. Hem süreç etkinliğinin değerlendirilmesi hem de HAp'nin genel kaidelere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Böylelikle HAp tozu özellikleri için gereken optimum değerler kontrol edilebilecektir. Bu bölümün sonunda HAp'nin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin nasıl tayin edileceği açıklanacaktır.

HAp'nin ilk klinik kullanılışından bu yana hücrelerin ve dokuların bu materyale nasıl tepki gösterdiğine dair bilgiler yeterli düzeye ulaşmıştır. HAp'nin vücutla biyolojik uygunluğu ürünün kullanımı için tek başına bir kaide değildir. Örneğin diş üzerindeki uygulamalarda çene basma kuvveti sonunda oluşan fiziksel yüklere karşı dayanımı da son derece önemli kaidelerdendir. Biyolojik uygunluk, antibakteriyel etkinlik ve hücre canlılığı gibi araştırma konularının yanında şu anda HAp'nin mekanik dayanımının, gücünün, elastikiyetinin ve tokluğunun kemiğe daha yakın olması için farklı polimerlerle beraber uygulamaları da mevcuttur [152, 153]. Sentetik HAp'nin hücre ve kemik biyolojisindeki uygunluğun yanında fiziksel mimarisi ve yüzey özellikleri, hücre çoğalmasını farklı şekillerde sağlamak için inorganik ve organik kimyasal sinyallerle nasıl etkileşeceğini anlamaya yönelik çalışmalar da vardır [72].

İyon katkılama yapılmış ürünlerin biyolojik uygunluğu, fiziksel ve mekanik kuvvetlere karşı dayanımı gibi konular HAp'nin kullanım yerindeki etkinliği için önemlidir. HAp'nin kullanım yerinde biyolojik etkilerden kaynaklı parçalanmaların olmaması ortopedik ve diş tedavi uygulamalarında arzu edilen bir durumdur. Bu amaçla yapılan çalışmalarda HAp biyolojik etkilere karşı dayanımı en yüksek olan biyomalzeme olarak bulunmuştur [133, 154, 155]. Ducheyne yaptığı çalışmada [154], tek fazlı sentetik HAp seramiklerinin çözünme hızının, stokiyometrik HAp < Ca eksiltmeli HAp < oksihidroksiapatit (OHAp) < β -TCP < α -TCP ile sıralandığını ve bu sıraya göre biyo bozunmanın arttığını bildirmiştir. Bu da çok fazlı HAp'lerin degradasyona uğrayacağı sonucunu elde etmemizi sağlamaktadır. Kullanım yerinde

parçalanabilen özelliklerde bir HAp isteniyorsa tek fazlı yerine β -TCP gibi gözenekli seramiklerin kullanımı daha uygun olacaktır. Biyo bozunma özelliğinin belirlenmesi için degradasyon çalışmaları yapılmaktadır. Serdar ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada HAp'nin diş üzerine kaplanan ürünün diş üzerinde degrade olmadığı ve biyobozunmaz bir malzeme olduğu sonucunu bildirmişlerdir [3]. Bununla birlikte yine aynı çalışmada mikro ve makro gözeneklilik derecesinin, kimyasal bileşimin ve uygulama pH değerinin, malzemenin kristalliliğinin biyolojik bozulmayı/çözünmeyi etkilediğini bildirmişlerdir. HAp ile Ag(I)-HAp biyomalzemesinin biyobozunurluğunun test edildiği bir başka çalışmada ise gümüş katkısıyla beraber ürünlerin daha az bozunma eğiliminde olduğu sonucu elde edilmiştir [156]. Biyolojik olarak bozunmanın *in vitro* değerlendirmesi, HAp'nin sahip olduğu Ca, P iyonlarının yanına bazı iyonların eklenmesinin başarısını da gösterecektir. Yapı içersine eklenen iyonlar biyobozunmaz ya da biyobozunur HAp elde etmemizi sağlayabilir.

Sonuç olarak HAp içersine iyon katkılanması antibakteriyel ve toksik etki ile beraber iyon salımı ve biyobozunurluk açısından değerlendirilmelidir. Elde edilen sonuçlar HAp'nin ortopedik ve diş tedavilerinde kullanımı için bizlere ipucu verecektir. HAp'nin diş hekimliğinde dentin hassasiyet giderme çalışmalarında kullanılabileceğine dair bilgiler Serdar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir [3].

1.1.5. Dentin Tübül Tıkama Çalışmalarında HAp

Mine tamiri, dentin hassasiyetlerinin ana kaynağı dentin tübüllerin ağızlarının kapatılması ve dentin kanalların doldurulması ve kozmetik diş hekimliği uygulamalarında HAp kullanımı yaygındır.

Dentin hassasiyeti, diş rahatsızlıklarının yaklaşık %57'sini oluşturan rahatsız edici bir durumdur. Tipik olarak diş ısısal, dokunsal, sıcak ve soğuk diyet veya kimyasal uyarıcılara karşı verilen yanıt diş hassasiyeti olarak tanımlanır. Dentin kaynaklı ağrı olarak tanımlanan bu ağrılar herhangi bir diş kusuru veya patolojisi ile açıklanamamaktadır. Dentin, diyet faktörleri ve vücut pH değerleri kaynaklı olarak yıpranabilir. Dentin duyarlılığına karşı en yaygın kabul gören teori hidrodinamik

teoridir [157]. Bu teori, dentin tübüllerinin ağzının açık olmasıyla tübüllerin kanalları içindeki sıvıların hassasiyet oluşturduğunu varsaymaktadır. Bu sıvı hareketi, diş sinir uçlarındaki algılayıcıları uyarak hassasiyet etkisini oluşturmaktadır. Kimi zaman bir sızlama olarak hissettiğimiz bu uyarılar ileride daha ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Dentin hassasiyetlerini tedavi etmek için sinir duyarsızlaştırılması, dentin tübül ağzlarının kapatılması veya dentinin sızdırmazlık maddeleri ile tıkanması gibi tedavi yöntemleri vardır.

Dentin hassasiyetine dentin tübül ağzlarının açık olması en önemli etkidir. Günümüzde dentin tübül ağzlarının tıkanması için reçine uygulaması [67] ve lazer ışınlama [157] yöntemleri kullanılmaktadır. Reçine kullanımından kaynaklı alerjik reaksiyonlar, lazerli ışınlama enerjisinin uygulama zorluğu, hastalıklı bölgenin yüksek enerji ile yanması gibi yan etkiler sıklıkla tercih edilen bu iki yöntemin sahip olduğu dezavantajlarıdır [157]. Bu yıllarda HAp'nin hassasiyet giderici olarak çalışması düşünülmesine de dentinin bir kısmının kazılarak, daha sonra HAp uygulamasıyla hem mineralleşme hem de tübül ağzlarının tıkanması fikri yaygınlaşmaya başlamıştır. Bağlar ve arkadaşları HAp kullanarak dentin tübüllerini ağzlarını toz HAp'lerle yapay tükürük içinde çöktürme metoduyla kaplamayı başarmışlardır. Yine bu çalışma da dentin yüzeyinin tamamen kapatıldığı ve diş tübüllerinin bir kısmında HAp'nin tübül kanalları içine aktığını tespit etmişlerdir. Klinik olarak aktif kullanımı henüz olmasa da lazerle beraber uygulanarak ya da biyouyumlu ve biyobozunur bir yapıştırıcı kullanılarak klinik uygulamalarda da yapılabilirliğine dair görüş belirtmişlerdir [3].

1.1.6. HAp' nin Karakterizasyon Parametreleri

HAp ile ilgili önceki bölümlerde yapılan tanımlamalarla HAp'nin kemik içersinde nano boyutta bulunan Ca ve P iyonlarından oluşan bir biyomalzeme olduğunu öğrendik. Ca ve P içeren bir biyomalzeme olarak kemikte oluşan boşlukların doldurulmasında bir dolgu malzemesi veya diş hekimliğinde tıkama ajanı olarak HAp, ortopedik kaplamalarda, diş, yüz ve kulak kemiklerinde, kalça ve diz protezleri gibi çeşitli tıbbi birçok uygulamalarda kullanılabilmektedir. Çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilen HAp, canlı vücudunun değişken koşullarına sahip olan

ortamlarında kullanılabilmektedir. Canlı vücudun bir parçası olarak kullanılacak olması HAp'nin fiziksel, kimyasal ve mekanik gerekliliklerinin yanında biyolojik olarak da gerekliliklerinin olmasını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle HAp'nin karakterizasyon aşamalarının fiziksel, kimyasal, mekanik ve biyolojik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. HAp'nin sağlık sektöründe canlıda kullanım amacı olduğu için, FDA, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından tanımlı bazı kabul kriterleri vardır. HAp ürünlerini canlıda kullanım amacıyla üretilmişse canlı deneyleri öncesinde aşağıdaki Çizelge 1.8'de gösterilen test verilerinin raporlanmasını ve kriterleri sağlaması gerekmektedir.

Çizelge 1.8 Analiz Parametreleri

Kullanım Amacı	Analiz Adı / Metodu
Elementel analiz	SEM-EDS, XRF, AAS, ICP-OES
Kimyasal Yapı ve kristalografik inceleme	XRD
Yüzey morfolojisi incelemesi	SEM
Tane boyutu tayini	ZETASİZER
Ca/P oranı tayini	SEM-EDS ve ICP-OES
Bileşen grupları tayini	FTIR
Yoğunluk tayini	Archimed Metodu
İyon salım tayini	AAS, ICP-OES
Bozunma sıcaklığı, Erime noktası tayini	TGA-DSC
Mekanik özellik tayini	Çekme Mukavemeti, Elastik Modülü, Eğilme Mukavemeti, Basma Mukavemeti, Kırılma Tokluğu, Sertlik Testi
Biyouyumluluk	Sitotoksisite
Biyobozunurluluk	Degradasyon
Mikroorganizma Direnci	Antibakteriyel Analiz

Bu tez çalışması içeriğinde HAp'nin fizikokimyasal özelliklerini karakterize etmek için XRD (kristalografik yapısı), SEM (parçacık morfolojisi), ZETASIZER (parçacık boyutu), FTIR (bileşen grupları), ICP-OES, EDS (Ca/P oranı), Archimed Metodu (yoğunluk tayini) ve biyoyumluluğunu test etmek için Sitotoksite (Hücre Canlılığı), Antibakteriyel analiz (Mikroorganizma Direnci), Degradasyon (Biyobozunurluk) analiz işlemleri kullanılmıştır.

HAp' nin tedavi amacıyla kullanılması durumunda rapor edilmesi gereken özelliklerinden bu tez çalışması içeriğinde kullanılan zorunlu analizlerle ilgili kısa bilgiler;

- a. Elementel Analiz: “50 ppm den daha fazla değerde olan ağır metaller ve bunlarla sınırlı olmamak üzere safsızlığa neden olabilecek element yüzdeleri belirlenmelidir” kısıtlaması nedeniyle elementel bir analiz yapılması gereklidir [134]. Elementel analiz işlemleri için SEM-EDS, ICP-OES gibi cihazlar kullanılarak ppm seviyesinde skrolama yapılmalıdır.
- b. Kristalografik İnceleme: Üretilen HAp tozlarının faz farklılıklarını gösterecek şekilde HAp tozunun Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi tarafından verilen kırınım pikleriyle uyum içinde olmalıdır [134].
- c. Yüzey Morfolojisi ve Tane Boyutu: Üretilen HAp tozları kullanım yerindeki amaca göre morfolojik olarak incelenerek tane boyutları, tanelerin yerleşim şekillerini ve kristallenme durumu 5µm ölçek değeri ve altında görüntülenmelidir [134]. Bu işlemlerde morfolojik inceleme için SEM kullanılmakla beraber tane boyu incelemesinde Zetasizer'da kullanılmaktadır. ISO 13779-1 [158] standardında geçerli değerlere göre tane boyutları not edilmelidir.
- d. Ca/P Oranı: Üretilen HAp tozları için atomik yüzde olarak Ca / P oranları rapor edilmelidir. İstatistiksel olarak anlamlı bir ortalama ve varyans üretmek için analiz en az 6 tekrarla yapılmalıdır [159].
- e. Bileşen Grupları: HAp tozunun IR tayfları belirtilmeli ve spektrumlar yoğunluğa karşılık dalga sayısı olarak çizilmelidir [160]. Bu çizimde HAp'nin sahip olduğu CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- gruplarının dalga sayıları belirtilmelidir.

- f. Yoğunluk: Üretilen HAp tozları literatürde tanımlı 3.00 - 3.22 g/cc [11] değerini sağlayıp sağlamadığı belirlenmelidir. Bu analiz işlemi için açık bir analiz yöntemi zorunluluğu yoktur [158].
- g. Biyouyumluluk (Sitotoksosite ve Degradasyon) : Üretilen HAp tozlarının biyouyumluluk gereklilikleri, ISO 10993, Medical Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi [161] standardında belirtilmiştir. Bu standardın 5.bölümünde çeşitli *in vitro* yöntemlerle sitotoksosite testlerini belirtirken, 13.bölümde bozunurluk tayini için degradasyon testini açıklamaktadır.
- h. Antibakteriyel Analiz: Üretilen HAp tozlarının kullanım yerinde antibakteriyel etki yapması düşünülüyorsa, hangi bakterilere karşı etkili bir malzeme olduğunu göstermek adına antibakteriyel analiz yapılmalıdır. Yapılan analiz sonuçları saat - yüzde olarak belirlenmelidir [162].

1.2. Tezin Amacı

Gelişen teknolojiyle birlikte insanların yaşam kalitesini arttırmaya yönelik çalışmalar da hız kazanmaya başlamıştır. Bu bağlamda, insan vücudunun en önemli öğelerinden biri olan dişin tedavisi ve korunması aşamalarında önemli yol kat edilen biyomalzeme bilimi ile insan vücudunda mevcut canlı dokuların görevlerini yerine getirmesinde yardımcı olmak amacıyla yeni malzemeler geliştirilerek üretilmektedir. İnsanların ağız hijyeni için yeterli tedbirleri almaması dişte oluşabilecek bütün hasarlar için ana faktör olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında beslenme alışkanlıklarına dikkat edilmemesi ve sonucunda bakteriyel metabolizmalardan kaynaklanan etkiler dişin sert dokularında mineral kayıplarına neden olmaktadır. Bu olumsuz etkilerin sonucunda dişte gerçekleşen yıpranmalar ve aşınmalar ile diş dentin tübüllerinin ağızlarının açılmasına sebep olarak dentin hassasiyeti şikâyetlerine neden olmaktadır. Bu hassasiyetlerin giderilmesi amacıyla hidroksiapatit biyomalzemesi sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı diş hekimlerinin dentin hassasiyeti giderme çalışmalarında kullandığı önemli bir biyomalzeme olan katkısız hidroksiapatiti ve % 0,05, % 0,20, % 0,40 gümüş katkı oranlı hidroksiapatitleri *in vitro* olarak çöktürme yöntemiyle sentezleyip uluslararası kriterlere uygunluğunu fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak

değerlendirdikten sonra dentin yüzeyi kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliğini araştırmaktır. Bu doğrultuda üretilen hidroksiapatit ve gümüş katkılı hidroksiapatit biyomalzemelerinin çöktürme yöntemiyle üretimi aşamalarında ki kritik işlem parametrelerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Üretim sonucu elde edilen nihai ürünün faz tanımlama ve faz safsızlığı, bileşen gruplarının tayini, yüzey morfolojisi, yoğunluk ve tane yapısı incelenerek fiziksel ve kimyasal olarak uygunluğunun belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca gümüş katkısıyla beraber tedavi esnasında gerçekleşebilecek enfeksiyonları veya daha önceden var olan enfeksiyonları önlemeyi ve gidermeyi amaçlayan bu çalışma da antibakteriyel bölge oluşturma hedefinin gümüş salımıyla beraber negatif bir etki oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Hidroksiapatit tozlarındaki gümüş iyonlarının bazı antibakteriyel özellikleri gösterebileceği bilinmesine rağmen, bu çalışmada temel bir amaç, seçilen gümüş iyon oranları için, seçilen bazı bakteriyel türlere karşı her numune için ayrı ayrı antibakteriyel tepkisini ölçmek ve en uygun konsantrasyon aralığını tespit etmek amaçlanmıştır. Dentin tübül kaplama çalışmasından önce üretilen hidroksiapatit biyomalzemelerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonların uluslararası kısıtlamaları sağlayıp sağlamadığı belirlenen bu çalışmada uluslararası kısıtlamaları karşılayan bir biyomalzeme üretmek amaçlanmaktadır. Bu şartları sağladığı tespit edilen ürünlerin dentin tübül yüzeylerine ağız ortamı taklit edilerek kaplanması amaçlanmıştır. Dentin tübül yüzeylerine kaplanan malzemelerin uygunluğu çeşitli testlerle kontrol edilerek yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda bu tez çalışması 5 bölümle hazırlanmıştır. Dişin ve hidroksiapatitin genel yapısı tezin 1. bölümünde açıklanmıştır. Üretim yöntemi ve karakterizasyon aşamalarının anlatıldığı 2. bölümde çöktürme yönteminin bütün aşamaları ve karakterizasyonda kullanılan yöntemler ve cihazlar açıklanmıştır. Yapılan üretim sonucunda elde edilen hidroksiapatit ve gümüş katkılı hidroksiapatit tozlarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonundan elde edilen veriler tezin 3. bölümünde yer almaktadır. Bununla beraber hidroksiapatit tozlarının uluslararası kriterlere uygunluğunun test edildiği bu bölüm gümüş salım tayini ile devam etmektedir. 3. bölümün sonunda ise fiziksel, kimyasal ve biyolojik

karakterizasyonu yapılan ve en iyi salım karakterine sahip hidroksiapatit ve % 0,40 gümüş katkılı hidroksiapatitin dentin yüzeyine kaplama etkinliğinin sonuçları ve tartışma bölümü vardır. 4. bölüm olan Sonuçlar kısmında ise elde edilen bütün verilerin sonuçları yer almaktadır. Tezin son bölümü olan 5. bölümde ise Kaynaklar kısmı yer almaktadır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Giriş

Bu bölümde, dentin tübüllerinin tıkanarak dişte hassasiyet giderici etki elde etmek amacıyla üretilen HAp'nin üretiminde seçilen çöktürme metodunun üretim süreçleri ve ekipmanları, üretim sonucunda uygulanacak fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyon parametreleri, HAp yapısı içine katılan gümüş iyonlarının salım tayini ve dentin tübüllerine tıkama amaçlı kullanılan yöntem açıklanacaktır.

Bu tezin nihai amacı, dentin tübülleri üzerine kaplama malzemesi olan HAp'nin üretilmesi, bunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyonunun yapılması ve sonunda bütün gereklilikleri sağlayan ürünün, dentin tübülleri üzerine kaplanmasıdır. Bu nedenle bu bölümde öncelikle HAp'nin üretim yöntemi ile bunun için gerekli fizikokimyasal ve biyolojik karakterizasyon işlemleri anlatılacaktır. Ardından dentin tübüllerinin üzerine kaplama süreci açıklanacaktır.

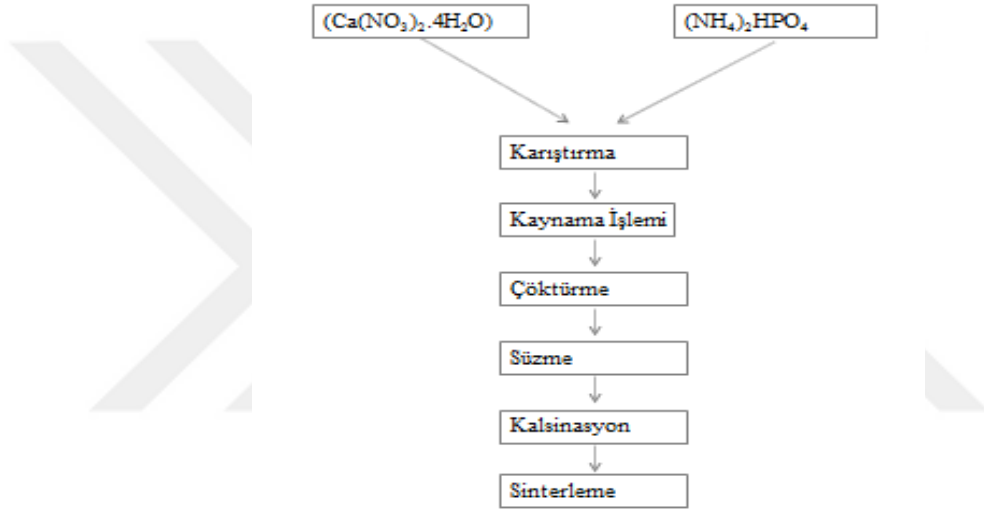
HAp'nin üretimi için Turkoz ve arkadaşlarının [11] çöktürme metodu dikkate alınmıştır. Fizikokimyasal ve biyolojik karakterizasyon için; faz analizi incelemesinde XRD, yüzey morfolojisi incelemesinde SEM, elementel analizde SEM-EDS ve ICP-OES, tane boyut incelemesinde Zetasizer ve SEM, Ca/P oranının belirlenmesinde SEM-EDS ve ICP-OES, bileşen gruplarının belirlenmesinde FTIR, yoğunluk ölçümü için Archimed yöntemi kullanılmıştır. İyon salım tayini için ICP-OES, toksikolojik inceleme için sitotoksite, biyobozunma tayini için degradasyon ve mikroorganizma direnci için antibakteriyel analiz kullanılmıştır. Dentin tübül tıkama çalışmasında ise Bağlar ve arkadaşlarının [3] yaptığı çalışmadaki yöntem, deneysel tasarım ve analizler referans alınmıştır.

2.2. Hidroksiapatit Tozlarının Üretimi

Hidroksiapatit üretimi, Çizelge 2.1'deki malzemeler kullanılarak Şekil 2.1'de belirtilen aşamalara göre yapılmıştır.

Çizelge 2.1 HAp üretiminde kullanılan materyaller

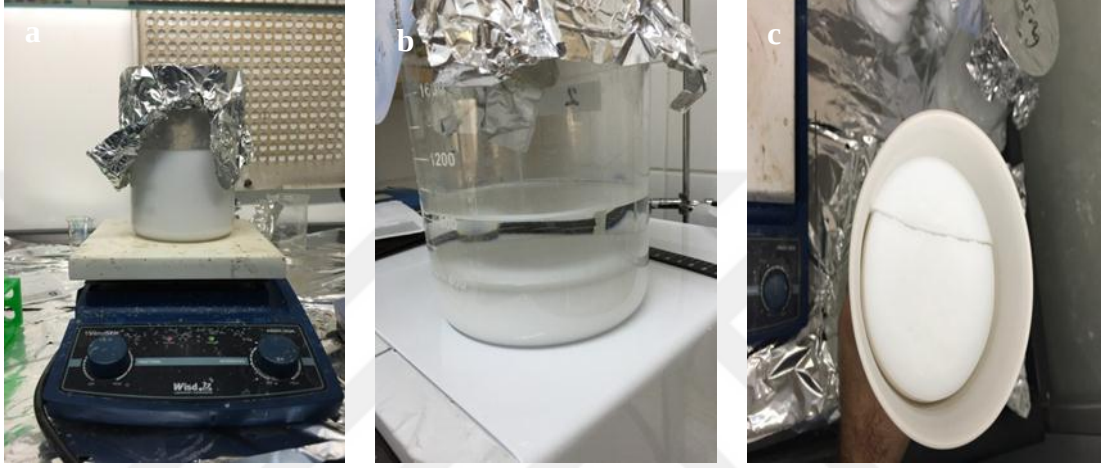
Materyal Adı	
(Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O) Kalsiyum nitrat	(NH ₄) ₂ HPO ₄ Amonyum fosfat
NH ₃ Amonyak	AgNO ₃ Gümüş nitrat
Etüv ve Kül fırını	Saf su
Hassas terazi	Manyetik karıştırıcı
Isıtıcı	Filtre kâğıdı
Çeşitli ebatlarda beher	Vakum ünitesi



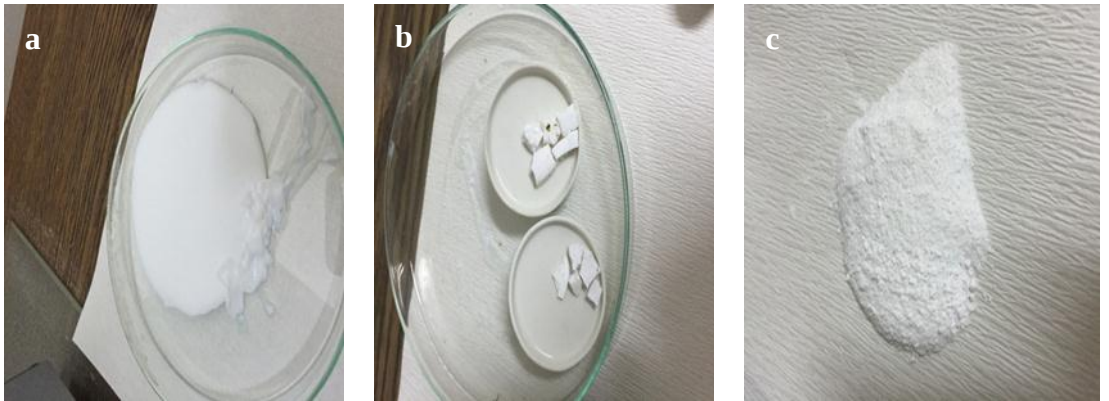
Şekil 2.1 Reaksiyon 1, HAp üretim şeması

Katkısız HAp üretimi için öncelikle Ca/P = 1,67 olacak şekilde 5,94 gr (NH₄)₂HPO₄ ve 17,71 gr (Ca(NO₃)₂·4H₂O) tozları hazırlandı. Ardından diamonyum fosfat, behere konulup bir miktar saf su eklenip manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra amonyak eklenerek karıştırılmaya devam edildi. Diğer yandan, kalsiyum nitrata bir miktar saf su eklenip, gözle görünür bir çözünme elde edilinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Yeterli çözünmenin elde edilmesinden sonra her iki çözelti, bir miktar amonyak eklenerek karıştırıldı. Elde edilen karışım, kısa bir süre kaynatıldıktan sonra 12 saat süreyle karıştırma işlemine tabi tutuldu.

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi nihai karıştırma işleminden sonra çöktürme ve süzme işlemleri vakum pompası kullanılarak yapıldı. Süzülen malzeme “ıslak kek” olarak ifade edilmekte olup bunun kurutulması için belirli bir sıcaklıkta ve sürede kurutma işlemi yapıldı. Elde edilen nihai üründe kristallenmenin gerçekleşmesi için 1100 °C sıcaklıkta 1 saat sinterleme işlemi yapıldı. Sinterlenen tozlar daha sonra öğütme işlemine tabi tutuldu. Şekil 2.3’de bu süreçte elde edilen malzeme görülmektedir.

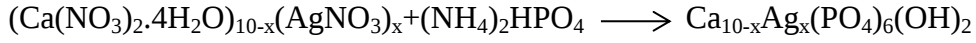


Şekil 2.2 Çözeltilerin a) Karıştırma, b) Çöktürme ve c) Süzme işlemi



Şekil 2.3 a) Isıl işlem, b) öğütme ve c) nihai ürün

Ag(I) iyonları katkılı HAp üretiminde çözelti hazırlama işleminde aşağıdaki reaksiyon akışında gösterilen Ca’dan eksiltme ile Ag katkılama yapılmıştır.



% 0,05, % 0,20, % 0,40 Ag(I) iyonları katkılı HAp üretimi için Ca-Ag/P oranı 1,67 olacak şekilde aşağıda belirtilen miktarlarda malzemeler kullanıldı. Her üç grup için 11,84 gr $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ reaksiyona katıldı. Bu tartım işlemlerinden sonra Ca ve Ag beraber saf su ile P ise kendi başına saf su ile karıştırıldı. Bundan sonra elde edilen çözeltilerle katkısız HAp için geçerli üretim aşamaları tekrarlanarak Ag(I)-HAp ürünleri elde edildi.

% 0,05 Ag(I)-HAp için 35,40 gr $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ve 0,012 gr AgNO_3

% 0,20 Ag(I)-HAp için 35,35 gr $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ve 0,050 gr AgNO_3

% 0,40 Ag(I)-HAp için 35,28 gr $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ve 0,109 gr AgNO_3

2.3. Hidroksiapatit Tozlarının Karakterizasyonu

2.3.1. HAp Tozlarının Fizikokimyasal Karakterizasyonu

2.3.1.1. X-Işını Kırınım İncelemesi

X-Işını kırınımı (XRD), malzemelerin kristalografik özelliklerinin karakterize edilmesi için kullanılan güçlü ve tahribatsız bir analiz tekniğidir. X ışını toz kırınımı, bilinmeyen kristal yapıları malzemelerin (örneğin mineraller, inorganik bileşikler) tanımlanması için en yaygın şekilde kullanılır [163]. Kristal malzemelerin yapı kristalliliğinin ve fazlarının, kristal yönelimlerinin ve ortalama tane büyüklüğünün, kristal kusurlarının belirlenmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. X-Işını kırınım modeli, herhangi bir malzemedeki periyodik atomik düzenlemelerin parmak izini belirlediği için çok çeşitli kristalli numuneler için hızlı faz tanımlamayı mümkün kılmaktadır [163]. Bu tez çalışması kapsamında üretilen HAp numunelerin sahip olduğu fazları ve kırınım veren pikleri belirlemek amacıyla Afyon Kocatepe Üniversitesinde bulunan SHIMADZU 6000 model XRD cihazı kullanılmıştır.

Cihaz 40kV/40mA ile üretilen 1,544 Å dalga boyuna sahip Cu K α X-Işınlarını kullanmaktadır (Şekil 2.4). Bu analizde, X-Işını detektörü numune etrafında hareket

ederek pik yoğunluklarını ölçmektedir. Ölçülen pik şiddetleri karakteristik bir özellik olan kırınım açısı 2θ 'yı vermektedir. En yüksek tepe, %100 olarak tanımlanmaktadır. Bu maksimum pik değerine göre diğer tüm piklerin şiddetleri belirlenmektedir. XRD analizinde 2θ tarama aralığı 10° ile 80° arasında ve $0,1^\circ$ 'lik adımlarla yapılmıştır.



Şekil 2.4 SHIMADZU 6000 model XRD cihazı

Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi (JCPDS) tarafından HAp için belirlenen ve Çizelge 2.2'de gösterilen 09-0432 koduna göre referans 2θ değerleri kullanılarak faz tanımlama işlemi yapılmıştır.

Çizelge 2.2 ASTM, Numara 9-432, HAp

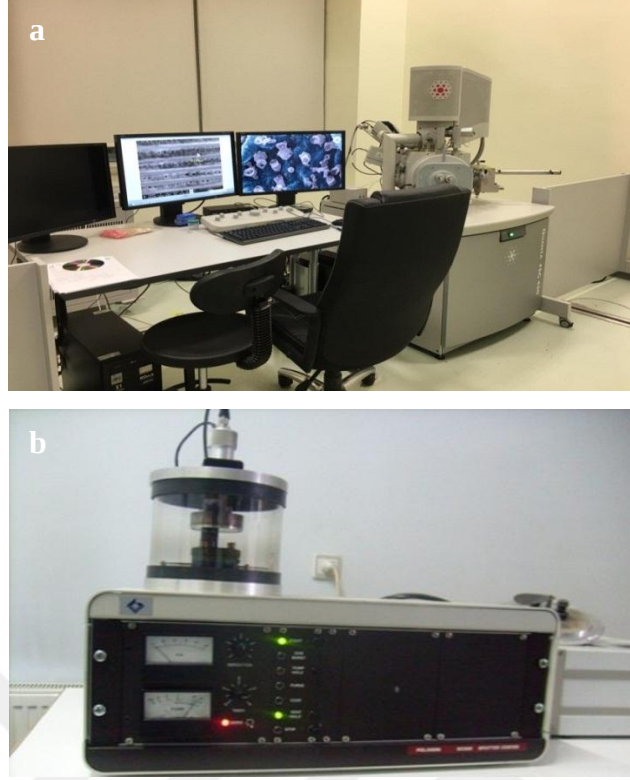
d (Å)	I/Ri %	Miller İndisleri	d (Å)	I/Ri %	Miller İndisleri
5,250	5	(101)	2,000	5	(203)
4,720	3	(110)	1,943	30	(222)
4,070	9	(200)	1,890	15	(312)
3,880	9	(111)	1,871	5	(320)
3,510	1	(201)	1,841	40	(213)
3,440	40	(002)	1,806	20	(321)
3,170	11	(102)	1,780	11	(410)
3,080	17	(210)	1,754	15	(402), (303)

2,814	100	(211)	1,722	20	(004), (411)
2,778	60	(112)	1,684	3	(104)
2,720	60	(300)	1,644	9	(322), (223)
2,631	25	(202)	1,611	7	(313)
2,528	5	(301)	1,587	3	(501), (204)
2,296	7	(212)	1,542	5	(420)
2,262	20	(310)	1,530	5	(331)
2,228	1	(221)	1,503	9	(214), (421)
2,148	9	(311)	1,474	11	(502)
2,134	3	(302)	1,465	3	(510)
2,065	7	(113)			
2,040	1	(400)			

2.3.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılım Spektrumu (EDS) incelemesi

SEM, yüksek gerilim ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine gönderilmesi ile elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan elastik ve elastik olmayan çarpışmalarla meydana gelen elektron demetlerinin kullanılması ilkesine dayanmaktadır.

Üretim için kullanılan çöktürme yönteminin, HAp tozlarının yüzey morfolojisi, tane yapısı ve Ca/P değerine etkisinin anlaşılabilmesi için SEM kullanılmıştır. Üretim süreçlerinde dış kaynaklardan dolayı olası kirlenmelerini ortadan kaldırmak amacıyla HAp tozları, SEM incelemesi öncesi etanol ile yıkandı. Yıkama işlemi sonucunda oluşan nemin ortadan kaldırılması için oda sıcaklığında 30 dakikalık nem uçurma işlemi yapıldı. HAp toz örnekleri, iyi bir iletken olmadığından analiz sırasında numunelerin iletkenliğini arttırmak için yüzeyleri Kırıkkale Üniversitesinde bulunan Polaron marka altın kaplama cihazı (Şekil 2.5) ile ince bir tabaka halinde Altın/Paladyum ile kaplandı.



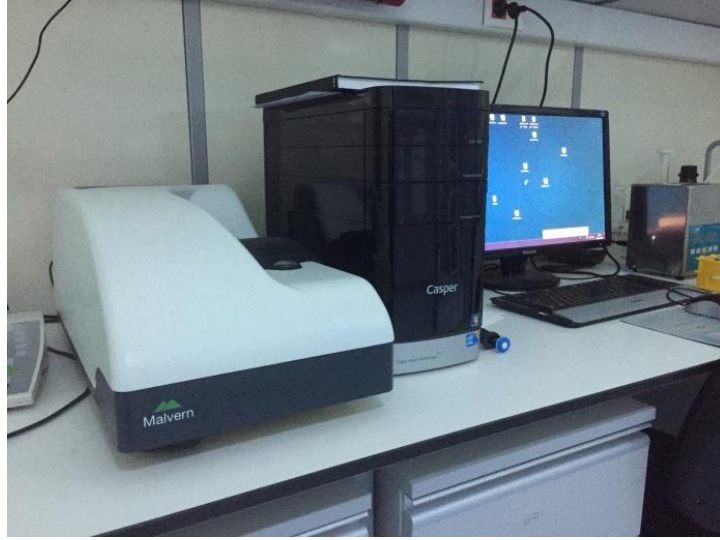
Şekil 2.5 a) FEI / Quanta 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu, b) Polaron Altın kaplama cihazı

HAp tozunun yüzey morfolojisi niceleyici EDS özelliğine sahip cihazla (Şekil 2.5) 20 kV'luk hızlandırma geriliminde ve ikincil elektron demetleriyle, 0,5 ve 1,0 μm çözünürlükte değerleriyle incelendi. Yüzey morfolojileri incelenirken cihaz yazılımında (Measurement Scaler) mevcut ölçüm programı kullanılarak tane boyut ölçümleri yapıldı. Tane boyut ölçümlerinde her bir numune için 10 adet ölçüm kaydedildi. Elde edilen ölçüm sonuçlarıyla ortalama tane boyut değeri elde edildi. Bu değerler, Zetasizer cihazıyla elde edilen tane boyut değerleriyle karşılaştırıldı. SEM incelemesi sırasında her bir numune için EDS kullanılarak Ca/P oranı ve yüzey haritalandırması yapıldı. Böylece HAp ana bileşenleri olan Ca, P ve O'nun analitik olarak dağılımı belirlendi.

2.3.1.3. Zetasizer İncelemesi

Zetasizer cihazı, numunelerin kimyasal reaktifliği, opaklığı, akışkanlığı ve malzeme mukavemetini anlamaya yardımcı olan ve nano boyutta tane boyutunun belirlenmesini sağlayan bir cihazdır. Parçacıkların büyüklüğünün ölçümü 2 mW gücünde küçük bir helyum-neon lazeri ile tek mercekli bir lazer kırınım sistemi vasıtasıyla gerçekleştirildi. Küçük tanelerin boyutlarını ölçmek için ışığın ortam içerisinde tane boyu etrafındaki hem kırılmasını hem de geçirgenliğini dikkate alan Mie teorisi [164] kullanılmıştır. Cihazda, düşük güçteki helyum-neon lazerin ışığı, (genellikle 18 mm çapında) tek renkli ışık demeti oluşturmak için kullanılmaktadır. Tane boyut analizi yapılması için Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarları bünyesinde kullanılan Malvern Mastersizer S Zetasizer cihazı kullanılmıştır. (Şekil 2.6,) Cihaz, 0,05 ila 3500 mikron arasında tane boyutlarını belirleyebilmektedir.

Tane boyut analizi, ISO 14887 standardına [165] uygun olarak yapıldı. Bu standart gereği 1 g sodyum heksametafosfat, bir dağıtıcı olarak işlev görmek üzere 1000 ml deiyonize su içinde manyetik bir karıştırıcı ile karıştırıldı. Sonra 0,5 gram öğütülmüş HAp numunesi 80 - 100 ml olacak şekilde hazırlanan çözelti, önceki adımda elde edilen çözelti içine dâhil edildi. Daha sonra bu iki çözelti, 5 dakika kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu işlemle parçacıkların birbirlerinden bağımsız olarak hareket etmesi ve ayrılması sağlanmıştır. Bu nedenle karıştırılan süspansiyon daha sonra 5 dakikalık bir süre boyunca ultrasonik banyoya alındı. Analiz işlemi için hazır hale gelen çözelti, cihaz içerisine alındı ve her bir numune için aynı işlem tekrarlanarak tane boyut ölçümleme işlemi yapıldı. Tane boyut analizi sonucunda elde edilen sonuçlar bir grafik halinde veri çıktısı olarak kaydedildi. Cihazın yazılımıyla elde edilen ortalama tane boyut değerlerinin SEM incelemesi sonucunda elde edilen değerlerle uyumluluğu değerlendirildi.



Şekil 2.6 Malvern Mastersizer S Zetasizer cihazı

2.3.1.4. ICP-OES İncelemesi

İndüktif olarak çiflenmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi ICP-AES, İngilizce “Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy” ifadesinin kısaltmasıdır. Ayrıca, indüktif olarak çiflenmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) olarak da adlandırılmaktadır. Belirli bir elementin karakteristik dalga boylarında elektromanyetik radyasyon yayan uyarılmış atomlar ve iyonlar üretmek için indüktif olarak bağlanmış plazmayı kullanan bir tür emisyon spektroskopisi olan ICP-OES, elementlerin kimyasal analizlerinde kullanılan analitik bir yöntemdir.

Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvar bünyesinde bulunan ve Şekil 2.7’de gösterilen ICP-OES cihazıyla HAp örneklerin ana bileşenleri olan Ca, P, Ag değerleri ppm düzeyinde belirlendi. Elde edilen Ca ve P değerleri, SEM-EDS çalışmasından elde edilen Ca, P değerleriyle kıyaslandı. Burada, Ca/P oranı için beklenen 1,66..7 değerinin gerçekleşme durumu gözlemlendi. Bu analiz için 14 ml cam tüp içerisine 3 ml nitrik asit, 11 ml eşlenik vücut sıvısı (SBF)+HAp eklendi. Bu solüsyon içerisinden Ca, P değerleri ppm seviyesinde tespit edildi. Yapılan analiz sonucunda elde edilen sonuçlar 3 ayrı ölçümün ortalamasıdır. Aynı zamanda ICP-OES, gümüş salım tayininde yapıdan salım yapan Ag(I) iyon değerlerinin belirlenmesinde de kullanıldı. Gümüş salım tayininde benzer şekilde 14 ml cam tüp

içerisine 3 ml Nitrik asit, 11 ml SBF+Ag(I)-HAp kullanılarak hazırlanan çözeltinin de analizi yapıldı. Farklı gün sürelerinde bekletilen her bir örnek için Ag(I) iyonu değeri kaydedildi. Elde edilen değerler, bir çizelgeye dönüştürüldü. ICP-OES cihazı, hem Ca/P oranının belirlenmesinde hem de Ag(I) iyonu salım değeri belirlenmesinde kullanıldı.



Şekil 2.7 ICP-OES Cihazı

2.3.1.5. Yoğunluk Ölçümü İncelemesi

Yoğunluk ölçümünde kullanılmak üzere HAp numunelerden bir kısmı öğütülmeden sinterlendi. Bu HAp numunelerinin yoğunluğunun belirlenmesinde kesin bir analiz yöntem zorunluluğu olmadığından [134], yoğunluk ölçümlerinde Archimed yöntemi kullanıldı (Şekil 2.8).

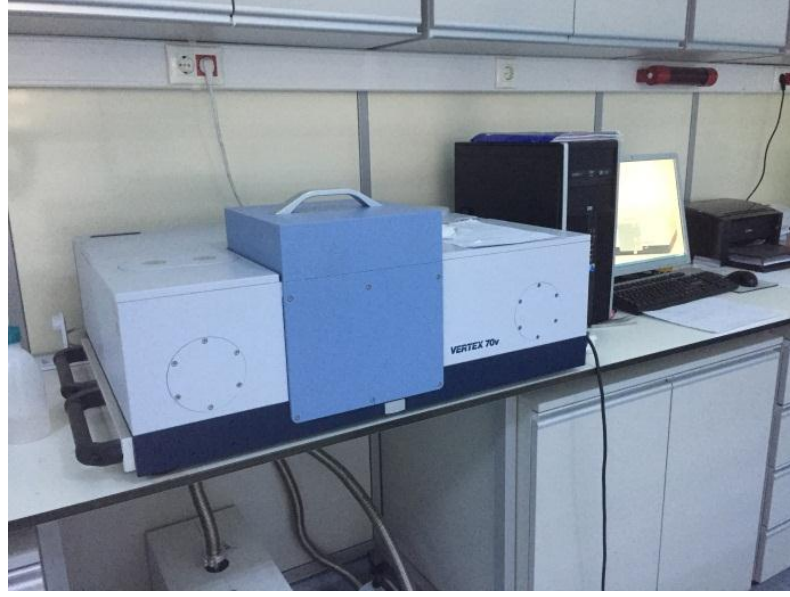
Parçacık boyutu ve gözenekli yapı malzeme yoğunluğunu etkileyen faktörlerdendir. Yoğunluk ölçümünde öncelikle HAp katı örneklerinin ağırlıkları tartıldı. Aynı örnek sulu terazi içine daldırılarak sulu halinde ağırlığı ölçüldü. Taşıdığı su miktarı ölçülerek, kuru ağırlığın hacme oranıyla yoğunlukları belirlendi. Elde edilen yoğunluk değerlerindeki değişim, katkı oranındaki değişime göre incelendi.



Şekil 2.8 Archimed prensibine göre yoğunluk ölçüm sistemi

2.3.1.6. FTIR İncelemesi

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) katı, sıvı veya gazın kızılötesi soğurma spektrumunu veya salınımını elde etmek için kullanılan bir yöntemdir [124, 165]. FTIR spektroskopisinin amacı bir örneğin her dalga boyunda ışığı ne kadar iyi soğurduğunu ölçmektir [166]. Bunu ölçebilmek için kullanılan FTIR’da, bir numuneye belli bir frekansta tek dalga boyunda ışık gönderilerek, ışığın ne kadarının numene tarafından emildiği ölçülmektedir [124, 165]. Bu işlemde dalga boyuna karşılık gelen soğurma oranına göre bir pik şiddeti oluşmaktadır. Bu analiz sonucu, dalga boyuna karşılık gelen soğurma şiddeti çizilerek bir spektrum elde edilmektedir. FTIR spektroskopisi, birçok malzemenin kimyasal yapısını belirlemede kullanıldığı gibi, CaP ürünlerinin kimyasal analizinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu analiz sonucunda elde edilen spektrumun pikleri; konum, yoğunluk, genişlik ve dalga sayısı gibi bilgileri göstererek, ürünün fonksiyonel gruplarının yorumlanmasında katkı sağlamaktadır.



Şekil 2.9 Bruker Vertex V70 FTIR Cihazı

Üretimi yapılan HAp toz numunelerinin fonksiyonel gruplarını belirlemek amacıyla Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Bruker Vertex V70 marka FTIR cihazı (Şekil 2.9) kullanıldı. Cihaz, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında çalışmakta olup çözünürlüğü 4 cm^{-1} ve 36 kez ortalama taraması sayısı olan bir cihazdır. Cihazda, birkaç mg kadarlık toz numuneler ile analiz edilebilmektedir. Kullanılan numune miktarının azlığı, analizlerin tekrarlanabilirliği gibi özellikleri nedeniyle FTIR tekniği kullanışlı bir analiz yöntemidir. Bu analizle ürettiği katkısız HAp ve Ag(I)-HAp örneklerinin PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} fonksiyonel grupları belirlenmeye çalışıldı. Analiz sonucunda dalga boyuna karşılık soğurma yoğunluğunu gösteren bir spektrum çizildi. Elde edilen grup dalga boyları literatürle karşılaştırılarak sonuçların uygunluğu değerlendirildi.

2.3.2. HAp Tozlarının Biyolojik Karakterizasyonu

2.3.2.1. Antibakteriyel İncelemesi

Bölüm 1.1.4 literatür özeti bölümünde ortopedi ve diş tedavilerinde olası bakteriyel enfeksiyonlara tedavinin ilk aşamasında karşı koyabilmek için HAp kullanılan

çalışmalarda bazı antibakteriyel ajanların eklendiği anlatılmıştı. Katkılanan iyonların antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi ürünün uygulama yerindeki aktifliği hakkında bilgi edinmemizi sağlamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada farklı katkı oranlarında gümüş iyonu eklenmiş HAp tozlarının antibakteriyel özellikleri belirlenmeye çalışıldı.

Antimikrobiyal aktivite testleri ASTM E2149 [162] standardına göre yapıldı. Test için *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus mutans* ATCC 25175 ve *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarının 24 saatlik taze kültüründen Tryptic Soy Broth besiyerine ekim yapıldı. 18 saatlik üreme sonucu 475 nm’de ölçümleri yapılan ve $3,0 \cdot 10^8$ adet konsantrasyonuna denk miktarda absorbansı okunan mikroorganizma süspansiyonunun standartta belirtilen miktara kadar tampon ile seyreltme yapıldı. Steril 250 ml’lik erlenlere antimikrobiyal aktivite testi yapılacak olan örneklerden her biri için ayrı ayrı 0,5 - 2,0 g kadar malzeme hassas terazide tartılarak konuldu. Üzerlerine, konsantrasyonları $3,0 \cdot 10^5$ adet olan taze kültürlerden 50 ml aşılama yapıldı. İlk saatte Plate Count Agar’a numunelerden ekim yapıldı. Erlenler çalışmalamalı inkübatörde (150 rpm) inkübasyona bırakıldı. 0., 1. ve 24. saatlerde Plate Count Agar’a ekimleri yapılan ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılan numunelerin, inkübasyon sonrası sayımları yapıldı. Yapılan sayımların değerlendirilmesi sonucu deneye tabi tutulan numunelerin antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediği yüzdesel olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar tez içeriğine hem şekil hem de çizelge olarak eklendi.

KH₂PO₄, NaOH, HCl, Tryptic Soy Broth, Plate Count Agar deney için gerekli kimyasal maddeler ve besiyerlerdir. Bununla beraber Otoklav, mikropipet, çalışalayıcı ve sabit inkübatör, spektrofotometre, pH metre, laminar flow kabini, manyetik karıştırıcı, çalışalayıcı su banyosu, distile su cihazı, hassas terazi, dijital kronometre/saat, koloni sayım cihazı, sıcaklık, basınç ve nem ölçer aletleri de deney için gerekli ekipmanlardır.

2.3.2.2. Sitotoksisite İncelemesi

Çöktürme yöntemini kullanarak üretimi yapılan katkısız HAp ve Ag(I)-HAp biyomalzemelerin vücut içi uygulamalarda kullanılması hedefi nedeniyle

malzemelerin toksik etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle üretilen bu biyomalzemelerin biyolojik değerlendirilmesi için TS EN ISO 10993-5'e uygun olarak vücut dışı sitotoksosite deneylerinin yapılması gerekmektedir [161].

Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde yapılan sitotoksosite deneyleri, toksikoloji çalışmalarında *in vitro* koşullarda yaygın olarak kullanılmaktadır [161]. MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium) testi, toksik madde varlığıyla oluşacak toksikliği veya hücre canlılığını saptamada kullanılan yöntemlerden biridir [161]. Sitotoksosite testi ve hücre yayılımı, örneklerin canlılığının %70'in altında olması durumunda sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, HAp, Ag(I) katkılı HAp tozlarının sitotoksik etkisini gözlemlemek için bu test, HAp partikülleri ile muamele öncesi, sonrası ve ayrıca degradasyon sonundaki ortam sıvıları için de gerçekleştirildi. Bu işlemler, L929 fibroblast hücreleri kullanılarak yapıldı. Test prosedürü için EN 10993-5 standardı kullanıldı. Kontrol gruplarına göre canlılık yüzdesi aşağıdaki denklem kullanılarak ISO 10993-5 standartlarına göre hesaplandı.

$$Canlılık (\%) = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad 2.1$$

Buradaki OD570e ve OD570b değerleri, sırasıyla numunelerin ve kontrol grubunun optik yoğunluk değerleridir.

Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Biyoyumluluk laboratuvarında bulunan sitotoksosite deney düzeneğinde aşağıdaki adımlar takip edilerek analizler yapıldı. Analizler laminar flow kabininde, steril bir ortamda yapıldı.

Çizelge 2.3 Sitotoksosite analizi süreçleri [161].

Süre (h)	İşlem
00:00	96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim: 1×10^4 hücre/kuyucuk/100 μ L DMEM besiyeri, İnkübasyon (% 5 CO ₂ , 37°C, > % 90 nem)
24:00	Kültür vasatı uzaklaştırılır
24:00	DMEM besiyeri içinde deney numunesi özütünün ≥ 4 farklı derişimi uygulanır (100 μ L), (Muamele edilmemiş kör= besiyeri, pozitif ve negatif kontroller uygulanır), İnkübasyon (% 5 CO ₂ , 37°C, > % 90 nem)
48:00	Morfolojik değişiklikler mikroskopik olarak değerlendirilir. Deney vasatı uzaklaştırılır., 50 μ L MTT çözeltisi eklenir. İnkübasyon (% 5 CO ₂ , 37°C, 2 h)
51:00	MTT çözeltisi uzaklaştırılır Her kuyucuga 100 μ L izopropanol eklenir Kültür kabı çalkalanır.
51:30	570 nm’de absorbans okunur (referans 650 nm)

2.3.2.3. Degradasyon İncelemesi

Çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan katkısız HAp ve Ag(I)-HAp tozlarının biyoyumluluk gerekliliklerini test etmek için yapılan analiz yöntemlerinden birisi de degradasyon tayinidir [167]. Degradasyon, bir maddenin kendini oluşturan kimyasal bağ yapısının fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkiler sonucunda değişerek fiziksel olarak bozunmasıdır [159, 166]. Kullanım yerindeki sıcaklık değişimi, diyet faktörü ya da uygulama bölgesinde maruz kalınan kimyasal atıklar ve pH değişimi sonucu ortaya çıkan asidik ya da alkali ortam gibi etkiler malzemenin bozunmasına sebep olabilmektedir [167]. Vücut içi uygulamalar hedef alındığı için degradasyon testinde vücut içi sıvılardan olan SBF ile yapay tükürük kullanıldı.

Degradasyona uğramaması yani biyobozunmaz oluşu malzemenin yapısal kararlılığının da bir ölçüsü olarak değerlendirilebilir. Bozunum olması ya da

olmaması kullanılan malzemenin kullanım yerindeki beklentilerine göredir. Dentin tübül tıkama gibi çalışmalarda tıkaçıcı ya da kaplayıcı olarak kullanılan ajanların yüzey üzerinde degrade olmaması beklenmektedir. Antibakteriyel etki elde etmek amacıyla yapılan iyon katkılı malzeme bazı çalışmalarda ürünün belli bir oranda bozunuma uğraması istenen bir durumdur.

Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde yaptığımız analiz işlemi için, ISO 10993 Medical Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi [167] standardı Bölüm-13 referans alındı. Katkısız HAp ve Ag(I)-HAp numunelerinin degradasyonu Kokubo ve arkadaşları tarafından önerilen eşlenik vücut sıvısı (SBF) kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirildi [168]. Bu amaçla, 37°C (etüv içinde) ortam sıcaklığında fosfat tamponu (pH 7,4) kullanıldı. Analiz yapılırken ürünler çalışma amacına göre 4, 8, 12, 16, 20 hafta süreyle degradasyona tabi tutuldu. Degradasyon işleminde öncelikle malzemelerin kuru ağırlıkları ölçüldü. Her 4 haftalık süre sonunda malzemenin kuru ağırlığındaki değişime göre degradasyon miktarı kaydedildi. Degradasyon sırasında her 4 hafta da bir ortam pH'si kontrol edildi. Degrade olan örnek miktarı ISO 10993-13 standardı referans alınarak hesaplandı. Degradasyon çalışması süresince örnek/sıvı oranı 1/1 (kütle (mg) / hacim (ml)) olacak şekilde sabit tutuldu.

Degradasyon çalışması değerlendirmesinde malzemenin kütleli olarak değişimi değerlendirilmektedir. Analiz öncesi ve sonrası kütle farkına göre değerlendirilen degradasyon miktarı bozunma durumunun incelenmesinde tek başına yeterli değildir. Bu nedenle dentin tübül tıkama çalışmasında degradasyon öncesi ve sonrası SEM, FTIR ve sitotoksikite analizleri de yapılmıştır. Böylelikle degradasyonun sırasıyla morfoloji, fonksiyonel gruplar ve malzeme toksisitesi üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Bununla birlikte degradasyon çalışmasında kullanılan degradasyon sıvısı SBF, toksik olmadığından degradasyon sonucunda bu sıvının içine salınabilecek ve toksik etki doğurabilecek malzemelerin etkisinin değerlendirilmesi için degradasyon öncesinde ve sonrasında degradasyon sıvısının toksikliği de incelendi. Bütün analizler sonucunda elde edilen veriler çizelgelerle ve şekillerle gösterilmiştir.

2.4. Ag(I)-HAp Tozlarından Gümüş Salım Tayini

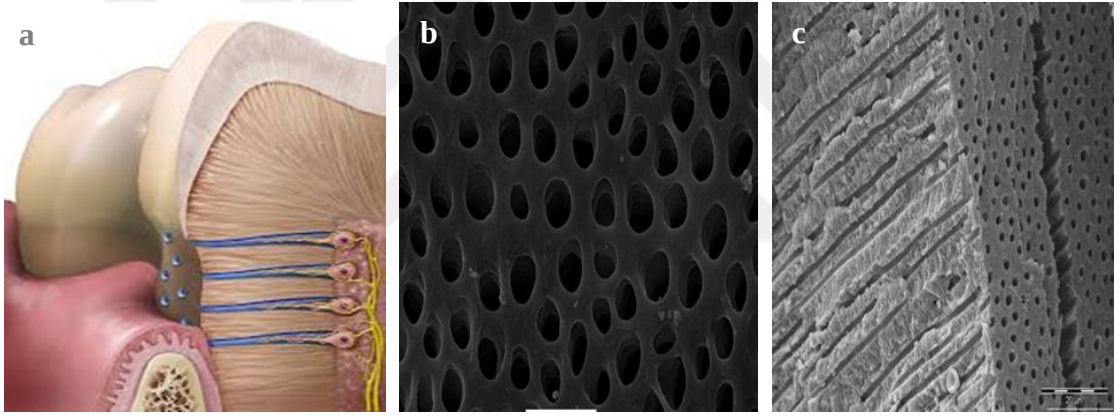
Bu çalışmada, diş dentin yüzeylerinin kaplanması çalışmasında kullanılmak üzere çöktürme metoduyla sentezlenen hidroksiapatite (HAp), 0,05 %, 0,20 %, 0,40 % (w/v) oranlarında Ag(I) iyonu katkılı, gümüş katkılı nano hidroksiapatitten (Ag(I)-HAp) gümüş iyonunun salımı incelendi. Bu amaçla, SBF içerisinde belirli zaman dilimlerinde (1/2–1–3–5–10–20–30 gün) bekletilen örneklerin muamele sonunda Bölüm 2.3.1.4’ de tarif edildiği gibi ICP-OES ile Ag(I) konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bu çalışmalara ek olarak uygulama yerinin taklit edilerek biyomalzemenin bozunup bozunmadığının kontrol edildiği degradasyon çalışması 2.3.2.3 bölümünde tarif edildiği gibi yapıldı. Eşlenik vücut sıvısı ortamında 20 hafta süreyle yapılan degradasyon çalışmasında malzemenin bozunması kontrol edildi. Olası bozulma sonucunda Ag(I)-HAp biyomalzemeden Ag(I) salımı oluşup oluşmadığı belirlemek için degradasyona tabi tutulan katı örnekte ve degradasyon sıvısında Bölüm 2.3.2.2’ de tarif edildiği gibi sitotoksikite çalışması yapıldı. Bu işlemle beraber degradasyon tayini yapılan örneklerin hem degradasyon öncesinde hem de degradasyon sonrasında toksikliği de kontrol edildi. Degradasyon çalışmasında hazırlanan sıvı toksik olmadığından, bu yolla degradasyon sonucunda malzeme toksikliğinin değişimi izlenmiştir. Elde edilen verilerle *in vitro* olarak Ag(I) salım tayini ppm cinsinden belirlendi. Salım değerleri ve degradasyon yüzdeleri zamana bağlı olarak çizildi. Degradasyonun salım üzerindeki etkisini belirlemek amaçlı yapılan sitotoksikite çalışmasına ait sonuçlarda şekil olarak gösterildi. Gümüş salım tayini çalışması içeriğinde ayrıca salım mekanizmasının iyi anlaşılmasını sağlayan salım kinetiği çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre Ag(I) katkılı HAp malzeme için çalışma içeriğindeki iyon gruplarından hangisinin biyo amaçlı olarak kullanılabilir olduğu belirlenmeye çalışıldı.

Bu çalışma içeriğinde sonuçların istatistiksel olarak anlamlılıklarını değerlendirmek için F ve t çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. İstatistiksel çalışmanın sonunda, sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı ilgili şekillerin üzerinde küçük harflerle gösterildi. Ayrıca yapılan analizlerde sonuçların doğruluğunun belirlenmesinde kullanılan geçerli kılma çalışmasıyla geri kazanım hesaplamaları da yapıldı. Bu hesaplamada salım işleminden sonra ve standart ekleme yöntemi ile (0,05

ppm Ag(I)) eklenerek değerlendirildi ve salım çalışması için geri kazanım % 92 olarak bulundu. Bununla birlikte, sitotoksitite çalışmalarında da geri kazanım % 96 olarak belirlendi.

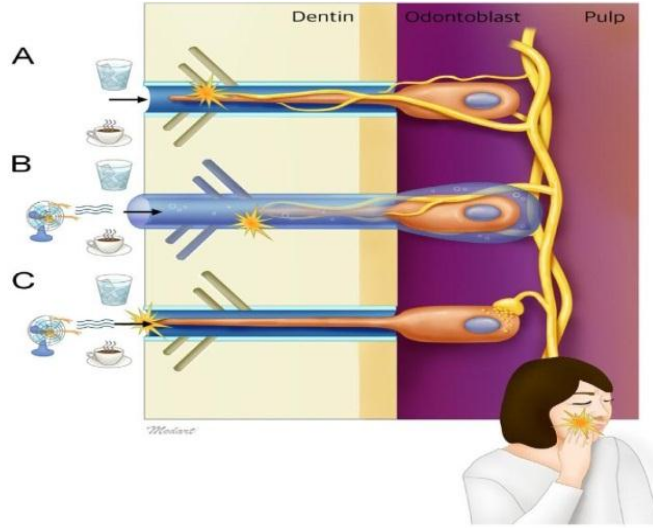
2.5. HAp Tozlarının Dentin Tübüllerine Kaplanması

Ağız hijyeni bilincinin eksik olmasından, yeme ve içme alışkanlıklarından kaynaklanan asit ataklarından ve bakteriyel metabolizmadan kaynaklanan asit saldırılarından dolayı diş sert dokularında mineral erimeyebilmektedir. Bu olumsuz etkilerin sonucunda dişte gerçekleşen yıpranmalar ve aşınmalar ile diş tübüllerinin ağızlarının açılması meydana gelmektedir (Şekil 2.10).



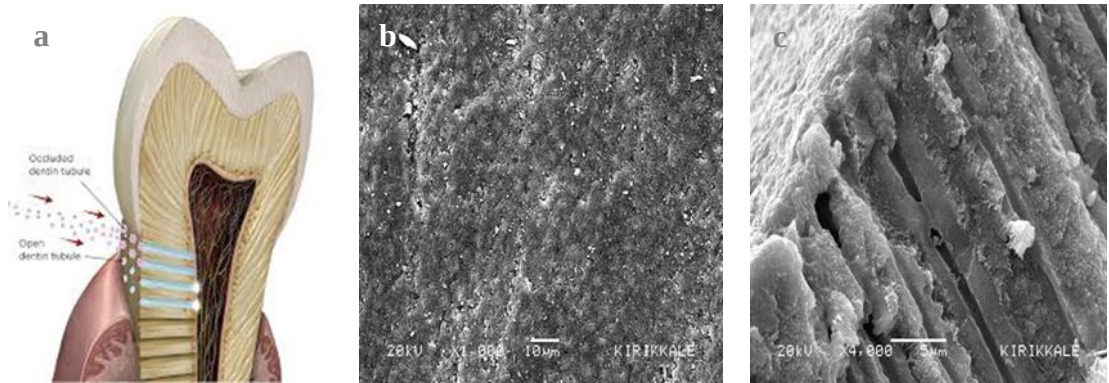
Şekil 2.10 a) Dentin tübülleri, b,c) Dentin tübül ağızlarının açık olduğu durum

Bu tür diş tübüllerinin açıldığı lezyonları olan kişiler, soğuk, sıcak veya dokunsal gibi uyarıcılardan kaynaklanan ağrılara maruz kalmaktadır. Bu etkiler sonucunda dişte dentin hassasiyeti diye adlandırılan ağrıların olacağı Bölüm 1.1 de açıklanmıştır. Dentin hassasiyetinin kaynakları Şekil 2.11’ de [169] temsili olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.11 Dentin hassasiyeti temsili görsel [169]

Dentin tübül ağzlarının kapatılmasıyla tübül kanallarına sıvı akışı engellenecektir. Dış etkilerinde engellendiği bu durumda diş hassasiyeti ortadan kaldırılabilir. HAp gibi Ca-P içerikli bir biyomalzemenin burada tıkayıcı olarak kullanılmasıyla hem hassasiyet giderici etki elde edilmiş olacaktır hem de yeniden mineral kazanan bir dentin yüzeyi elde edilmiş olacaktır. Bu amaçla yapay farklı yöntemler kullanılarak dentin yüzeyleri kapatılarak aşağıdaki Şekil 2.12’de olduğu gibi bir durum elde edilecektir.



Şekil 2.12 Dentin Tübül Kaplama İşlemi a) Tübül Kaplama b) Kaplanmış Dentin Tübülü c) Kaplanmış Tübül Kanalı İç

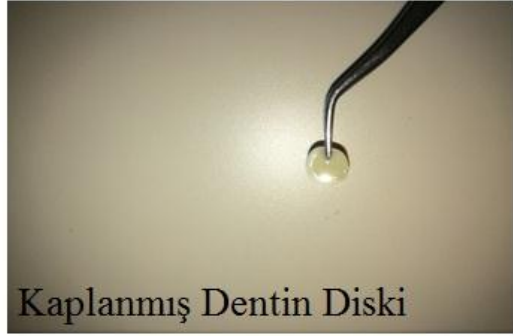
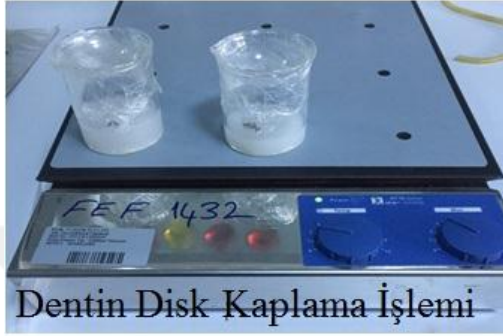
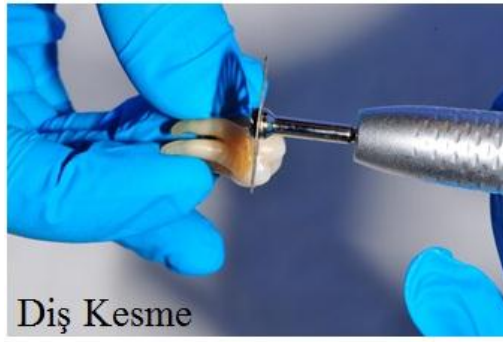
2.5.1. Dentin Disklerinin Hazırlanması ve Kaplama işlemi

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan ve bu tezin ekinde sunulan Etik Kurul kararıyla bağışçıların bilgilendirilmesinden ve kabul protokolünün onaylanmasından sonra çıkarılmış yirmi dört çürük insan dişi toplandı. Dişler çevredeki tüm yumuşak dokulardan temizlendi. Kullanım için dişler % 10'luk formaldehit solüsyonunda 1 saat bekletildi. Daha sonra akriliğe kesim işlemlerinin kolay olması için gömüldü. Daha sonra dentin blokları (2 mm kalınlıkta) oklüzal yüzeye paralel olarak, oklüzal dentin-mine bağlantısının 1 mm altında, su soğutmalı düşük hızlı elmas testereyle kesilerek elde edildi. Kesim sonucunda dentin yüzeylerini barındıran diskler, ıslak zemin 600, 1000, 1200 ve 2000 kumlu silisyum karbür parlatma kâğıtları ile parlatıldı. Dentin numuneleri bir yarısı kontrol grubu bir yarısı da deney numunesi olmak üzere iki parçaya bölündü. Dentin örneklerinde lezyonlar (70-100 mm derinliğinde) oluşturmak için, 25°C'de 96 saat demineralizasyon çözeltisine daldırıldı. Daha sonra temizlik amacıyla deiyonize suyla 10 dakika boyunca yıkandı. Bu işlemler için uygulanan yöntem Şekil 2.13'de gösterilmiştir. Numuneler daha sonra rasgele olarak üç gruba ayrıldı. Bu gruplardan birincisi hiçbir işlemin yapılmayacağı kontrol amaçlı kullanılacak kaplamasız grup, ikincisi katkısız HAp kaplaması amacıyla kullanılacak grup, üçüncüsü de Ag(I)-HAp kaplaması amacıyla kullanılan gruptur. Kaplama ve karakterizasyon işlemleri öncesinde numuneler aşağıda belirtilen aşamaları takip etmiştir.

Grup 1 – Kontrol dişi olarak adlandırılan ve kaplama yapılmayan diş 8 saat yapay tükürükte tutuldu.

Grup 2 - Dentin örnekleri %10 HAp içeren HAp-saf su-suni tükürük süspansiyon çözeltisine daldırıldı. 200 rpm'de karıştırılarak 8 saatte boyunca 37°C'de karıştırıldı.

Grup 3 - Dentine örnekleri %10 Ag-HAp içeren HAp-saf su-suni tükürük süspansiyon çözeltisine daldırıldı. Daha sonra, örnekleme grubu 2'ye uygulanan süreç bu grup elemanlarına da uygulandı.



Şekil 2.13 Dentin Disk Modeli Uygulaması

Bu *in vitro* çalışmada Şekil 2.10'daki gibi açık dentin tübül ağzları sentezlenen HAp ve Ag(I)-HAp tozlarıyla Şekil 2.12'deki gibi kaplanmaya çalışılmıştır. Bu kaplama işlemi, HAp malzemelerin kendiliğinden çökelme kabiliyetini ve/veya dentin yüzeyine yapışma yeteneğini ve fırçalama ya da sürtünme gibi herhangi bir ekstra fiziksel kuvvet olmaksızın dentin yapısına nüfuz etme kabiliyetini belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Bu kaplama işlemi için Bağlar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullandıkları Şekil 2.12 gösterilen dentin disk modeli [3] kullanılmıştır. Hazırlanan dentin kesitleri üzerine HAp tozları yapay tükürük içinde çöktürme metoduyla yığılmaya çalışılmıştır.

Ayrıca bu çalışma içinde kaplama amaçlı kullanılacak HAp tozlarının *Staphylococcus mutans*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite özellikleri belirlemek için Bölüm 2.3.2.1'de tarif edilen şekilde antibakteriyel analiz yapıldı.

Ayrıca kaplama işleminde HAp kaplı dentin numunelerinin toksikolojik özelliklerini değerlendirmek için Bölüm 2.3.2.2' de tarif edilen şekilde sitotoksikite çalışmaları da

yapıldı. Bu malzemelerin kaplama/remineralizasyon etkilerini değerlendirmek için HAp ve Ag-HAp'nin SBF'deki dentin yüzeyleri üzerindeki bozulması da Bölüm 2.3.2.3'de tarif edilen degradasyon analizi yapıldı. Kaplanan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değerlendirmek amacıyla, bozunma işleminden önce ve sonra sırasıyla Bölüm 2.3.1.6'da ve Bölüm 2.3.1.2'de tarif edilen şekliyle FTIR ve SEM çalışmaları da yapıldı.

Kontrol diş, HAp kaplı diş ve Ag(I)-HAp kaplı diş gruplarından elde edilen sonuçların farklılıklarını istatistiksel olarak analiz etmek için 0,05 anlamlılık düzeyinde F ve t çoklu karşılaştırma testleri yapıldı. Bu değerlendirme de k faktörü 2 olan % 95'lik bir güven aralığı kullanıldı. Bozulma ve sitotoksiste testlerinin istatistiksel değerlendirmesi için aşağıdaki gibi bir hipotez belirlendi. Örnek olarak, kontrol dişinden ve HAp uygulanmış diştten alınan sonucun değerlendirilmesinde kullanılan hipotez aşağıdaki verilmiştir. Kontrol dişi, HAp kaplı diş ve Ag(I)-HAp kaplı diş gruplarından kendi aralarındaki değerlendirmesinde de bu hipotez kullanılmıştır. Kontrol grubu dişin hem HAp kaplı diş hem de Ag(I)-HAp kaplı diş ile değerlendirmesinin yanında HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişte kendi aralarında değerlendirilmiştir.

1. Hipotez: $H_0: X_{ort_Kontrol} = X_{ort_HAp}$, İki verinin aritmetik ortalamasında bir fark yoktur.
2. Hipotez: $H_1: X_{ort_Kontrol} \neq X_{ort_HAp}$, İki verinin aritmetik ortalamaları farklıdır.

Burada kurulan hipotezde Kontrol dişi için elde edilen değerlerle HAp için elde edilen değerlere uygulanan F ve t çoklu testinde $I_{tstat} > t$ sonucu elde edilmişse; iki veri birbirinden farklı ve kritik iki değer olarak tanımlandı. Böylelikle 1. Hipotez reddedilmiştir. “İki verinin aritmetik ortalamaları farklıdır” sonucu not edildi. Bunun zıttı bir sonuç elde edildiğinde ise; 1.Hipotez kabul edilmiş, 2.Hipotez reddedilmiştir ve “İki verinin aritmetik ortalamasında bir fark yoktur.” sonucu not edildi. Aynı hipotezi kullanarak SEM, Sitotoksiste ve Degradasyon analizleri için de istatistiksel değerlendirme yapıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Giriş

Bu tez çalışmasının amacı, çöktürme yöntemiyle nanoboyutta katkısız HAp ve % 0,05, % 0,20, % 0,40 (w/v) Ag(I) iyonu katkılanmış Ag(I)-HAp biyomalzemelerini sentezleyerek dentin tübülleri kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliğini araştırmaktır. Uygulamalarda sıklıkla tercih edilen ticari HAp ürünlerinin yerine bu çalışma da çöktürme yöntemiyle üretilen ürünler kullanılmıştır. Bununla birlikte diş tedavisi uygulamalarında kullanılmayan gümüş katkılı HAp ile ağız ortamında antibakteriyel bir bölge oluşturmak da hedeflenmiştir. Bu doğrultuda üretilen HAp'lerin diş tedavilerinde kullanılacak olması nedeniyle fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin ISO 13779-1 [158], ASTM F1185 [134], ASTM E2149 [162] ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi [160] tarafından belirtilen kriterleri karşılaması önemlidir. Kriterlere uygun olan numunelerden gümüş katkılı ürünler üzerinde ayrıca gümüş salım tayini yapılarak zamana bağlı olarak yüzdesel bir salım değeri belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra katkısız HAp ve % 0,40 Ag(I) katkılı Ag(I)-HAp numuneler yapay tükürük kullanarak ağız içi ortamının taklit edildiği bir ortamda dentin tübülleri üzerine kaplanmaya çalışılmıştır. Son olarak da kaplama etkinliği çeşitli testlerle kontrol edilerek metodun geçerliliği gözlemlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan deneysel işlemler aşağıda sıralandığı gibi 3 aşamada planlanmıştır.

1. Aşamada üretilen katkısız HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numunelerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin ISO 13779-1 [158], ASTM F1185 [134], ASTM E2149 [162] ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi [160] tarafından belirtilen kriterlere uygunluğu kontrol edilmiştir.
2. Aşamada kriterleri sağlayan numunelerden % 0,05, % 0,20, % 0,40 Ag(I) iyonu katkılanmış Ag(I)-HAp numunelerinin gümüş salım tayini belirlenmeye çalışılmıştır.
3. Aşamada ise katkısız HAp ve % 0,40 Ag(I) katkılı Ag(I)-HAp numunelerinin dentin tübülleri üzerine kaplanarak kaplama performansı araştırılmıştır.

3.2. HAp Tozlarının Fiziksel ve Kimyasal Analizi

3.2.1. Faz Tanımlama ve Faz Safsızlığı İncelemesi

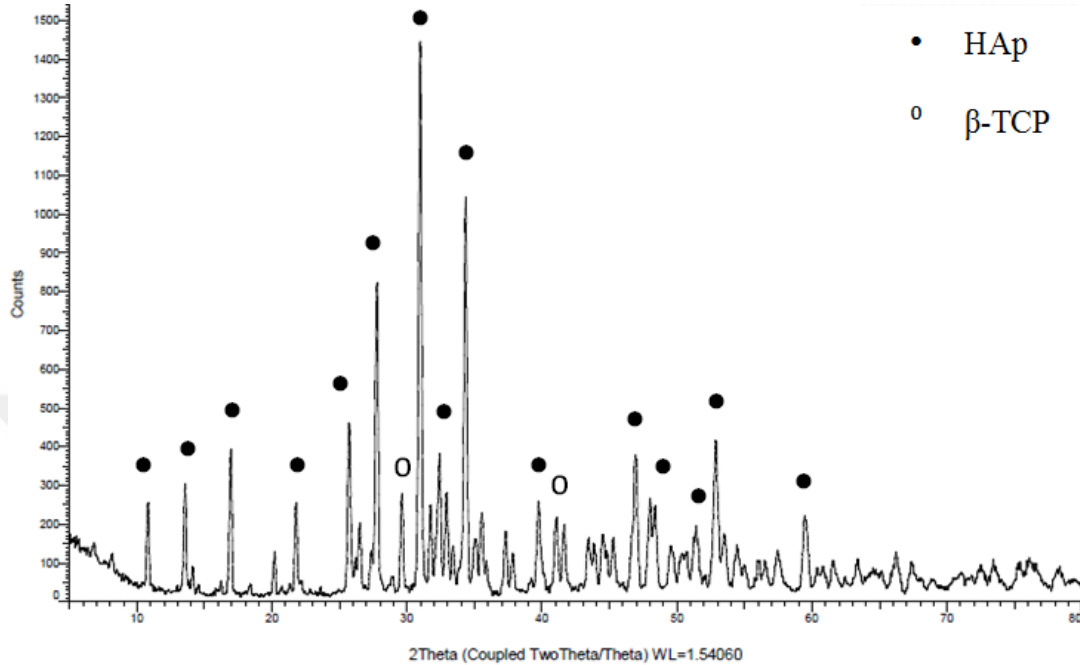
Üretilen katkısız HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numunelerinin kristalografik incelemesinin yapılması amacıyla XRD yöntemi (bkz. Bölüm 2.3.1.1) kullanılmıştır. Elde edilen XRD modelleri üzerinde zirve noktalarının karşılık geldiği 2θ değerlerinin literatürle olan uyumu belirlenmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte XRD çalışmasından HAp için a ve c örgü parametreleri cihaz kütüphanesi yardımıyla belirlenmiştir. XRD modelinde elde edilen HAp deseni ve farklı gümüş katkılı Ag(I)-HAp numunelerinin desenleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’ de gösterilmiştir. XRD şekilleri üzerinde HAp, β -TCP, CaO, Ag ve Ag_3PO_4 için karakteristik olan 2 teta değerleri gösterilmiştir.

Tüm HAp ve gümüş katkılı Ag(I)-HAp numunelerinin XRD desenlerinin HAp’nin sahip olduğu XRD desenine çok benzediği bulunmuştur. Bununla birlikte HAp için $2\theta = 31.77^\circ$, % 0,05 Ag(I) için $2\theta = 31.80^\circ$, % 0,20 Ag(I) için $2\theta = 32,02^\circ$ ve % 0,40 Ag(I) için $2\theta = 31.90^\circ$ olarak belirlenmiştir. Gümüş katkılama oranına göre 2θ değerlerinde dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir.

Gümüş eklenen tüm hidroksiapatit örneklerinde XRD desenlerinde gösterildiği gibi gümüş fosfat (Ag_3PO_4) ve gümüş metali (Ag) varlığı gözlenmiştir. Artan gümüş içeriği ile birlikte, Ag_3PO_4 piklerinin şiddetinde katkı oranıyla orantılı bir artış da gözlenmiştir. Bununla beraber her bir grup için $2\theta = 45.31^\circ$ ’de küçük tepe noktası metal gümüşün varlığını göstermektedir. Ayrıca yaklaşık $2\theta = 20^\circ$ ve 36° ’lerde Ag_3PO_4 varlığı tespit edilmiştir.

Alınan XRD sonuçlarına göre tüm XRD modellerinin kalsiyum fosfatlar için geçerli Uluslararası Kırılma Verileri Merkezi (ICDD) dosyaları ile tutarlı karakteristik zirvelere sahip olduğu görülmüştür. JCPDS Stokiyometrik HAp için 9-432 dosya numarası ile karakteristik HAp indis değerleri her bir açı için dikkatlice incelenmiştir. XRD analizi sonucunda üretimi yapılan HAp’nin faz safsızlığı %99,05 ($\pm 0,5$), $a = 9.4263 (\pm 0,04)$ (9.4420 nm [97]) ve $c = 6.8944 (\pm 0,04)$ nm (6,8800 nm [97]) örgü parametreleri sonucu elde edilmiştir. Elde edilen örgü parametre değerleri

ve XRD modelleri literatürde yayınlanmış olan tipik XRD sonuçlarıyla ile birebir uyumlu olduğu görülmüştür [11, 70, 97, 132].



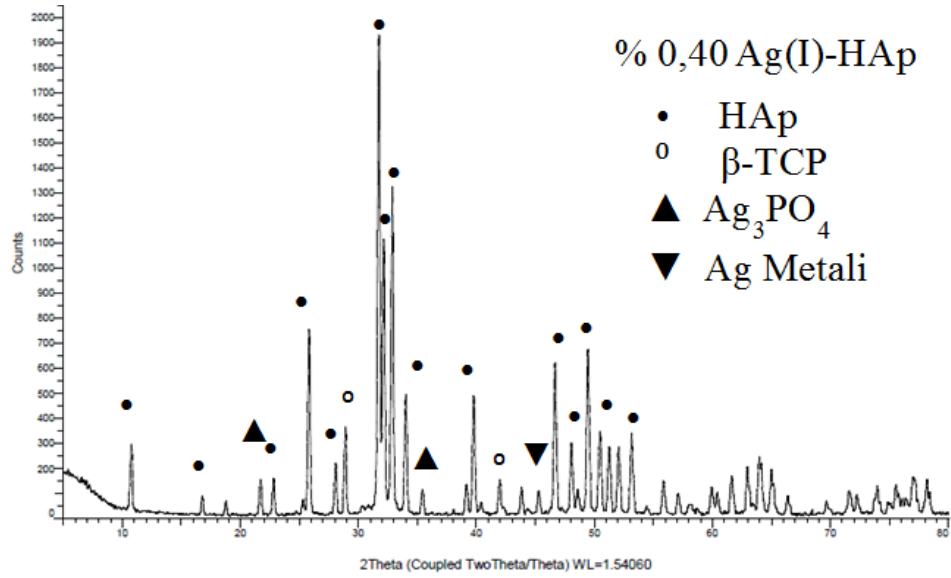
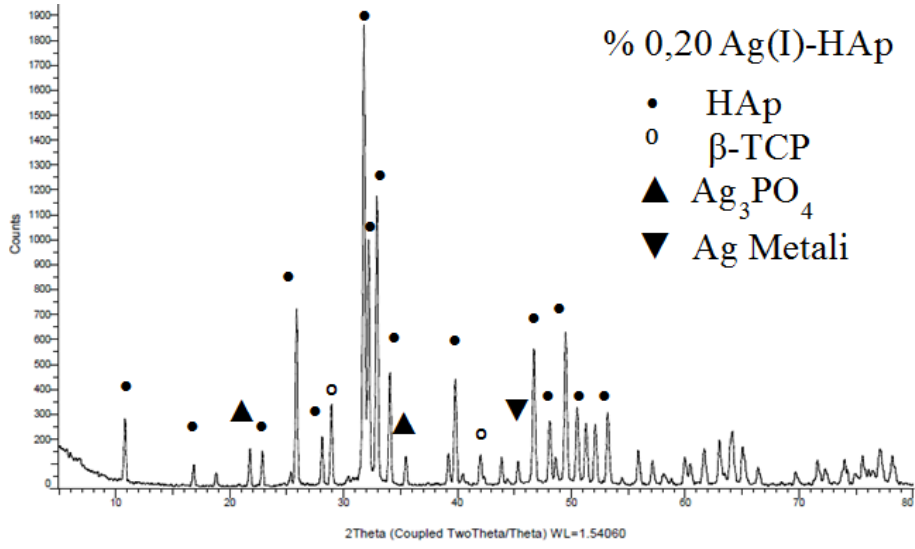
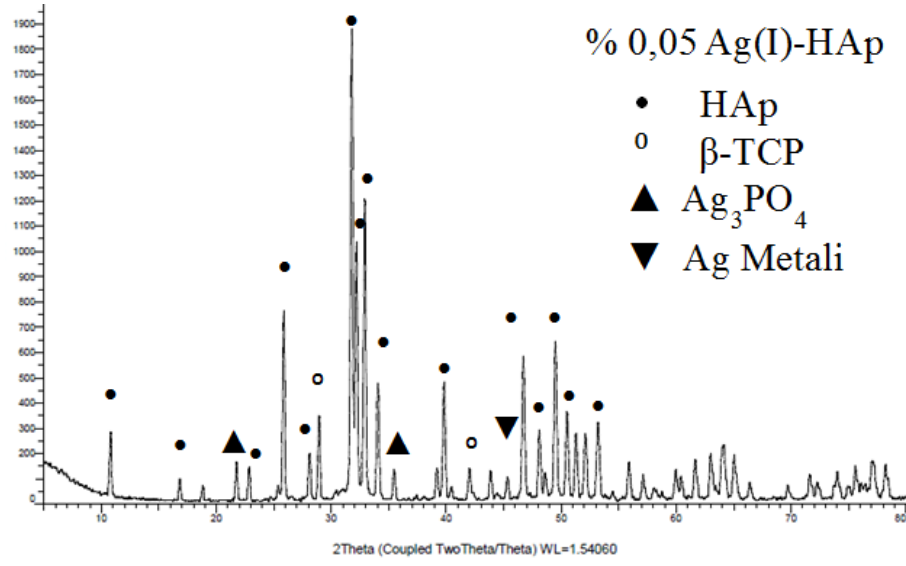
Şekil 3.1 HAp XRD sonucu (JCPDS no. 09-0169 ve JCPDS no. 09-0432)

XRD modellerinde elde edilen sonuçlara göre HAp ve farklı gümüş katkılı Ag(I)-HAp numunelerinin hepsinde CaO'nun eser elementleri gözlemlenmemesine rağmen çok az miktarda β -TCP fazına ait pikler gözlenmiştir. β -TCP fazı Ag(I)-HAp'ler için HAp'den daha fazla gözlemlenmiştir. Ca'dan eksiltme olarak yapılan Ag ilavesinin bir sonucu olarak Ca oranındaki azalma ile Ag(I)-HAp'lerde HAp'den daha fazla β -TCP fazı gözlemlenmiştir. Üretim aşamalarında Ca ve P grupları öncelikle kendi aralarında çözelti haline getirilip daha sonra birbirleriyle karıştırılmaktadır. ICP-OES cihazıyla belirlenmeye çalışılan Ca ve P'nin reaktif oranlarına göre (bkz. Çizelge 3.7) Ca ve P'nin bütünü reaksiyona girmemektedir. Reaksiyona giren Ca ve P'lerin varlığı Ca/P molar oranını sağlamaktadır. Reaksiyona girmeyen Ca ve P'lerin süzdürme işlemiyle tam uzaklaştırılamaması HAp kirliliğine neden olacaktır. Reaksiyona fazla Ca girmesi ya da fazla P girmesi yapının safsızlığını etkileyeceğinden bu durum çok istenmemektedir [73, 97]. Çöktürme yöntemiyle elde edilen HAp'lerde katkısız olmayan yapılar ya da tam HAp olmayan apatitler ısıtma

sırasında ayrışır [11, 70]. Safsızlık üzerinde etkisi olduğu için istenmeyen bu durumlar aslında Ca/P molar oranı 1,67'yi aştığı ya da altında kaldığı durumlardır. Ca/P molar oranı 1,67'yi aşarsa, yani fazla Ca varlığı CaO oluşmasına, Ca/P molar oranı 1,67' nin altında kalırsa yani fazla P varlığı da β -TCP fazının oluşmasına neden olacaktır [70, 97]. Bu iki sonucun ortaya çıkmaması için başlangıç reaktif oranları dikkatlice ayarlanmalıdır. Reaksiyona girmeyen Ca ve P'ler süzdürme işlemiyle düzgün bir şekilde uzaklaştırılmalıdır.

(Ca(NO₃)₂·4H₂O), (NH₄)₂HPO₄, NH₃, AgNO₃ ana girdi ürünlerin reaksiyonu sonucunda oluşan Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ HAp formülü, çöktürme metodu içerisinde gerçekleştirilen kurutma ve sinterleme işlemleri sonucunda 20 mol NH₄NO₃ ve 6 mol H₂O bileşenlerinin yapıdan ayıldığını göstermektedir. Bununla beraber üretim için kullanılan ana girdi ürünlerinin safsızlığı da elde edilecek ürünün safsızlığını etkileyeceğinden dolayı önemlidir. Üretilen HAp numunelerinin sahip olabileceği kirlilikler ya da yabancı iyonlar XRD analizi ile açıkça belirlenebilmektedir. Elde edilen XRD sonuçlarına göre üretim aşamasında kullanılan girdi ürünlerinde az miktarda da olsa bulunabilen sodyum (Na²⁺), amonyum (NH₄⁺), potasyum (K⁺), klorür (Cl⁻) ve nitrat (NO₃⁻) [97] gibi iyonların nihai üründe bulunmadığı görülmüştür. Bu iyonlar üretilen HAp'nin safsızlığına direkt etki edebilen iyonlar olarak kristal örgü içine kolayca dâhil olabileceğinden [70, 97] XRD modelinde bulunmamaları üretim metodunun etkinliğini ve reaksiyon sentezinde kullanılan ana malzemelerin safsızlığını göstermektedir. HAp sentezlenmesi aşamasında tercih edilen çöktürme yönteminin etkinliği XRD modelinden elde edilen sonuçlarla doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması içeriğinde HAp ve farklı oranlarda Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp tozları oda sıcaklığında üretilmiştir. Düşük sıcaklıklar ya da oda sıcaklığı gibi bir değerde sentezlemenin HAp saflığı üzerindeki etkisi çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda 20°C ±2 reaksiyon sıcaklığının önemi vurgulanmıştır [81, 86–88, 91].



Şekil 3.2 Ag(I)-HAp XRD sonucu (JCPDS no. 09-0169 ve JCPDS no. 09-0432)

Bu tez içeriğinde yapılan çalışma ve XRD sonuçlarına göre reaksiyon için tercih edilen $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığının uygunluğu ile HAp üretimi için kritik bir sıcaklık olduğunu görülmüştür. Tercih edilen bu sıcaklık değerleri, üretim esnasında çözeltilerin karıştırma hızlarına ve sürelerine dikkat edilmezse nihai ürünün kalitesine doğrudan etki etmektedir. Bu sıcaklıklarda yavaş bir karıştırma hızı ve kısa bir süre tercih edilirse reaksiyon gerçekleşme hızı yavaşlayacağından farklı fazların oluşmasına neden olabileceği bildirilmiştir [170]. Üretim esnasında karıştırma hızının fazlalığı ve 12 saat gibi bir karıştırma süresinin CaO fazlarının varlığını önemli ölçüde azalttığı bilindiğinden [170] yapılan çalışma sonucunda elde edilen XRD modelinde CaO fazının bulunmayışı tez içeriğinde tercih edilen 200 rpm karıştırma hızının ve 1 saatlik karıştırma süresinin uygunluğunu göstermektedir. Hızlı tercih edilen karıştırma hızının yanında çok yavaş karıştırma hızı Monetit (DCPA), Brushite (DCPD), TCP, CaO gibi fazların oluşmasına neden olduğundan [170] karıştırma hızı ve karıştırma süresi sıcaklıkla beraber optimize edilmiştir.

Çözeltilerin karıştırılmasından sonra gerçekleştirilen çöktürme süresi de nihai HAp'nin kalitesi üzerinde etki edeceğinden çöktürme işlem süresini uzun tutmak tavsiye edilmektedir [170]. Elde edilen XRD modellerine göre bu tez içeriğinde uygulanan 12 saatlik çöktürme süresinin yeterli bir süre olduğu sonucu elde edilmiştir.

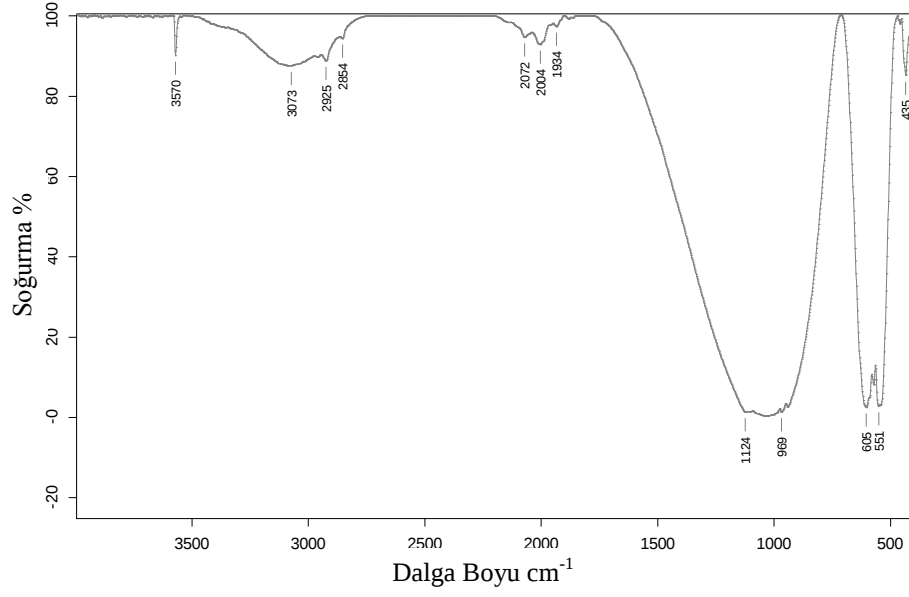
Üretim parametreleri içinde nihai HAp ürününün kalitesi üzerindeki en etkili faktör kurutma ve sinterleme işlemlerinde tercih edilen sıcaklıklar ve uygulama süreleridir [170]. Kurutma işleminde amaç reaksiyon sonucunda açığa çıkan uçucuların yapıdan çıkarılmasıdır. Bu kurutma işlemi en düşük sıcaklıkta uçabilecek gruba göre ayarlanmalıdır. Sıcaklık değeri uçucunun uçması için gerekli sıcaklık iken uygulama süresi de o uçucunun yapıdan çıkması için gerekli süredir. Kurutma süresi az tercih edilen çalışmalar da yine CaO ve β -TCP gibi fazların barınmasına neden olacağı bildirilmiştir [170]. Kurutma ve sinterleme sıcaklığı malzemenin yüzey morfolojisi üzerinde de etkili olduğundan dikkatlice optimize edilmiştir. Sinterleme sıcaklığı ve süresi malzemenin morfolojisi, tane yapısı ve tane boyutu üzerinde etkili olduğundan HAp'nin mekanik özelliklerine de etki etmektedir [11]. Bu tez çalışması içeriğinde bu etki SEM cihazı ile morfolojik olarak incelenmiştir. XRD analizi sonucunda çalışma içeriğinde tercih edilen 200°C kurutma sıcaklığının ve 12 saatlik kurutma

süresinin, 1100 °C sinterleme sıcaklığının ve 1 saatlik sinterleme süresinin uygun yapıda HAp elde etmek için ideal değerler olduğu sonucu elde edilmiştir.

Tez çalışması içeriğinde tercih edilen çöktürme metodunda (bkz. Bölüm 1.1.3.1) uygulanan reaksiyon 1 hammaddelerinin nihai ürün üzerinde etkili olmakla beraber safsızlığa etki edecek kirletici etkilerinin çok az olduğu sonucu elde edilmiştir. Bununla beraber bu reaksiyonda kullanılan yüksek sinterleme sıcaklığı da nihai ürün üzerinde oluşabilecek kirlenmeleri ortadan kaldırması da avantajlı bir durum olarak değerlendirilmiştir. XRD piklerinin pik alanları dikkatle incelendiğinde (Şekil 3.2 ve Şekil 3.2) dar zirvelere sahip bir sonuç gözlenmiştir. Dar pik alanları daha büyük kristallenmeyi geniş pik alanları ise daha az kristallenmeyi göstermektedir [70]. HAp numunelerinin sahip olduğu dar ve uzun pik varlığı kristallenmenin uygunluğunu göstermektedir. XRD ile faz tanımlaması, faz safsızlığı, kristallilik, kristal ölçüleri, lattice ve miller indisleri belirlenebilmektedir. Bu çalışmanın içeriğinde ise üretilen malzemelerin XRD karakterizasyonunda fazların tanımlanması ve faz safsızlıkları değerlendirilmiştir.

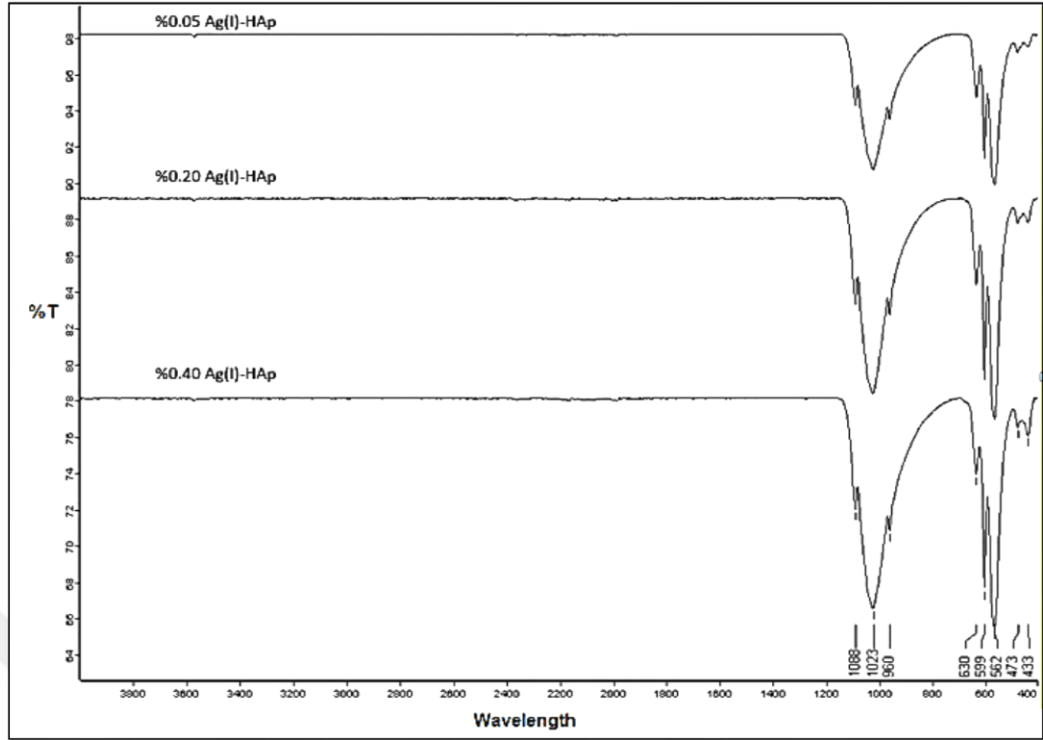
3.2.2. Bileşen Grupları İncelemesi

HAp'nin sahip olduğu mineral bileşenlerinin insan kemiğine ve dişine benzemesinden dolayı HAp'ler diş hekimliğinde özellikle dentin hassasiyeti tedavilerindeki dentin tübül tıkama uygulamalarında kullanılmaktadır. Çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan HAp ve farklı katkı oranlarında Ag(I) iyonları eklenmiş Ag(I)-HAp'nin sahip olduğu PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} bileşen gruplarının belirlenmesinde FTIR analizi (bkz. Bölüm 2.3.1.6) kullanılmıştır. Bu analizlerde elde edilen spektrumlar HAp ve Ag(I)-HAp için sırasıyla aşağıdaki Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 HAp FTIR Spektrumu

FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrumlara göre PO_4^{3-} grupları sahip oldukları dalga boyu değerleriyle; üretilen HAp'nin bükme titreşimi (ν_2) 477 cm^{-1} , O–P–O bükme titreşimi (ν_4) 571 ve 603 cm^{-1} , P–O arasında simetrik gerilme titreşimi (ν_1) 969 cm^{-1} , P–O arasında asimetrik gerilme titreşimi (ν_3) 1037 ve 1100 cm^{-1} , OH^- titreşim (ν_1) ve gerilme (ν_s) titreşimleri 640 ve 3570 cm^{-1} dalga boylarında gözlenmiştir. 3600 ila 2600 cm^{-1} dalga boyu değerlerinde gözlemlenmesi beklenen suyun OH bandına ait piklerde gözlenmiştir.



Şekil 3.4 Ag(I)-HAp FTIR Spektrumları

HAp'nin temel yapısı içinde karbonat iyonlarının bulunması beklenmemesine rağmen sentez koşullarına bağlı olarak, CO₂'nin suda çözünmesi ve sonuçta meydana gelen karbonat iyonlarının kristal kafes içine dâhil edilmesi nedeniyle çoğu zaman karbonat içeren bir HAp elde edilir [124]. PO₄³⁻ grubunun CO₃²⁻ grubuna bağlanmasını gösteren soğurma CO₃²⁻ pikleri 1700 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gözlenmiştir. Zayıf şiddetli PO₄³⁻, asimetrik gerilme titreşimi (ν₃) ve simetrik gerilme titreşimi (ν₁) emme bantları 1934 ve 2072 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gözlenmiştir. Bununla birlikte HAp ve Ag(I)-HAp için sırasıyla 432 cm⁻¹ ve 1127 cm⁻¹, 433 cm⁻¹ ve 1132 cm⁻¹ dalga boylarında çok az bir pik şiddetiyle β-TCP fazına ait olan pikler de gözlenmiştir. Üretim sonucunda elde edilen ürünün FTIR sonuçlarında gözlenen β-TCP fazına ait bantlar XRD sonuçlarıyla uyumludur.

Farklı katkı oranlı Ag(I) iyonları eklenerek üretimi yapılan Ag(I)-HAp tozları için yapılan FTIR çalışmalarında da HAp için yapılan FTIR analiziyle uyumlu bileşen grupları bulunmuştur. Sentezlenen HAp ve Ag(I)-HAp tozlarına ait kimyasal bağlarının soğurulma bantları için elde edilen spektrum değerleri literatür

değerleriyle kıyaslanarak aşağıdaki Çizelge 3.1' de not edilmiştir. Elde edilen dalga boyu değerleri HAp ve Ag(I)-HAp için geçerli pik noktalarıyla uyumludur.

Farklı katkı oranlarında Ag(I) iyonları eklenmiş Ag(I)-HAp gruplarında daha önceki yapılan çalışmalarda sunulan gümüş fosfat bağlarına karşılık gelen titreşim bantları (975 ve 1017 cm^{-1} dalga boyları [171]) tez içeriğinde yapılan FTIR çalışmasında da gözlenmiştir. Daha önceki yapılan çalışmada gümüş katkı oranlarının yüksekliği nedeniyle bu pikler net bir şekilde ayırt edilirken bu çalışma içeriğinde tercih edilen katkı oranlarının düşük olması nedeniyle pik ayrımı çok net yapılamamıştır. Ag(I) iyonları katkılanmış numunelerde gümüş ve fosfat arasında gerçekleşen bağın çok net olarak gözlenmemesinin nedeni, üretim için tercih edilen gümüş katkı oranlarının azlığından kaynaklanmaktadır. FTIR analizlerinde en yoğun şiddete göre diğer pik şiddetleri ayarlandığından en yoğun pik daha net gözükcektir. Bunun sonucu olarak daha fazla oranda fosfat varlığı Ag_3PO_4 ile oluşacak titreşim bandını görünmez hale getirecektir.

Çöktürme yöntemiyle üretilen HAp'ler absorbe edilmiş suyun çıkarılması için kurutma ısı işlemine ve katkısız HAp fazının oluşması için sinterleme ısı işlemine tabi tutulmaktadır. Bu işlemlerde ki uygunsuzluklar XRD analizinde olduğu gibi FTIR analizinde de gözlemlenmektedir. Kurutma işleminde yeterli süre beklenilmemesi, hızlı kurutma yapılması, düşük sıcaklık ya da yüksek sıcaklıkta kurutma ve sinterleme ısı işlemlerinin yapılması ürün kalitesine etki edecektir. Bu nedenle ideal bir ısı işlem sıcaklığı ve ısı işlem süresi belirlenmelidir. Kurutma işleminde süre ve sıcaklık değerlerinde ki uygunsuzlar FTIR analizlerinde su varlığını gösteren dalga boyu noktalarında açığa çıkmaktadır. HAp tozlarının FTIR analizlerinde çok az miktarda su varlığını gösteren pikler gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz analizler sırasında gözlenen su soğurma bandı KBr'nin ortamdaki su moleküllerini çekmesinden dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak da spektrumda su bantları oluşturmuştur. Normalde HAp analizlerinde de az bir miktar soğurulan su varlığı gözlenirse de KBr ile yapılan pelletleme sonucunda bu su varlığı artmıştır. Bu su bantlarının ortadan kaldırılması için hazırlanan pelletler belli bir süre kurutma işlemine tabi tutularak ve özel hermetik kaplarda analiz öncesi bekletilerek adsorbe edilen geniş su bantları daraltılabilir. Ag(I)-HAp'lerde analiz için hazırlanan pelletler 35°C sıcaklıkta ve yaklaşık 20

dakika süreyle etüvde bekletilerek FTIR analizleri yapılmıştır. Sonucunda yoğun su soğurma bantları gözlemlenmemiştir (Şekil 3.4).

Çizelge 3.1 HAp FTIR sonuçları

Bileşen Grubu	Soğurma Bandı, cm^{-1}		
	Referans	HAp	Ag(I)-HAp
CO_3^{2-}	1640 [124] 1650 [11]	1700	1695
PO_4^{3-}	460 [124] 474 [11]	477	473
	560 ve 600 [124] 571 ve 604 [11]	571 ve 603	562 ve 599
	960 [124] 961 [11]	969	960
	1020 ve 1120 [124] 1046 ve 1090 [11]	1037 ve 1100	1023 ve 1088
	1950-2100 [124]	1934-2072	1943-2064
OH^-	630 ve 3540 [124] 631 ve 3572 [11]	640 ve 3570	3580
HPO_4^{2-}	875 [124]	-	-
Soğurulan Su	3600 [124] 3600 [11]	3600	3600

Hem üretim esnasında hem de karakterizasyon aşamalarında soğurulan suyun kaybedilmesi kafes parametrelerini etkilememektedir [124]. FTIR analizlerinde üretilen HAp'ler için sentez parametrelerinden ve safsızlıklarından kaynaklanan H_2O grubu pikleri gözükse de NO_3^- ve NH_4^+ gruplarına ait pikler gözlenmemiştir. Sentez parametreleri ve safsızlık kaynaklı piklerin var olması nihai ürün için negatif bir etki olarak düşünülmemektedir [124]. Bu nedenle XRD sonuçları üzerinde etkili olmayacaktır. Yani malzemenin yapısında ve faz safsızlığında bir değişime neden olmayacaktır. Ancak bu grupların varlığının biyolojik uygulamalar için önemli

olduğunu düşünülmektedir. Bu uçucuların varlığının biyolojik uygulamalarda oluşabilecek reaksiyonlar nedeniyle ortadan kaldırılması önemli olarak değerlendirmektedir. Yapılan bu çalışmada su grubu gözlemlenmişken amonyum ve diğer uçucu grupları gözlenmemiştir. Diş tedavileri gibi biyolojik bir uygulama amacı var olan bu çalışma da bu grupların gözlemlenmemesi olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Üretim aşamalarında uygulanan sinterleme ısıl işlemindeki farklılıklar da CaP seramiklerinin faz safsızlığına, faz türüne ve numune tane boyutuna etki etmektedir. Bu etkiler XRD analizinde gözlemlendiği gibi FTIR analizinde de gözlemlenebilir. Üretim esnasında kullanılan ısıl işlem sıcaklığının ve süresinin bir sonucu olarak amonyumun kalıntıları da bazen bileşen grupları içinde gözlenebilmektedir. 1320-1480 cm^{-1} dalga boyları arasındaki bölgede karakteristik amonyum zirvelerin [124] gözlemlenmemesi ısıl işlem sonucu bu grubun yapıdan uzaklaştığını göstermektedir. FTIR, biyolojik uygulamalar için sıklıkla tercih edilen saf ve termal olarak kararlı bir HAp ve β -TCP elde etmek için sentez parametrelerini değerlendirmemize yardımcı olan bir analiz yöntemidir [124]. FTIR sonuçlarından elde edilen bilgilere göre HAp tozlarının karakteristik özelliklerinin sağlanması için ana girdi ürünlerin yüksek düzeyde saf olması gerektiği anlaşılmıştır. Ayrıca istenen ürünü elde etmek için malzemenin ısıtma süreçlerinde tercih edilen sıcaklık değerlerinin ve uygulama sürelerinin dikkatlice seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte yapmış olduğumuz üretimde elde edilen ürünlerden alınan FTIR spektrumlarına göre kurutma sıcaklığı ve süresinin koşullarının yoğun HAp yapısının elde edilmesi için ideal değerler olduğu sonucu elde edilmiştir.

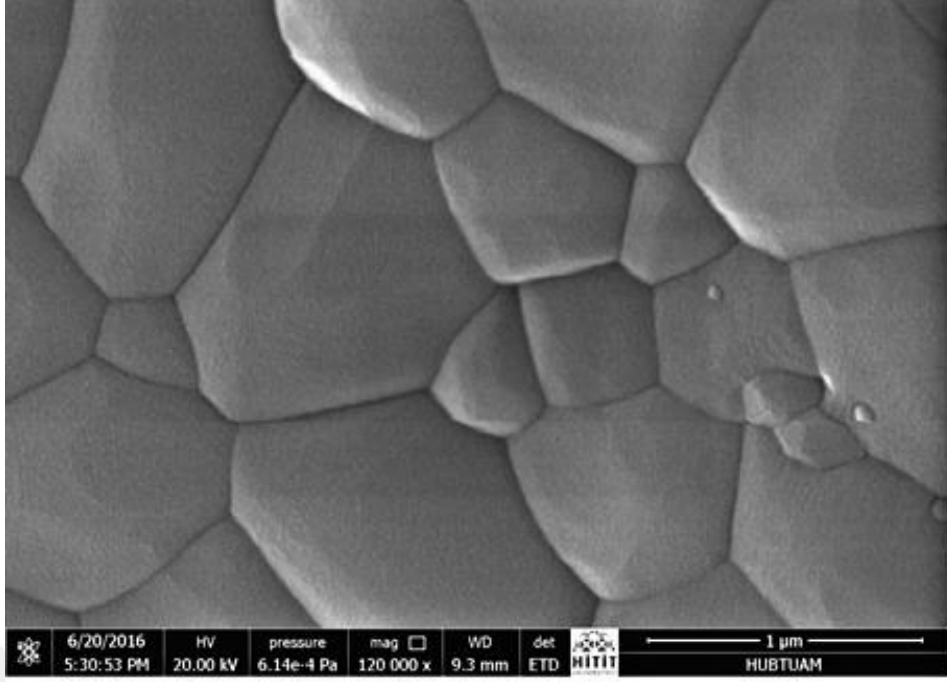
Çöktürme yöntemiyle sentezlenmiş HAp ve Ag(I)-HAp'lerin fazlara göre sahip oldukları bileşen gruplarını belirlemek amacıyla kullanılan FTIR analiz sonuçlarıyla da FDA [160] tarafından biyolojik uygulamalarda kullanılacak CaP biyoseramik ürünleri için tanımlanan özellikleri sağladığı görülmüştür.

3.2.3. Yüzey Morfolojisi İncelemesi

Bu tez çalışmasında üretilen HAp tozlarının kullanım yerindeki amaca uygunluğunu morfolojik olarak değerlendirmek için SEM (bkz. Bölüm 2.3.1.2) tercih edilmiştir.

Ayrıca Bölüm 1.1.6’da tanımlanan HAp’nin Ca/P molar oranı (bkz. Bölüm 2.3.1.2 ve 2.3.1.4) tayininde SEM kullanıldığı için Ca/P oranı sonuçları yüzey morfolojisi çalışması içinde değerlendirilmiştir. Dentin tübüllerinin kaplanarak dentin hassasiyet giderme tedavilerinde kullanmak amaçlı olarak üretilen katkısız HAp ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin SEM görüntüleri aşağıdaki Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’ da gösterilmiştir.

Her iki grup için yapılan çalışma sonucunda elde edilen SEM görüntülerinde yoğun ve bal peteği desenli bir morfoloji gözlenmiştir. HAp’nin morfolojik olarak değerlendirmesinden beklenen az deformeli, düzgün dağılımlı ve düzenli şekilli parçacıklara sahip olduğu sonucu elde edilmiştir. Üretimde kullanılan çöktürme yöntemi parametreleri her bir numune için aynı tutulduğundan yüzey morfolojileri üzerine etki edebilecek tek etken iyon katkılama ve bu iyonların katkı oranlarıdır. Bu tez çalışması içeriğinde elde edilen SEM görüntülerine göre seçilen katkı oranlarındaki değişimin yüzey morfolojisine net bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Yüzey morfolojisinde katkılama oranına göre değişimin incelendiği bir çalışma da morfoloji değişimi için kritik bir değer tanımlanmıştır [11]. Belirtilen bu çalışmada Ag(I) iyonu eklenmiş HAp için % 2 gibi bir değerden sonra morfolojisinin düzensiz bir yapının elde edildiği ve tanelerde ısı işlem izlerinin gözlemlendiği bildirilmiştir [11]. Yaptığımız çalışma için tercih edilen katkı oranları için bu denli keskin farklılıklar gözlenmemiştir.

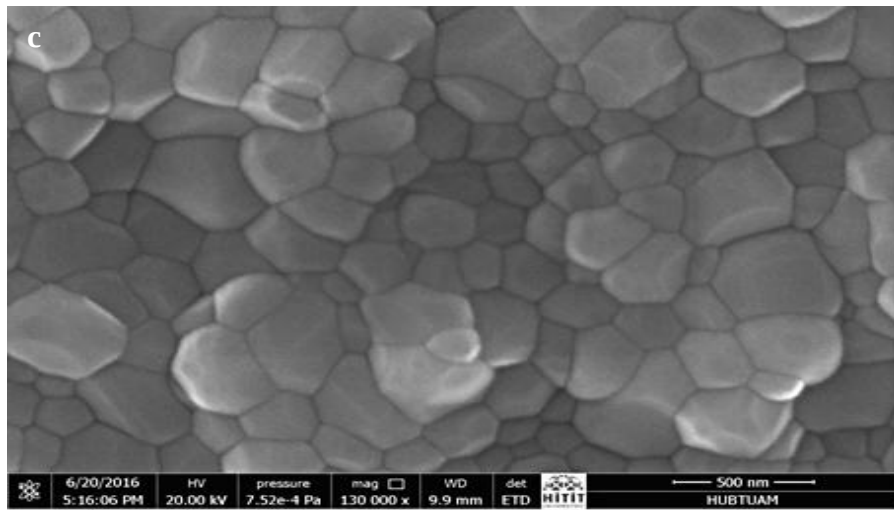
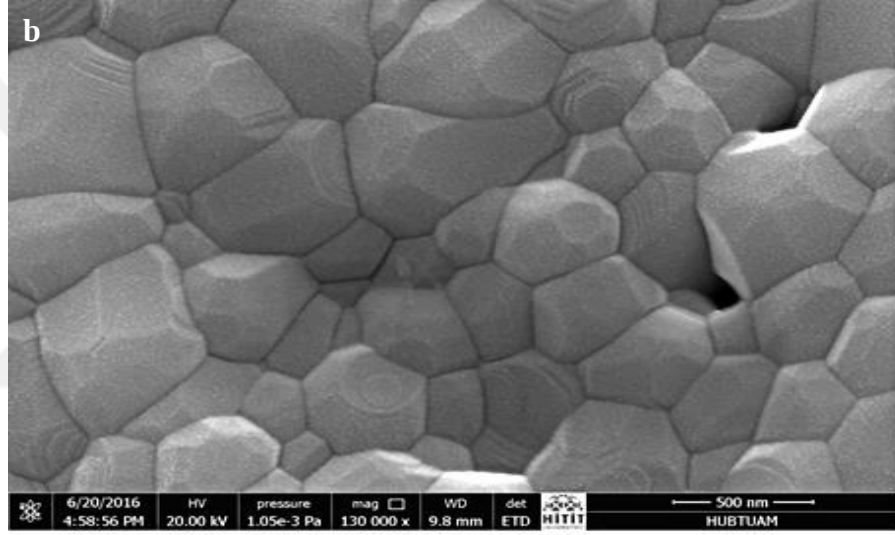
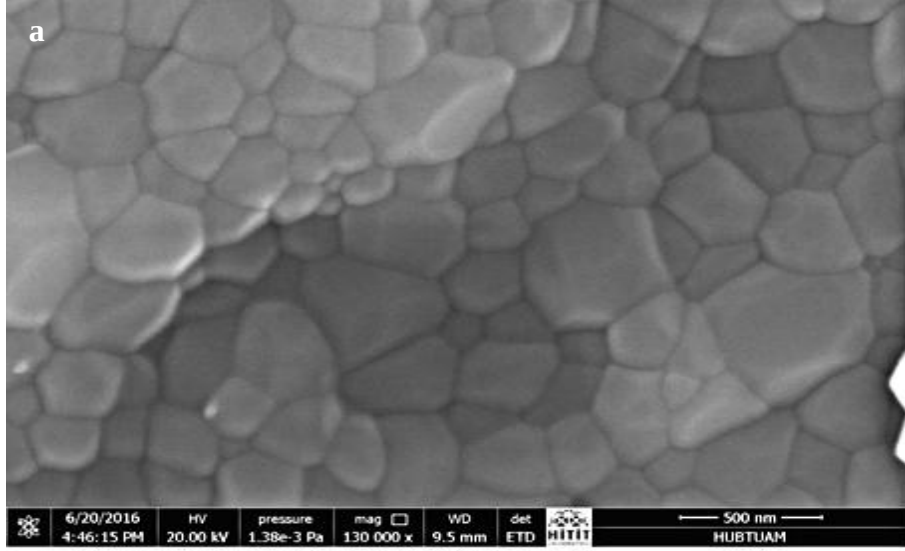


Şekil 3.5 HAp SEM Görüntüsü

Üretilen HAp tozlarının yüzey morfolojisi üzerine etki eden en önemli parametre sinterleme sıcaklığıdır [70]. Yüzey düzgünlüğünü arttırmak için sinterleme sıcaklığı yüksek bir değer ve çöktürme süresi için en az 12 saatlik bir süre ve ideal bir Ca/P oranı seçilmelidir [11, 70]. 1100°C ve 1 saat olarak ayarlanan sinterleme işleminin düzenli, pürüzsüz, bal peteği desenli ve nano boyutta HAp parçacıkları oluşturduğu görülmüştür. HAp'nin sahip olduğu bu pürüzsüz yüzey, yüzeye yapışma ve/veya tutunma ihtimalini azaltacağından diş tedavilerinde diş yüzeyine mikroorganizmaların tutunmasını engelleyen ideal bir yüzey oluşturacaktır. Dentin tübülleri üzerine kaplama amaçlı kullanılması planlanan bu ürün mikroorganizmalarla ilk karşılaşacak yer olacağından yüzey pürüzlülüğünün az olması tedavinin etkinliği için çok pozitif bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çökelme işlemi için belirlenen süre HAp tozlarının çözelti içindeki sıvı yapılardan sıyrılarak ağırlık farkıyla tabana çökmesi için gerekli süre olarak yazılabilir. Bu süre tam bir çökelmenin olması için optimize edilmiştir. Bu çalışmada çökelme işlemi için 12 saatlik bir süre uygulanmıştır. Parçacıkların çökmesi için belirlenen süre az olursa ve çökelen kısımla sıvı içerik birbirinden tam ayrılmazsa çözelti+parçacık

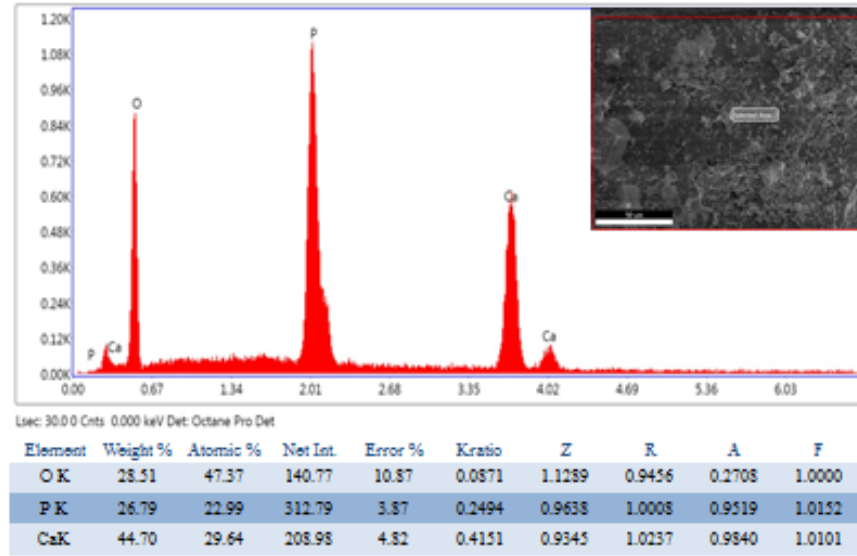
karışımı ile ısıtma işlemi başlayacaktır. Bu durumda parçacıkların çözeltiden tamamen ayrılamamasından dolayı ve de hızlı uygulanan ısıtma işlemiyle beraber malzemenin yüzey morfolojisi de pürüzlü hale gelecektir [131]. Bu nedenle ısıtma işlemi öncesi parçacıkların çözeltiden tamamen ayrılması için en az 12 saatlik bir çökeltme süresi uygulanmıştır. Aynı zamanda süzdürme işlemi de yeterli bir süre beklemeye beraber düşük vakum pompası kullanılarak daha etkin bir ayırma sağlanmaya çalışılmıştır. Normalde bütün HAp yapıları ısıtma işleminin başladığı ilk andan ısıtma işleminin bittiği son ana kadar ki sürede pürüzlüden pürüzsüz yüzeye doğru ilerlerler [131]. İlk anda yani pürüzlü durumda moleküller daha fazla yapışma eğilimine ve büyüme eğilimine sahiptirler. Isıtma işlemiyle beraber pürüzlü yüzeyden pürüzsüz yüzeye dönüşüm başlayacaktır. Yüzey pürüzsüzleştikçe de moleküllerin eklenmesi yavaşlayacak ve nihai yapı ortaya çıkacaktır [131]. Bu tanım gereğince ısıtma işlemi süresi ve sıcaklığı çok dikkatli uygulanmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre pürüzlü yüzey olarak ortaya çıkabilecek negatif etkiyi azaltmak için ilk kurutma işlemini bir süre daha arttırarak bu yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi görülmüştür. Bu çalışmada ise çökeltme sıcaklığı laboratuvar şartlarındaki sıcaklık, kurutma sıcaklığı 200°C ve sinterleme sıcaklığı da 1100°C olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sıcaklıklarıyla beraber ısıtma işlemlerinin uygulandığı süreler de malzemenin yüzey kalitesini etkilemektedir [127, 128]. Üretim aşamalarında seçilen süreler ise çökeltme için en az 12 saat, kurutma için 12 saat ve sinterleme için ise 1 saat süreler seçilmiştir. Seçilen bu sıcaklık ve süre değerleriyle dış tedavilerinde bakteriyel yapışmaların az olacağı pürüzsüz yüzeyler elde edilmiştir.



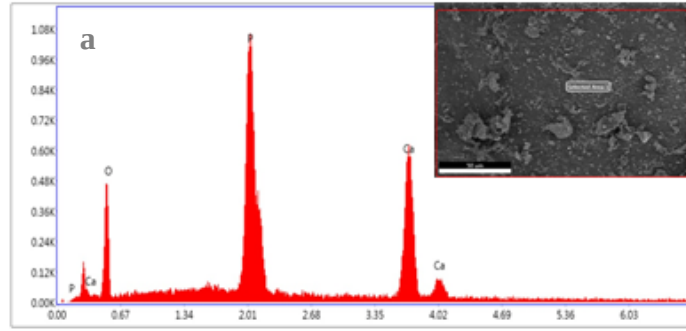
Şekil 3.6 Ag(I)-HAp SEM görüntüleri a) % 0,05 b) % 0,20 c) % 0,40 Ag(I)-HAp

HAp üretim yöntem parametrelerinin faz safsızlığına etkisine XRD çalışmasında tanımlanmıştır. Ca fazlalığından CaO ve P fazlalığından da β -TCP fazlarının ortaya çıkacağı açıklanmıştır. Kalsiyum fosfat bileşiklerinden HAp, TCP'den biyolojik olarak daha etkindir [70]. Bu tez çalışması içeriğinde dentin tübül yüzeylerine kaplama hedefi, biyolojik bir yüzeye kaplama işlemi olduğundan HAp'nin sahip olduğu Ca/P değerleri, safsızlığı da göstermek için ayrıca belirlenmiştir.

Bu çalışma içeriğinde Ca/P oranı SEM-EDS (bkz. Bölüm 2.3.1.2) kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ölçümlerde $50\mu\text{m}$ ölçek değerinde alınan genel SEM görüntüsünde yaklaşık $200\mu\text{m}^2$ 'lik bir alan seçilerek ölçümleme yapılmıştır. Katkısız HAp ve Ag(I)-HAp'lere ait SEM-EDS spektrumları ve sonuçları sırasıyla Şekil 3.7 ve 3.8'de gösterilmiştir. Aynı zamanda bütün gruplar için elde edilen Ca/P oranları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

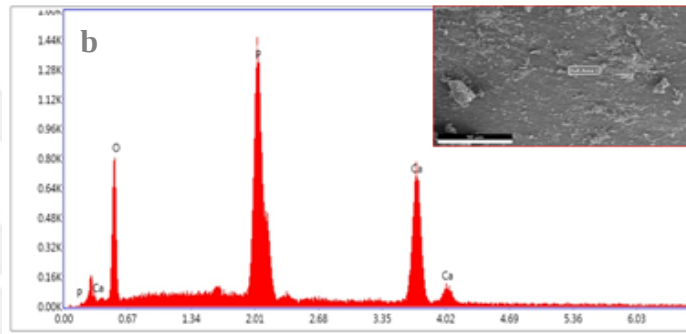


Şekil 3.7 Katkısız HAp, SEM-EDS Spektrumu



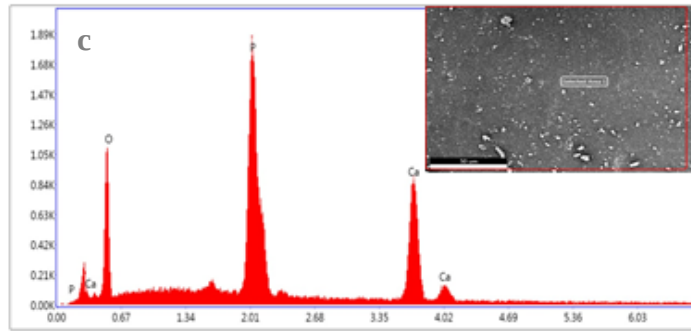
Use: 30.00 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F
O K	18.75	34.24	74.21	11.85	0.0520	1.1488	0.9375	0.2413	1.0000
P K	30.39	28.76	320.97	3.83	0.2897	0.9817	0.9945	0.9530	1.0154
Ca K	50.24	37.00	213.04	4.92	0.4789	0.9526	1.0190	0.9809	1.0096
Ag L	0.09	0.03	12.38	35.87	0.0020	0.6830	1.1742	1.0350	1.0808



Use: 30.00 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F
O K	19.71	35.31	125.99	11.15	0.0675	1.1395	0.9415	0.2564	1.0000
P K	29.98	27.02	408.98	3.72	0.2823	0.9733	0.9977	0.9533	1.0148
Ca K	49.70	37.61	255.28	4.81	0.4389	0.9441	1.0214	0.9815	1.0099
Ag L	0.21	0.05	1.15	62.11	0.0016	0.6782	1.1763	1.0371	1.0812



Use: 30.00 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %	Kratio	Z	R	A	F
O K	17.16	25.38	170.82	10.69	0.0846	1.1307	0.9457	0.2756	1.0000
P K	30.84	26.61	539.18	3.52	0.2880	0.9653	1.0010	0.9545	1.0136
Ca K	51.40	48.01	301.87	4.72	0.3897	0.9359	1.0238	0.9813	1.0102
Ag L	0.36	0.07	0.15	77.68	0.0000	0.7231	1.2003	1.0553	1.0940

Şekil 3.8 Ag(I)-HAp, SEM-EDS Spektrumları, a) % 0,05 b) % 0,20 c) % 0,40 Ag(I)-HAp

SEM-EDS çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlardan sağlanan verilerle hazırlanan çizelge incelendiğinde kalsiyum fosfat seramikleri için tanımlanan [91], [92] Ca/P oranları elde edilmiştir. Bu sonuçlarda hem XRD hem de FTIR analizlerinden elde edildiği gibi katkısız HAp mineralini göstermektedir. Üretimde elde edilen bu değer diş dentin tübül hassasiyet tedavilerinde kullanımı düşünülen HAp için istenen bir Ca/P değeridir. Ancak bu şekilde belirlenen Ca/P değeri uygulanan metodun geçerliliği açısından düşündürücüdür. Yani SEM-EDS analizinde seçilen bölgeye göre veri alımı olduğu için aslında bütünü temsil etmemektedir. Tekrarlı yapılan ölçümler sonucunda alınan ortalama değerle malzemelerin Ca/P oranları hakkında bilgi edinmemizi sağlamaktadır. Bakılan bölgeye göre skorlama yapıldığından kristallenmenin olmadığı, morfolojinin bozuk olduğu ya da ısıl işlemle beraber gerçekleşebilecek pürüzlü yüzey gibi etkilerin olduğu bölgelerden genelde ölçüm tercih edilmez. Bu olumsuz yaklaşımı ICP-OES cihazıyla bütün malzemenin sahip olduğu Ca, P değerlerini miktar olarak belirleyerek aşılabileceği düşünüldüğü için EDS ölçümlerini doğrulamak adına ICP-OES cihazıyla Ca/P oranını belirlenmeye çalışılmıştır. ICP-OES cihazıyla elde edilen Ca, P değerleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. Bu işlem tekrarıyla bütün olarak bir HAp yapısının varlığı da doğrulanmış olacaktır. Hem daha gerçekçi bir Ca/P değeri hem de yapıyı bütün olarak skorlamak verilerin doğru kaydedilmesi açısından önemlidir.

Çizelge 3.2 Ca / P değerleri

Numune	Ca	P	Ca / P
Katkısız HAp	44,70	26,79	1,6685
% 0,05 Ag(I)-HAp	50,24	30,39	1,6531
% 0,20 Ag(I)-HAp	49,70	29,98	1,6577
% 0,40 Ag(I)-HAp	51,40	30,84	1,6666

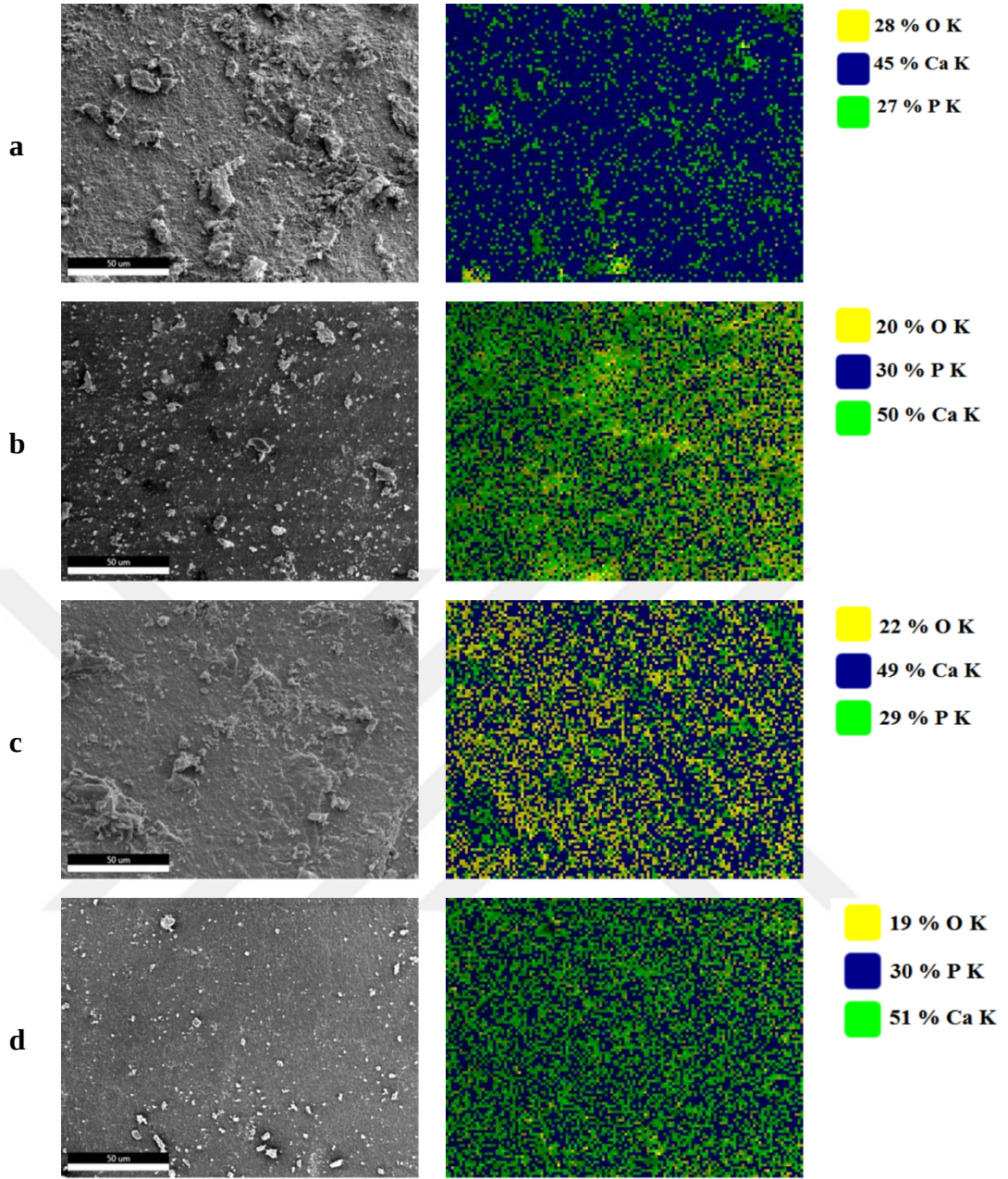
Bu bölümde ICP-OES cihazıyla yapılan ölçümlerden alınan sonuçlardan sadece katkısız HAp için elde edilen sonuçlar verilmiştir. Farklı Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp tozlarının Ca/P değerleri Ag(I) iyonları salım çalışması (bkz. Bölüm 3.3) bölümünde verilmiştir. Katkısız HAp tozu için elde edilen Ca, P değerleri sırasıyla 1,821 ppm ve 1,095 ppm olarak ölçülmüştür. Bu değerler sonucunda elde edilen

Ca/P oranı 1,6630 olarak bulunmuştur. SEM-EDS sonucundan elde edilen 1,6685 Ca/P değeriyle oldukça uyumlu sonuç elde edilmiştir. Bölgesel ve seçime bağlı alınan EDS ölçümlerinden alınan sonucun ICP-OES gibi bütününe miktar olarak belirleyen çalışmayla uyumlu çıkması bütünen bir HAp yapısının varlığını göstermektedir.

Çizelge 3.3 Katkısız HAp, ICP-OES Sonucu

Ölçüm	Sonuç (ppm)		
1	1148990	1,111	1,882
2	1145730	1,095	1,818
3	1145560	1,080	1,823
Ortalama	1146760	1,095	1,821
Standart Sapma	1933,11	0,016	0,002
	Ar 430,010	P 177,495	Ca 317,993

SEM-EDS ve ICP-OES çalışmalarıyla üretilen malzemelerin Ca/P değerleri belirlenmiştir. ICP-OES cihazıyla bütün olarak Ca/P değeri okunmaya çalışılmıştır. Bunun yanında yapı içinde Ca, P dağılımlarını gösterebilmek adına SEM cihazıyla haritalandırma çalışması da yapılmıştır. Bu çalışma ile yapı içinde homojen bir dağılımın gözlenip gözlenmediği belirlenmeye çalışılmıştır. SEM cihazından alınan genel bir görüntü üzerinde yapılan haritalandırma görselleri Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Bu çalışmada dağılıma sebep olan elementler farklı renklerle boyanmış ve boyalı alan skorlaması yapılarak Ca/P oranı bu yöntemle de kontrol edilmiştir. Haritalandırma çalışmalarından elde edilen sonuca göre dağılımın homojen olduğu ve kümelenmelerin olmadığını gözlenmiştir. Haritalandırma işlemi Ca/P oranının belirlenmesinden çok genel dağılımı görmek adına yapılan bir işlem olduğundan EDS ve ICP-OES cihazlarından alınan sonuçlarla karşılaştırılmamıştır.



Şekil 3.9 HAp ve Ag(I)-HAp yüzey haritalandırması a) HAp b) %0,05 c) %0,20 d) %0,40 Ag(I)-HAp

Sonuç olarak çöktürme yöntemiyle sentezlenen HAp ve Ag(I)-HAp biyomalzemeleri bal peteği desenli ve düzenli şekilli, yüzeyleri pürüzsüz parçacıklara sahiptir. Elde edilen bu morfoloji ve Ca/P değerleri üretilen bu biyomalzemelerin yüksek reaksiyon sıcaklıklarında, uzun çökelme zamanlarında üretildiğinin de bir göstergesi olmuştur. Bu biyomalzemeler morfolojik olarak yüzey pürüzlüğü gibi negatif bir etki

doğuracak özelliğe sahip olmadığından ve Ca/P oranıyla HAp fazını net bir şekilde doğruladığından bu haliyle diş dentin tübülleri hassasiyet çalışmalarında kaplama malzemesi olarak kullanılmasının uygun olduğu sonucu elde edilmiştir.

3.2.4. Yoğunluk Tayini

Üretilen HAp tozlarının karakteristik özelliklerinden olan yoğunluk değerinin belirlenmesi için Archimed yöntemi (bkz. Bölüm 2.3.1.5) kullanılmıştır [11]. Yapılan yoğunluk ölçümleri ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.4’de gösterilmiştir. Malzemelerin bağıl yoğunluk değerleri deneysel olarak ölçülen yoğunluk değerinin teorik olarak bilinen yoğunluk değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır (katkısız HAp yoğunluğu 3.156 g/cm^3 , [11]).

Çizelge 3.4 Yoğunluk Ölçüm Sonuçları

Numune	Sinterlenmiş Yoğunluk (g/cm^3)	Bağıl Yoğunluk (%)
HAp	3,051	96,673
% 0,05 Ag(I)-HAp	3,089	97,877
% 0,20 Ag(I)-HAp	3,112	98,605
% 0,40 Ag(I)-HAp	3,140	99,493

Elde edilen yoğunluk ölçüm sonuçlarına göre çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan katkısız HAp tozunun yoğunluk değeri $3,051 \text{ g/cm}^3$ ve bağıl yoğunluğu % 96,673 olarak belirlenmiştir. Üretimi yapılan katkısız HAp tozları katkısız HAp için tanımlı teorik yoğunluk değeri olan 3.156 g/cm^3 yoğunluk değerine kıyasla daha az yoğunudur. Farklı katkı oranlarında %0,05 - %0,20 - %0,40 Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp örnekleri için sırasıyla 3,089 – 3,112 – 3,140 g/cm^3 olarak yoğunluk

değerleri ölçülmüştür. Katkı oranı arttıkça Ag(I)-HAp tozlarının yoğunluklarının arttığı görülmektedir.

Yapılan yoğunluk ölçümlerinde malzemelerin yoğunlukları hacimlerinden elde edilmiştir. Archimed metodunda sabit kütle olarak ayarlanan örnekler önce hassas terazide ölçümlenmiş daha sonra aynı kütlelere sahip numuneler ayrı ayrı su içine daldırılarak, sudaki hacim artışı gözlenmiştir. Hem katkısız hem de farklı Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp numunelerinin sabit basınç ve sabit sıcaklık altında, sabit kütleler konularak yoğunluklar belirlenmeye çalışıldığından yoğunluk sonuçlarındaki farklılık ölçülen numunelerin hacimlerindeki değişimden kaynaklanmaktadır. Yani aynı kütleye sahip olan numunelerden farklı hacim değerleri sağlamıştır. Bu da artan yoğunluk değerine göre aynı kütlede azalan bir hacim ortaya çıkarmaktadır. Katkısız HAp'ye yapılan iyon katkılamaıyla beraber malzemenin kapladığı hacim azalmış ve daha yoğun bir malzeme haline gelmiştir. Aynı şekilde farklı Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp numunelerde de artan katkı oranıyla beraber azalan bir hacim değeriyle daha yoğun bir malzeme elde edilmiştir.

Seramik biyomalzemeler için sabit kütlede, katı kütle yoğunluğundaki artma gözenekli bir kütle örneği göz önüne alındığında, gözenekli yapının azalmaya başladığı ve hacmi oluşturan tanelerin birbirine daha sıkı halde yaklaştığı şeklinde yorumlanmıştır. Aynı şekilde üretimi yapılan hem katkısız hem de farklı Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp numunelerin daha sıkı bir paketlenme göstererek yoğunluk değerlerinde artma olmuştur. Turkoz ve arkadaşlarının [11] yaptığı çalışmada yoğunluk değerlerinde belli bir kritik katkı oranı değerine kadar yoğunluk değerinde artış gözlemişken, her iyon için farklı olan kritik katkı oranı değeri aşılnca malzeme yoğunlukları azalmaya başladığını bildirmişlerdir. Bu azalış yapıya tutunmaların azaldığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre seçilen maksimum katkı oranında bile yoğunluk için bir artış gözlenmiştir. Bu artış sonucunda elde edilen bütün yoğunluk değerleri HAp'nin biyolojik uygulamalarında istenen $3,00 - 3,22 \text{ gr/cm}^3$ [11] yoğunluk değerleri aralığındadır. Teorik olarak biyolojik uygulamalar için tarif edilen değerlerin içinde yoğunluk sonuçlarının elde edilmesi bu tez çalışması içerisinde uygulanan üretim metodunun etkinliğini göstermiştir.

Bu çalışma içerisinde karşılaştırılan katı maddelerin sabit kütlede hacimlerinde meydana gelen azalma tane boyutlarındaki değişimle de açıklanmaya çalışılmıştır. Artan yoğunluk değerleri sonucunda azalan tane boyutları boyutsal olarak biyolojik uygulamalar için kabul edilebilir bir sonuç olsa da azalan boyut değerleriyle malzemenin bozunma olasılığının artması istenen bir durum değildir. Bu nedenle ideal bir yoğunluk ve tane boyut değeri yakalanmalıdır. Yoğunluk değerlerindeki değişimler malzemelerin tane boyutları ve morfolojisi üzerinde etkili olduğundan HAp için ayırt edici temel özellikler olan mekanik eğilme mukavemeti, gerilme mukavemeti ve kırılma dayanıklılığı gibi değerler üzerinde de değişimlere sebep olacaktır [11]. Özellikle ortopedi uygulamalarında mekanik özelliklerde ki değişimler dikkatle incelendiğinden bu değişimlerin bu tarz uygulamalar için değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tez içeriğinde diş dentin tübül tıkama çalışmaları yapılacağından ve bu uygulamalarda malzemelerin mekanik özellikleri aşırı öneme sahip olmadığından mekanik değişimler irdelenmemiştir.

Çöktürme metoduyla yaptığımız üretimde reaksiyona giren kimyasalların ve süreç parametrelerinin saflık ve özellikleri HAp'nin kristallik, kristalit boyutu, morfolojisi, parçacık boyutu dağılımı, yüzey alanı gibi özelliklerin yanında malzemenin yoğunluk değerine de doğrudan etkili olduğu sonucu elde edilmiştir. Sonuç olarak diş hekimliği uygulamaları için belirtilen $3,00 - 3,22 \text{ g/cm}^3$ yoğunluk değerlerini bu çalışma içerisinde üretilen HAp biyomalzemelerinin sağladığı görülmüştür.

3.2.5. Tane Boyutu Tayini

Üretilen katkısız HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numunelerinin tane boyutları Zetasizer (bkz. Bölüm 2.3.1.3) ve SEM cihazı (bkz. Bölüm 2.3.1.2) ölçüm programı kullanılarak belirlenmiştir. SEM cihazı kullanılarak yapılan tane boyut ölçümlerinde elde edilen görsel üzerinde 10 adet farklı tanenin tane boyutları ölçülmüştür. Ölçülen tane boyutları ve ortalama tane boyutu değerleri çizelge halinde listelenmiştir. Bununla beraber Zetasizer cihazı kullanarak üretilen malzemelerin tane boyutları incelenmiştir. Zetasizer cihazıyla yapılan ölçüm sonuçları her bir numune için ayrı ayrı aşağıdaki Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Hem SEM cihazı hem de Zetasizer cihazıyla yapılan tane boyut ölçüm sonuçları karşılaştırılmıştır. Tane boyut

dağılımları üzerindeki dikkate değer değişim malzemenin mekanik özelliklerini değiştireceğinden katkısız HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numuneleri kendi aralarında değerlendirilerek iyon katkılamanın ve farklı oranlı iyon katkılamanın etkileri bu bölüm içeriğinde tartışılmıştır.

SEM görüntülerinden tane boyut değerleri yaklaşık 100–500 nm aralığında olduğu sonucu elde edilmiştir (Çizelge 3.5). Elde edilen tane boyut değerleri hem kendi içinde hem de gruplar için değerlendirildiğinde dikkate değer bir tane boyut değişimi elde edilmemiştir. Dentin tübülleri üzerinde kaplama malzemesi ve hatta dentin tübül kanallarına akabilen bir malzeme üretme hedefi için ana kriter olan nano boyutta malzeme sentezleme hedefinin gerçekleştiği bu sonuçlarla doğrulanmıştır. Dentin tübüllerinin ağızlarının yaklaşık 1-2 µm civarında olması nedeniyle üretilen malzeme boyutlarının kanal içine rahatlıkla girebilecek boyutlarda olduğu sonucu elde edilmiştir.

Üretilen katkısız HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numunelerinin tane boyutları Zetasizer cihazıyla da ölçülmüştür. Zetasizer cihazında konulan madde miktarındaki bütün tanelerin tane boyut dağılımını belirlendiğinden genel tane boyut dağılımı için daha iyi bir fikir elde etmeyi sağlamaktadır. Ölçümler sonucunda elde edilen tane boyut dağılımları cihaz çıktısı şeklinde alınarak tez içeriğine aşağıdaki Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de görüldüğü gibi eklenmiştir. Cihaz çıktısı olarak verilen sonuç görselinde Polidispersite indeksi (PDI) olarak adlandırılan indeks, tek bir ortalamayı varsayarak genel dağılımın genişliğini göstermektedir. Yani ortalama bir tane boyut dağılımını göstermektedir. Bütün tane boyut dağılımını içerisinde bulundurduğundan etkili bir ölçüm tekniğidir.

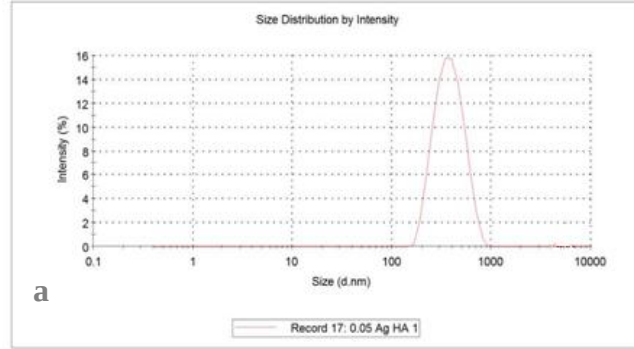
Çizelge 3.5 Tane boyut ölçümleri, SEM

Numune	Ölçüm (nm)										Ortalama (nm)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Katkısız HAp	226	313	322	210	185	233	230	153	228	183	228
% 0,05 Ag(I)-HAp	206	112	282	263	338	149	445	212	173	228	240
% 0,20 Ag(I)-HAp	239	196	113	322	241	303	400	369	253	120	256
% 0,40 Ag(I)-HAp	395	177	513	302	186	408	466	376	392	475	369

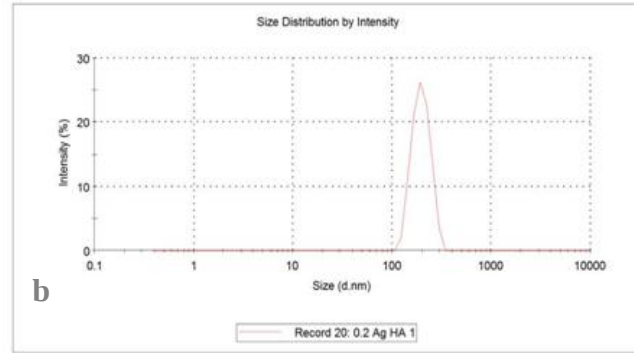


Şekil 3.10 Katkısız HAp Zetasizer Analiz Sonucu

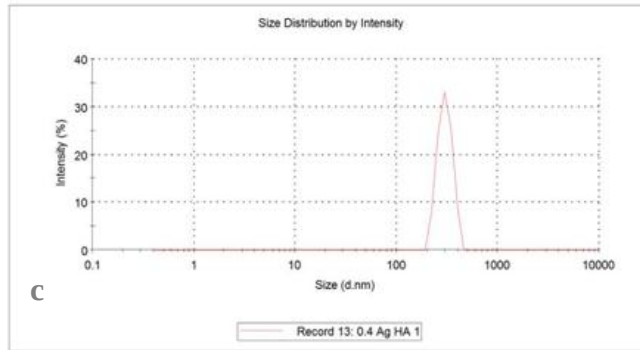
	Size (d.n...	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.n.m): 406,3	Peak 1: 390,7	100,0	128,2
Pdl: 0,268	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,963	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



	Size (d.n...	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.n.m): 239,1	Peak 1: 197,3	100,0	40,08
Pdl: 0,288	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,942	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



	Size (d.n...	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.n.m): 450,2	Peak 1: 300,8	100,0	47,95
Pdl: 0,479	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,982	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 3.11Ag(I)-HAp Zetasizer Sonuçları a) % 0,05 b) % 0,20 c) % 0,40 Ag(I)-HAp

Zetasizer sonuçlarında katkısız HAp için 228,5 nm, % 0,05 Ag(I)-HAp için 406,3 nm, % 0,20 Ag(I)-HAp için 239,1 nm ve % 0,40 Ag(I)-HAp için 450,2 nm ortalama tane boyut değerleri elde edilmiştir. Ca'dan eksiltme olarak uygulanan gümüş katkılanması Ca oranını azalttığından Ag(I) iyonu ilavesi ile tane boyutlarının küçülmesi beklenmektedir [11]. Bu haliyle katkı oranlarındaki artışa göre tane boyutlarının büyüdüğü sonucunu elde edilmiştir. Ancak buradan, artan katkı oranı tane boyut dağılımını artırır sonucuna ulaşamayacağı düşünülmüştür. Çünkü malzeme yoğunluklarının da bilinmesiyle böylesine bir sonuç ifade edilebilir. Yoğunluk artması malzemelerin aynı hacme daha fazla tane girmesi olduğundan normalde beklenen tane boyutların azalmasıdır. Burada Zetasizer' da gözlenen tane boyut değerindeki artış cihazda kullanılan ölçüm tekniğiyle de ilişkilendirilebilir. Analiz süresi boyunca HAp tozlarının topaklaşması analiz etkinliğini sorgulamamıza neden olmaktadır. Topaklaşmayla beraber cihaz daha yüksek bir tane boyutu değeri okuyacaktır. Ancak bu tez çalışması içeriğinde tercih edilen katkı oranları bu etkinin net olarak gözlemlenmesi için yeterli oranlar değildir. Bu etkinin net olarak gözlemlenmesi için daha yüksek farkta katkı oranları tercih edilmelidir.

İlk bakışta bu farklı değerler hem iyon katkılanmanın hem de iyon katkı oranlarındaki değişimin tane boyut dağılımı üzerinde etkisi var gibi yorumlansa da çalışma içeriğinde hedeflenen 1-2 μm 'lik dentin tübülleri için bütün değerler uygun olduğundan bu dağılım farkı önemli olarak değerlendirilmemiştir. Tane boyut dağılımı üzerinde malzeme yoğunlukları da etkilidir. Çünkü Zetasizer ölçümlerinde kullanılan ortam yoğunluğu her malzeme için aynıdır. Fakat her malzemenin kendi yoğunluğu aynı değildir. Bu nedenle bu tane boyut dağılımları malzeme yoğunlukları da dikkate alınarak değerlendirilmelidir.

Zetasizer ölçümleri esnasında hem katkısız HAp ve hem de farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp numunelerde gözlemlenen hızlı topaklaşma analiz için dikkate değer bir sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle Zetasizer ölçümlerinde HAp' den daha yoğun bir sıvı ortamı kullanıp, bu sıvı içinde en az 30 dakika sonike işlemi analizin verimliliği açısından önemli olarak değerlendirilmiştir.

Çöktürme yöntemiyle sentezlenmiş HAp ve Ag(I)-HAp'lerin sahip oldukları 100 – 500 nm değerleri aralığında tane boyut değerlerinin FDA [160] tarafından biyolojik

uygulamalarda kullanılacak CaP biyoseramik ürünleri için tanımlanan tane boyut dağılımlarını açık bir şekilde sağladığı görülmüştür.

Bu bölümde çöktürme metoduyla üretilen HAp ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag(I)-HAp tozlarının çöktürme işlem parametrelerinin elde edilen nihai HAp özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirdik. Sonuç olarak elde edilen nihai HAp tozlarının arzu edilen özelliklere ulaşmış olmasının çöktürme işlemi parametresine büyük ölçüde bağlı olduğu belirlenmiştir. Dişte dentin tübül hassasiyet giderme çalışmalarında dentin tübül tıkama amaçlı kullanımı hedeflenen HAp ve Ag(I)-HAp tozlarının faz safsızlığının ve bileşen gruplarının, yoğunluğunun, yüzey morfolojisinin ve tane boyutlarının, Ca/P oranının biyolojik uygulamalar için gerekli olan kriterleri sağladığı görülmüştür.

Diş dentin hassasiyetinin giderilmesi amacıyla dentin tübüllerinin tıkatılmasında kullanılacak HAp ve Ag(I)-HAp tozlarının biyouyumlu, biyo-bozunmaz ve toksik olmayan özellikler içermesi sağlık açısından önemlidir. Bu çalışma içerisinde antibakteriyel bir bölge oluşturma amacı, sentetik olarak üretilen HAp'lere katkılanan farklı katkı oranlarındaki gümüş iyonları ile sağlanmak istenmiştir. Bu işlem antimikrobiyal etki elde etmek için pozitif bir düşünce olsa da katkılanan Ag(I) iyonlarının kullanım yerinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkiler nedeniyle yapıdan salınarak toksik bir etki ortaya çıkarıp çıkarmadığının tespiti önemli bir konudur. Bu nedenle dentin tübüllerinde tıkama çalışmasının yapılmasından önce Ag(I) salım tayinin yapılması çalışma içeriğinde önemli bir deney parametresi olarak bildirilmiştir. Bundan sonraki bölümde HAp tozlarının sahip olduğu gümüş iyonlarının biyolojik etkiler sonucunda göstereceği salım profili belirlenmeye çalışılacaktır. Salım karakteristiğinden elde edilen sonuçlara göre dentin tübüllerinde tıkama çalışmasına geçilmiştir.

3.3. Ag(I) Katkılı Hidroksiapatit' ten Gümüş Salımının *In Vitro* Koşullarda İncelenmesi

% 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag(I)-HAp tozlarının salım karakterizasyonun belirlenmesi için eşlenik vücut sıvısı (SBF) içerisinde belirli zaman dilimlerinde (1/2-1-3-5-10-

20–30 gün) bekletilen örneklerin muamele sonundaki Ag(I) konsantrasyonu ICP-OES cihazı (bkz. Bölüm 2.3.1.4) ile belirlenmiştir. Aynı zamanda ICP-OES ile yapı içerisine katkılanan Ag(I) iyon yüzdelерinin yapıda tutunma değerlerini gösteren reaktif oranları belirlenmiştir. Bununla birlikte ağız ortamının taklit edilmeye çalışıldığı bir ortamda HAp ve Ag(I)-HAp biyomalzemelerin bozunup bozunmadığının kontrol edildiğı degradasyon çalışması (bkz. Bölüm 2.3.2.3) yapılmıştır. Olası bozulma sonucunda Ag(I)-HAp biyomalzemesinden Ag(I) salımı oluşup oluşmadığını belirlemek için degradasyona tabi tutulan katı örnekte ve degradasyon sırasında sitotoksosite tayini (bkz. Bölüm 2.3.2.2) çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre salım kinetiğı belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen Ag(I) iyon salım değerleri, degradasyon ve sitotoksosite sonuçları şekiller ve çizelgeler halinde bu bölüm içeriğinde sunulmuştur.

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formülüyle gösterilen hidroksiapatit kalsiyumlu fosforlu hidroksit iyonlarından oluşmaktadır [11]. Yapıya belirli bir amaç için katkılanan elementler HAp'nin formülünde değişikliğe sebep olmaktadır. Ag(I) katkılanması yapılan HAp biyomalzemesi için formül $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ şeklinde ifade edilmektedir [11, 21]. Burada yapılan katkılama, kalsiyumdan eksiltme ile formüle edilmektedir. Dişin genel yapısında var olan HAp ve kolajen yapısı genellikle bakterilerin dişin sert yapısını oluşturan diş minesi, dentin ve sement tabakasına hasar vermesi sebebiyle bozunmaktadır. Diş minesi ve dentin esas olarak HAp tuzlarından meydana geldiğinden bakteriyel ve asidik ortama maruz kalma hidroksiapatit tabakasının çözülmesine sebep olabilmektedir [21–24].

Çürüme, ortamdaki serbest H^+ iyonlarıyla başlar ve diş yapısındaki Ca'nın iyonlar halinde dişten ayrılmasına sebep olur [172]. Bu olay;



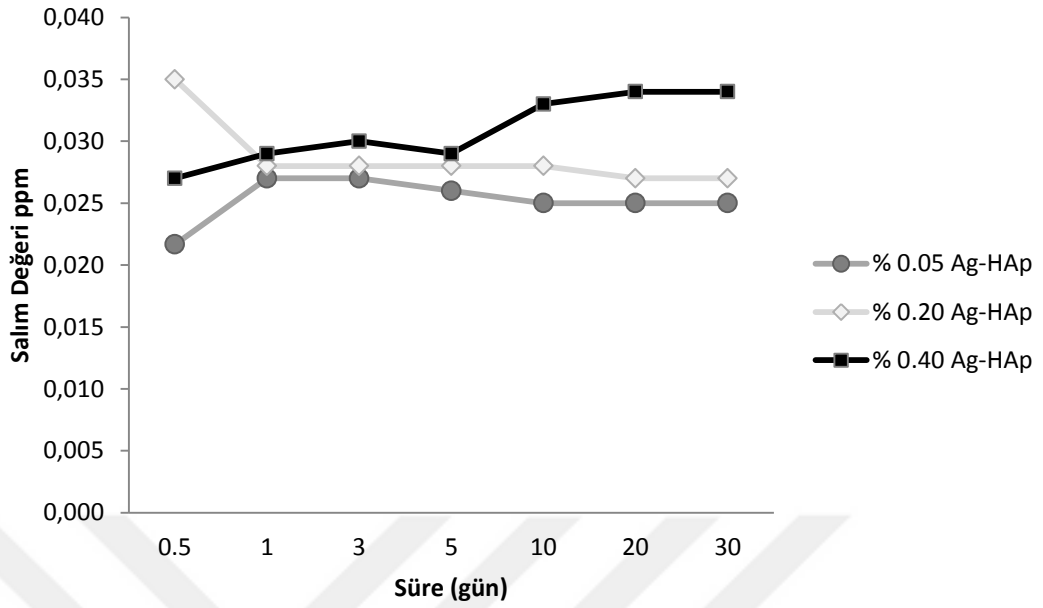
şeklinde reaksiyon ile ifade edilebilir [171]. HAp içyapısı itibariyle karmaşık bir yapıya sahip olmasından ötürü değişik iyonları katkılanmaya izin vermektedir [170, 171]. Gümüş katkılı materyaller kimyasal olarak dayanıklı olup, sahip olduğu gümüş iyonlarını ancak uzun bir zaman süreci sonrasında yüzeylerinden salmaktadırlar [143, 170]. Ag(I) iyonun katkılanması ile yapının bazik kuşağı yakınlığını artmaktadır. Ag(I) ilavesi HAp'de hem daha düşük pH'lerde bozunmamaya sebep

olur hem de PO_4^{3-} gruplarıyla yaptığı bağ ile yapının bozunmasını zorlaştırmaktadır. Gümüş katkılanan hidroksiapatit tozlarında, gümüş iyonunun HAp yapısına girmesi ile HAp kafes yapısında bir küçülme meydana geldiğini bildirilmiştir [167]. Bütün bu pozitif katkılara rağmen olası yapı bozunmasında serbest haldeki Ag(I) iyon varlığı toksik etkileri sebebiyle risklidir. Ag(I) varlığı sağlık açısından riskli olduğu bilindiğinden salım değerlerinin kontrol edilmesi önemlidir.

Bu amaçla % 0,05-% 0,20-% 0,40 Ag(I) iyonları katkılı Ag(I)-HAp tozlarından salım yapan gümüş miktarları ICP-OES cihazıyla belirlenmiştir. Salım zamana bağlı olarak belirlenmiş ve Şekil 3.12’de ve Çizelge 3.6’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ilk olarak artan katkı oranıyla beraber salım yapan Ag(I) iyonu miktarının da arttığı belirlenmiştir. Belirli gün kadar SBF içerisinde bekletildikten sonra alınan salım ölçümlerinde 0,020 ppm ile 0,035 ppm arasında Ag(I) salım değerleri elde edilmiştir. Her katkılama oranı incelendiğinde 30 günün sonunda en az salım değeri % 0,05 Ag(I)-HAp, en fazla salım değeri ise % 0,40 Ag(I)-HAp için elde edilmiştir. Her grupta 10.günden sonra salım değerlerinde değişim gözlenmemiştir. Salım değerleri belli bir noktadan sonra sabitlemiştir. Bu sabitleme durumu salımın bu noktadan sonra gerçekleşmediğini göstermektedir.

Genel olarak, vücutta olası salım yapacak iyonların başlangıçtaki ani salımı, olumsuz reaksiyonlara neden olabilir. Ag(I)-HAp tozları için yapılan salım çalışmasında ilk anda gözlenen yüksek salım; Ag(I)-HAp tozlarının üretimi esnasında Ag(I) iyonlarının bir kısmının kimyasal bağa katılmadan yüzeyde zayıf fiziksel bağ ile yapıya tutunanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle ilk günlerindeki salım değerleri dikkatle incelenmelidir. Yapılan salım testinde ilk kontrol günleri ile son kontrol günleri arasında dikkate değer bir fark gözlenmemiştir. Cerrahi uygulamalarda enfeksiyon sonucunda ortaya çıkan etkilerin gözlemlendiği süre 2 hafta olarak değerlendirildiğinde, bu sabitlenen nokta ve devamında tercih edilen gün değeri ile deney süresinin yeterli olduğu sonucu elde edilmiştir.

Eşlenik Vücut Sıvısı Gümüş Salımı



Şekil 3.12 Ag(I)-HAp gümüş salımı

Çizelge 3.6 Ag(I)-HAp gümüş salımı

Deney Ortamı	Numune Adı	Gün	0.5	1	3	5	10	20	30
SBF	% 0.05 Ag(I)-HAp	Salım miktarı, ppm	0,022	0,027	0,027	0,026	0,025	0,025	0,025
		Standart sapma	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001
	% 0.20 Ag(I)-HAp	Salım miktarı, ppm	0,035	0,028	0,028	0,028	0,028	0,027	0,027
		Standart sapma	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001
	% 0.40 Ag(I)-HAp	Salım miktarı, ppm	0,027	0,029	0,030	0,029	0,033	0,034	0,034
		Standart sapma	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001

Salım tayini için yapmış olduğumuz çalışma sonucunda; katkılama oranlarındaki artışa göre salım değerlerinde artış sonucu elde edilmiştir. Ancak burada önemli olan yapıya giren gümüşlerin ne kadarının yapıdan salındığıdır. Gözlenen 0,027 ile 0,035 ppm aralığındaki değerler yapıya tutunan Ag(I) oranlarının ne kadarına tekabül

etmektedir. Yapıya tutunan tüm gümüşler yapıdan salım yapıyor olabilir. Bu durumun açığa çıkarılması için nitrik asitle muamele edilen HAp ve Ag(I)-HAp örnekleri mikrodalgada yakılarak yapıya tutunan Ca, P ve Ag oranları belirlenmeye çalışılmıştır.

Aşağıdaki Çizelge 3.7’de görüleceği üzere Ca’ların % 69-71 oranıyla P’lerin % 89-92 oranlarıyla yapıya tutunduğu görülmüştür. Ag(I) katkılamlarda ise Ag reaktif oranları % 83-86 aralığında elde edilmiştir. Bu çalışmada tercih edilen katkı oranlarına göre artan katkıyla beraber Ag(I) iyonlarının yapıya daha iyi girdiği sonucu elde edilmiştir. % 83-86 arasında olan reaktif Ag(I) oranları teorik olarak beklenen değerden daha az Ag(I) iyonlarının yapıya katıldığını göstermektedir. Yapılan katkılama oranına göre elde edilecek beklenen maksimum salım değerlerine orantısal olarak bakıldığında, katkılama oranı arttıkça salım değerinin yüzdesel olarak azaldığı sonucu elde edilmiştir. %0,05 Ag(I)-HAp için elde edilen 0,027 ppm değeri teorik olarak beklenen maksimum 54 ppm salım değerinin % 0,060’ına tekabül etmektedir. Aynı şekilde %0,20 Ag(I)-HAp için elde edilen 0,035 ppm değeri teorik olarak beklenen maksimum 211 ppm salım değerinin % 0,020’sine, % 0,40 Ag(I)-HAp için elde edilen 0,034 ppm değeri teorik olarak beklenen maksimum 432 ppm salım değerinin % 0,009’una tekabül etmektedir. Burada önemli olan yapıya giren gümüşlerin ne kadarının yapıdan salındığının belirlenmesi olduğundan sonuç; bu çalışmada tercih edilen katkılama oranındaki artışla ters orantılı bir % salım değerinin elde edildiğidir.

Elde edilen sonuca göre yukarıda belirtilen oranlarla yapıya tutunan Ag(I) iyonlarının çok az bir kısmının yapıdan salındığıdır. Ca/P oranındaki değişimin de incelendiği bu çalışmada katkısız HAp üretiminde 1.66...7 oranı elde edilmiştir. Kalsiyumdan eksiltme olarak yapılan % 0,05, % 0,20 ve % 0,40 gümüş katkılamanın sonucunda azalan kalsiyum ile 1,33 – 1,67 aralığında Ca/P oranıyla tanımlanan kalsiyumu eksiltmiş HAp sonucu elde edilecektir. Kalsiyumdan eksiltme olarak yapılan gümüş katkılama da gümüş oranı kadar kalsiyum elementinin yüzdesi azaltılmaktadır. Gümüşün atom çapının daha küçük olmasından dolayı gümüş katkılayarak yapılan bu değişim, yapının daha sıkı paketlenmesine ve elektrostatik çekim kuvvetinin artmasıyla [29, 32] yapısal bozunmanın azalmasına sebep olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 3.7 Ag(I)-HAp reaktif oranları

Numune Adı	Ca (ppm)			P (ppm)			Ag (ppm)		
	Teorik değer	Deneysel değer	Reaktif yüzde %	Teorik değer	Deneysel değer	Reaktif yüzde %	Teorik değer	Deneysel değer	Reaktif yüzde %
HAp	3006	2148	71,46	1390	1289	92,73	-	-	-
% 0.40 Ag-HAp	2993	2098	70,10	1390	1263	90,86	432	370	85,65
% 0.20 Ag-HAp	3000	2077	69,23	1390	1241	89,28	211	179	84,83
% 0.05 Ag-HAp	3004	2080	69,24	1390	1249	89,86	54	45	83,33

Biyolojik uygulamalarda ortama salınan gümüş değerinin 10 ppm'den fazla olmaması gerekmektedir [173]. İşaret edilen bu değerden daha yüksek seviyelerde, gümüşün insan hücreleri için zehirli hale geldiği bilinmektedir [173]. Yapılan salım çalışması sonunda elde edilen sonuçların hepsi burada belirtilen değer in oldukça altındadır. Ortamda salım sonucunda var olan gümüş değerlerinin zehirleyici etki gösterecek noktalarda olmadığı sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlarla gümüşün cerrahi operasyonlarda gerçekleşebilecek olası bakteriyel enfeksiyonlara karşı azaltıcı bir etki doğuracağı da açıktır. Gümüş varlığının antibakteriyel etkisi bilindiğinden salım grafiğine bakıldığı zaman ilk günlerde gözlenen yüksek salım değerinin olumlu olduğunu düşünülmektedir. İlk günlerden sonra salımın sabitlemeside toksik etkinin artmayacağını göstermektedir. Ag(I) iyonlarının ilk günlerdeki salım değerlerinin son günlerdeki salım değerleriyle dikkate değer bir farkının olmaması sabitleyen bir salımı ve sabit kalan bir HAp yapısını göstermektedir. Böylece bu bozunmadan kalan halin kemik oluşum sürecinde önemli bir adım olan yeniden mineralleşme sürecine de katkı sağlayacağı şeklinde yorumlanmıştır.

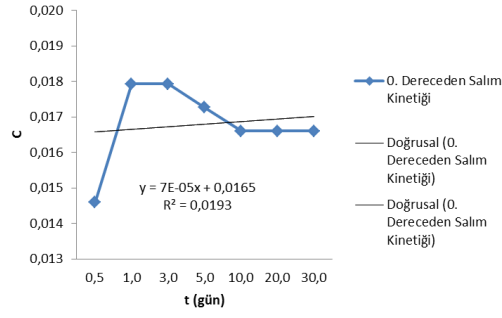
Gümüş içeren HAp biyomalzemelerin vücut içerisinde kullanılmasında maruz kalacağı en önemli çözelti SBF olduğundan, SBF solüsyonundan H_3O^+ iyonu ile Ca^{+2} iyonu serbest olabilmektedir [37]. Buda SBF çözeltisinde Ca iyon aktivitesinin artışa sebep olabilmektedir [39, 40]. Bu bilgiler ışığında Ca salım değerlerinin de kontrol

edilmesi önemlidir. Salım yapan eser elementlerin yapıdan salımının kontrol edildiği çalışmalarda katkılanan eser elementin genel özellikleri ve kullanılan ortamın özellikleri yani çevresel parametreler de dikkatlice incelenmelidir. Aynı şekilde salım değerlerinin antibakteriyel etkinliğini görmek için belirli bakterilere karşı etkileri de incelenebilir. HAp'nin kullanım yerinde vücut fonksiyonlarını normal seviyelerde tutacak özellikte olmasının ana göstergesi; içerisindeki Ca, P, Ag gibi iyonları vücut içerisine salıp salmadığıdır. Bu çalışmada yapılan Ag(I) salımının yanı sıra Ca iyonları da yapı içerisine salınabilir. Ancak, sadece fazla miktarda Ag(I) salımı toksik etkiye sebep olabileceği için bu çalışmada Ag(I) salımı değerlendirmesi yapılmıştır.

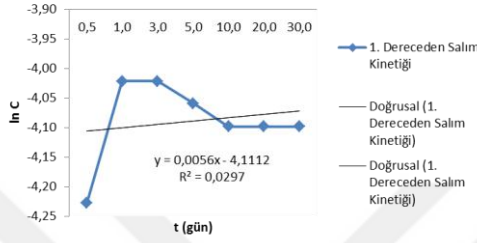
HAp'nin diş tedavilerinde kullanıldığı çalışmalarda, bazı tümör türleri üzerinde gelişim önleyici etkilere sahip olduğundan yalnızca iyon katkılı HAp içeren kompozit malzemeler ya da sadece HAp kontrollü ilaç salımı uygulamalarında ilaç taşıyıcı ortam olarak tercih edilebilmektedirler [174]. İyon katkılı HAp ile antibakteriyel bir ajan elde etme düşüncesi ve tedavinin ilk 10 günlük süresinde oluşabilecek enfeksiyonları ilk anda önlemek düşüncesi Ag(I) iyonları içeren HAp'ler için bir kontrollü salım kinetiğinin gerekliliğini göstermektedir. İlk 10 günlük sürede gerçekleşecek ve sonrasında sabit bir salım değerinin belirlenmesine ve zamana bağlı olarak açığa çıkan Ag(I) iyonu madde miktarının belirlenmesine ilaveten elde edilen salım sonuçlarının salım kinetiği de belirlenmiştir. Tıbbi amaçlı kullanılan bu ürünün sahip olduğu Ag(I) iyonlarını belli bir kinetikle salması tedavide istenmeyen durumların ortaya çıkmasını engelleyebilir. Salım kinetiğinin belirlenmesiyle katkı oranındaki artışa göre yapının salıma karşı dirençlenip dirençlenmediğini de gösterilebilecektir.

Katkı oranındaki artışa göre azalan şeklinde ifade edilen salım değeriyle, elde edilecek salım kinetiği karşılaştırılmış ve en uygun katkı oranı bu çalışma içerisindeki gruplar arasından belirlenmiştir. Çalışma içeriğinde kullanılan Ag(I)-HAp'lerin salım kinetiğinin 0., 1., 2. dereceden olup olmadığını belirlemek için Demir, Y. K. ve arkadaşları tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır [175]. Belirlenen salım kinetik sonuçları % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag(I)-HAp için sırasıyla aşağıdaki Şekil 3.13, 3.14, 3.15'de gösterilmiştir.

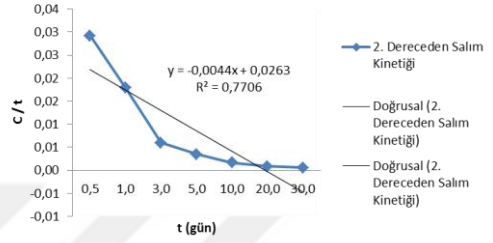
0. Dereceden Salım Kinetiği



1. Dereceden Salım Kinetiği

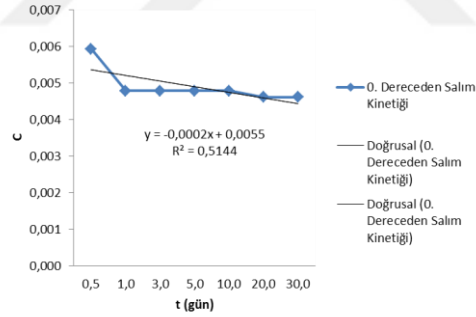


2. Dereceden Salım Kinetiği

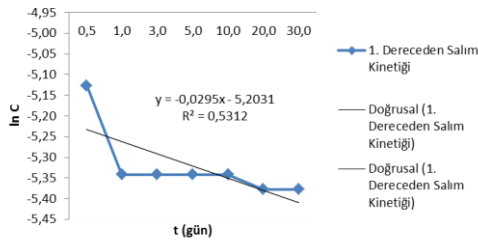


Şekil 3.13 % 0,05 Ag(I)-HAp salım kinetiği

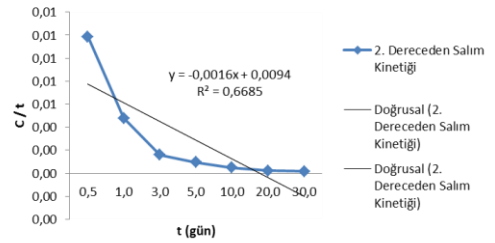
0. Dereceden Salım Kinetiği



1. Dereceden Salım Kinetiği

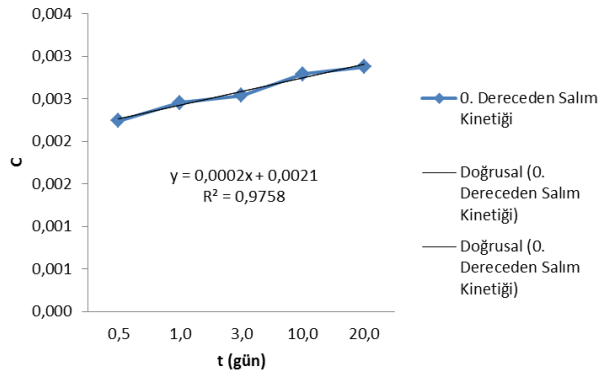


2. Dereceden Salım Kinetiği

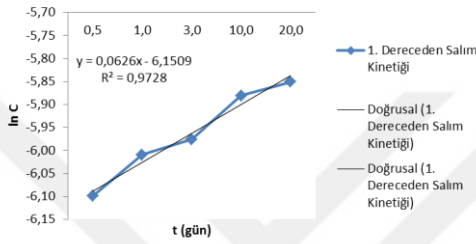


Şekil 3.14 % 0,20 Ag(I)-HAp salım kinetiği

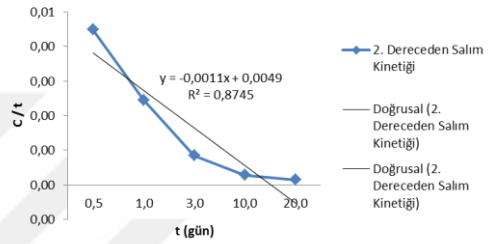
0. Dereceden Salım Kinetiği



1. Dereceden Salım Kinetiği



2. Dereceden Salım Kinetiği



Şekil 3.15 % 0,40 Ag(I)-HAp salım kinetiği

% 0,05 Ag(I)-HAp tozu için yapılan salım kinetiği çalışmasında R^2 değerlerine göre 2. Dereceden bir salım kinetiğine sahip olduğu belirlenmiştir. % 0,20 Ag(I)-HAp tozu için yapılan salım kinetiği çalışmasında da R^2 değerlerine göre 2. Dereceden bir salım kinetiğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte % 0,40 Ag(I)-HAp tozu için yapılan salım kinetiği çalışmasında R^2 değerlerine göre 0. Dereceden bir salım kinetiğine sahip olduğu belirlenmiştir. Artan katkı oranlarına göre salım kinetik değerlerinde bir değişim gözlenmiştir. Sıfırıncı dereceden reaksiyonlar herhangi bir reaktan konsantrasyonundan bağımsız ilerleyen reaksiyonlardır. 1. Dereceden reaksiyonlar ise bir reaktanın konsantrasyonuna doğrudan bağlı olarak ilerleyen bir reaksiyondur. 2 dereceden reaksiyon ise reaktan konsantrasyonuna üstel olarak bağlıdır [175]. Bu tanım doğrultusunda % 0,05 ve % 0,20 gibi düşük katkı oranlarında katı maddenin sıvı içinde çözündüğü ve iyonların serbest bırakıldığı anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre % 0,05 Ag(I)-HAp, % 0,20 Ag(I)-HAp'den daha fazla çözünürdür. % 0,20 Ag(I)-HAp'de % 0,40 Ag(I)-HAp'den daha fazla çözünürdür sonucu elde edilmiştir. Bu kinetik değerleriyle beraber artan katkı

oraniyla katı yapı içinde yüzeye doğru kütle transferinin ve difüzyonun azaldığı düşünülmektedir. Öte yandan, salım kinetiğinin artan derecesiyle beraber çözülme mekanizmasının daha fazla iyon salınmasına neden olması beklenmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan Ag(I) iyon salım çalışmasında da artan katkı oranıyla beraber azalan bir salım değeri elde edilmesi, salım kinetiğinin 0. Dereceye dönmesiyle uyumludur.

Güçlü asit güçlü bazı, zayıf asit zayıf bazı sever şeklinde tarif edilen teoremle [176], Ca gibi güçlü asitin yerine Ag gibi zayıf bir asit katınca çelişki ortaya çıkmaktadır. Buda Ag(I) iyonlarının yapıya bağlanmasının zayıf olmasını ve salım yapmasını gerektirmektedir. Bu nedenle Ag salım tayini yapmak gereklidir. Ancak Ca'nın bağlanma enerjisi, Ag'nin bağlanma enerjisinden daha düşüktür. Yani Ag'nin bağlanma enerjisi büyük olduğu için yapıdan koparmak için daha fazla enerji gerekmektedir. Buda Ca'dan daha az salım yapacağı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

HAp 3 düzleme 6 gen simetride atomların dizilmesiyle oluşmaktadır. Her bir atom 3'lü atom gruplarının arasında kalan çukura konumlanmaktadır [70]. Hegzagonal yapı aynı hacme sahip atomlarla % 74 atomik paketleme faktörü oranına sahiptir. HAp yapısı içerisinde var olan Ca yerine Ag eklenmesi bu atomik paketlenme faktörü oranına etki edecektir [70]. Daha büyük hacimli Ca'ların eksiltilmesiyle oluşan boşluklara daha küçük hacimli Ag'ler yerleşmektedir. Atom çapı daha küçük olduğu için istiflenmeye katkı sağlayacaktır. Ancak katkı oranındaki artış istiflenmede yığılmalara sebep olacaktır. Buda yapıyla bağ oluşturamayan bir grup oluşturabileceği için salım yapma ihtimalini arttırmaktadır. Bu nedenle Ag(I) iyon katkılanması için maksimum sınırı olan bir katkı oranını gerekli kılmaktadır. % 0,40 maksimum katkı oranıyla elde edilen ppb seviyesinde salım bize katkı oranının arttırılabileceğini göstermektedir. Ancak katkı oranındaki artışla beraber gerçekleşebilecek salım değerindeki artış risk oluşturduğundan çalışmamız için bu oranın yeterli bir oran olduğunu sonucuna varılmıştır.

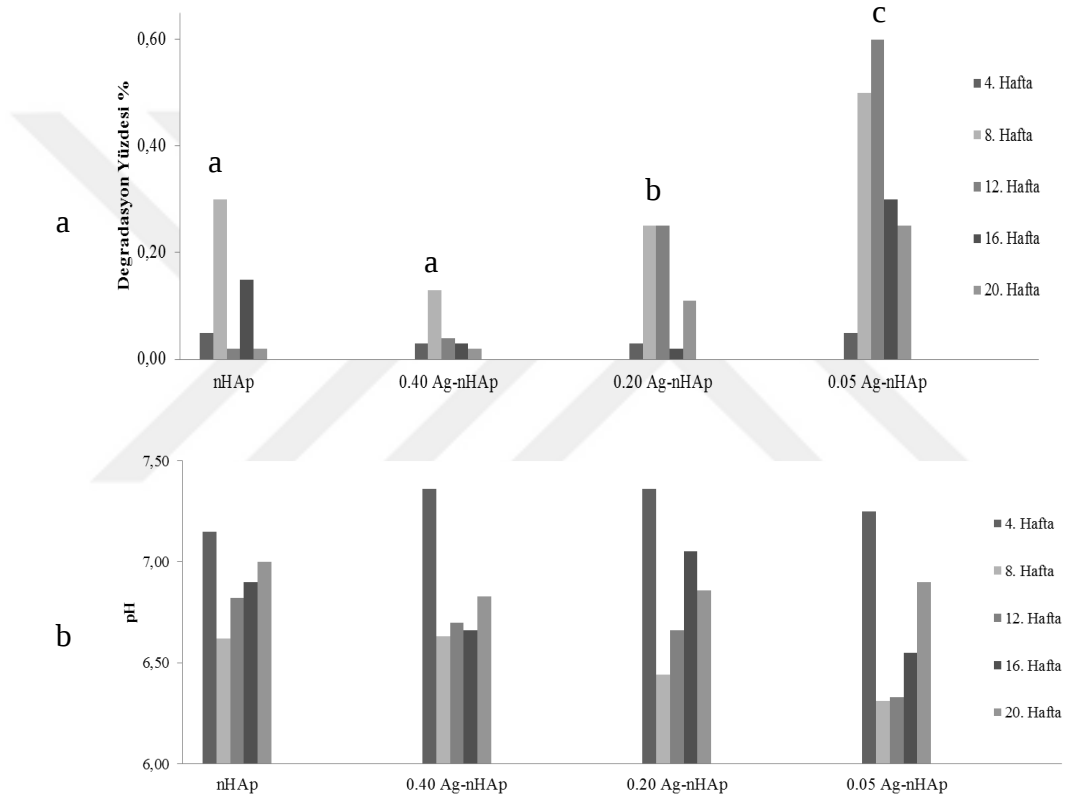
HAp içerisine farklı yöntemlerle katkılanabilecek farklı iyonların kemik oluşumu, antimikrobiyal fayda, mukavemet kazandırma gibi hem biyolojik hem de fiziksel olarak faydaları olabilir. Ancak yapılan katkılamanın sonucunda ortaya çıkan yeni molekül yapısının atomik ölçekte ne etkiler ortaya çıkardığı hakkında çok az şey bilinmektedir [177]. Bununla birlikte HAp yapısı içerisinde var olan iyonların

uygulama yerinde farklı iyonlarla yer deşiştirmesi HAp kristallerinin çözünlürlüğünü, termal kararlılığını ve mekanik özelliklerini değiştirebileceğinden salım çalışmasında vücut ortamının taklit edilmesi önemlidir. Bu yolla, vücut ortamında gerçekteşebilecek iyon değişimleri sonucu ortaya çıkabilecek olası yapı bozunmaları da belirlenebilmiş olacaktır.

Bu tez çalışmasında HAp'nin iyonik katkılarları için yapısal olarak bir kapasitesinin olduğunu göstermiştir. Bu nedenle yapılacak iyon katkılarları için bir sınır değer olduğu ve bu sınır değer aşıldığında yapısal bozunmaların kolaylaşabileceği açıktır. HAp yapısı içerisine yapılacak iyon katkılarının uzun vadede göstereceği tepkiler ve bu tepkiler sonucunda ortaya çıkacak olası zararlı etkiler dikkatle incelenmelidir. Yapılan bu çalışmada seçilen düşük oranlar sebebiyle yapısal bir bozunma beklenmemektedir. Ancak kullanım yerinde gerçekteşebilecek olası iyon/anyon değişimleri gibi olaylardan ortaya çıkabilecek etkileri gözlemlemek için insan vücut sıvısı kullanılarak belirli bir süreye kadar degradasyona tabi tutarak hem HAp'nin hem de Ag(I)-HAp'nin yapısının bozunup bozunmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla çöktürme metoduyla üretilen % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag(I) katkılı Ag(I)-HAp ve katkısız HAp numunelerinin degradasyonuna çalışılmıştır.

Degradasyon işleminin biyomalzemenin, kullanım yerlerindeki ortamları taklit ederek bozunma ürünü ortaya çıkarıp çıkarmadığına karar vermek için iyi bir yöntemdir. Kimyasal reaksiyon sonucunda malzeme yapısındaki değişimi esas alan degradasyon çalışması ortam sıcaklığı ve atmosferi ile muamele süresi gibi işlem parametrelerine bağlıdır. Bu nedenle yapılan işlem oda sıcaklığında, her bir örnek için aynı gün süreyle ve 1 atmosfer basıncında gerçekteştirilmiştir. Degradasyon çalışması sonucunda gerçekteşecek olası bozunmada en etkili bozunma ürünü serbest halde degradasyon sıvısı içerisinde var olabilecek olan gümüştür. Bu nedenle çalışma aşamalarında degradasyondan önce ve sonra sitotoksikite ve pH çalışması yapılmış ve değişim gözlenmiştir. Degradasyon işleminin hücre canlılığı üzerindeki etkisini gözlemlemek üzere yapılan sitotoksikite testi EN ISO 10993-5 standardı [161] dikkate alınarak yapılmıştır. Degradasyon işleminde kullanılan sıvı vücut eşlenik sıvısıdır ve toksik değildir. Degradasyon işleminde gerçekteşecek olası bozunma ya da salım, degradasyon sıvısında yer alacağı için degradasyon sıvısının da degradasyon öncesi ve sonrası toksikliğine bakılmıştır.

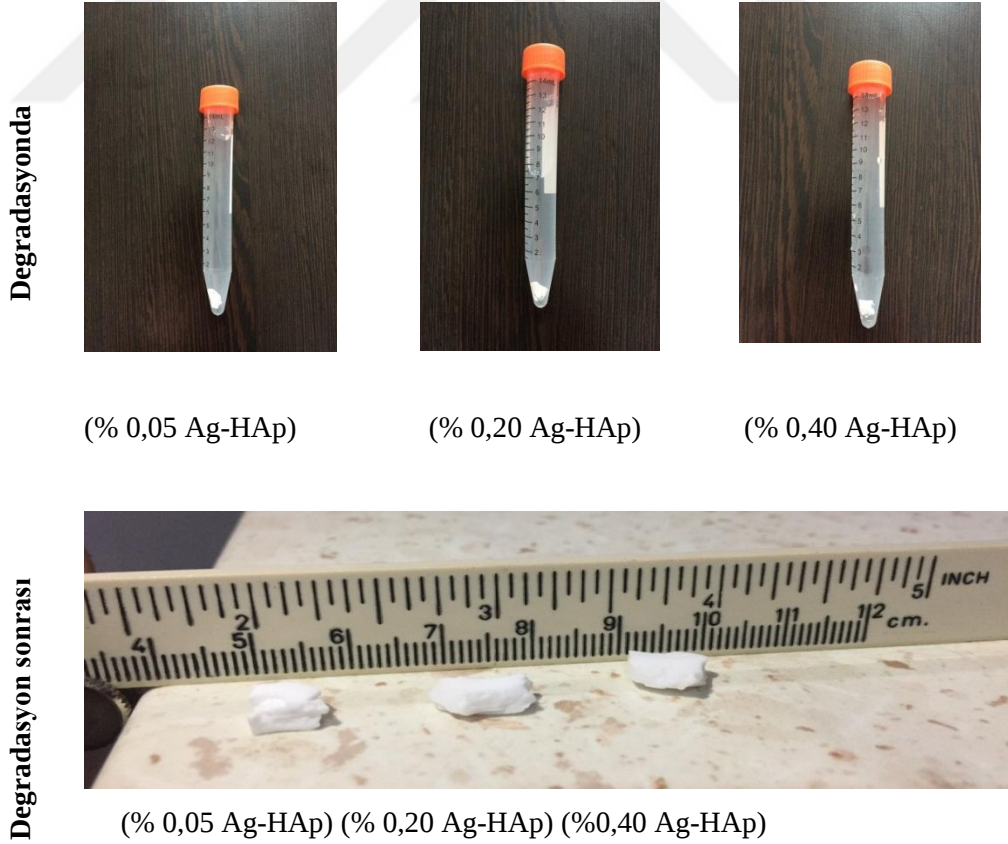
Aşağıdaki Şekil 3.16, 4 ila 20 hafta süresince HAp ve farklı oranlarda Ag(I) iyonları içeren HAp'nin *in vitro* ortamda bekletildiğinde degradasyon yüzdeleri (Şekil 3.16 a) ve pH değişimlerini (Şekil 3.16 b) göstermektedir. Degradasyon analizinde uygulanan hızlandırılmış deney şartları nedeniyle beklenen 20 haftalık süre yaklaşık 50 aylık bir süreye tekabül etmektedir. Şekil 3.16 b'ye bakıldığında, tüm ölçümlerde pH'ın 6,55 – 7,40 pH aralığında olduğu gözlenmiş ve bu değer canlı ağız ortamı için uygun olduğu sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.16 a) Degradasyon ve b) pH çalışması, küçük harfler k=2 % 95 güven aralığında anlamlı farkı göstermektedir.

Degradasyon sonuçlarına bakıldığında ise salım davranışını destekler şekilde artan gümüş katkısı ile azalan bir degradasyon yüzdesi elde edilmiştir. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, çöktürme yöntemi ile üretilen HAp ve farklı Ag(I) katkı oranlı Ag(I)-HAp partiküllerinin degradasyona uğramadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte degradasyon analizi sonucunda alınan verilerin anlamlı bir farka sahip olup

olmadığını belirlemek adına yapılan F ve t test çalışması sonuçlarına göre HAp ve %0,40 Ag(I)-HAp verileri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte %0,05 ve %0,20 Ag(I)-HAp grupları için elde edilen değerler hem kendi aralarında hem de HAp ve %0,40 Ag(I)-HAp için elde edilen değerlerle anlamlı bir farka sahip olduğu bulunmuştur. %0,40 Ag(I)-HAp için elde edilen degradasyon sonucu bu katkı oranında gümüş salımında elde edilen sonuçla eşdeğerdir. Diğer taraftan degradasyon çalışması ile elde edilen sonuçlar kütle denkliğinin sağlandığını ve molekül kütlelerinin/dağılımının değişmediğini göstermektedir. Malzeme kütlelerinde değişimin olmamasının yanında malzemenin bir bütün halinden çıkarak parçalara ayrılmaması da önemlidir. Yapı içerisindeki safsızlıkların ortadan kalktığı bu durumda malzeme yapısı değişmemiş olarak kabul edilmektedir. Yapılan degradasyon analizi sonrasında malzeme yapılarının fiziksel olarak herhangi bir değişime uğramadığı gözlenmiştir (Şekil 3.17). Buda üretilen örneklerin biyolojik uygunluğa sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.17 Degradasyon sırasında ve sonrasında Ag(I)-HAp' ler

Gümüş iyonlarının uygulama ortamına salınmasıyla o alanın mükemmel anti-bakteriyel özellik gösterdiği bilinmektedir [9, 11, 18–20]. Antibakteriyel etki göstermesi tek başına yeterli değildir. Aynı zamanda salım yaptığı ortamda toksik etki meydana getirmemesi gerekmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında degradasyon sonunda Ag(I)-HAp biyomalzemelerin Ag(I) salımı oluşup oluşmadığına degradasyona tabi tutulan katı örneklerin ve degradasyon sıvılarının toksikliğine bakarak da karar verilmeye çalışılmıştır. Degradasyon sıvısı içerisinde bekletilen örnek degradasyon işleminden sonra sıvı içerisinden çıkartılmıştır. Hem numunelerin hem de degradasyon sıvılarının ayrı ayrı hücre canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen sitotoksikite sonuçları degradasyon sonundaki katı örnekleri için Çizelge 3.8’de gösterilmiştir. Bu çizelgeden elde edilen grafik Şekil 3.18’de gösterilmiştir. Degradasyon sonrası sıvıları için elde edilen hücre canlılık yüzde değerleri Çizelge 3.9’da ve bu çizelgeye göre elde edilen grafik Şekil 3.19’da verilmiştir.

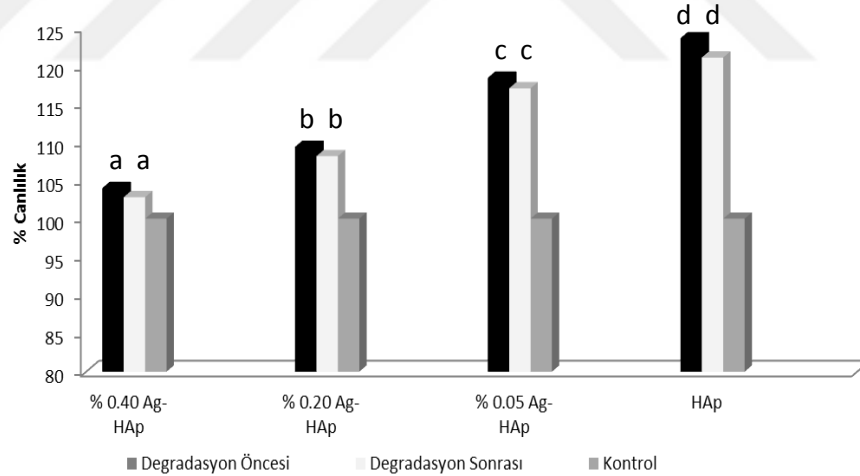
Çizelge 3.8 Degradasyon öncesi ve sonrası hücre canlılıkları

% Canlılık									
Numune Adı	Degradasyon Öncesi				Degradasyon Sonrası				Kontrol
	Ortalama	% Canlılık	Standart Sapma	k = 2 0.95 % Güven Seviyesi	Ortalama	% Canlılık	Standart Sapma	k = 2 0.95 % Güven Seviyesi	% Canlılık
% 0.40 Ag(I)-HAp	0,87366667	104,007937	2,78445909	5,56891817	0,86366667	102,81746	2,41366418	4,82732835	100,00
% 0.20 Ag(I)-HAp	0,91886667	109,388889	2,68326749	5,36653498	0,90866667	108,174603	2,79563422	5,59126843	100,00
% 0.05 Ag(I)-HAp	0,99466667	118,412698	2,07521092	4,15042185	0,98316667	117,043651	3,03925253	6,07850506	100,00
HAp	1,03816667	123,59127	3,23793475	6,47586951	1,017	121,071429	3,93325839	7,86651677	100,00

Çizelge 3.8 degradasyon öncesinde ve sonrasında katı örneğin hücre canlılığındaki değişimi göstermektedir. Hücre canlılık değerleri incelendiğinde artan gümüş katkısının hücre canlılığını düşürdüğü sonucunu elde edilmiştir. EN ISO 10993-5 standardında toksik değer sınırı % 70’in altı olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmada her numune için alınan hücre canlılık yüzde değerlerinin % 70’in üzerinde olması nedeniyle bu örneklerin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda

degradasyon öncesi ve sonrası için elde edilen sonuçlar üzerinde yapılan F ve t test çalışmasında, elde edilen sonuçların kendi aralarında anlamlı bir farka sahip olmadıkları görülmüştür. Bu değerlendirme örneklerin hücre canlılıklarında değişimin olmadığını göstermektedir. Ancak artan gümüş katkı yüzdesiyle hücre canlılığındaki azalma katkılama oranının belirli bir yere kadar geçerli olabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışma için tercih edilen katkı oranları toksik etkiye neden olmamıştır.

HAp biyomalzemeden gümüş salımı gerçekleşirse, gümüş salımı degradasyon sıvısında da hücre çoğalmasını azaltacaktır. Çizelge 3.9 incelendiğinde degradasyon sıvısı için yapılan hücre canlılık sonuçlarının her numune için arttığını göstermektedir. Bu artış % 0,40 Ag(I)-HAp için en yüksek olmuştur. Bu artış % 0,40 Ag(I) katkılı HAp örnekte gözlenen az salım sonucundan ortaya çıkmıştır. Degradasyon sıvısında hücre canlılık değerindeki artış üretilen biyomalzemelerin ortam toksisitesine pozitif katkısını göstermektedir.



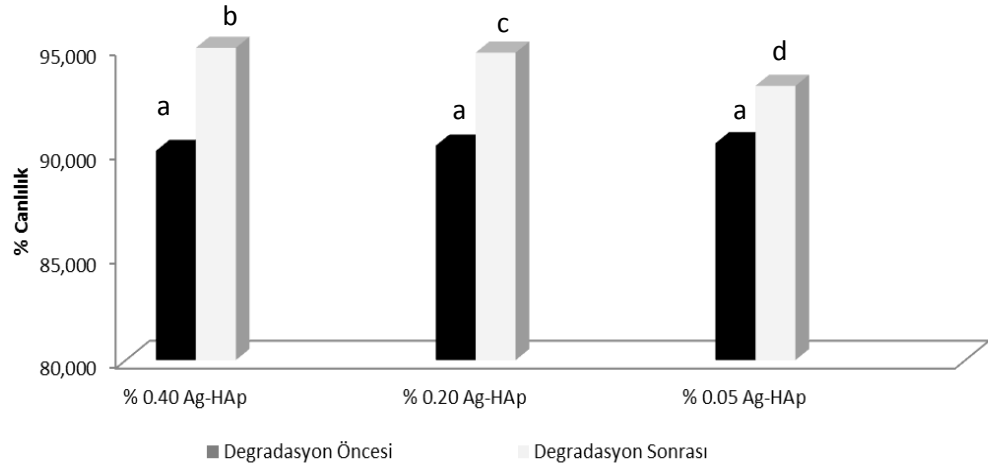
Şekil 3.18 Degradasyon öncesi ve sonrası hücre canlılıkları, küçük harfler k=2 % 95 güven aralığında anlamlı farkı göstermektedir.

Hidrofilik yüzeye sahip biyomalzemelerin hücre yapışması ve hücre çoğalması için faydalı malzemeler olduğunu bilinmektedir [177–179]. Eğer katkılama yapılan iyon,

hücre çoğalmasını azaltıcı etki oluşturmuşsa hücre canlılık değerinin düşmesi beklenir. Yapılan bu çalışmada tercih edilen bütün katkı oranlarında hücre çoğalması % 70 hücre canlılık değerinin üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlarla tercih edilen gümüş katkı oranlarının toksik etkiye sebep olmadığı ve iyi bir sito-uyumluluğa sahip olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 3.9 Degradasyon öncesi ve sonrası degradasyon sıvısı hücre canlılıkları

Degradasyon Öncesi ve Sonrası 1:16 Dilütasyon için Sıvı % Canlılık								
Numune Adı	Degradasyon Öncesi				Degradasyon Sonrası			
	Ortalama	% Canlılık	Standart Sapma	k = 2 0.95 % Güven Seviyesi	Ortalama	% Canlılık	Standart Sapma	k = 2 0.95 % Güven Seviyesi
% 0.40 Ag-HAp	0,399	90,050	3,360	6,720	0,387	96,903	3,876	7,752
% 0.20 Ag-HAp	0,395	90,300	5,360	10,720	0,371	94,767	6,440	12,880
% 0.05 Ag-HAp	0,388	90,420	4,300	8,600	0,375	93,174	3,951	7,903



Şekil 3.19 Degradasyon öncesi ve sonrası degradasyon sıvısı hücre canlılıkları, küçük harfler k=2 % 95 güven aralığında anlamlı farkı göstermektedir.

Artan katkı oranıyla beraber degradasyon yüzdelerinin ve gümüş salımının yüzdesel olarak azalması, degradasyon öncesi ve sonrası katı örnekler ile deney öncesi ve sonrası degradasyon sıvılarının hücre canlılık değerinin değişmemesi; seçilen katkılama oranlarında Ag(I)-HAp'nin toksik olmayan, yüzey tutunması ve bağ kuvvetleri yüksek olan bir biyomalzeme olduğunu göstermiştir. HAp'nin hegzagonal sıkı yapı paketlenme şeklinden de anlaşılacağı gibi Ag(I) iyonlarının sıkı bir elektrostatik etkileşime maruz kalarak hem HAp'nin yapısının bozulmamasına hem de Ag(I) iyonlarının yapıdan salınmamasına katkı sağladığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre Ag(I)-HAp ürünlerin kimyasal olarak dayanıklı olup, sahip olduğu gümüş iyonlarını uzun bir zaman süreci sonrasında yüzeylerinden ancak salabilecekleri anlaşılmıştır. Üretim aşamasında reaksiyona girmemiş, zayıf bir bağ ile bağlanmış ya da fiziksel olarak yüzeye yapışmış, üretim parametreleri arasında ki süzme işlemiyle de uzaklaştırılamamış metalik grupların varlığı XRD sonuçlarında gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre metalik halde gümüş bulunması gümüşün salım sonucuna etki edecek ilk öge olabileceğini düşünmemize sebep olmuştur. ICP-OES çalışmamızda uygulanan metoda göre elde edilen maksimum salım değerinin sadece yapının bütünü bozunması sonucunda elde edilecek Ag(I) varlığından değil aynı zamanda metalik halde bulunan Ag'ninde katkısı olduğunu göstermektedir. Metalik halde bulunan gümüş varlığı ne kadar az olursa salım sonucunda elde edilecek değerde buna göre azalacaktır.

Degradasyon çalışmasında elde edilen sonuca göre hem HAp hem de Ag(I)-HAp tozlarının bozunmadığı sonucu elde edilmiştir. Degradasyon çalışmasında degradasyon öncesi ve sonrasında tozların hücre canlılığı kontrol edildiğinde hücre canlılık sonuçlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak degradasyon sıvısında yapılan hücre canlılığı çalışmasında katkı oranının etkinliğini görmemize yardımcı olacak bir sonuç elde edilmiştir. Degradasyon sıvısının degradasyon öncesi yapılan hücre canlılığı çalışmasında % 90 civarı hücre canlılığı elde edilmişken, degradasyon sonrası sıvılarda yapılan hücre canlılığı çalışmasında ise artan katkı oranıyla beraber artan bir hücre canlılığı gözlenmiştir. Degrade olmayan bir ürünün degradasyon sıvısında hücre canlılığını değiştirecek etki Ag(I)-HAp tozlarında yapıya tutunamayan ve metalik halde bulunan gümüş varlığı olarak düşünülmüştür. Degradasyon sıvısı ile ilk temas sonucunda HAp tozlarına fiziksel olarak yapışmış

gümüşler kopmaya başlayacaktır. Bunun sonucunda da hücre canlılığı değerleri değişecektir. Ag(I) katkılamayla beraber reaktan Ag(I) değeri belirlemek amacıyla yapılan ICP-OES çalışmasında %0,05 Ag(I)-HAp için %83,33 olan reaktan oranı %0,20 Ag(I)-HAp için %84,83 ve %0,40 Ag(I)-HAp için %85,65 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçta artan katkı oranıyla beraber yapıya güçlü kimyasal bağ ile bağlanan gümüş varlığının arttığını ve fiziksel yapışmaların azaldığını ve sonuç olarak da degradasyon sıvısının hücre canlılığının arttığı sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlar HAp tozları içine Ca'dan eksiltme olarak katılacak Ag(I) varlığı için bir minimum değer yorumu yapmamıza yardımcı olabilir. Yapılan bu çalışma da artan katkı oranıyla beraber yapıya giren reaktan oranının artması, salımın azalması ve degradasyon sıvısı hücre canlılığının artması çalışma içeriğinde kullanılan oranlardan % 0,40 Ag(I) katkı oranının biyolojik uygulamalar için daha etkin sonuçlar vereceği sonucu elde edilmiştir.

Özet olarak, çöktürme metoduyla üretimi yapılan HAp ve %0,05, %0,20, %0,40 Ag(I) katkılanmış Ag(I)-HAp tozlarının diş hassasiyeti tedavilerinde sıklıkla kullanılan ticari ürünler yerine dentin tübüllerini tıkama ve yeniden mineral kazandırma amaçlı kullanımı bu çalışma da hedeflenmiştir. Üretilen örneklerin diş tedavilerinde kullanılacak olması nedeniyle fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin ABD Gıda ve İlaç İdaresi [160] tarafından belirtilen kriterleri karşılayıp karşılamadığı test edilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre HAp ve farklı katkı oranlı Ag(I)-HAp tozlarından biyolojik etkinliği en fazla olan % 0,40 Ag(I) iyon katkılı Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin dentin tübüllerinin kaplanması amacıyla kullanılmasına karar verilmiştir.

3.4. Hidroksiapatit ve % 0,40 Ag(I) Katkılı Hidroksiapatit ile *In Vitro* Dentin Tübülü Tıkama Çalışması

Diş hekimlerinin sıklıkla karşılaştıkları dentin hassasiyeti, dentin tübüllerinin açılması sonucunda kişilerin soğuk, sıcak veya dokunsal gibi uyarıcılardan kaynaklanan ağrı şikayetleridir (bkz. Bölüm 1.1.1.3). Dentin tübüllerinin kanallarının uçlarında yer alan sinirlerin bu uyarıcılarla aktivasyonu sonucunda hassasiyetler oluşmaktadır. Bu hassasiyetler açılan dentin tübül yüzey alanı ve kanal içeriğindeki

kirlenme ile orantılı olarak artmaktadır. Aşırı dentin duyarlılığın tedavisinde potasyum iyonları içeren kimyasal ajanların uygulanmasıyla sinirleri hassaslaştırma ve dentin tübüllerini tıkayarak geçirgenliğini azaltıp sıvı akışını azaltma uygulamaları vardır. Bu uygulamalarda açığa çıkan dentinal tübüllerin fonksiyonel yarıçaplarını önemli ölçüde bloke edebilen veya kısmen azaltabilen ürünler HAp kullanılmaktadır. HAp dentin tübülleri içindeki sıvı akışını azaltabilen biyoaktif potansiyeli olan materyaller arasında mineralizasyon sürecine katkı sağlayan, biyouyumlu ve dental yapının ana öğelerinden birisi olması nedeniyle uygulamalarda tercih edilmektedir.

Dentin tübül tıkama amaçlı yapılan bilimsel çalışmalarda toz formunda veya macun formunda ticari olarak temin edilebilen HAp'ler kullanılmaktadır. Bu tez çalışması içeriğinde; ticari ürünler yerine çöktürme metoduyla sentezlenen ürünün kullanılmasının ve HAp ile beraber hem antibakteriyel aktiviteyi arttırmak hem de dokudaki hücre canlılığını arttırmak amacıyla Ag(I) katkılı HAp gibi yeni bir hassasiyet giderici biyomalzemenin geliştirilmesi, çalışmaya özgün bir değer katmaktadır.

Tezin bu kısmında yürütülen bu *in vitro* çalışmada, çöktürme yöntemiyle sentezlenen HAp ve % 0,40 Ag(I) iyonu katkılanmış Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin dentin yüzeyi kaplama etkinliğini ve yeniden mineralleşmeye katkısını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amacın değerlendirilmesi için;

Hem enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak hem de dentin yüzeylerine yapışma kapasitesini arttırmak amacıyla Ag(I)-HAp kullanılan bu çalışmada hem kaplama işlemi öncesinde hemde kaplama işlemi sonrasında üretimi yapılmış HAp ve Ag(I)-HAp numunelerinin *Staphylococcus mutans*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite özellikleri ASTM E2149 [162] standardına göre incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen sonuçlar şekil olarak tez içeriğinde sunulmuştur. Antibakteriyel özellikleri değerlendirilen numuneler dentin yüzeyi üzerine yapay tükürük içinde (bkz. Bölüm 2.5) kaplanmıştır. Kaplanan örneklerin kaplama kapasitesini belirlemek için öncelikle SEM çalışması yapılmıştır. Yüzeye kaplanan biyomalzemelerin bozunma sürecini değerlendirmek için degradasyon çalışması yapılmıştır. Degradasyonun kaplama etkinliği üzerindeki etkisini test etmek için degradasyon çalışmasından önce ve sonra FTIR ve SEM

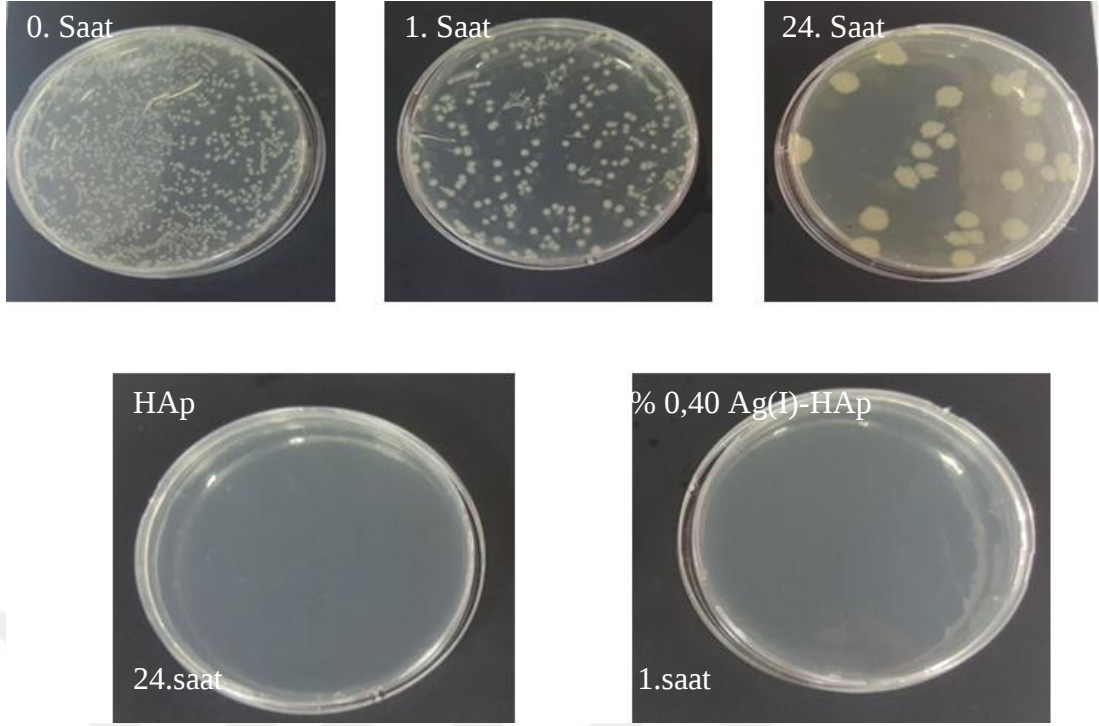
alışmaları yapılmıştır. HAp kaplı dentin numunelerinin toksikolojik özelliklerini belirlemek için ISO 10993, Medical Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi [161] standardında göre sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1. *In Vitro* Antibakteriyel Aktivite Testi

HAp ve Ag(I) iyonlarıyla üretilen Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin antibakteriyel özellikleri diş ürümelerinde etkili olan *Staphylococcus mutans* ATCC 25175'e karşı etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda antimikrobiyal aktif biyomateryalin *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Candida albicans* ATCC 90028 bakterilerine karşı etkinliği de ASTM E2149 [162] standardına göre belirlenmeye çalışılmıştır (bkz. Bölüm 2.3.2.1). Antimikrobiyal aktivite testinde analiz süresi boyunca bakteri yüzey morfolojisindeki değişimler incelenmemiştir. 0., 1., 24. saate kadar çoğaltılan bakterilerin HAp'lerle 24 saat muamelesi sonucunda elemine edilen bakteri oranları belirlenmeye çalışılmıştır. Alınan sonuçlar izelge 3.10 ve Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10 Antibakteriyel analiz sonuçları

Mikroorganizma	Elemine Oranı (%)	
	HAp	% 0,40 Ag(I)-HAp
<i>Staphylococcus mutans (gram pozitif)</i>	100	100
<i>E.coli (gram negatif)</i>	100	100
<i>Candida albicans (gram pozitif)</i>	100	100

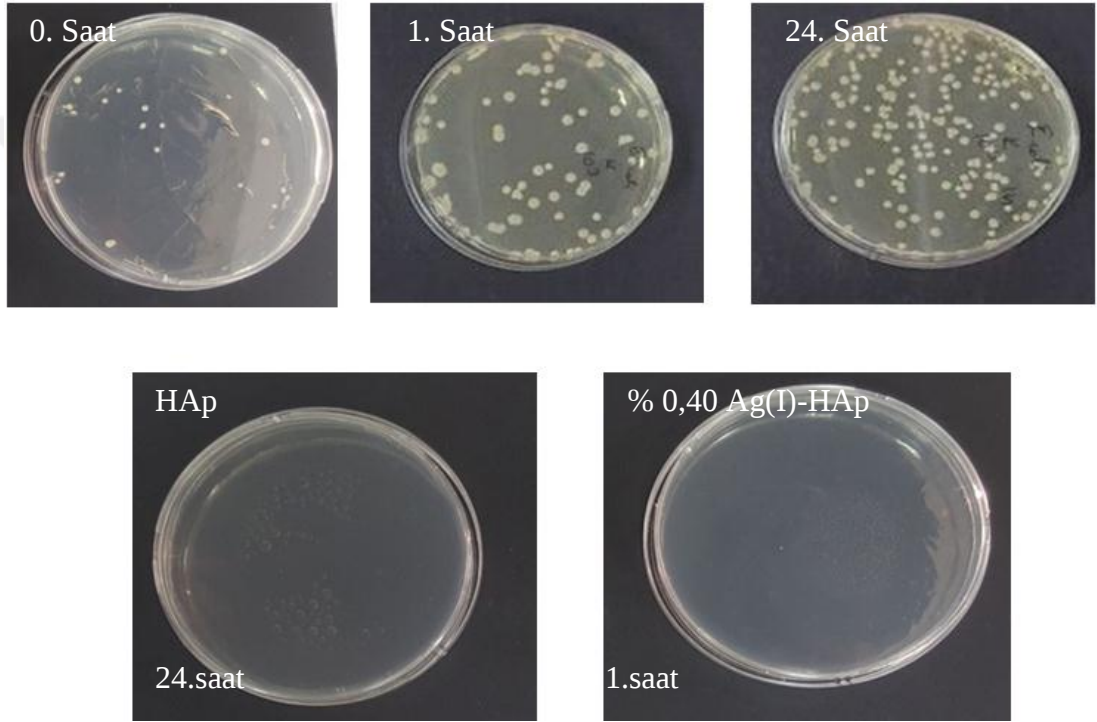


Şekil 3.20 Antibakteriyel analiz, *Staphylococcus mutans*

Antibakteriyel analizden elde edilen sonuçlara göre 24 saat bakteri üremesine izin verdikten sonra muamele edilen numunelerden HAp için 24 saat sonunda Ag(I)-HAp için 1.saat sonunda bütün bakteri gruplarının elemine olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre, hem HAp hem de % 0,40 Ag(I)-HAp biyomalzemeleri için bakteri üremesini önlemede etkili olduğu sonucu elde edilmiştir.

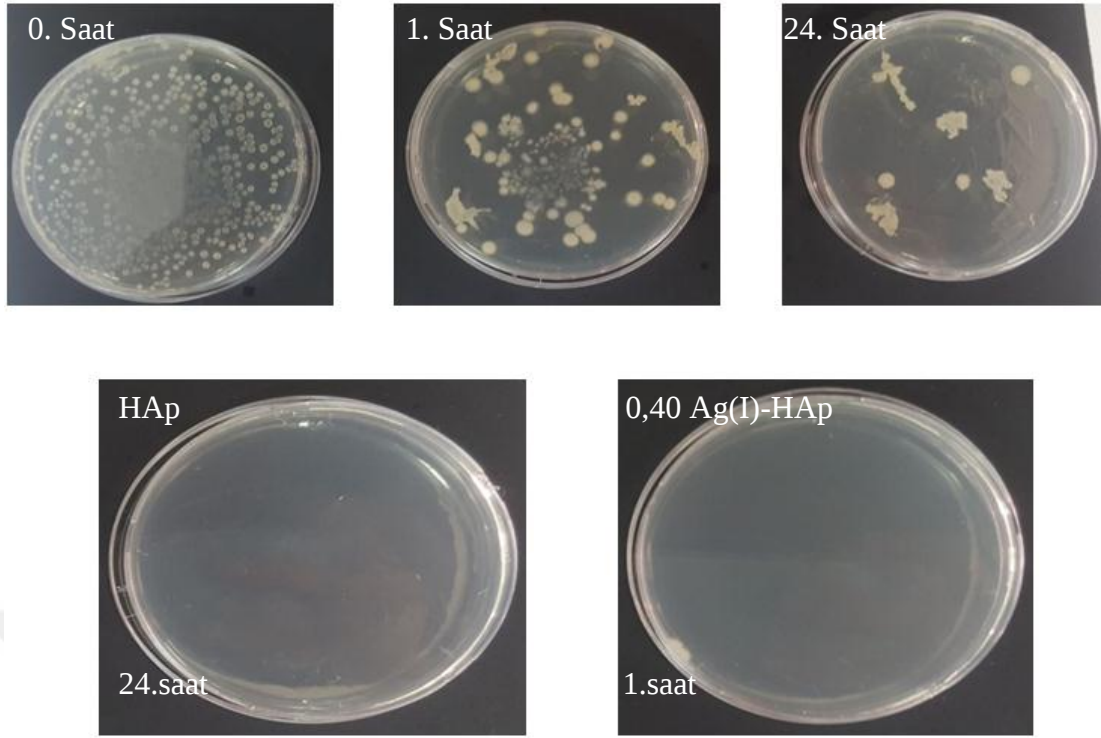
Katı numunedeki metal iyonlarının bakteriyel hücrelerle nasıl etkileşime girebileceği konusunda iki ana mekanizma açıklanmıştır. İlk mekanizma, bakteriyel duvar ile metal iyonları arasında doğrudan bir etkileşimin olduğu, elektrostatik kuvvetler tarafından mikroorganizmaların HAp yüzeylerine çekilmesi esasına dayanır. İkinci mekanizma ise Ag(I) iyonlarının önce HAp içerisinden salınması ve sonra bakterilere ulaşması ve reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır [180, 181]. Tez içeriğinde yapılan bu çalışma da *Staphylococcus mutans* ve *Candida albicans* gibi gram artı (gram +), *Escherichia coli* gibi gram eksi (gram -) bakterilere karşı muamele uygulanarak her iki mekanizma da test edilmiştir. Antibakteriyel analiz sonucunda elde edilen Çizelge 3.10'a göre hem gram – hem de gram + için katkısız HAp'lerde 24 saat Ag(I)-HAp'lerde 1 saat sonunda % 100 bakterinin elemine edildiği sonucu

elde edilmiştir. Buda bakteriyel etkide birinci mekanizmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Antibakteriyel analiz fosfat tampon çözeltisi ile yapılmıştır. Sıvı ile gerçekleşen temas sonucu salım tayininde olduğu gibi çok az da olsa gümüş salımı gerçekleştirmesi ikinci mekanizmanın da etkili olduğunu göstermektedir. Ürünün degrade olmaması ve degradasyon ürünlerinin toksik olmaması gibi nedenlerle antibakteriyel etki için bakteriyel duvar ve Ag(I) iyonları arasındaki etkileşimin olası diğer etkileşimlerden daha baskın olduğu düşünülmüştür.



Şekil 3.21 Antibakteriyel analiz, *Escherichia coli*

Gümüş varlığı antibakteriyel ajan olarak pozitif bir düşünce olsa da aşırı gümüş varlığı da toksik etki doğurabilecektir. Hücre canlılık çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre artan gümüş katkı oranıyla beraber azalan hücre canlılığı çalışmalar için sınırlı bir gümüş ilavesine izin vermektedir. Bu nedenle hem antibakteriyel hedefler için uygun olan hem de olası toksik etkileri elemine edebilen bir oranın belirlenmesi gerekmektedir.



Şekil 3.22 Antibakteriyel analiz, *Candida albicans*

Antibakteriyel etki ve sonunda toksik etki oluşturmamak için Lim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da [33], Ag(I) iyonlarının 7 güne kadar yavaş salımının antibakteriyel özellikler açısından uygun olduğunu göstermiştir. Ancak tez içeriğindeki bu çalışmada yavaş salımdan ziyade tedavilerde gerçekleştirilecek ilk enfeksiyonları ortadan kaldırmak için toksik etki ortaya çıkarmayacak kadar ani/patlama salımın olabileceği vurgulanmıştır.

Gümüşün bilinen toksik etkileri sebebiyle yapıya ilk anda gerçekleşecek ani salım değerinin de sınırlı bir noktada olması gerekmektedir. Çalışma içeriğinde gözlemlenen ani/ patlama salımları toksik etki doğuracak değerlerden uzakta ve aynı zamanda hızlı antibakteriyel özellik açığa çıkaracak değerdedir. Çalışma içeriğinde tercih edilen bu oran hem antibakteriyel özellik göstermiş hem de hücre canlılığı için olumsuz bir sonuç göstermemiştir. Gözlenen bu antibakteriyel etki ile klinik uygulamalarda tedavi esnasında gerçekleştirilecek olası enfeksiyonların azaltılabileceği düşünülmüştür.

Diş hekimliği klinik çalışmaları sırasında gerçekleşebilecek olası enfeksiyonlar 2 hafta gibi bir süre içinde ortaya çıktığı için antibiyotik takviyesi enfeksiyon gerçekleşikten sonra uygulanmaktadır. Bu enfeksiyon varlığı uygulamanın sağlığı açısından risk teşkil ettiğinden uygulama esnasında bu işlemi yapmak düşünülebilir ancak bunun vücut sıvısı tarafından elemine edilmesi ihtimali de gereksiz antibiyotik alımına sebep olacaktır. Bu olumsuz etkileri ortadan kaldırabilmek ve kalıcı bir çözüm sunmak için gümüş ilaveli HAp'nin sahip olduğu antibakteriyel özellik sonuçları hem de gümüş salım sonuçları ile HAp'nin diş tedavilerinde gümüş ilavesiyle beraber gerçekleşebilecek olası enfeksiyonları önleyebilecek antibiyotik takviyesi olarak kullanılmasının mümkün olduğu düşünülmüştür.

3.4.2. *In Vitro* Dentin Tübül Kaplama

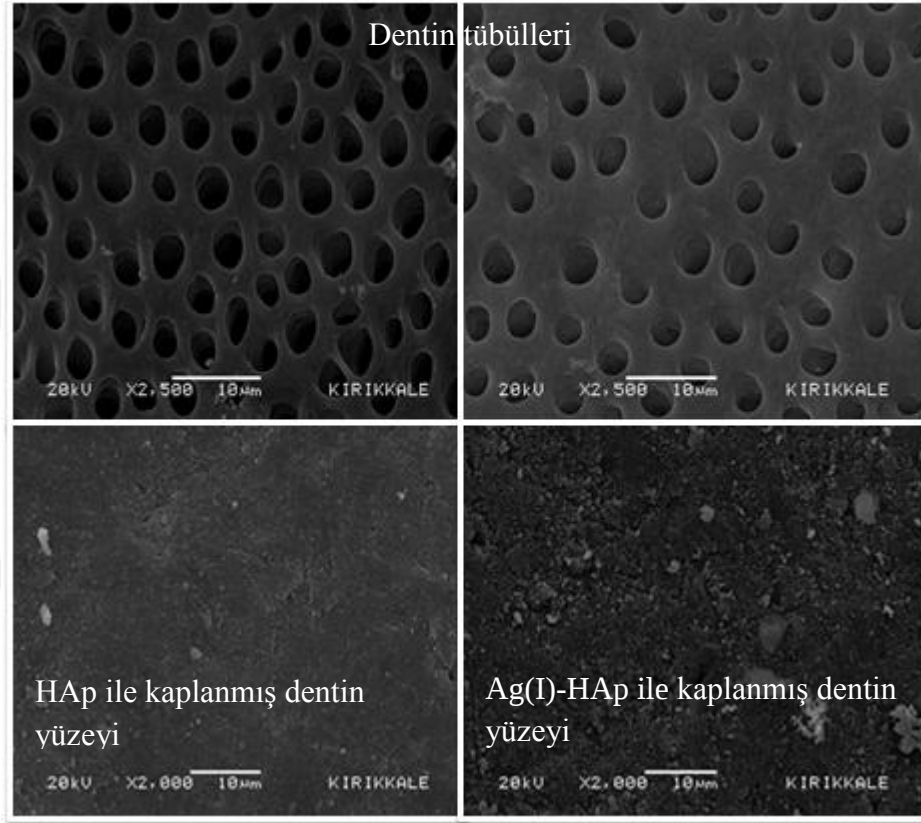
3.4.2.1. Kaplama İşlemi

Bölüm 2.5'de uygulama yöntemi detaylıca anlatılan bu çalışmada kontrol diş olarak adlandırılan ve kaplama yapılmayan diş 8 saat yapay tükürükte tutulmuş numunedir. Bununla birlikte HAp kaplı diş olarak adlandırılan grup, dentin numunesinin % 10 HAp içeren HAp-saf su-suni tükürük süspansiyon çözeltisiyle muamele edilen gruptur. Son olarak Ag(I) kaplı diş olarak ifade edilen grup ise dentin numunesinin % 10 Ag-HAp içeren Ag(I)-HAp-saf su-suni tükürük süspansiyon çözeltisiyle muamele edilen gruptur.

HAp ve % 0,40 Ag(I) iyon katkılı Ag(I)-HAp ile 7 günlük dentin tübül kaplama işlemlerinden sonra dentin yüzeylerinin kaplanma durumu SEM analizi (bkz. Bölüm 2.3.1.2) ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Dentin tübül kaplama çalışması yapmadan önce hazırlanan bütün dentin gruplarına ait disklerinin 60 saniye boyunca % 10 sitrik asit çözeltisi ile muamele edilerek yüzeylerinin temizlenmesi sağlanmıştır. Dentin disklerinin saf su ile muamele edildiği ve suni tükürükte depolandığı dişler için yapılan bu temizleme işleminin sonunda elde edilen dentin yüzeyleri SEM ile incelenmiştir. Elde edilen SEM görüntülerine göre tüm dentin tübüllerin, hipersensitif dentine benzer şekilde açık

olduğu bir dentin (Şekil 3.23) varlığını net bir şekilde gösterilmiştir. Bununla beraber dentin yüzeylerinde az miktarda kirlilik gözlemlenmiştir. Ancak büyük oranda temiz ve pürüzsüz dentin tübül yapısı ile numune hazırlama sırasında genelde oluşan leke tabakasının uygulama alanından çıkarıldığı sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.23 Dentin tübül kaplama çalışması SEM görüntüsü

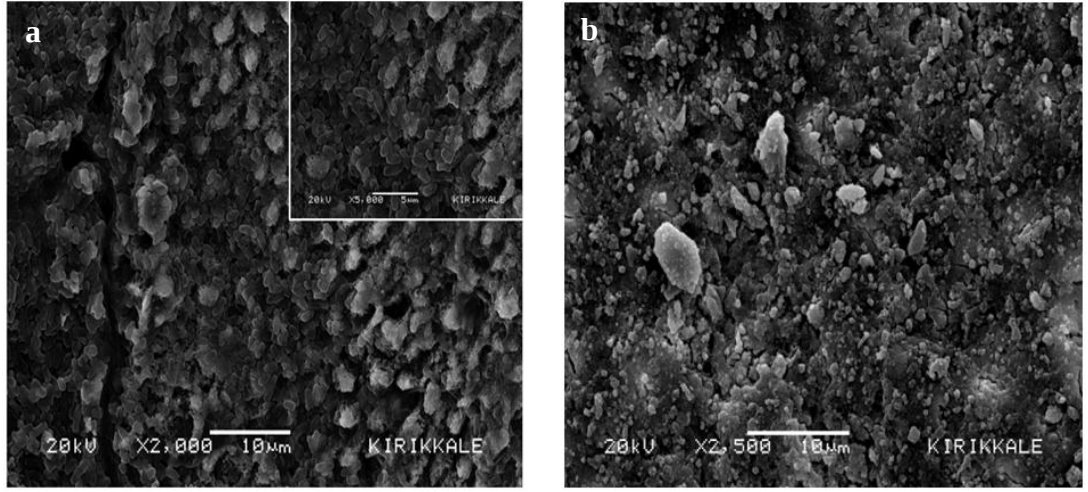
Dentin yüzeyinin açığa çıkması ile dentin tübüllerinin oral kavite ve pulpaya doğru açık olması dış etkilere karşı savunmayı zorlaştırmaktadır. Bu açıklığın kapatılarak tübüllerdeki sıvı akışını azaltmak ve pulpadaki sinir iletimi üzerinde etkiyi azaltmak diş hekimliğinde tedavilerde tercih edilen yöntemlerdir [71, 83]. Bu amaçla dentin yüzeyleri her iki grupta kaplanmıştır. Kaplama işleminin sonucunda dentin tübül yüzeylerinin tamamen kaplandığı görülmektedir (Şekil 3.23). Ancak bu kaplamanın tedavide başarılı bir sonuç vermesi için kaplanan yüzeyin fiziksel ve kimyasal etkiler sonucunda açılmaması gerekmektedir. Bu kaplama etkinliğini test etmek amacıyla

tez çalışması içerisinde degradasyon analizi yapılmıştır. Kontrol dişi, HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişler SBF ve suni tükürük içinde degradasyona maruz bırakılarak yüzeyden kopma olup olmadığı yani kaplamanın yüzeyden kalkıp kalkmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Degradasyon çalışması ile ürünlerin bozulma kapasitesi belirlenmiştir. Bununla beraber degradasyon sonucunun morfoloji üzerindeki etkisini incelemek için SEM analizi ve bileşen grupları üzerindeki etkisini incelemek için FTIR analizleri yapılmıştır. Degradasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Sitotoksosite çalışması da yapılmıştır. Degradasyon öncesi ve sonrası olarak yapılan analizlerin sonuçları tez içeriğinde çizelgelerle ve şekillerle sunulmuştur.

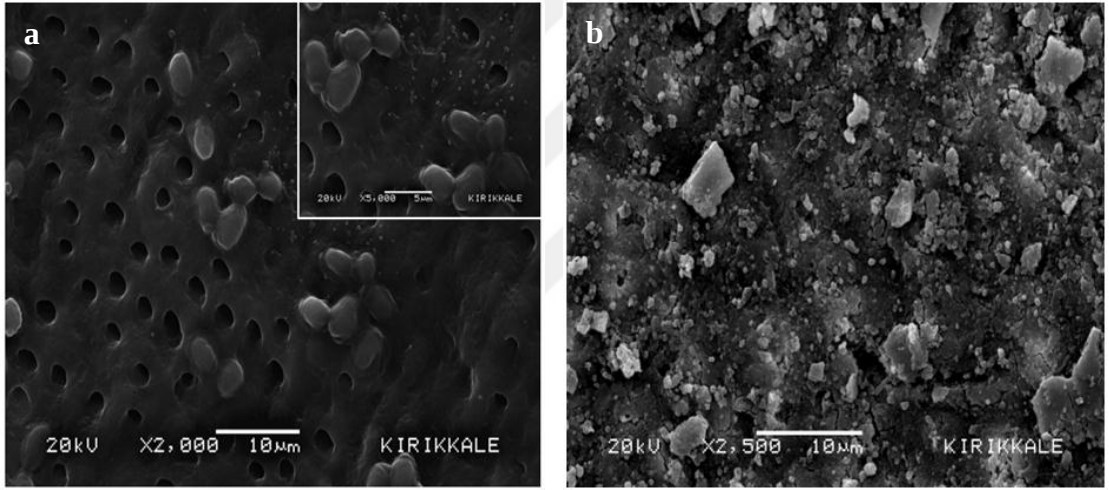
3.4.2.2. Antibakteriyel Analiz

Bu çalışma içeriğinde ayrıca hiçbir kaplamanın yapılmadığı kontrol dişine ve HAp kaplanmış dişlere *Staphylococcus mutans*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* bakterileri uygulanarak kaplama sonucunda antibakteriyel bir bölge elde edilip edilemeyeceği belirlenmeye çalışılmıştır.

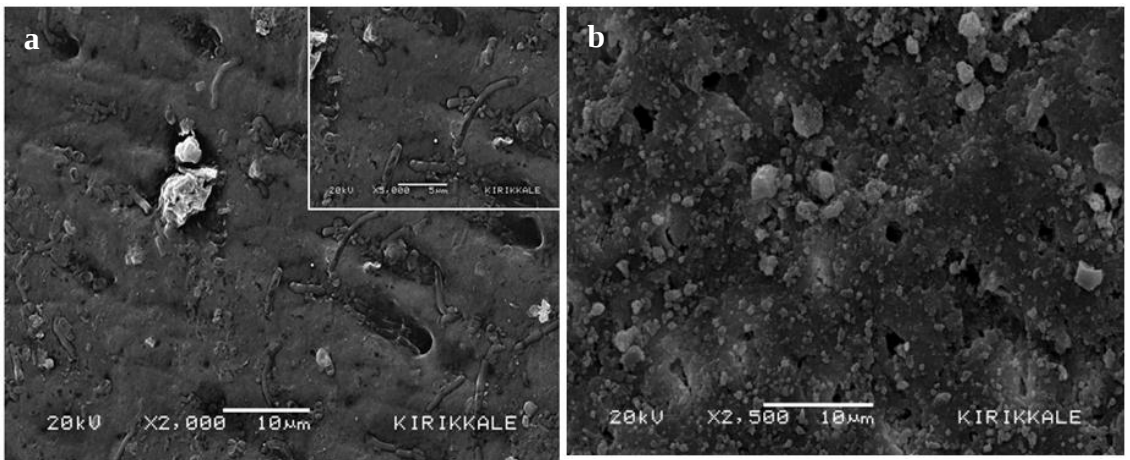
Kaplama işleminin yapılmadığı dişlerin dentin yüzeylerinde bakteri varlığı gözlenmiştir (Şekil 3.24a, 3.25a, 3.26a). Dentin tabakası büyük miktarda kollajenler, tübüller ve bunlar içinde de dentin lenfleri mevcuttur [14]. Bu dokunun hem organik içerikli hem kanallı hem de boşluklu yapıya sahip olması nedeniyle bakterilerin tutunmasını kolaylaştırdığı ve bakterilerin çoğalması için uygun bir ortam oluşturduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışmada da açık dentin yüzeylerinde bakteriyel çoğalma görülmektedir. Buna karşın gümüş katkılı HAp ile kaplanmış olan dentin örneklerinde hem yüzeyin tamamen HAp'lerle kaplandığı hemde bakteriyel çoğalmanın meydana gelmediği görülmüştür. Bu sonuçlara göre uygulanan sentetik Ag katkılı HAp'nin hem tübüllerini örterek dentin hassasiyetinin giderilmesini sağlayacağı hem de antibakteriyel etki göstereceği görülmüştür.



Şekil 3.24 a) Kaplanmamış ve b) kaplanmış diş Antibakteriyel Analizi, *Escherichia coli*



Şekil 3.25 a) Kaplanmamış ve b) kaplanmış diş Antibakteriyel Analizi, *C. Albicans*



Şekil 3.26 a) Kaplanmamış ve b) kaplanmış diş Antibakteriyel Analizi, *S. Mutans*

3.4.2.3. Degradasyon Analizi

Bu çalışma içeriğinde hazırlanan kontrol diş grup 1, HAp kaplı diş grup 2 ve Ag(I)-HAp kaplı grup 3 dentin numunelerinin kaplama işleminin ardından biyolojik sıvılarla etkileşimi sonucunda yüzeyde kalıcılığını ve kütle miktarındaki değişiklikleri belirlemek için SBF ve yapay tükürük çözeltisinde degradasyon çalışması yapılmıştır. 4 hafta süreyle uygulanan hızlandırılmış degradasyon çalışmasıyla 10 aylık bir kontrol süresi gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 2.3.2.3). Aynı zamanda kontrol diş olarak da adlandırılan ve kaplama yapılmayan dişte de dişin yapısal olarak bozunmaya karşı direncini incelemek için degradasyon uygulaması yapılmıştır. Numuneleri içeren sıvıların pH seviyeleri, her hafta 7,4 nötr su seviyesinde tutulmuştur. Analiz ISO EN 10993 – 13 [167] standardında uygulanan deney süreçleri dikkate alınarak yapılmıştır. Degradasyon yüzdesi hesabı ve istatistiksel değerlendirmesi yine bu standart içeriğinde tanımlı hesaplama yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil ve çizelge olarak çalışma içeriğinde gösterilmiştir.

Degradasyon çalışması sonucunda elde edilen kütle kaybı oranları Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Kontrol grubu için % 1,7 olarak hesaplan degradasyon değeri HAp ve Ag(I)-HAp kaplı diş için sırasıyla % 7,7 ve % 3,2 olarak hesaplanmıştır. Ortam pH’sindeki değişim yapının bozunması için bir gösterge olacağından her hafta sonunda ortam pH’leri ölçülmüştür. Yapılan degradasyon çalışmasında her hafta ortam sıvısının pH’leri tekrardan 7,4 olarak ayarlanarak her haftanın değişimleri kontrol edilmiştir.

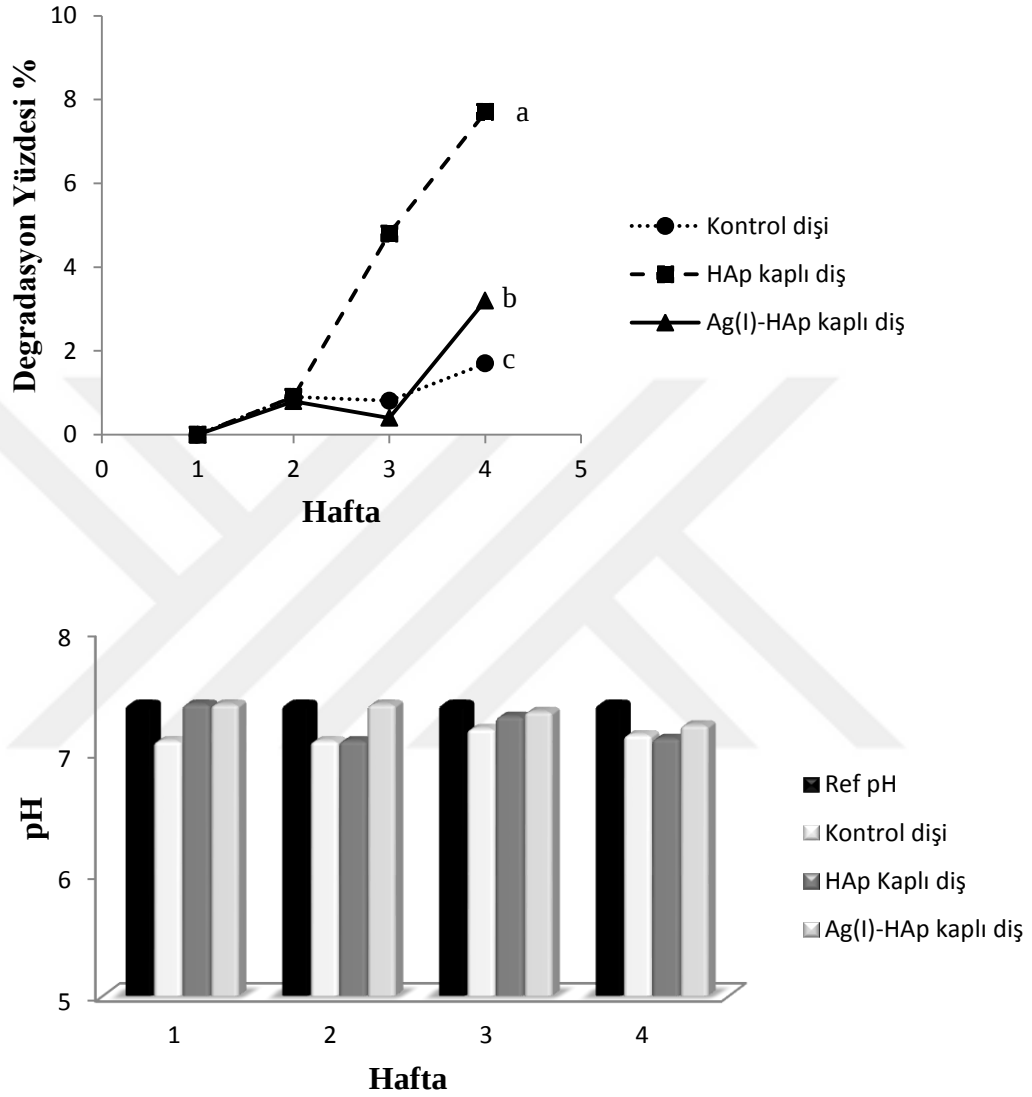
Çizelge 3.11 Degradasyon Yüzdeleri

Hafta	Kontrol Dişi		HAp Kaplı Dişi		Ag(I)-HAp kaplı diş	
	Degradasyon Yüzdesi %	pH	Degradasyon Yüzdesi %	pH	Degradasyon Yüzdesi %	pH
1	0,00	7,10	0,00	7,10	0,00	7,40
2	0,90	7,10	0,90	7,10	0,80	7,40
3	0,81	7,20	4,80	7,25	0,40	7,34
4	1,70	7,15	7,70	7,00	3,20	7,10

Bütün gruplar için elde edilen değerlerin anlamlı bir farka sahip olup olmadığını belirlemek için F ve t testi yapılmıştır. Çizelge 3.11 elde edilen test sonuçlarına göre anlamlı fark bulunan ikililer + anlamlı fark bulunmayan gruplar – işareti ile işaretlenmiştir. Çizelge 3.12’ye göre kontrol dişi olan grup 1 ve HAp kaplı dişi olan grup 2 için elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark olduğu sonucu elde edilmiştir. Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde kütle kaybı oranları kontrol, Ag(I)-HAp ve HAp kaplı dişi sırasında arttığı görülmüştür. Bütün gruplarda kütle kaybının çok az olduğu görülmüştür. Degradasyon oranları malzemenin belirli bir gün sonunda kütledeki değişime bakılarak belirlendiği için malzeme kütlelerinin analiz öncesi ve sonrası çok değişmediği sonucu elde edilmiştir. Eğer analizin başlangıç ve bitiş kütle değerlerinde değişim olursa bu değişime iki ögenin neden olabileceği düşünülmektedir. Bunlar; malzeme yapısının bozularak sıvı içeriğe karışması ve yüzeye kaplanan malzemelerin sıvı ile temas sonucunda koparak dişten ayrılmasıdır.

HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişlerde degradasyona neden olan bu iki etkinin iyi ayırt edilebilmesi için hiçbir kaplama işleminin uygulanmadığı kontrol dişi de degrade edilmeye çalışılmıştır. Böylelikle dişin kendinde var olan degradasyon eğilimi ile kaplama malzemesinin yüzeyden kalkma potansiyeli ayırt edilebilecektir. Hiçbir kaplama işleminin yapılmadığı grup 1 kontrol dişi % 1,7 gibi çok az bir degradasyon sonucu vermiştir. Dişin kendi yapısının SBF ve yapay tükürük içinde normal şartlarda bozulma eğilimi olmadığından burada elde edilen değer yüzey üzerinde kalan parçacıkların yüzeyden kopmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. HAp ve Ag(I)-HAp tozları için Bölüm 3.3’de yapılan degradasyon çalışmalarından (Şekil 3.16) elde edilen sonuçlara göre HAp tozları % 1’in altında degrade olduğu belirlenmiştir. Diş üzerine kaplanan HAp tozları çok düşük değerlerde degrade olduğu için üzeri HAp ve Ag(I)-HAp ile kaplanmış dişlerde ki bu degradasyon değerleri, yüzeyden tozların koptuğunu göstermektedir. Yüzeyden HAp ve Ag(I)-HAp tozlarının kopması dentin tübüllerinin tekrardan açık hale gelmesine sebep olursa açılan dentin yüzeyleri tekrar hassasiyet oluşturacaktır. Bu nedenle yüzeyden kopmaların aşırı olmaması istenmektedir. Kaplama işlemi yığın olarak bir çökeltme ile gerçekleştiğinden bu degradasyon oranlarında gerçekleşen kopmaların dentin yüzeylerini tamamen açık hale getirmeyeceği düşünülmüştür. Bu durumun

gözlemlenmesi için çalışma içeriğinde SEM ile degradasyon öncesi ve sonrası inceleme yapılmıştır.



Şekil 3.27 Degradasyon Yüzdeleri ve pH değişimleri, farklı küçük harfler anlamlı farkı göstermektedir

Ag(I) iyonlarının HAp 'nin yapısına dâhil edilmesinin antibakteriyel etkisi (bkz. Bölüm 3.4.1) ve çalışma içeriğinde tercih edilen katkı oranlarına göre artan katkı oranıyla beraber HAp tozlarına göre daha az degrade olması (bkz. Bölüm 3.3) çalışmalarda kullanılması için bir avantaj olarak değerlendirilmiştir. Bu

avantajlarının yanında diş üzerine uygulanan kaplama işleminde Ag(I)-HAp kaplı dişin HAp kaplı dişe göre daha az degrade olması da dikkat çekicidir. Bu sonuçta Ag(I)-HAp partiküllerin dentin yüzeyine bağlanma kuvvetinin HAp partiküllerinden daha iyi olduğunu ve yüzeyde daha iyi tutunduğunu göstermektedir. Bütün bu sonuçlara göre Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp'lerin dentin yüzeyine yapışma gücünü arttırdığı sonucu elde edilmiştir. Kaplı diş grupları arasında degradasyonun yüzey morfolojisinde ki durumunu gözlemlemek için SEM ve fonksiyonel grup sayısının üzerindeki etkisini gözlemlemek için FTIR analizleri uygulanmıştır.

Çizelge 3.12 Degradasyon çalışması F ve t Testi karşılaştırılması

	Kontrol dişi	Hap Kaplı Diş	Ag(I)-Hap Kaplı Diş
Kontrol dişi		+	+
Hap Kaplı Diş	+		+
Ag(I)-Hap Kaplı Diş	+	+	

3.4.2.4. SEM Analizi

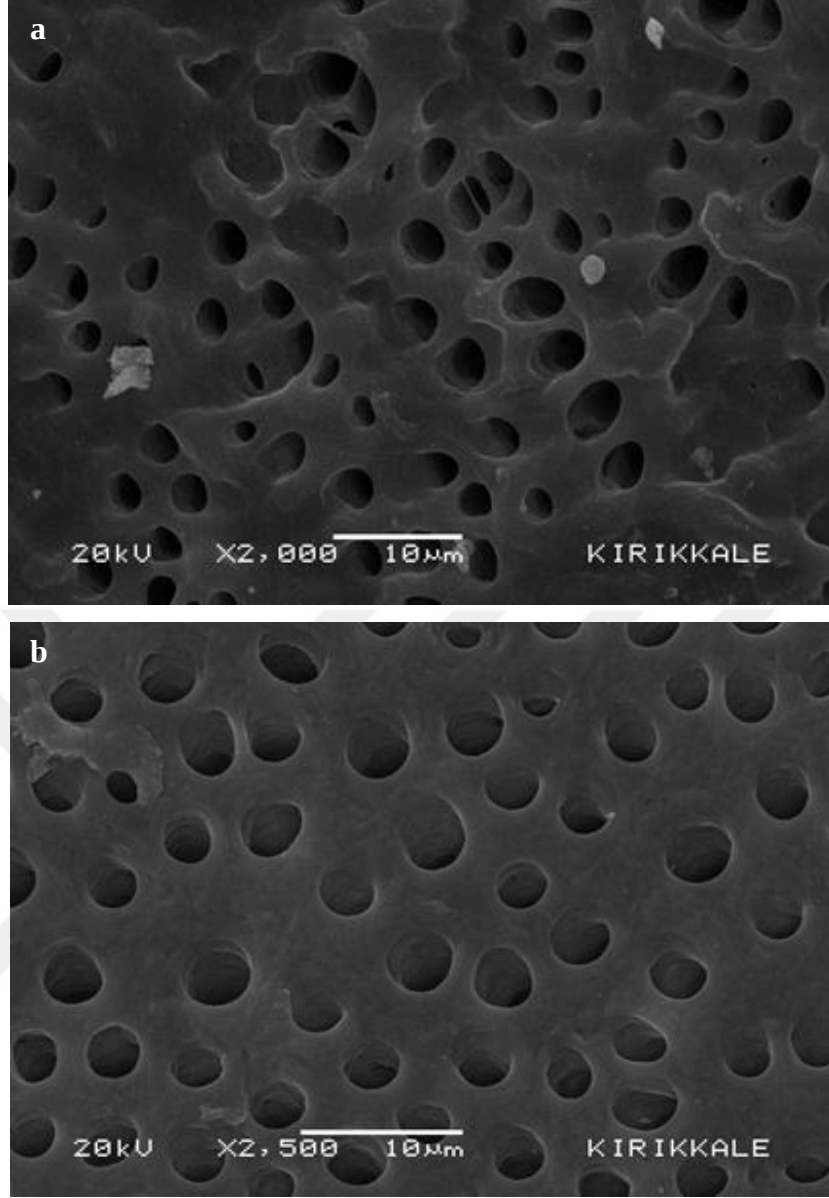
Kontrol dişi, HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişlerin yapısal ve morfolojik değişiklikleri degradasyon işleminden önce ve sonra uygulanan SEM analizi (bkz. Bölüm 2.3.1.2) ile belirlenmeye çalışılmıştır ve sonuçları Şekil 3.28, 3.29 ve 3.30'da gösterilmiştir.

Kontrol dişi degradasyonundan önce ve sonra elde edilen SEM görüntülerinde dikkate değer bir fark gözlenmemiştir. Degradasyon çalışmasının kontrol dişinin morfolojisi üzerinde bir etkiye sebep olmadığı sonucu elde edilmiştir. Bununla birlikte degradasyon çalışması sonucunda dentin yüzeylerinde az da olsa var olan ve degradasyon yüzdesi elde etmemize neden olan kirliliklerinde giderildiği sonucu elde edilmiştir (Şekil 3.28).

HAp kaplı diş ve Ag(I) kaplı diş sırasıyla % 10 HAp içeren HAp-saf su-suni tükürük ve % 10 Ag-HAp içeren Ag(I)-HAp-saf su-suni tükürük süspansiyon çözeltileri içinde 7 gün boyunca karıştırılmış sonrasında 1 günlük çöktürme işleminde sonucunda kaplama yapılmıştır. Bu kaplama işlemleri sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.29 ve 3.30’da gösterilmiştir.

Şekil 3.29 a ve 3.30 a’dan elde edilen SEM görüntülerinde herbir dentin grubu numunelerinin tübül yüzeylerinin tamamen kaplandığı ve açık bir tübül ağzının olmadığı görülmüştür. Bu görseller kaplama sürecinde kullanılan HAp biyomalzemelerinin dentin yüzeylerine çökmesi nedeniyle dentin yüzeylerinin görülemez hale geldiğini göstermiştir.

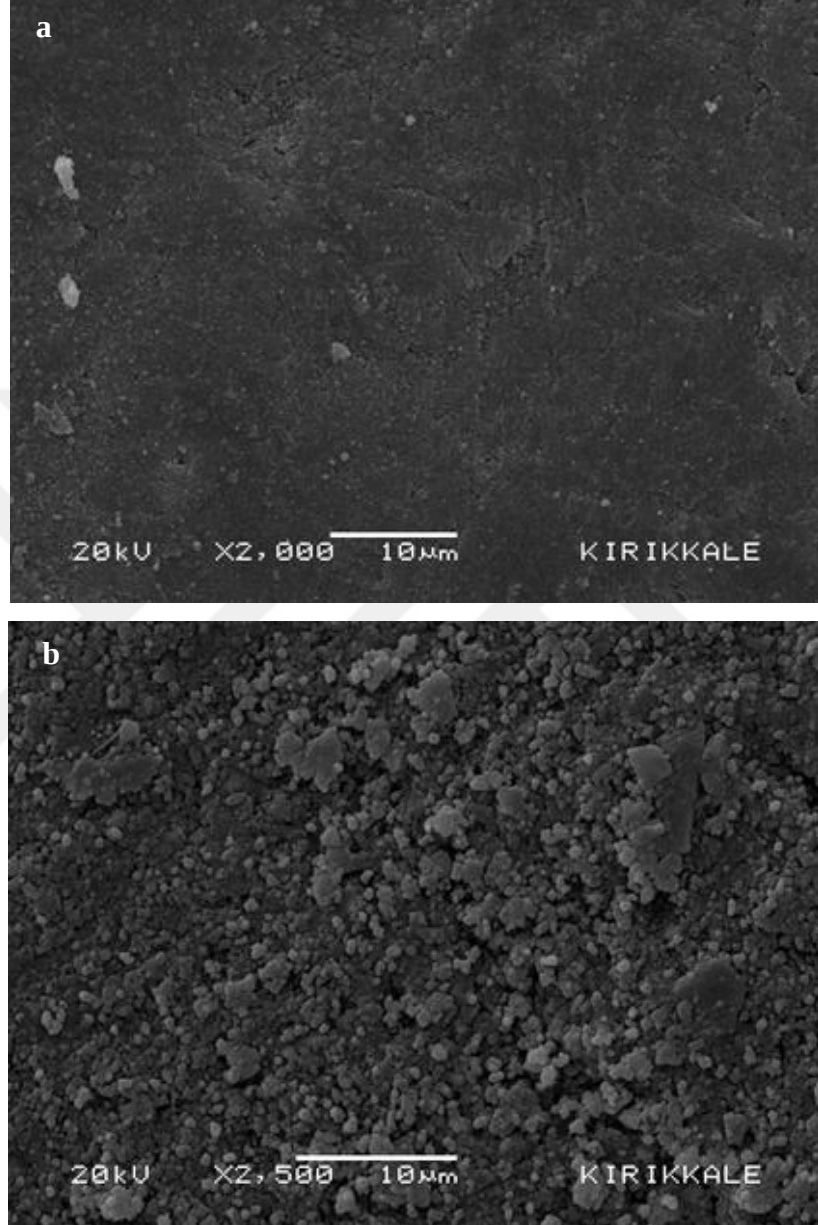
Dentin yüzeylerine yapay tükürük içinde çöktürme ile yapılan kaplama sonucunda dentin yüzeylerinin kapatılması hassasiyet çalışmalarına uygunluğu için tek başına yeterli değildir. Dentin yüzeylerinin maruz kalabileceği fiziksel ve kimyasal etkiler sonucunda bu yüzeylere kaplanan HAp biyomalzemelerinin yüzeyden kalkıp kalkmayacağı da önemli bir sorudur. Örneğin yüzeye uygulanan fırçalama gibi fiziksel bir kuvvetin yüzeye yapışmış HAp tabakasını çıkarıp tübüllerin tekrar açık hale getirme ihtimali uygulamanın etkinliği için önemlidir. Bununla birlikte ağız içinde yapay tükürük ve vücut sıvısı gibi sıvılarla kimyasal etkileşim sonucunda HAp biyomalzemelerinin yüzeyden çıkıp ıkmayacağın belirlenmesi de önemlidir. Bu etkilerin gözlemlenmesi için bu çalışma içeriğinde SBF ve yapay tükürük ile etkileşimin değeriendirildiği degradasyon çalışması yapılmıştır. Degradasyon alışmaları sonucunda yüzeyden HAp biyomalzemelerinin kalkıp kalkmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Degradasyon işleminin morfoloji üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.29 b ve 3.30 b’de gösterilmiştir.



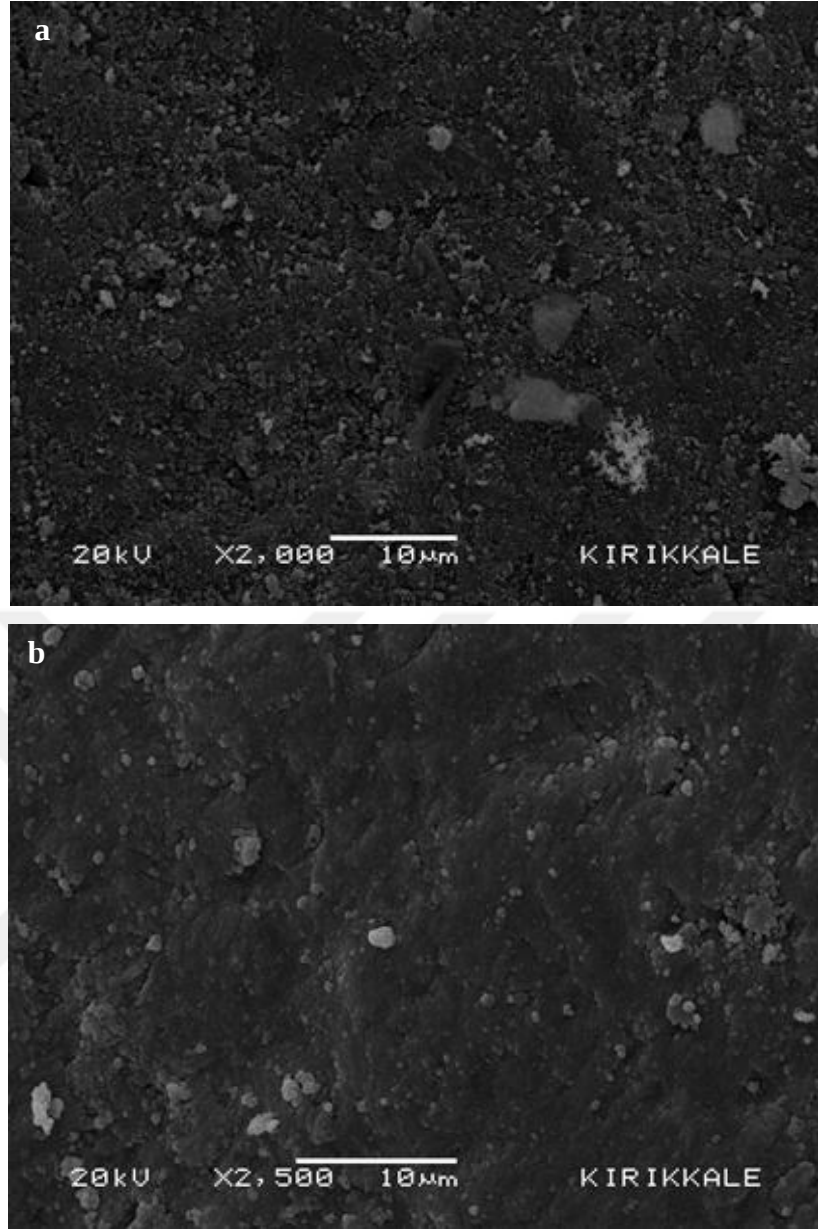
Şekil 3.28 Kontrol dişi degradasyondan önceki (a) ve sonraki (b) dentin tübül görüntüsü

Dentin yüzey kaplama işleminde kullanılan HAp biyomalzemeleri bozunmayan bir ürün olduğu için yüzeyden kopmaların olup olmadığı ve sonucunda tübül ağzlarının açılıp açılmadığı gözlemlenmeye çalışılmıştır. Degradasyon çalışması ile dentin yüzeylerinden nadir miktarda HAp'nin kalktığı ancak tübüllerin hala kapalı olduğu

görülmüştür. Aynı zamanda degradasyon işlemi HAp biyomalzemelerinin yüzey morfolojisi üzerinde de negatif bir etki oluşturmadağı sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.29 HAp kaplı diş degradasyondan önceki (a) ve sonraki (b) dentin tübül görüntüsü

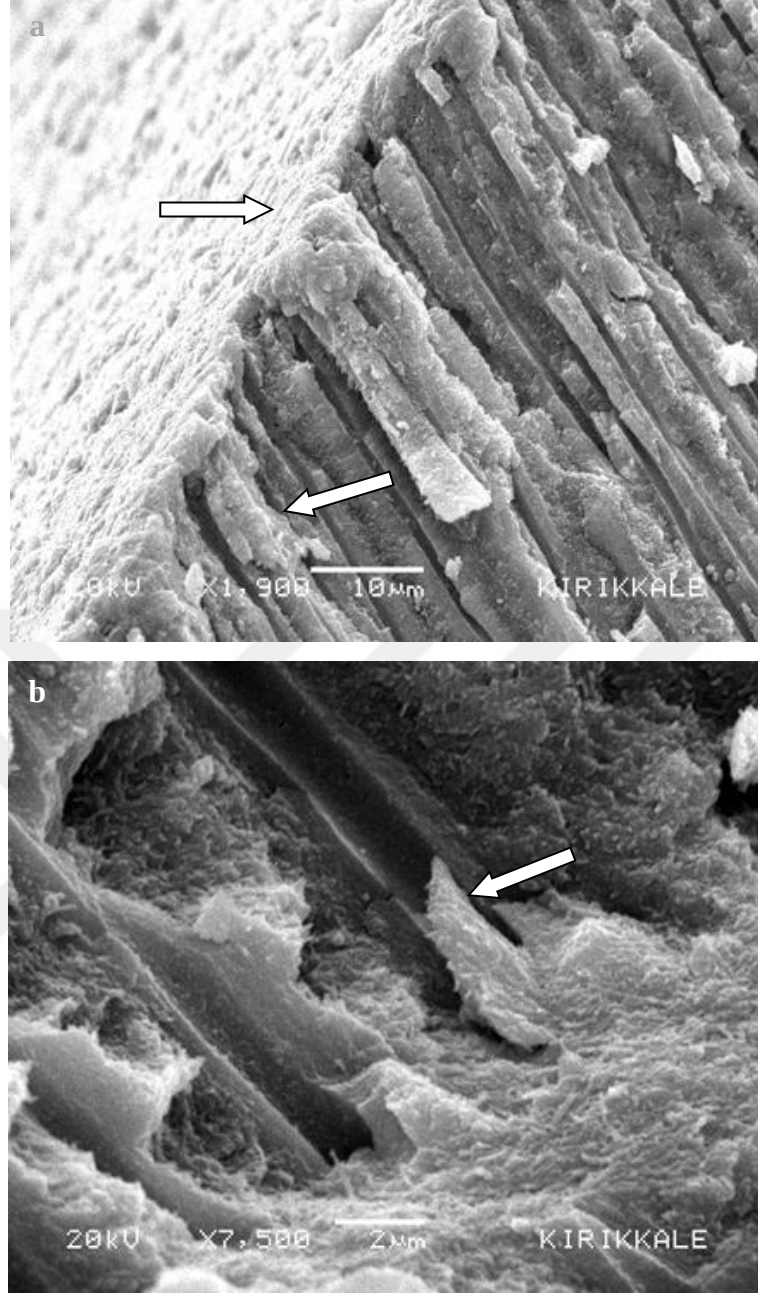


Şekil 3.30 Ag(I)-HAp kaplı diş degradasyondan önceki (a) ve sonraki (b) dentin tübül görüntüsü

Açık dentin tübül yapısı, normalde dişte gözle görünür herhangi bir dental hasar veya patoloji olmadığı halde farklı uyarıcılara cevap şeklinde dentin hassasiyetine neden olmaktadır. Ancak dentin yüzeylerinin kapatılması ileride dışarıdan maruz kalınacak sıcak ve/veya soğuk sıvı teması, dokunma veya kimyasal uyarılara karşı koruyucu bir tedavi olabilir. Dentin tübül kanalları pulpaya kadar uzanan bir yapıda olduğu için bu

kanalların içinde var olabilecek mikroorganizmalar sadece yüzeyin kapatılmasıyla elemine edilemeyecektir. Bu nedenle dentin tübül kanalları içinde de HAp biyomalzemelerinin var olması bu mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasına da yardımcı olabilir.

Çalışma içeriğinde antibakteriyel etki sağlamak amacıyla Ag(I) iyonları katkılanmış Ag(I)-HAp bu kanal içinde akabilirse o bölgelerdeki mikroorganizmaları elemine edebilecektir. Yani kaplama işleminde hem yüzey kaplaması hem de kanal içine akma hedeflenmelidir. % 0,40 Ag(I) katkılanmış Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin antibakteriyel olması nedeniyle kanal içerisinde olası mikroorganizmaları elemine edebileceği düşünülmüştür. Kanal içerisinde HAp varlığını gözlemlemek adına dentin disklerinin yan kesit görüntüleri alınmıştır. Elde edilen yan kesit görüntüleri ve mevcut HAp'ler işaretlenerek Şekil 3.31'de gösterilmiştir. Elde edilen yan kesit görüntülerinde hem HAp hem de % 0,40 Ag(I) iyonu katkılanmış Ag(I)-HAp biyomalzemelerinin kanal içerisine bir miktar aktığı görülmüştür. Elde edilen bu görüntülerde kanal boyunca sadece tübül ağızlarından en fazla 50µm'ye kadar bir ilerleme tespit edilmiştir. Dentin tübül kanalları pulpaya kadar 2-3 mm uzunluğunda olduğu düşünülürse kanal içerisinde akılan bu mesafenin az olduğu anlaşılmaktadır. Buna rağmen hassasiyet giderici tedavi için istenen ve tez içerisinde hedeflenen tübül yüzey kaplama işleminin çalışma içeriğinde başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 3.31 HAp (a) ve Ag(I)-HAp (b) kaplı diş yan kesit SEM görüntüsü

3.4.2.5. FTIR Analizi

Dentin tübül yüzeylerinin kaplama işleminden sonra uygulanan bozunma deneyi sonucunda HAp tozlarının yüzeyden uzaklaşıp uzaklaşmadığını belirlemek amacıyla FTIR çalışması (bkz. Bölüm 2.3.1.6) da yapılmıştır. Yüzeye yapılan kaplama işlemi

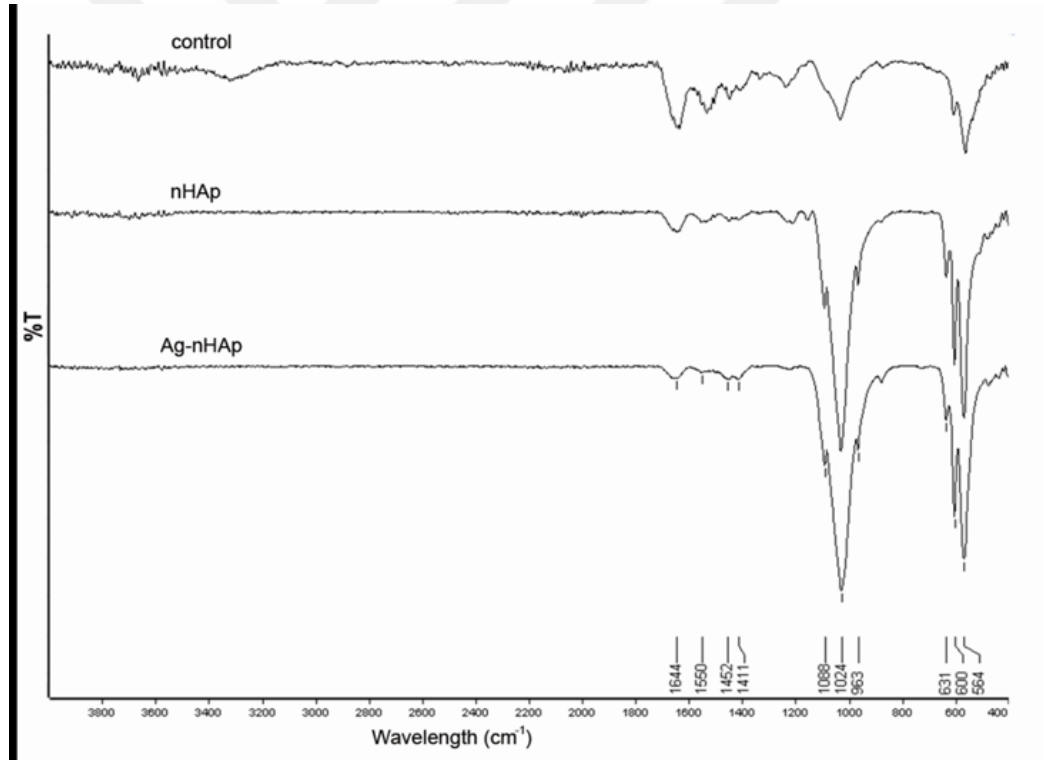
sonunda dentin yüzeyindeki malzemenin bileşen grupları belirlenerek yüzeydeki yapının HAp olup olmadığı belirlenmiştir. Daha sonra dentin diskleri degradasyona (bkz. Bölüm 2.3.2.3) tabi tutulmuştur. Uygulanan degradasyon işlemiyle birlikte yüzeyde gerçekleşebilecek kayıpların bileşen grupları üzerindeki etkileri belirlemeye çalışılmıştır. Şekil 3.32’de ve Şekil 3.33’da kontrol dişi, HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişlerin degradasyonundan önceki ve sonraki FTIR sonuçları görülmektedir.

Kontrol dişi için bozunma işleminden önce elde edilen FTIR spektrumlarında dişi için karakteristik olan amid I (C = O) zirveleri 1634 cm^{-1} ’de, amid II (N-H ve C-N) 1544 cm^{-1} ’de ve amid III (C-N ve N-H) ise 1236 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Kontrol dentin numunesi yüzeyleri demineralize edildiğinden mineralsız bölge kolajen bakımından zengin bir alan haline gelmiştir. Bu nedenle, FTIR analizinde kollajen tepe noktaları belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Bu pik grupları dişin kollajen grubunun varlığını göstermektedir. Aynı zamanda kontrol dişinde HAp için karakteristik olan piklerde elde edilmiştir. Çizelge 3.13’de gösterilen karakteristik pik noktalarıyla dişin kendi içeriğinde de HAp’nin varlığı görülmüştür [11, 124].

Çizelge 3.13 Degradasyon öncesi FTIR spektrumları

Bileşen Grubu	Soğurma Bandı, cm^{-1}		
	Kontrol dişi	HAp kaplı dişi	Ag(I)-HAp kaplı dişi
Amid I	1644	1640	1637
Amid II	1544	1538	1540
Amid III	1236	1239	1230
CO_3^{2-}	1695	1700	1695
PO_4^{3-}		477	473
	600	571 ve 603	562 ve 599
	963	969	960
	1040 ve 1097	1037 ve 1100	1023 ve 1088
		1934-2072	1943-2064
OH^-	3600	640 ve 3570	3580

HAp ve Ag(I)-HAp kaplı diş için elde edilen FTIR spektrumlarında kolajen yapısı ve HAp katmanını gözlenmiştir. HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dentin örneklerinin FTIR spektrumları, kontrol grubu için kollajen bantların pik şiddetlerinde ki azalmanın dışında hemen hemen aynı soğurma bantlarını sergilemiştir. HAp ve Ag(I)-HAp ile yapılan kaplama sonucunda dişteki apatit yapısından absorpsiyon bantlarının yoğunluğunun arttığı açıkça görülmüştür. Kplama yapılan HAp gruplarından alınan sinyaller daha kuvvetli olduğu için bu gruplarda kolajen yapısını gösteren pikler kontrol dışında gözlenenler kadar keskin değildir. FTIR spektrumlarından elde edilen bileşen gruplarına göre SEM çalışmasında da görülen ve yüzeyi tamamen kapatan malzemenin HAp olduğu doğrulanmıştır.

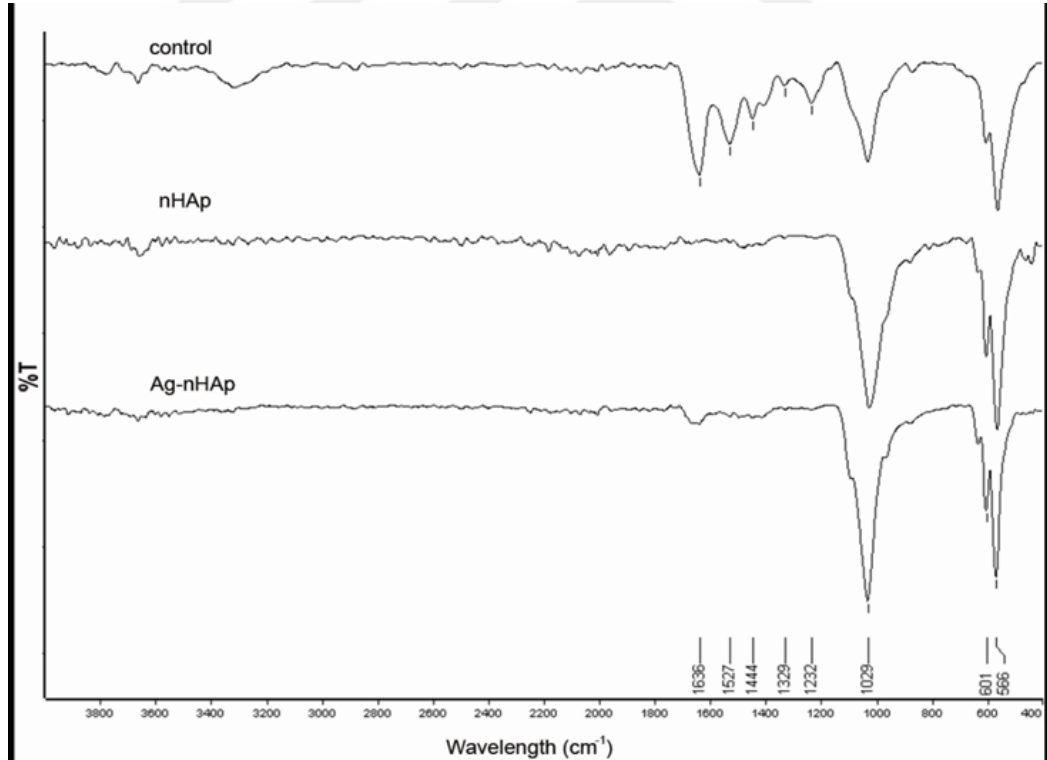


Şekil 3.32 Degradasyondan önceki FTIR spektrumu

Kaplama işleminin ardından elde edilen kaplı dişlerin dentin yüzeylerinden kaplama malzemesinin çıkıp çıkmadığını belirlemek için yapılan degradasyon çalışması

sonrasında yeniden FTIR çalışması yapılmıştır. Bu yolla yüzeyden olası kalkmaların bileşen gruplar üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Tüm numunelerin degradasyondan sonra elde edilen pik yoğunluklarında bir düşüş dışında, karakteristik zirveler aynı dalga boylarında tekrar belirlenmiştir. Kontrol grubunun FTIR spektrumları degradasyon işleminden önce ve sonra değerlendirildiğinde, kollajen pik yoğunluklarında gözle görülür bir fark belirlenememiştir. Bu da bozunma işleminin kolajenler üzerinde dikkate değer bir etki yapmadığı şeklinde değerlendirilebilir. Bir ay boyunca SBF içerisinde tutulduktan sonra hem SEM hem de FTIR sonuçlarında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Karakteristik zirveler yine aynı dalga boylarında, ancak yoğunluklarında kısmi bir düşüşle belirlenmiştir. Bu duruma sıvı içerikten çıkarıldıktan sonra kurutma işleminin sonunda olası nemin neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.33 Degradasyondan sonraki FTIR spektrumu

Kontrol dışında yapılan FTIR analizi spektrumlarında elde edilen sonuç demineralize olmuş dentin yüzeyinde çok az da olsa HAp kalıntılarının olduğudur. Kaplama işleminin ardından alınan spektrumlarda baskın hale gelen HAp bileşen gruplarının varlığı da demineralize olan dentin yüzeyinin yeniden mineral kazandığını göstermektedir. Degradasyon işleminin ardından gözlenen benzer pikler de yeniden mineralleşen dentin yüzeyinin degradasyon sonucunda mineral kaybetmediği şeklinde değerlendirilebilir.

HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dişlerin degradasyonu sonrasında alınan FTIR spektrumlarında organik bileşenleri gösteren dalga boylarındaki piklerin şiddetlerinde az da olsa bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma degradasyon sonrasında HAp'nin karakteristik piklerinin daha belirginleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca degradasyon esnasında ortaya çıkan zayıf karboksilik asitler nedeniyle sıvı ortamın asitlik oranının artmasıyla bazı organik bağların kopması mümkündür. Bunun sonucu olarak fonksiyonel gruplar karakteristik olarak olmasa da grup sayısında değişim olduğundan küçük bir miktar değişim gözlenebilecektir. Bu nedenle organik gruplarda ki bu değişim fonksiyonel grup sayısında azalama olarak değerlendirildiğinden yapı bozulması olarak değerlendirilmemiştir.

Dentin örneklerinin dört hafta boyunca SBF'de bekletilmesi ile uygulanan degradasyon çalışması sonucunda elde edilen FTIR spektrumlarında kontrol dişi, HAp ve Ag(I)-HAp kaplı diş için karakteristik kolajen ve HAp pikleri bozunmadan öncekine benzer şekilde gözlenmiştir. Bu sonuç, SEM analizinden elde edilen sonuçla eş olarak kaplama malzemesinin yüzeyden kalkmadığı şeklinde yorum yapmamızı sağlamıştır.

3.4.2.6. Sitotoksite Analizi

Hücrelerin canlılığının metabolik aktivite ile ölçülmesine dayanan sitotoksite testi (bkz. Bölüm 2.3.2.2) dentin tübül yüzeylerinin kaplama işleminden sonra uygulanan bozunma deneyi ile toksik bir etki oluşturup oluşturmadığını test etmek için yapılmıştır. Bu analiz öncelikle kaplama işleminin ardından kaplama malzemesinin oluşturabileceği toksisiteyi belirlemek için kontrol dişi, HAp ve Ag(I)-HAp kaplı diş için yapılmıştır. Daha sonra uygulanan degradasyon işleminin ardından olası

salımların neden olabileceği toksisiteyi belirlemek için degradasyon sıvısının da toksikliği belirlenmeye çalışılmıştır. ISO 10993-5 Ek C standardına göre yapılan bu analiz de standart değerlendirme kriterine göre hücrelerin canlılığı % 70'in altındaysa toksik olarak kabul edilmiştir. Sitotoksite analizinde hücre canlılık değerlerin belirlenmesinde kullanılan kontrol hücre grubu çoğalması % 100 kabul edilerek diğer gruplar bu kontrole göre değerlendirilmiştir. Çalışma içerisinde alınan sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir farka sahip olup olmadığını belirlemek için F ve t test çalışmaları yapılmıştır. Testler sonucunda elde edilen sonuçlar çizelgeler ve şekil olarak çalışma içeriğinde sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirme sonuçları ise anlamlı bir fark varsa farklı küçük harflerle anlamlı bir fark yoksa aynı küçük harflerle şekil üzerinde gösterilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarının sonuçları etkileyen faktörlerden birisi üretilen HAp biyomalzemelerinin morfolojik özellikleridir [183]. Evans ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da hücre etkileşimi ve sonuç olarak, herhangi bir pozitif ve negatif etki, parçacıkların kimyasal yapısından bağımsız olarak katı numunenin fiziksel özelliklerinden etkilenebilen hücre-parçacık etkileşimi ile doğrudan ilişkilendirmiştir. Bu bilgiye göre üretilen HAp biyomalzemeleri dış üzerine kaplandıktan sonra kaplanan örneklerin morfolojisi, parçacıkların topaklaşması ve kristal büyüklüğü gibi fiziksel özellikler, çalışılan hücrelerin tepkisini değiştirebilir. Bu da hücre canlılık sonuçları üzerinde etki edebilir. Bu durumda HAp ve Ag(I)-HAp kaplı dış grupları arasındaki fark için sadece metal iyon varlığı düşünülmesi eksik kalacaktır. Bu etkinin değerlendirmeye alınıp alınmamasına karar vermek için kaplama işleminden önce yapılan SEM çalışması ile numunelerin yüzey morfolojileri incelenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.3). Yüzey morfolojileri hem HAp için hem de farklı katkı oranlı Ag(I) iyonları eklenmiş Ag(I)-HAp grupları için benzer olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonucu olarak bu çalışma içeriğinde hücre canlılığı üzerinde morfolojinin etkisi değerlendirilmemiştir. Hücre kültürü çalışmalarının sonuçları etkileyen faktörlerden bir diğeri ise Ca/P oranı ve dolayısıyla malzemenin sahip olduğu safsızlık değerleridir [183]. Malzemenin sahip olduğu CaO, β -TCP, HAp fazları farklı çözünme hızlarına sahip olduğundan bu hızlardaki farklılıklar çevre ortamın pH'sini değiştireceğinden değerlendirmelerde üretilen biyomalzemelerin Ca/P oranı da dikkatle incelenmelidir. Ca/P oranlarının

incelenmesi için yapılan bu çalışmada çöktürme yöntemiyle üretilen HAp ve Ag(I)-HAp için elde edilen Ca/P değerleri birbirine çok yakın olduğu için çözünme özelliklerinin farklı olmayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle malzeme toksisitesi üzerinde etkisi olmadığı düşünüldüğünden değerlendirilmeye alınmamıştır. Yaptığımız sitotoksiste çalışmalarının sonuçlarını etkileyen ana faktör Ag(I) iyon varlığı olarak düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında en uygun katkılama oranına sahip Ag(I)-HAp ile HAp arasındaki iyon farkından ortaya çıkabilecek etkiler değerlendirilmeye alınmıştır.

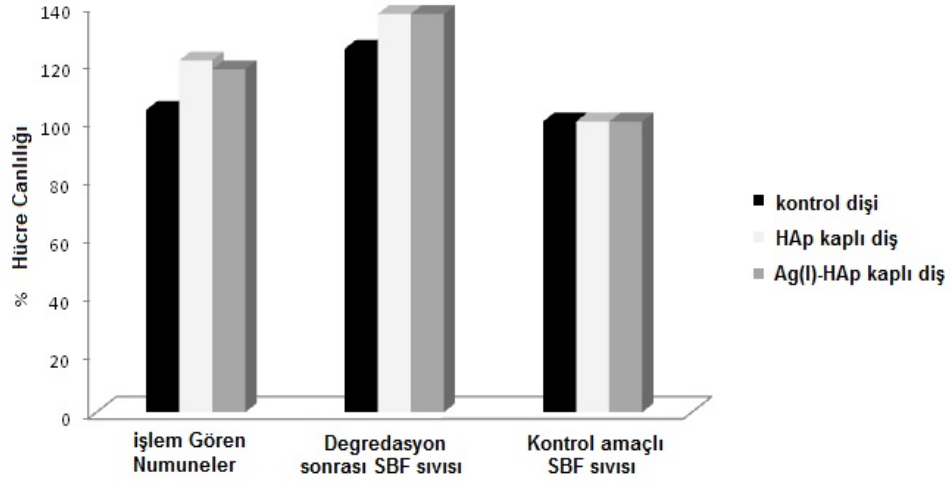
Sitotoksiste testinde hem kaplama yapılan dentin numuneleri (Şekil 3.34 ve Çizelge 3.14) hem de SBF'ye daldırma işleminden sonra kalan sıvılar (Şekil 3.34 ve Çizelge 3.15) analiz edilmiştir. Tüm grupların hücre canlılık sonuçları % 70'in oldukça üzerindedir. Bu değerler standartta tanımlanan kritik değerlerden daha yüksek olduğu için numunelerin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca HAp kaplı diş için elde edilen hücre canlılık değeri ile kontrol dişi ve Ag(I)-HAp kaplı diş için elde edilen hücre canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farka sahip bir hücre canlılık değeri olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.14 Sitotoksiste Analiz Sonuçları

Numune	% Hücre Canlılık	Standart Sapma	Ölçüm Belirsizliği $\pm$
Kontrol Dişi	103,640	4,546	9,09
Hap Kaplı Diş	121,776	3,274	6,55
Ag(I)-HAp Kaplı Diş	117,782	4,985	6,97
Kontrol	100,000	-	-

Ag(I) iyonlarının antimikrobiyal özellik olarak faydalı etkileri Bölüm 3.4.1'de gösterilmiştir. Ancak gümüşün aşırı kullanımı toksik etki gösterebilir. Ag(I)-HAp kaplı diş örnekleri üzerindeki hücrelerin canlılığı HAp kaplı diş ile karşılaştırıldığı zaman hücre canlılıklarında anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Ag(I)-HAp kaplı diş

grupları göz önüne alındığında hücre canlılık sonuçlarında, HAp kaplı diş grubuna göre bir düşüş elde edilmiştir. Bu sonuca göre, HAp kaplı dişin hücre canlılık üzerinde olumlu bir etki gösterdiğinden bahsedilebilir. Ancak Ag(I)-HAp kaplı diş için elde edilen hücre canlılık değerlerinin de test standardında belirtilen kritik % 70 değerinin oldukça üzerinde olduğu için toksik değildir şeklinde değerlendirilmiştir. Hücrelerin sahip oldukları çoğalma hızlarına gümüşün etki etmesiyle bu değer az okunduğu düşünülebilir. Çoğalma için bir süre daha beklenildiğinde Ag(I)-HAp kaplı dişte de HAp kaplı diş gibi benzer bir sonuç elde edilebileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak Ag(I)-HAp biyomalzemesinin gümüş salım çalışmalarından elde edilen sonuçlarla beraber, dentin hassasiyet tedavileri esnasında gerçekleştirilecek enfeksiyonları ilk anda engelleyebilecek ya da tedavi edilen bölgede daha önceden var olan enfeksiyonu ortadan kaldıracak bir kullanım için uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 3.34 Sitotoksosite Sonuçları

Kaplama işleminin ardından elde edilen sitotoksosite çalışmalarında bütün grupların toksik olmadığı sonucu elde edilmiştir. Çalışma içeriğinde kaplama işleminin biyolojik sıvılara karşı etkinliğini gözlemlemek amaçlı yapılan degradasyon çalışması sonucunda ürünlerin degrade olmadığı sonucu elde edilmiştir. Degradasyon işleminin esnasında degradasyon sıvısı ile gerçekleşen etkileşim sonucunda olası

salım ve kopmalar degradasyon sıvısında toksikolojik olarak değişikliğe neden olabilecektir. Bu nedenle sitotoksisite analizi degradasyon çalışmasının sonunda degradasyon sıvısı için de yapılmıştır. Bu yolla degradasyon sıvısının toksikliğindeki değişimin kaynağı belirlenmeye çalışılmıştır. Degradasyon sıvısı için elde edilen hücre canlılık değerleri Çizelge 3.15’de gösterilmiştir. Degradasyon sonrası elde edilen degradasyon sıvıları için, ISO 10993-5 Ek C standardına göre 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16 ve 1:32 seyreltme oranlarında da sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Bu seyreltme oranlarının her birinde de hücre canlılık sonuçları % 70’in üzerinde elde edilmiştir. Seyreltme değerine bakıldığı zaman, çevre oksijenin en uygun olduğu değer 1:16 seyreltme oranı olduğu görülmektedir. Bu seyreltme oranında hücrelerin yaşayabilecekleri en yüksek seviyeye ulaştıkları görülmüştür. Böylece, 1:16; optimum hücre büyüme değeri olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çizilen şekilde 1:16 seyreltme oranı hesaba katılmıştır.

Şekil 3.34’den görülebileceği üzere bütün çalışma gruplarında hücre canlılık değerlerinde artış gözlenmiştir. HAp kaplı diş ve Ag(I)-HAp kaplı diş canlılık oranlarında sırasıyla % 16 ve % 15 artış belirlenmiştir. Eğer Ag(I)-HAp kaplı dişin hücre canlılık değerinde belirgin bir azalma gözlemlenseydi degradasyon sıvısında toksisiteye neden olduğu sonucu ortaya çıkacaktı. Ancak degradasyon sıvılarındaki sitotoksisite çalışmalarında hücre canlılıkları % 70’in üzerinde olduğu için ve başlangıçtaki degradasyon çalışmalarından elde edilen hücre canlılık değerlerinden daha düşük olmadığı için hem HAp’nin hem de Ag(I)-HAp’nin uygulamalarda toksikolojik bir etkisinin olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Hücre canlılık değerlerin azalması toksisiteyi temsil ettiğinden elde edilen değerlerin standart gerekliliklerinin üzerinde olması tedavi amaçlı yapılan uygulamalarda önemlidir. Gümüş iyonu gibi toksik özellikleri bilinen iyonların insanlarda aşırı seviyelerde var olması toksisiteye neden olacağı bilinmektedir [183, 184]. Bununla birlikte, genel olarak toksik olarak görülen gümüş iyonlarının ancak belirli bir değer üzerinde toksikolojik etki gösterdiği de bilinmektedir. Küçük konsantrasyonlarda toksik etki göstermeyen gümüş iyonları hücre canlılığını da arttırdığı bilinmektedir. Mevcut araştırmada seçilen Ag(I) iyonu ve % katkı oranı ile toksisite ve biyolojik tepkiler arasındaki ilişkiyi ölçmek ve karşılaştırmak için daha önceden yapılmış bir uygulama yoktur. Genel olarak Ag(I)-HAp kaplı diş üzerinde

yapılan sitotoksisite çalışmalarından hücrelerle aktif etkileşim sağlandığı ve hücre canlılığına negatif bir etkinin olmadığı görülmüştür. Dahil edilen gümüş iyonu katkısından bağımsız olarak çalışılan HAp kaplı dişte de benzer sonuç elde edilmiştir.

Embriyolojik aşamada dişin gelişim ve oluşum süreçlerinde protein yapısının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [184]. Her ne kadar kollajen (tip I) dentin organik matrisinin ana bileşeni olsa da, dentin fosforin ve dentin matriks protein 1 (DMP1) gibi çeşitli kollajen olmayan proteinler (NCP) diş oluşumunda ve mineralleşmenin kolaylaşmasında hayati bir rol oynamaktadır [186].

Dentin yüzeyi üzerindeki tabakasını kaybederek dentin hassasiyeti oluşan bu bölgelerde HAp gibi mineral kaynaklarını kullanarak kaplamak hem hassasiyet giderme de hem de yeniden mineralleşmede etkili bir yol olduğu görülmüştür. FTIR sonuçlarında kontrol dişinde kaplamadan önce çok az bir yoğunlukta gözlemlenen HAp'nin karakteristik pikleri kaplama sonunda daha belirgin hale gelmiştir. SEM görsellerinde de dentin tübül yüzeyinin kaplama sonunda görünmez hale gelmesi de bu yüzeydeki mineral varlığını göstermektedir. Bu sonuçlar orada kesin bir mineralleşme olacağı ve kollajen fibrillerinin büyümesini değiştireceği anlamına gelmese de biyomimetrik olarak dentin tübüllerinin tıkanabileceğini göstermiştir. Degradasyon işlemi sonucunda yapılan SEM ve FTIR analizlerinde bu biyomalzemelerin hala varlığını ilk anda ki gibi devam ettirmesi de kollajen iskelet yapısına HAp minerallerinin yerleşebilmesi düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Çizelge 3.15 Degradasyon Sıvıları Sitotoksosite Analizi Sonuçları

Numune	Seyreltme Oranı	% Hücre Canlılık	Standart Sapma	Ölçüm Belirsizliği $\pm$
Kontrol Dişi	1:2	88,871	3,965	7,93
	1:4	121,306	1,684	3,37
	1:8	118,531	2,529	5,06
	1:16	125,986	3,123	6,25
	1:32	134,585	3,758	7,52
HAp Kaplı Diş	1:2	103,837	4,806	9,61
	1:4	139,048	5,800	6,60
	1:8	139,320	3,781	7,56
	1:16	137,850	3,344	6,69
	1:32	123,483	4,674	9,35
Ag(I)-HAp Kaplı Diş	1:2	98,980	4,854	8,71
	1:4	135,354	4,079	7,34
	1:8	136,764	2,488	6,53
	1:16	139,041	5,312	7,58
	1:32	151,102	3,457	2,86

Bu çalışmada elde edilen SEM ve FTIR sonuçlarına göre tüm HAp tipleri etkili bir tübül tıkaması göstermiştir. Her iki gruptan elde edilen kütle kaybı (bozulma yüzdesi) sonuçları göz önüne alındığında üretilen ve kaplanan tozların kimyasal kararlılığının olduğu görülmüştür. Sitotoksosite çalışmaları sonucunda da katkılama oranının herhangi bir toksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Sadece ticari HAp ürünlerini kullanarak daha öncesinde yapılmış çalışmaların bulgularıyla çalışmamız içeriğinde elde edilen sonuçlar paraleldir [3, 22, 65, 68, 186–189]. Bu çalışma dentin hassasiyet giderme amaçlı üretilen HAp gruplarıyla, kaplama mekanizması ve

karakterizasyon aşamalarıyla literatüre katkı sağlayacak içeriktedir. Uygulama da tercih edilen biyolojik vücut sıvısı ve tükürük etkisinin yanında asit ataklarının veya mekanik kuvvetlerin HAp katmanının stabilitesi üzerindeki etkilerinin de incelenmesi çalışma için yeni ilgi alanları olarak değerlendirilmiştir.



4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında dişte herhangi bir dental hasar veya patoloji olmadığı halde sıcak-soğuk sıvı teması, dokunma veya kimyasal uyarılar sonucunda oluşan dentin hassasiyetinin giderilmesi tedavilerinde dentin tübüllerinin kaplanması amacıyla hidroksiapatit ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 Ag iyonları katkılanmış hidroksiapatit biyomalzemeleri çöktürme metoduyla üretilmiştir. Dentin üzerine bakteri yapışması kolayca gerçekleşebildiği için klinik tedavilerde bakteriyel direnci olan bir biyomalzemenin tercihi önemlidir. Bu tez çalışmasında farklı katkı oranlarında gümüş iyonları katkılanmış hidroksiapatit biyomalzemeleri ile dentin hassasiyet giderme tedavilerinde bakteriyel direncinin artırılması ve antibakteriyel bir alan oluşturulması hedeflenmiştir.

Dentin tübül kaplama çalışması yapılmadan önce bu tez çalışmasında çöktürme yöntemiyle üretilen hidroksiapatit tozlarının FDA, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından tanımlı kristalografik, morfolojik, tane boyutu, bileşen grupları gibi fizikokimyasal ve biyouyumluluk, biyobozunurluk ve bakteriyel direnci gibi biyolojik gereklilikleri sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. Bununla beraber hidroksiapatite katkılanan gümüş iyonlarının klinik tedavilerde biyolojik sıvılarla teması sonrası yapıdan uzaklaşıp toksik bir etki oluşturup oluşturmadığının test edilmesi için gümüş salım tayini yapılmıştır. Bu ön analizler sonucunda en uygun olan katkısız hidroksiapatit ve % 0,40 gümüş iyonu katkılanmış hidroksiapatit dentin tübül yüzeyine kaplanmıştır. Kaplama işleminin ardından kaplama etkinliğinin ve kalıcılığının test edilmesi için degradasyon çalışması yapılmıştır.

Yapılan üretim, fiziksel, kimyasal ve biyolojik karakterizasyon, kaplama işlemi ve kaplama işleminin etkinliğinin kontrol edildiği bu çalışmadan çıkan sonuçlar aşağıdaki gibi kısa bölümlerle sunulmuştur.

Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

Çöktürme yöntemiyle üretilen hidroksiapatitin ve gümüş katkılı hidroksiapatitlerin faz tanımlaması ve faz safsızlıklarının belirlenmesi için yapılan XRD analiz sonuçlarına göre tüm XRD modellerinin Uluslararası Kırılma Verileri Merkezi (ICDD) dosyaları ile tutarlı karakteristik zirvelere sahip olduğu görülmüştür.

Hidroksiapatit ve farklı gümüş katkılı gümüşlü hidroksiapatit numunelerinin XRD modellerinin hepsinde CaO'nun eser elementleri gözlemlenmemesine rağmen çok az miktarda β -TCP fazına ait pikler gözlenmiştir. Burada gözlenen β -TCP fazı % 0,5'inde altında gözlemlendiği için malzeme safsızlığında dikkate değer bir oran olarak değerlendirilmemiştir. Kalsiyum fosfat (CaP) bazlı en çok incelenen ve kullanılan ayrıca klinik olarak test edilmiş sentetik malzemeler hidroksiapatit, β -trikalsiyum fosfat (β -TCP - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ve iki fazlı HAp/ β -TCP karışımları olduğundan üretimi yapılan ürünlerde çok az β -TCP gözlemlenmesinin klinik uygulamalarda sorun teşkil etmeyeceği düşünülmüştür.

Çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan hidroksiapatit ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 oranlı Ag iyonları eklenmiş gümüşlü hidroksiapatit numunelerinin sahip olduğu PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} bileşen gruplarının belirlenmesi için yapılan FTIR analizi sonucunda hidroksiapatitin sahip olduğu karakteristik CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- grupları literatürle uygun olarak belirlenmiştir. Üretilen hidroksiapatit tozları için yapılan FTIR analizlerinde sentez parametrelerinden kaynaklanan H_2O grubu pikleri gözükse de NO_3^- ve NH_4^+ gruplarına ait pikler gözlenmemiştir. Diş tedavileri gibi biyolojik bir uygulama amacı var olan bu çalışma da bu uçucu grupların gözlemlenmemesi olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Katkısız hidroksiapatit ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 oranlı Ag iyonları katkılı hidroksiapatit numunelerinin SEM görüntülemelerinde tane boyutu < 500 nm seviyelerinde olan, az deformeli, düzgün dağılımlı, küresel ve düzenli şekilli parçacıklara sahip ve bal peteği desenli bir morfoloji gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışma içeriğinde seçilen gümüş katkılama oranındaki değişimin hidroksiapatit morfolojisi üzerinde bir etki göstermediği görülmüştür.

Üretilen hidroksiapatit tozları dentin tübüllerinde kaplama amaçlı kullanımın yanında gümüş katkısıyla beraber antibakteriyel bir alan hedeflenmiştir. Hidroksiapatit tozlarının sahip olduğu bu pürüzsüz yüzey mikroorganizmaların yapışma ihtimalini azaltacaktır. Mikroorganizmalarla ilk karşılaşacak yer bu yüzey olacağından pürüzlülüğünün az olması tedavinin etkinliği için pozitif bir katkı olarak değerlendirilmiştir.

SEM-EDS ve ICP-OES analiz çalışmaları sonucunda kalsiyum fosfat seramikleri için tanımlanan Ca/P değeri hidroksiapatit ve gümüşlü hidroksiapatitler için 1.65 – 1.67 değerleri arasında elde edilmiştir. Bu sonuçlarda XRD, FTIR analizlerinden elde edildiği gibi katkısız hidroksiapatit mineralini göstermektedir. Üretimde elde edilen bu değer diş hekimliği ve ortopedi tedavilerinde kullanımı düşünülen HAp için istenen bir Ca/P değeridir. Aynı zamanda FDA tarafından biyolojik uygulamalar için geçerli Ca/P oranı değeriyle tez çalışması içeriğinde üretilen malzemelerin Ca/P oranlarının oldukça uyumlu olduğu sonucu elde edilmiştir.

Çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan hidroksiapatit ve % 0,05 - % 0,20 - % 0,40 oranlı Ag(I) iyonları eklenmiş gümüşlü hidroksiapatit numunelerinin yoğunluk değerleri sırasıyla 3,051, 3,089, 3,112 ve 3,140 gr/cm³ olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler 3,00 – 3,22 gr/cm³ teorik katkısız hidroksiapatit yoğunluk değer aralığındadır. Bu elde edilen sonuç hidroksiapatite yapılan gümüş iyonu katkısıyla tozların kapladığı hacmi azalttığı ve daha yoğun bir malzeme haline getirdiği sonucu elde edilmiştir. Bununla birlikte yapılan gümüş katkı oranlarındaki artışla doğru orantılı olarak azalan bir hacim ve daha yoğun bir malzeme sonucu elde edilmiştir. Bu gümüş ilavesiyle beraber daha sıkı bir yapının oluşacağını göstermektedir. Artan yoğunluk sonucunda tanelerin küçülmesi dentin tübülü gibi kaplama çalışmalarında daha iyi istiflenmeyi sağlayacağından ve dentin tübül kanalları içine malzemenin girme şansını arttıracığından % 0,40 Ag(I)-HAp biyomalzemesi en etkin malzeme olarak değerlendirilmiştir.

Çöktürme yöntemiyle üretimi yapılan hidroksiapatit ve Ag(I) iyonları eklenmiş gümüşlü hidroksiapatit biyomalzemelerin herbirinin tane boyutları SEM ve Zetasizer analizleri ile belirlenmiştir. Her iki analiz sonucunda da bütün hidroksiapatitlerin <500 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen tane boyut değerleri ile göre FDA tarafından biyolojik uygulamalarda kullanılacak CaP biyoseramik ürünleri için tanımlanan kriterleri sağladığı görülmüştür.

Gümüş Salım Tayini

% 0,05 - % 0,20 - % 0,40 gümüş katkılı hidroksiapatit tozları için yapılan fiziksel ve kimyasal analizlerin yanında katkılanan gümüş iyonlarının biyolojik etkiler nedeniyle yapıdan salınarak toksik bir etki ortaya çıkarıp çıkarmadığını tespit etmek

amacıyla gümüş salım tayini çalışması yapılmıştır. Gümüş iyonlarının biyolojik etkiler sonucunda göstereceği salım profilinden elde edilen sonuçlara göre dentin tübüllerinde tıkama için en ideal gümüş katkı oranı belirlenmiştir.

Bu *in vitro* çalışma içeriğinde 1/2 günden 30 güne kadar eşlenik vücut sıvısı içerisinde bekletildikten sonra ICP-OES cihazıyla gümüş salım tayini yapılmıştır. Yapıya giren gümüş iyonlarından % 0,05 gümüş katkı için % 0,060'ı, % 0,20 gümüş katkı için % 0,020'si ve % 0,40 gümüş katkı için % 0,009'u salım yapmıştır. Buda tez çalışması içeriğinde tercih edilen katkı oranlarındaki artışla beraber azalan bir salım sonucunu vermiştir. Bu yüzde değerlerine göre yapıya tutunan gümüş iyonlarının minimum 0,020 ppm ve maksimum 0,035 ppm gibi çok düşük değerlerde salım yaptığı sonucu elde edilmiştir. Biyolojik uygulamalar için yapıda bulunan gümüş miktarının salım değerinin 10 ppm'den fazla olmaması gerektiğinden yapıdan salım yapan gümüşler insan hücreleri için zehirli etki oluşturmayaacağı sonucu elde edilmiştir. 10. günden sonra salım değerlerinde dikkate değer bir artma veya azalma gözlenmemiş ve bu noktadan sonra sabitlemiştir. Elde edilen sabitleme sonucu bu noktadan sonra salımın gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen *in vitro* salım değerleri toksik bir etki oluşturacak değerlerde olmadığından diş tedavilerinde kullanılabileceği sonucu elde edilmiştir. Bütün gruplarda başlangıçta gerçekleşen ani salımlarında diş tedavilerinde olası enfeksiyon bulaşmalarını önleme de pozitif bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ürünlerin kullanım yerlerine eş özellikte bir ortam taklit edilerek yapılan degradasyon çalışmasında ürünlerin bozunmadığı görülmüştür. Gümüş içeriğinden dolayı olası toksiklik durumu da bu çalışma içeriğinde incelenmiştir. Sitotoksisite çalışması sonucunda % 70 hücre canlılık değerinin oldukça üzerinde hücre canlılık değerleri elde edilerek standartta istenen canlılık değerleri rahatlıkla sağlanmıştır. Çalışmada tercih edilen katkılama oranlarının sonuçlar üzerinde etkinliği salım, degradasyon ve sitotoksisite çalışmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlara göre katkılama arttıkça salımın azaldığı, ürünlerin daha az bozunduğu ve degradasyon testinin yapıldığı ortamın toksikliğine pozitif katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlarla üretimi yapılan gümüş iyonları katkılanmış hidroksiapatit hem iyileşmeye katkı sağlayan antimikrobiyal özellikleri hem de ppb düzeyinde gözlenen salım

değerlerinden dolayı diş hassasiyet tedavisi çalışmalarında kullanılabilecek bir biyomalzeme olabileceği sonucu elde edilmiştir.

Bu çalışmadan ve fiziksel ve kimyasal karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre hidroksiapatit ve % 0,40 gümüş katkılı hidroksiapatit biyomalzemelerinin dentin tübüllerinin kaplanması amacıyla kullanılmasına karar verilmiştir.

***In Vitro* Dentin Tübül Kaplama**

Dentin hassasiyetinin tedavisinde dentin tübüllerinin kaplanması amacıyla çöktürme yöntemiyle üretilen nano boyutta hidroksiapatit ve % 0,40 gümüş katkılı hidroksiapatitler insan bünyesinde tedavi amaçlı kullanılacak olması nedeniyle tez içeriğinde ifade edilen fiziksel, kimyasal ve biyolojik bir dizi karakterizasyon aşamalarından geçirilerek kaplama öncesi uygun bir malzeme olup olmadığına karar vermeye çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucunda uygunluğu belirlenen bu biyomalzemeler yapay tükürük içinde dentin tübülleri üzerine kaplanmıştır.

Kaplama kapasitesini belirlemek için yapılan SEM çalışmalarında dentin yüzeyinin tamamen kaplandığı ve dentin tübüllerinin görünmez hale geldiği sonucu elde edilmiştir. Kaplanan yüzeyin fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkiler sonucunda açılmaması kaplamanın ve yüzeyde tutunmanın da etkinliğini gösterecektir. Kaplama etkinliğinin test edildiği çalışmalara ek olarak bu tez çalışmasında ağız ortamının sıvı hali taklit edilerek yapay tükürük ve eşlenik vücut sıvı ile biyolojik degradasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla yapılan 10 aylık süreye tekabül eden degradasyon çalışmalarında bu biyomalzemelerin ve dişin çok çok az miktarda degrade olduğu sonucu elde edilmiştir. Bununla beraber gümüş katkılı hidroksiapatitin katkısız hidroksiapatite göre daha az degrade olduğu sonucu elde edilmiştir.

Gümüş katkılı hidroksiapatitin çalışma içeriğinde tercih edilen katkı oranıyla beraber hidroksiapatit tozlarına göre daha az degrade olması antibakteriyel alan hedeflenerek yapılan gümüş ilavesinin yanında aynı zamanda yüzeyde ki tutunmaya da pozitif bir katkısının olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlarla bu katkı oranına sahip bir ürünün çalışmalarda kullanılması için bir avantaj olarak değerlendirilmiştir.

Degradasyon çalışması sonucunda olası morfolojik değişimlerin de belirlenmeye çalışıldığı bu çalışma da degradasyon sonrasında yapılan SEM analizlerinde dentin yüzeylerinin hala kapalı kaldığı ve kaplama sürecindeki olası safsızlıkların yüzeyden uzaklaştırıldığı sonucu elde edilmiştir. Degradasyondan sonra kaplama malzemelerinde morfolojik olarak hiçbir değişikliğin gözlemlenmediği bu çalışmada degradasyonun kaplama malzemelerinin bileşen gruplarına etkisi de belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan FTIR analizleri sonucunda hidroksiapatit için geçerli olan karakteristik pikler hem degradasyon öncesinde hem de degradasyon sonrasında aynı dalga boyu noktalarında tekrar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarda ürünün hem yüzeyden kalkmadığını hem morfolojik olarak yapısının bozunmadığını hem de ana bileşen yapısının hala değişmeden kaldığını göstermiştir.

Herhangi bir bozunmanın gerçekleşmediği sonucu alınan bu çalışmalara ek olarak gümüş varlığı nedeniyle degradasyon sonrası oluşabilecek toksik bir etkinin varlığının belirlenmesi için degradasyona tabi tutulan numunelerin toksikolojik durumları da test edilmiştir. Sitotoksikite testi hem kaplama yapılan dentin numuneleri hem de degradasyon işleminden sonra kalan degradasyon sıvıları için yapılmıştır. Tüm grupların hücre canlılık sonuçları standartta belirtilen minimum hücre canlılık değeri olan % 70'in oldukça üzerinde bulunmuştur. Bu değerler standartta tanımlanan kritik değerlerden daha yüksek olduğu için degradasyonun herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu yolla vücut ortamı taklit edilerek yapılan bozunma çalışması sonucunda kaplama malzemesinin taklit sıvısıyla temasının herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı sonucu elde edilmiştir. Bu çalışma içeriğinde tercih edilen % 0,40 katkı oranlı gümüş hidroksiapatitin bozunmaması ve degradasyon sonrasında yüzeyde tutunmaya devam etmesi dentin hassasiyet tedavileri esnasında gerçekleşebilecek enfeksiyonları ilk anda engelleyebilecek ve de tedavi edilen bölgede daha önceden var olan enfeksiyonu ortadan kaldırabilecek bir biyomalzeme olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak ticari olarak temin edilebilir hidroksiapatitler yerine tez çalışması içeriğinde çöktürme yöntemiyle üretilen hidroksiapatitlerin de diş hassasiyetlerini gidermek için dentin tübül kaplama çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılabileceği sonucu elde edilmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013.
- [2] M. Balooch, S. Habelitz, J. H. Kinney, S. J. Marshall, and G. W. Marshall, "Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization," *J. Struct. Biol.*, vol. 162, no. 3, pp. 404–410, 2008.
- [3] S. Baglar, U. Erdem, M. Dogan, and M. Turkoz, "Dentinal tubule occluding capability of nano-hydroxyapatite; The in-vitro evaluation," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 81, no. 8, pp. 843–854, 2018.
- [4] M. R. de Oliveira Carrilho, F. R. Tay, D. H. Pashley, L. Tjäderhane, and R. M. Carvalho, "Mechanical stability of resin–dentin bond components," *Dent. Mater.*, vol. 21, no. 3, pp. 232–241, 2005.
- [5] C. H. Chu, E. C. M. Lo, and H. C. Lin, "Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children," *J. Dent. Res.*, vol. 81, no. 11, pp. 767–770, 2002.
- [6] J. C. Llodra, A. Rodriguez, B. Ferrer, V. Menardia, T. Ramos, and M. Morato, "Efficacy of silver diamine fluoride for caries reduction in primary teeth and first permanent molars of schoolchildren: 36-month clinical trial," *J. Dent. Res.*, vol. 84, no. 8, pp. 721–724, 2005.
- [7] H. P. Tan, E. C. M. Lo, J. E. Dyson, Y. Luo, and E. F. Corbet, "A randomized trial on root caries prevention in elders," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 10, pp. 1086–1090, 2010.
- [8] W. Zhang, C. McGrath, E. C. M. Lo, and J. Y. Li, "Silver diamine fluoride and education to prevent and arrest root caries among community-dwelling elders," *Caries Res.*, vol. 47, no. 4, pp. 284–290, 2013.

- [9] C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, C. L. Popa, M. Motelica-Heino, and D. Predoi, "Evaluation of samarium doped hydroxyapatite, ceramics for medical application: Antimicrobial activity," *J. Nanomater.*, vol. 2015, p. 14, 2015.
- [10] M. Vallet-Regí, "Revisiting ceramics for medical applications," *Dalt. Trans.*, no. 44, pp. 5211–5220, 2006.
- [11] M. Turkoz, A. O. Atilla, and Z. Evis, "Silver and fluoride doped hydroxyapatites: investigation by microstructure, mechanical and antibacterial properties," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 8, pp. 8925–8931, 2013.
- [12] M. Addy and P. Mostafa, "Dentine hypersensitivity. I. Effects produced by the uptake in vitro of metal ions, fluoride and formaldehyde onto dentine," *J. Oral Rehabil.*, vol. 15, no. 6, pp. 575–585, 1988.
- [13] D. H. Pashley, M. J. Livingston, O. W. Reeder, and J. Horner, "Effects of the degree of tubule occlusion on the permeability of human dentine in vitro," *Arch. Oral Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 1127–1133, 1978.
- [14] R. Murugan and S. Ramakrishna, "Development of nanocomposites for bone grafting," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 65, no. 15–16, pp. 2385–2406, 2005.
- [15] F. Korkusuz and P. Korkusuz, "Kalsiyum hidroskiapatit seramiklerin ortopedide kullanımı," *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, vol. 31, pp. 63–67, 1997.
- [16] N. George, J. Faoagali, and M. Muller, "Silvazine (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates," *Burn. J. Int. Soc. Burn Inj.*, vol. 23, no. 6, pp. 493–495, 1997.
- [17] A. P. Adams, E. M. Santschi, and M. A. Mellencamp, "Antibacterial properties of a silver chloride-coated nylon wound dressing," *Vet. Surg.*, vol. 28, no. 4, pp. 219–225, 1999.
- [18] B. Singh, A. K. Dubey, S. Kumar, N. Saha, B. Basu, and R. Gupta, "In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of wet chemically prepared $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ($0.0 \leq x \leq 0.5$) hydroxyapatites," *Mater. Sci. Eng. C*, vol.

31, no. 7, pp. 1320–1329, 2011.

- [19] A. Bahadir, C. Ergun, and M. Baydogan, “Synthesis and characterization of Ag doped hydroxylapatite as an antibacterial scaffolds material,” in *Defect and Diffusion Forum*, 2009, vol. 283, pp. 250–255.
- [20] K.-H. Lau, C. Goodwin, M. Arias, S. Mohan, and D. J. Baylink, “Bone cell mitogenic action of fluoroaluminate and aluminum fluoride but not that of sodium fluoride involves upregulation of the insulin-like growth factor system,” *Bone*, vol. 30, no. 5, pp. 705–711, 2002.
- [21] M. Mirzaee, M. Vaezi, and Y. Palizdar, “Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 675–684, 2016.
- [22] R. Kulal, I. Jayanti, S. Sambashivaiah, and S. Bilchodmath, “An in-vitro comparison of nano hydroxyapatite, novamin and proargin desensitizing toothpastes-A SEM Study,” *J. Clin. diagnostic Res. JCDR*, vol. 10, no. 10, p. ZC51, 2016.
- [23] M. L. Mei, L. Ito, Y. Cao, E. C. M. Lo, Q. L. Li, and C. H. Chu, “An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy,” *J. Dent.*, vol. 42, no. 4, pp. 395–402, 2014.
- [24] L. Niu *et al.*, “Biomimetic remineralization of dentin,” *Dent. Mater.*, vol. 30, no. 1, pp. 77–96, 2014.
- [25] H. Yang, L. Zhang, and K.-W. Xu, “Effect of storing on the microstructure of Ag/Cu/HA powder,” *Ceram. Int.*, vol. 35, no. 4, pp. 1595–1601, 2009.
- [26] L. P. D. da Cruz, R. G. Hill, X. Chen, and D. G. Gillam, “Dentine Tubule Occlusion by Novel Bioactive Glass-Based Toothpastes,” *Int. J. Dent.*, vol. 2018, 2018.
- [27] P. Saravanapavan, J. E. Gough, J. R. Jones, and L. L. Hench, “Antimicrobial macroporous gel-glasses: dissolution and cytotoxicity,” in *Key Engineering*

Materials, 2004, vol. 254, pp. 1087–1090.

- [28] E. Hidalgo and C. Dominguez, “Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts,” *Toxicol. Lett.*, vol. 98, no. 3, pp. 169–179, 1998.
- [29] W. J. Basirun, B. Nasiri-Tabrizi, and S. Baradaran, “Overview of hydroxyapatite–graphene nanoplatelets composite as bone graft substitute: Mechanical behavior and in-vitro biofunctionality,” *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 177–212, 2018.
- [30] J. Terra, M. Jiang, and D. E. Ellis, “Characterization of electronic structure and bonding in hydroxyapatite: Zn substitution for Ca,” *Philos. Mag. A*, vol. 82, no. 11, pp. 2357–2377, 2002.
- [31] P. Rulis, L. Ouyang, and W. Y. Ching, “Electronic structure and bonding in calcium apatite crystals: Hydroxyapatite, fluorapatite, chlorapatite, and bromapatite,” *Phys. Rev. B*, vol. 70, no. 15, p. 155104, 2004.
- [32] D. Haverty, S. A. M. Tofail, K. T. Stanton, and J. B. McMonagle, “Structure and stability of hydroxyapatite: density functional calculation and Rietveld analysis,” *Phys. Rev. B*, vol. 71, no. 9, p. 94103, 2005.
- [33] P. N. Lim, E. Y. Teo, B. Ho, B. Y. Tay, and E. S. Thian, “Effect of silver content on the antibacterial and bioactive properties of silver-substituted hydroxyapatite,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 101, no. 9, pp. 2456–2464, 2013.
- [34] S. Miao *et al.*, “Fabrication and evaluation of Zn containing fluoridated hydroxyapatite layer with Zn release ability,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 2, pp. 441–446, 2008.
- [35] J. Dobias and R. Bernier-Latmani, “Silver release from silver nanoparticles in natural waters,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 9, pp. 4140–4146, 2013.
- [36] Y. Sogo, T. Sakurai, K. Onuma, and A. Ito, “The most appropriate (Ca+ Zn)/P molar ratio to minimize the zinc content of ZnTCP/HAP ceramic used in the

- promotion of bone formation,” *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.*, vol. 62, no. 3, pp. 457–463, 2002.
- [37] P. Yang, Z. Quan, C. Li, X. Kang, H. Lian, and J. Lin, “Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 32, pp. 4341–4347, 2008.
- [38] T.-Y. Liu, S.-Y. Chen, D.-M. Liu, and S.-C. Liou, “On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 107, no. 1, pp. 112–121, 2005.
- [39] V. Simon, C. Albon, and S. Simon, “Silver release from hydroxyapatite self-assembling calcium–phosphate glasses,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 354, no. 15–16, pp. 1751–1755, 2008.
- [40] A. A. Yanovska *et al.*, “Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti–6Al–4V substrates and their characterization,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 36, pp. 215–220, 2014.
- [41] L. Stipniece, K. Salma-Ancane, N. Borodajenko, M. Sokolova, D. Jakovlevs, and L. Berzina-Cimdina, “Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method,” *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 2, pp. 3261–3267, 2014.
- [42] V. Stanić *et al.*, “Synthesis of antimicrobial monophase silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 9, pp. 4510–4518, 2011.
- [43] P. Narendran *et al.*, “Influence of pH on wet-synthesis of silver decorated hydroxyapatite nanopowder,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, pp. 143–150, 2018.
- [44] M. Meininger, S. Meininger, J. Groll, U. Gbureck, and C. Moseke, “Silver and copper addition enhances the antimicrobial activity of calcium hydroxide coatings on titanium,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 5, p. 61, 2018.

- [45] D. M. Vranceanu *et al.*, “PULSED ELECTROCHEMICAL DEPOSITION OF Ag DOPED HYDROXYAPATITE BIOACTIVE COATINGS ON Ti6Al4V FOR MEDICAL PURPOSES,” *University Politeh. Bucharest Sci. Bull. Ser. B-Chemistry Mater. Sci.*, vol. 80, no. 1, pp. 173–184, 2018.
- [46] Y. Chen *et al.*, “Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings,” *Surf. coatings Technol.*, vol. 205, no. 7, pp. 1892–1896, 2010.
- [47] P. Nawani and D. Walters, “Biological Characterization of Antimicrobial Coatings,” in *Handbook of Antimicrobial Coatings*, 2017.
- [48] K. Olcay, H. Ataoglu, and S. Belli, “Evaluation of Related Factors in the Failure of Endodontically Treated Teeth: A Cross-sectional Study,” *J. Endod.*, 2018.
- [49] S. Büttgenbach and S. Büttgenbach, “Reinraumtechnik,” in *Mikromechanik*, 2013.
- [50] L. Tjäderhane *et al.*, “Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins,” *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 1, pp. 116–135, 2013.
- [51] K. Ohgushi and T. Fusayama, “Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin,” *J. Dent. Res.*, vol. 54, no. 5, pp. 1019–1026, 1975.
- [52] M. K. Pugach *et al.*, “Dentin caries zones: mineral, structure, and properties,” *J. Dent. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 71–76, 2009.
- [53] R. G. Craig, F. A. Curro, W. S. Green, and J. A. Ship, “Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review,” *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 139, no. 6, pp. 705–712, 2008.
- [54] E. C. Say, M. Nakajima, P. Senawongse, M. Soyman, F. Ozer, and J. Tagami, “Bonding to sound vs caries-affected dentin using photo-and dual-cure adhesives,” *Oper Dent*, vol. 30, no. 1, pp. 90–98, 2005.
- [55] X.-T. Wu *et al.*, “A direct electric field-aided biomimetic mineralization

system for inducing the remineralization of dentin collagen matrix,” *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 11, pp. 7889–7899, 2015.

- [56] D. Cummins, “Dentin hypersensitivity: from diagnosis to a breakthrough therapy for everyday sensitivity relief,” *J. Clin. Dent.*, vol. 20, no. 1, p. 1, 2009.
- [57] M. L. Mei, L. Ito, Y. Cao, Q. L. Li, E. C. M. Lo, and C. H. Chu, “Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation,” *J. Dent.*, vol. 41, no. 9, pp. 809–817, 2013.
- [58] J. S. Earl, R. K. Leary, K. H. Muller, R. M. Langford, and D. C. Greenspan, “Physical and chemical characterization of dentin surface following treatment with NovaMin technology,” *J. Clin. Dent.*, vol. 22, no. 3, pp. 62–67, 2011.
- [59] W. H. Arnold, M. Prange, and E. A. Naumova, “Effectiveness of various toothpastes on dentine tubule occlusion,” *J. Dent.*, vol. 43, no. 4, pp. 440–449, 2015.
- [60] A. Gysi, “An attempt to explain the sensitiveness of dentine,” *Brit J Dent. Sci*, vol. 43, pp. 865–868, 1900.
- [61] M. R. Byers and W. K. Dong, “Autoradiographic location of sensory nerve endings in dentin of monkey teeth,” *Anat. Rec.*, vol. 205, no. 4, pp. 441–454, 1983.
- [62] T. J. Hirvonen and M. V. O. Narhi, “The effect of dentinal stimulation on pulp nerve function and pulp morphology in the dog,” *J. Dent. Res.*, vol. 65, no. 11, pp. 1290–1293, 1986.
- [63] M. Brännström and A. Åström, “A study on the mechanism of pain elicited from the dentin,” *J. Dent. Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 619–625, 1964.
- [64] S. Y. Lee, H. K. Kwon, and B. I. Kim, “Effect of dentinal tubule occlusion by dentifrice containing nano-carbonate apatite,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 35, no. 11, pp. 847–853, 2008.

- [65] S. A. Lavender *et al.*, “Mode of action studies of a new desensitizing dentifrice containing 8.0% arginine, a high cleaning calcium carbonate system and 1450 ppm fluoride,” *Am. J. Dent.*, vol. 23, no. Special Issue, pp. 14A-19A, 2010.
- [66] D. Cummins, “Advances in the clinical management of dentin hypersensitivity: a review of recent evidence for the efficacy of dentifrices in providing instant and lasting relief,” *J. Clin. Dent.*, vol. 22, no. 4, p. 100, 2011.
- [67] J. Cunha-Cruz, J. R. Stout, L. J. Heaton, J. C. Wataha, and N. PRECEDENT, “Dentin hypersensitivity and oxalates: a systematic review,” *J. Dent. Res.*, vol. 90, no. 3, pp. 304–310, 2011.
- [68] R. Wang *et al.*, “Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual-affinitive peptide for dentinal tubule occlusion,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 29, no. 2, pp. 268–277, 2014.
- [69] Y.-C. Chiang *et al.*, “A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivity,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 236–240, 2010.
- [70] S. W. K. Kweh, K. A. Khor, and P. Cheang, “The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 89, pp. 373–377, 1999.
- [71] Antonio Nanci, *Ten Cate’s Oral Histology 8th Edition*, 8th ed. 2012.
- [72] S. Weiner and H. D. Wagner, “The material bone: structure-mechanical function relations,” *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998.
- [73] F. J. Hellmich, C. and Ulm, “Micromechanical Model for Ultrastructural Stiffness of Mineralized Tissues,” *J. Eng. Mech.*, vol. 128, no. 8, pp. 898–908, 2002.
- [74] J. Y. et al Rho, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, pp. 92–102, 1998.

- [75] et al Liu, Y., “BMP-2 Liberated from Biomimetic Implant Coatings Induces and Sustains Direct Ossification in an Ectopic Rat Model,” *Bone*, vol. 36, pp. 745–757, 2005.
- [76] R. B. et al Martin, “Skeletal Tissue Mechanics,” *Springer-Verlag, New York*, 1998.
- [77] M. A. Topaloğlu, U., Ketani, “Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri,” *Dicle Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 10, no. 1, pp. 62–71, 2017.
- [78] E. H. Burger, “Experiments on Cell Mechanosensitivity: Bone Cells as Mechanical Engineers,” *Bone Mech. Handbook. Cowin SC (ed). CRC Press. New York.*, 2001.
- [79] X. Zhu, “Nano Hydroxyapatite/Collagen, Nano Hydroxyapatite and Anodic Oxides on Titanium – Preparation, Characterization and Biological Response,” Eberhard-Karls-University, 2005.
- [80] M. O. Reilly, “A Critical Investigation into the Spray Drying of Powders for Thermal Spray Applications,” Dublin City University, 2003.
- [81] Keskin A, “Hidroksiapatit seramiklerinin mekanik özelliklerinin zirkonya ilavesi ile geliştirilmesi,” İstanbul Teknik Üniversitesi, 2000.
- [82] Alanyalı H, “Biyoaktif cam seramikler,” *Metallurji*, vol. 7, pp. 69–74, 1997.
- [83] W. Ross, Michael H.; Kaye, Gordon I.; Pawlina, *Histology: a Text and Atlas*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- [84] J. P. Simmer and A. G. Fincham, “Molecular mechanisms of dental enamel formation,” *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1995.
- [85] D. Deutsch, A. Palmon, L. W. Fisher, N. Kolodny, J. D. Termine, and M. F. Young, “Sequencing of bovine enamelin (‘tuftelin’) a novel acidic enamel protein,” *J. Biol. Chem.*, 1991.
- [86] M. R. Giuca, G. Cei, F. Gigli, and P. Gandini, “Oral signs in the diagnosis of celiac disease: review of the literature,” in *Minerva Stomatol*, 2010.

- [87] R. Touger-Decker and L. C. Van, "Sugars and dental caries. [Review] [101 refs]," *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003.
- [88] J. M. Hardie, "The microbiology of dental caries.," *Dent. Update*, 1982.
- [89] M. Otsuka, Y. Nakahigashi, Y. Matsuda, J. L. Fox, and W. I. Higuchi, "A Novel Skeletal Drug Delivery System Using Self-Setting Calcium Phosphate Cement. 7. Effect of Biological Factors on Indomethacin Release from the Cement Loaded on Bovine Bone," *J. Pharm. Sci.*, vol. 83, no. 11, pp. 1569–1573, 1994.
- [90] V. Alt *et al.*, "The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model," *Biomaterials*, vol. 27, no. 26, pp. 4627–4634, 2006.
- [91] E. Verron, J. M. Bouler, and J. Guicheux, "Controlling the biological function of calcium phosphate bone substitutes with drugs," *Acta Biomaterialia*. 2012.
- [92] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates as bioceramics: State of the art," *Journal of Functional Biomaterials*. 2010.
- [93] S. J. Kalita, A. Bhardwaj, and H. A. Bhatt, "Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, 2007.
- [94] J. S. Bow, S. C. Liou, and S. Y. Chen, "Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized β -tricalcium phosphate," *Biomaterials*, 2004.
- [95] V. P. Orlovskii, V. S. Komlev, and S. M. Barinov, "Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics," *Inorg. Mater.*, 2002.
- [96] K. de Groot, "Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: A review," *Ceramics International*. 1993.
- [97] S. Puajindanetr, "Characterisation and Sintering of Precipitated Hydroxyapatite," Queen Mary and Westfield College London, 1993.

- [98] P. Parhi, A. Ramanan, and A. R. Ray, "A convenient route for the synthesis of hydroxyapatite through a novel microwave-mediated metathesis reaction," *Mater. Lett.*, 2004.
- [99] P. W. Brown and B. Constantz, *Hydroxyapatite and related materials*. 2017.
- [100] R. A. Young and D. W. Holcomb, "Variability of hydroxyapatite preparations.," *Calcif. Tissue Int.*, 1982.
- [101] P. Cheang and K. A. Khor, "Addressing processing problems associated with plasma spraying of hydroxyapatite coatings," *Biomaterials*. 1996.
- [102] H. Y. Yasuda, S. Mahara, Y. Umakoshi, S. Imazato, and S. Ebisu, "Microstructure and mechanical property of synthesized hydroxyapatite prepared by colloidal process," *Biomaterials*, 2000.
- [103] S. J. Kalita, S. Bose, H. L. Hosick, and A. Bandyopadhyay, "CaO-P2O5-Na2O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics," *Biomaterials*, 2004.
- [104] N. Roveri *et al.*, "Synthesis of hydroxyapatite nanocrystals in metasilicate gel," in *A Global Road Map for Ceramic Materials and Technologies: Forecasting the Future of Ceramics, International Ceramic Federation - 2nd International Congress on Ceramics, ICC 2008, Final Programme*, 2008.
- [105] I. M. *et al.*, "Nanocrystalline carbonate-apatites: role of Ca/P ratio on the upload and release of anticancer platinum bisphosphonates.," *Nanoscale*, 2012.
- [106] E. A. Monroe, W. Votava, D. B. Bass, and J. McMullen, "New Calcium Phosphate Ceramic Material for Bone and Tooth Implants," *J. Dent. Res.*, 1971.
- [107] S. R. Paital and N. B. Dahotre, "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies," *Materials Science and Engineering R: Reports*. 2009.

- [108] E. B. Nery, K. L. Lynch, W. M. Hirthe, and K. H. Mueller, "Bioceramic Implants in Surgically Produced Infrabony Defects," *J. Periodontol.*, 2013.
- [109] M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus, and H. P. Drobeck, "Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface.," *J. Bioeng.*, 1977.
- [110] S. D. Cook, J. F. Kay, K. A. Thomas, and M. Jarcho, "Interface mechanics and histology of titanium and hydroxylapatite-coated titanium for dental implant applications.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 1987.
- [111] P. Luo and T. G. Nieh, "Preparing hydroxyapatite powders with controlled morphology," *Biomaterials*, 1996.
- [112] S. Mohapatra, P. Pramanik, N. Pramanik, and P. Bhargava, "Processing and properties of nano-hydroxyapatite(n-HAp)/poly(ethylene-co- acrylic acid)(EAA) composite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications," *J. Am. Ceram. Soc.*, 2007.
- [113] T. Aslanov, D. Uzunoğlu, and A. Özer, "Synthesis of Hydroxyapatite-alginate Composite: Methylene Blue Adsorption," *Sinop Üniversitesi Fen Bilim. Derg. Sinop Uni J Nat Sci*, 2017.
- [114] N. R. Boeree, J. Dove, J. J. Cooper, J. Knowles, and G. W. Hastings, "Development of a degradable composite for orthopaedic use: mechanical evaluation of an hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite material," *Biomaterials*, 1993.
- [115] S. Nadir, A. Belainass, A. Irhzo, and J. L. Lacout, "Synthese par neutralisation d'une hydroxyapatite pure a partir de l'acide orthophosphorique technique et de la calcite," *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1996.
- [116] H. Morgan, R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, and P. Anderson, "Preparation and characterisation of monoclinic hydroxyapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate," *Biomaterials*, 2000.
- [117] J. C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium*

Orthophosphates. 1994.

- [118] E. Boanini, M. Gazzano, and A. Bigi, “Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature,” *Acta Biomaterialia*. 2010.
- [119] L. Calderín, D. Dunfield, and M. J. Stott, “Shell-model study of the lattice dynamics of hydroxyapatite,” *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, 2005.
- [120] M. Kolenčík and V. Simansky, “Application of various methodological approaches for assessment of soil micromorphology due to VESTA program applicable to prediction of the soil structures formation,” *Acta Fytotech. Zootech.*, 2016.
- [121] M. Corno, C. Busco, B. Civalleri, and P. Ugliengo, “Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006.
- [122] R. Kumar, P. Cheang, and K. A. Khor, “RF plasma processing of ultra-fine hydroxyapatite powders,” in *Journal of Materials Processing Technology*, 2001.
- [123] T. Anee Kuriakose *et al.*, “Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature,” *J. Cryst. Growth*, 2004.
- [124] A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, and E. Laborde, “Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate,” *Mater. Chem. Phys.*, 2003.
- [125] J.-K. Liu, X.-H. Yang, and X.-G. Tian, “Preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres,” *Powder Technol.*, vol. 184, no. 1, pp. 21–24, 2008.
- [126] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, and P. Thomas, “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders,” *Biomaterials*, 2002.

- [127] S. Lazić, J. Katanić-Popović, S. Zec, and N. Miljević, "Properties of hydroxyapatite crystallized from high temperature alkaline solutions," *J. Cryst. Growth*, 1996.
- [128] S. Lazić, S. Zec, N. Miljević, and S. Milonjić, "The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid," *Thermochim. Acta*, 2001.
- [129] A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, and C. Mingazzini, "Characteristics of synthetic hydroxyapatites and attempts to improve their thermal stability," *Mater. Chem. Phys.*, 2000.
- [130] L. Bernard, M. Freche, J. L. Lacout, and B. Biscans, "Modeling of the dissolution of calcium hydroxide in the preparation of hydroxyapatite by neutralization," *Chem. Eng. Sci.*, 2000.
- [131] M. Giuliatti, M. M. Seckler, S. Derenzo, M. I. Ré, and E. Cekinski, "Industrial crystallization and precipitation from solutions: State of the technique," *Brazilian J. Chem. Eng.*, 2001.
- [132] I. Smičiklas, A. Onjia, and S. Raičević, "Experimental design approach in the synthesis of hydroxyapatite by neutralization method," *Sep. Purif. Technol.*, 2005.
- [133] R. Z. LeGeros, R. Kijowska, W. Jia, and J. P. LeGeros, "Fluoride-cation interactions in the formation and stability of apatites," *J. Fluor. Chem.*, 1988.
- [134] ASTM, "Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants 1," *Obs. Black Lit. Rev.*, 2003.
- [135] M. Bohner *et al.*, "Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep," *Biomaterials*, 2003.
- [136] V. Uskoković and D. P. Uskoković, "Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents," *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2011.

- [137] I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, L. Montanaro, and G. Gusmano, "Synthesis and characterization of Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders," in *2nd International Congress on Ceramics, ICC 2008*, 2008.
- [138] P. Habibovic and J. E. Barralet, "Bioinorganics and biomaterials: Bone repair," *Acta Biomaterialia*. 2011.
- [139] M. M. Dvorak *et al.*, "Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004.
- [140] J. T. Seil and T. J. Webster, "Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature," *International Journal of Nanomedicine*. 2012.
- [141] J. E. Bird, "Advances in the surgical management of bone tumors," *Current Oncology Reports*. 2014.
- [142] G. A. Fielding, M. Roy, A. Bandyopadhyay, and S. Bose, "Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings," *Acta Biomater.*, 2012.
- [143] T. Akiyama *et al.*, "Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia," *J. Orthop. Res.*, 2013.
- [144] H. J. Klasen, "A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver," *Burns*. 2000.
- [145] H. H. Lara, E. N. Garza-Treviño, L. Ixtapan-Turrent, and D. K. Singh, "Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds," *Journal of Nanobiotechnology*. 2011.
- [146] J. B. Wright, K. Lam, D. Hansen, and R. E. Burrell, "Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens," *Am. J. Infect. Control*, 1999.
- [147] S. Samani, S. M. Hossainipour, M. Tamizifar, and H. R. Rezaie, "In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn + Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,"

J. Biomed. Mater. Res. - Part A, 2013.

- [148] Q. L. Feng *et al.*, “Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates,” *Thin Solid Films*, 1998.
- [149] R. J. Chung, M. F. Hsieh, K. C. Huang, L. H. Perng, F. I. Chou, and T. S. Chin, “Anti-microbial hydroxyapatite particles synthesized by a sol-gel route,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2005.
- [150] X. Bai, S. Sandukas, M. Appleford, J. L. Ong, and A. Rabiei, “Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2012.
- [151] A. Costescu *et al.*, “Fabrication, characterization, and antimicrobial activity, evaluation of low silver concentrations in silver-doped hydroxyapatite nanoparticles,” *J. Nanomater.*, 2013.
- [152] P. Patil, V. Patil, and A. Paradkar, “Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: In vitro and in vivo evaluation,” *Acta Pharm.*, 2007.
- [153] B. Vagaská, L. Bačáková, E. Filová, and K. Balík, “Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering,” *Physiological Research*. 2010.
- [154] S. R. Radin and P. Ducheyne, “The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 1993.
- [155] E. Garcia-Rey, T. Muñoz, J. Montejo, and J. Martinez, “Results of a Hydroxyapatite-Coated Modular Femoral Stem in Primary Total Hip Arthroplasty. A Minimum 5-Year Follow-Up,” *J. Arthroplasty*, 2008.
- [156] U. Erdem and M. B. Turkoz, “Silver release of Ag (I) doped hydroxyapatite: In vitro study,” *Microsc. Res. Tech.*, 2019.
- [157] M. Brännström, G. Johnson, and K. J. Nordenvall, “Transmission and control of dentinal pain: resin impregnation for the desensitization of dentin,” *J. Am.*

Dent. Assoc., 1979.

- [158] DIN Deutsches Institut für Normen e.V., *DIN EN 13779*. 2007.
- [159] ASTM, “Standard Specification for Calcium Phosphate Coatings for Implantable Materials,” *ASTM F1609*, 2003.
- [160] T. Callahan, J. Gantenberg, and B. Sands, “Calcium Phosphate (Ca-P) Coating Draft Guidance for Preparation of Food and Drug Administration (FDA) Submissions for Orthopedic and Dental Endosseous Implants,” in *Characterization and Performance of Calcium Phosphate Coatings for Implants*, 2009.
- [161] I. Standard, M. Vibration, I. Standard, S. E. Cie, and I. Standard, *International Standard 10993-5*. 2004.
- [162] ASTM, “E2149. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions,” *ASTM Stand. B.*, 2013.
- [163] J. Skalny and N. Hearn, *Handbook of Analytical Techniques in Concrete Science and Technology*. 2001.
- [164] R. M. Jones, “Particle size analysis by laser diffraction: ISO 13320, standard operating procedures, and Mie theory,” *American Laboratory*. 2003.
- [165] ISO, “ISO 14887, Sample Preparation Dispersing Procedures for Powders in Liquids,” *Int. Stand. Organ.*, 2000.
- [166] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, and C. Paluszkievicz, “FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods,” in *Journal of Molecular Structure*, 2005.
- [167] ISO, “ISO 10993-13 Degradation Analysis.”
- [168] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990.

- [169] J. won Kim and J. C. Park, "Dentin hypersensitivity and emerging concepts for treatments," *Journal of Oral Biosciences*. 2017.
- [170] M. M. Seckler, M. Danese, S. Derenzo, J. V. Valarelli, M. Giuliatti, and R. Rodríguez-Clemente, "Influence of process conditions on hydroxyapatite crystallinity obtained by direct crystallization," *Mater. Res.*, 2005.
- [171] R. Babu, J. Zhang, E. J. Beckman, M. Virji, W. A. Pasculle, and A. Wells, "Antimicrobial activities of silver used as a polymerization catalyst for a wound-healing matrix," *Biomaterials*, 2006.
- [172] F. Bou-Abdallah *et al.*, "REVIEW Organic Stereochemistry," *J. Chem. Theory Comput.*, 2012.
- [173] H. Vik, K. J. Andersen, K. Julshamn, and K. Todnem, "NEUROPATHY CAUSED BY SILVER ABSORPTION FROM ARTHROPLASTY CEMENT," *The Lancet*. 1985.
- [174] C. Santos, C. F. Rovath, R. P. Franke, M. M. Almeida, and M. E. V. Costa, "Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system," *Ceram. Int.*, 2009.
- [175] Y. K. Demir, A. Ü. Metin, B. Şatiroğlu, M. E. Solmaz, V. Kayser, and K. Mäder, "Poly (methyl vinyl ether-co-maleic acid) – Pectin based hydrogel-forming systems: Gel, film, and microneedles," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2017.
- [176] R. G. Pearson, "Hard and Soft Acids and Bases," *J. Am. Chem. Soc.*, 1963.
- [177] P. K. Khan *et al.*, "Influence of single and binary doping of strontium and lithium on in vivo biological properties of bioactive glass scaffolds," *Sci. Rep.*, 2016.
- [178] C. Eriksson, J. Lausmaa, and H. Nygren, "Interactions between human whole blood and modified TiO₂-surfaces: Influence of surface topography and oxide thickness on leukocyte adhesion and activation," *Biomaterials*, 2001.

- [179] M. C. Advincula, F. G. Rahemtulla, R. C. Advincula, E. T. Ada, J. E. Lemons, and S. L. Bellis, "Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol-gel-derived titanium oxide," *Biomaterials*, 2006.
- [180] M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange, and M. F. Sigot-Luizard, "Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration," *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997.
- [181] A. J. Kora and J. Arunachalam, "Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011.
- [182] K. S. Oh, K. J. Kim, Y. K. Jeong, and Y. H. Choa, "Effect of Fabrication Processes on the Antimicrobial Properties of Silver Doped Nano-Sized HAp," *Key Eng. Mater.*, 2009.
- [183] E. J. Evans, "Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy," *Biomaterials*, 1994.
- [184] F. W. Sunderman, "Metal carcinogenesis in experimental animals," *Food and Cosmetics Toxicology*. 1971.
- [185] A. Yamamoto, R. Honma, A. Tanaka, and M. Sumita, "Generic tendency of metal salt cytotoxicity for six cell lines," *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999.
- [186] G. K. Hunter, P. V Hauschka, A. R. Poole, L. C. Rosenberg, and H. A. Goldberg, "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins.," *Biochem. J.*, 1996.
- [187] C. Liu, Y. Huang, W. Shen, and J. Cui, "Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11," *Biomaterials*, 2001.
- [188] P. Yuan *et al.*, "Effects of Dentifrice Containing Hydroxyapatite on Dentinal Tubule Occlusion and Aqueous Hexavalent Chromium Cations Sorption: A Preliminary Study," *PLoS One*, 2012.

- [189] J. Yu, H. Yang, K. Li, J. Lei, L. Zhou, and C. Huang, "A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: An in vitro study," *J. Dent.*, 2016.
- [190] X. Lin, F. Xie, X. Ma, Y. Hao, H. Qin, and J. Long, "Fabrication and characterization of dendrimer-functionalized nano-hydroxyapatite and its application in dentin tubule occlusion," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2017.



EKLER

EK 1 ETİK KURUL KARARI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU								
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI				Dentin Hassasiyetinin Tedavisinde Saf, Florür ve Gümüş İlaveli Nano-Hidroksiapatit'in Etkinliğinin İn-Vitro Olarak değerlendirilmesi				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU								
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili				
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Ekim 2018	01	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Ekim 2018	01	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
	OLGU RAPOR FORMU	Ekim 2018	01	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama						
	SİGORTA	☐						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒						
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐						
	İLAN	☐						
	YILLIK BİLDİRİM	☐						
	SONUÇ RAPORU	☐						
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐						
	DİĞER:	☐						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:15/18		Tarih: 01.10.2018					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.							
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU								
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	İmza
Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ	Göğüs Hastalıkları	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof. Dr. Figen ÇOŞKUN	Acil Tıp	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof.Dr. Hakan BOYUNAĞA	Tıbbi Biyokimya	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr. Ebru ERDEMİR	Periodontoloji	Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒
Prof.Dr. M. Faik ÖZVEREN	Beyin ve Sinir Cerrahisi	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof.Dr. Meral SAYGUN	Halk Sağlığı	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Gülten KARACA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof..Dr. Ashi Fahriye CEYLAN IŞIK	Tıbbi Farmakoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ İmza:								

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümit ERDEM

Doğum Tarihi : 28.12.1981

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu :

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi (2000-2004)

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi (2004-2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar:

Ereğli Demir Çelik Boru Fabrikası (ERBOR) 2006-2008

Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK) 2009-2010

Kırıkkale Üniversitesi (KU) 2012-...

Yayınları (SCI-SCI Expanded) :

Erdem, U., & Turkoz, M. B. (2019). Silver release of Ag (I) doped hydroxyapatite: In vitro study. *Microscopy research and technique*. DOI: 10.1002/jemt.23243

Yaşar, E., **Erdem, U.**, Tuna, M. A., Armağan, O., & Kırındı, T. (2018). The Effect of Ti Content on α 'Martensite Phase Transformation, and Magnetic Properties by Mössbauer Spectroscopy in Fe-30% Ni-x% Ti (wt%) Alloys. *Acta Physica Polonica A*, 133(5), 1165-1169.

Ince-Yilmaz, O., Erol, T., Kara, K., Dogan, M., & **Erdem, U.** (2018). Impacts of high Voltage Electric Field (HVEF) Applications on Germination and Seedling Growth of Wheat Seed (*Triticum aestivum* L.) with Analysis by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *feb-fresenius environmental bulletin*, 5153.

Baglar, S., **Erdem, U.**, Dogan, M., & Turkoz, M. (2018). Dentinal tubule occluding capability of nano-hydroxyapatite; The in-vitro evaluation. *Microscopy research and technique*, 81(8), 843-854.

Yazar, H. R., & **Erdem, U.** (2008). Nature of excited states of gadolinium isotopes. *Chinese Journal of Physics*, 46(3), 270-277.

Yayınları (Diğer) :

Araştırma Alanları : Biyomalzeme, Kemik Minerali, Yüzey Kaplama, Malzeme Karakterizasyonu