

Odaklanmış İyon Demeti (FIB) kesitlemesi ile diş dokularına ait içyapıların mikro/nano-analizi

Meltem Sezen^{1*}, Feray Bakan²

05.10.2016 Geliş/Received, 01.12.2016 Kabul/Accepted

doi: <https://doi.org/10.16984/saufenbilder.284224>

ÖZ

Diş dokuları sert ve kırılğan olduğundan, bu malzemelerin ultramikrotomi veya diğer metotlarla kesitlenmesi ve içyapılarının mikro ve nano analizi problem yaratmaktadır. Bu tür malzemelerin mikroyapılarının bölgesel ve istenilen geometride incelenmesi için FIB-SEM çift demet platformların kullanılması en uygun çözümdür. Çift demet platformları, eşzamanlı olarak yüksek büyütme ve yüksek çözünürlüklere varabilen görüntüleme ve elementel analiz imkânı sağlamaktadır. Bu çalışmada, FIB-SEM ile dentin ve mine tabakaları gibi farklı özelliklerdeki diş dokularının içyapılarındaki mikro-/nano-yapısal farklılıkların tespiti sağlanmıştır. Farklı morfoloji ve kimyasal bileşene sahip diş dokularının içyapılarının iyon-kesitlemesi ile incelenmesi ile bu çalışma Türkiye'deki diş hekimliği alanında FIB-SEM platformlarının aktif kullanılması için önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Odaklanmış iyon demeti (FIB), İyon Kesitlemesi, Diş Dokusu, Dentin, Mine

Micro/nano analysis of tooth microstructures by Focused Ion Beam (FIB) cross-sectioning

ABSTRACT

Since dental structures are hard and fragile, cross-sectioning of these materials using ultramicrotomy and other techniques and following micro and nano analysis cause problems. The use of FIB-SEM dual beam platforms is the most convenient solution for investigating the microstructures, site-specifically and in certain geometries. Dual beam platforms allow for imaging at high magnifications and resolutions and simultaneous elemental analysis. In this study, the micro/nano-structural and chemical differences were revealed in dentin and enamel samples. The investigation of dental tissues having different morphologies and chemical components by ion-cross-sectioning is important for the use of FIB-SEM platforms in dentistry in Turkey.

Keywords: Focused Ion Beam (FIB), Ion Cross-Sectioning, Dental Tissue, Dentin, Enamel

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

¹ Sabancı Üniversitesi, SUNUM, İstanbul- meltemsezen@sabanciuniv.edu

² Sabancı Üniversitesi, SUNUM, İstanbul- feraybakan@sabanciuniv.edu

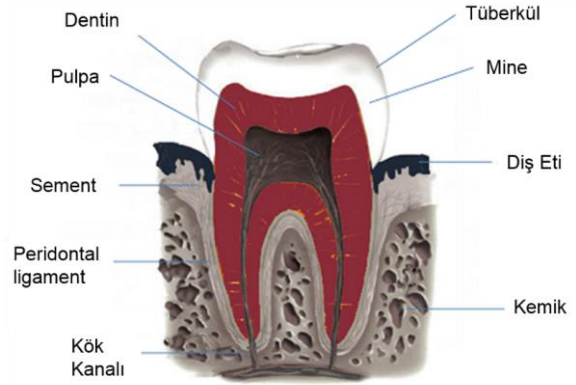
1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

İyon kolonları, kullanım kolaylığı bakımından diğer cihazlara entegre edilebilir. Bunlardan en kullanışlı olanı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile birlikte kullanımını sağlayan, elektron ve iyon kolonunun, EDS detektörünün, mikromanipülatör ve gaz enjeksiyon sistemleriyle bir arada bulunduğu çift- platformdur. Odaklanmış İyon Demeti-Taramalı Elektron Mikroskobu (FIB-SEM) platformlarında, seri kesitleme ve görüntüleme tekniği kullanılarak, malzeme üzerinde aşındırma sonucu temizlenen her bir kesitten alınan fazla sayıdaki iki boyutlu SEM görüntüleri veya EDS spektrumları/haritaları birleştirilerek, belirli bir hacimde üç boyutlu morfolojik veya kimyasal bilgi elde edilmektedir. Belirtilen uygulamalar sayesinde birkaç yüz mikrondan, birkaç mikrona kadar belirlenen hacimdeki elementel, kimyasal ve/veya morfolojik dağılım kolaylıkla belirlenebilmektedir. FIB tekniklerinin kullanılması özellikle içerisinde tübüler kanallar, gözenekler, mikro çatlaklar vs. bulunabilen farklı diş dokularının mikroyapısal analizinde önem taşımaktadır. Bu tür sert malzemelerin mikro/nano boyutlardaki analizi ve yapılandırılması için kullanılabilen tek yöntem FIB-SEM platformlarının mümkün kıldığı odaklanmış iyonlar ile aşındırma/kesitleme ve elektron/iyon destekli uygulamalardır [1], [2], [3], [4].

Dişler, mine, dentin ve sement olmak üzere üç sert diş dokusu ve bir yumuşak diş dokusundan (pulpa) oluşmaktadır. Ağız boşluğunda görünen diş kronu, mine tabakası ile örtülüdür. Diş minesi insan bedeninin en sert dokusudur ve esas unsurlar olan kalsiyum, fosfor, karbonat, magnezyum, sodyum, su ve organik bileşenler ile yaklaşık % 96 oranında organik olmayan bileşenlerden oluşmaktadır. Dentin insan bedeninin ikinci derecede en sert dokusudur ve yaklaşık % 70 oranında organik unsurlardan, % 20 oranında organik malzemelerden ve sudan oluşmaktadır. Dentin dokusu tübüler kanallar içermektedir. Kanallar içinde odontoblast uzantılarının bulunması dentinin canlı bir doku olduğunu göstermektedir. Mine dokusu prizma şeklindeki hidroksiapatit içerikli kristal yapılardan meydana gelir, bu nedenle çok sert bir inorganik malzemedir. Dentin tübüllerinin içindeki kollajen fibriller sinir ağı oluşturarak, hassasiyet sağlamaktadır [5], [6].

Hem mine, hem de dentin aşırı sert yapıları nedeniyle, içyapılarının ve dokular arası bağlantı noktalarının incelenmesi zor olabilmektedir. SEM incelemeleri sadece yüzey hakkında bilgi verirken, diş örneklerinin önceden kesilmiş, parlatılmış veya dağlanmış olması yüzeyin gerçek morfolojisinin incelenmesinde yanıltıcı olabilmektedir. Buna karşılık, bölgesel iyon kesitlemesi

teknisiyle dokuların yüzey altında bulunan gerçek morfolojisi ve kimyasal dağılımı kolayca açığa çıkmaktadır.



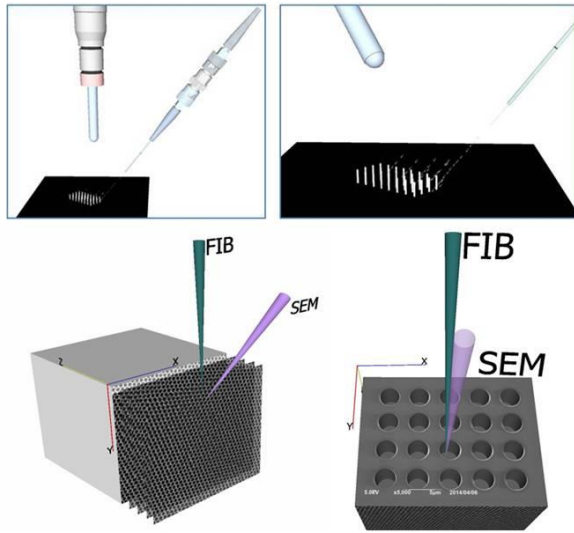
Şekil 1. Diş yapısının farklı bileşenleri (Different components of tooth structure)

2. YÖNTEM (EXPERIMENTAL)

Odaklanmış İyon Demeti (FIB) sistemleri, taramalı elektron mikroskobuna (SEM) çok benzer bir sistem olup tek farkı malzeme yüzeyinin elektron demeti yerine, odaklanmış bir iyon demeti ile taranmasıdır. Elektronlara kıyasla daha ağır olan iyonlar (genellikle galyum) malzeme yüzeyinin taranma sırasında aşındırılarak uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, çift demet platformları dahilinde yer alan gaz enjeksiyon sistemleri (GIS) malzeme yüzeyinin elektron veya iyonlar aracılığıyla bölgesel olarak metal depolanmasını ve dağlanmasını; mikromanipülatör ise, ön-kesitlerinin veya küçük boyutlardaki parçaların hazne içerisinde transferini mümkün kılmaktadır. FIB tekniklerinin, geleneksel elektron litografisine bir üstünlüğü ise, bütün bu işlem süreçleri için maske kullanımını ortadan kaldırmasıdır. Çift demet platformlarında, galyum iyonları ile mikro/nano boyutta yapılandırma, depolama ve görüntüleme işlemleri yürütülürken; elektronlar yüksek çözünürlükte görüntüleme ve analiz imkanı sağlamaktadır. Bu platformlar, iyonlar yardımıyla numunelerden yanal kesitler alınmasını mümkün kıldığından, malzemelerin hem yüzeyinde hem de iç kısımlarında detaylı analiz imkânı sunmaktadır. İyon kaynağı olarak FIB sistemlerinde ticari olarak galyum iyonları tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, insan dişi numuneleri incelenmiş olup, çürüksüz erişkin dişler üzerinde mine, dentin ve mine-dentin bağlantısının yüzeyi kesitlenerek, yüzey altındaki içyapısı yüksek çözünürlükte görüntülenmiştir. Tüm işlemler JEOL marka JIB 4601F MultiBeam model bir FIB-SEM platformunda yürütülmüştür. Diş yapıları elektriksel olarak yalıtkan olduğundan, elektron

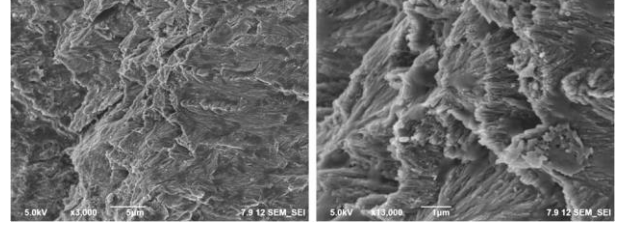
mikroskobu içerisinde yüklenme etkisini azaltmak amacıyla numunelerin yüzeyleri öncelikle sıçratma kaplama tekniği ile 10-20 nm kalınlığında ince altın film ile kaplanmıştır. Daha sonra numuneler çift demet platformu içerisinde alınarak kesitlenecek farklı bölgeler seçilmiştir. Kesitleme sürecinde 30 keV iyon voltajı ve başlangıçta nispeten yüksek iyon akımları eşliğinde (10-60 nA) 20-30 mikron genişliğinde çukurlar açılarak, numunelerde belirli bir hacim derinliğine ulaşılmıştır. Bunu takiben ilgili yan kesitlerde yüksek kalitede görüntü sağlamak için daha düşük iyon akımları (1-5 nA) ile kesit yüzeyleri ince paternler kullanılarak parlatılmış ve bu bölgelerden eşzamanlı olarak ikincil elektron (SE) ve geri saçılmışlı elektron (BSE) görüntüleri elde edilmiştir.



Şekil 2. FIB-SEM çift demet platformlarında yürütülen nanoyapılandırma ve nanoişleme çalışmaları (Nanostructuring and nanoprocessing work which are carried out in a FIB-SEM dual beam platform)

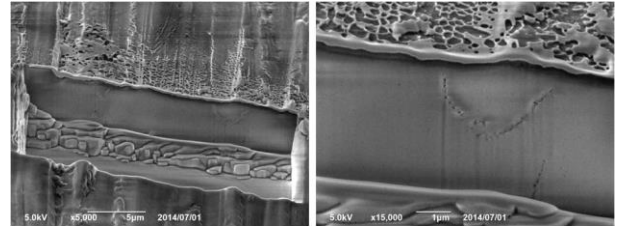
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (CONCLUSIONS AND DISCUSSION)

Diş dokularının farklı tabakalarında yürütülen iyonlarla kesitleme ve SEM görüntüleme süreçleri sonucunda, mine, dentin ve mine-dentin bağ dokusu tabakalarının mikroyapısı incelenmiş olup, her bir bölgeye ait mikron ve nano-boyutlardaki morfolojik farklılıklar tespit edilmiştir. Şekil 3'te kırılmış ve yüzeyine parlatma yapılmamış insan dişinin mine tabakasının yüzey görüntüsü verilmektedir. İkincil elektron görüntülerinde mine dokusunu oluşturan prizma şeklindeki kristaller gösterilmektedir.



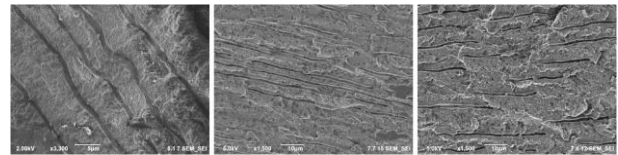
Şekil 3. Malzeme yüzeyinden alınmış mine tabakası ve prizmalara ait SEM ikincil elektron görüntüleri. (SEM-SE images of enamel layer and prisms taken from material surface)

Mekanik olarak kesilmiş ve yüzeyi parlatılmış mine tabasından alınan FIB kesiti ise Şekil 4'te verilmekte olup, mine tabakasının ne kadar yoğun bir içyapıya sahip olduğu görülmektedir. Kesitte, iç içe sıkı paketlenmiş prizma şeklindeki kristallerin sınır çizgileri de görülmektedir.



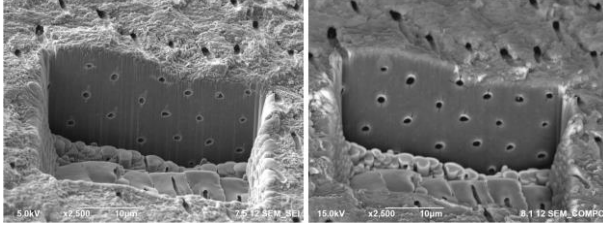
Şekil 4. FIB ile kesitlenmiş mine dokusunun içyapısı. Aynı kesitten farklı büyütme oranlarında SE görüntüleri alınmıştır (The inner structure of enamel layer that is cross-sectioned by FIB. SE images were taken from the same region, but different magnifications)

Diğer bir çalışma ise insan dişinin dentin tabakasında gerçekleştirilmiş olup, dokunun yüzey görüntüsü ve içyapısı incelenmiştir. Şekil 5'te kırılmış dentin yüzeyinin ikincil elektron görüntüsü verilmektedir. Yüzeyde tübül dentin kanalları görülmekte olup kanalların belirli bir yönelime sahip olduğu anlaşılmaktadır.



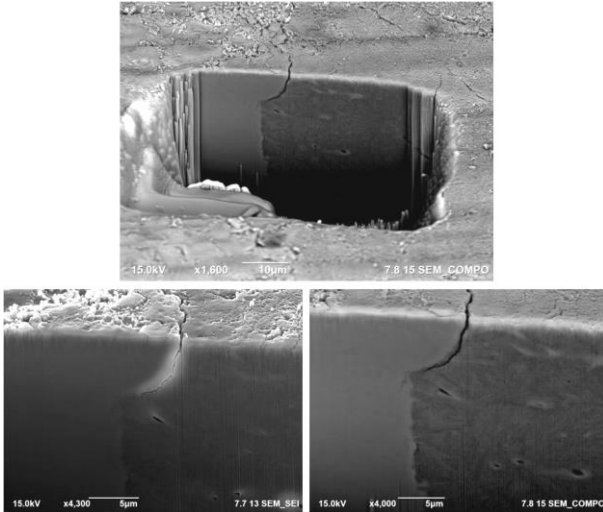
Şekil 5. Malzeme yüzeyinden alınmış dentin tabakası ve tübüllere ait SEM ikincil elektron görüntüleri (SEM-SE images of dentin layer and tubules taken from material surface)

Dentin tabakasından alınan FIB kesitinde (Şekil 6) ise tübüllerin boyutu ve dağılımı açıkça gözlemlenmektedir. Bu çalışmaya göre tübüllerin çaplarının 1 µm civarında ve tübüller arası mesafenin 3-5 µm aralığında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6. Dentin dokusunun iç yapısında bulunan dentin tübüllerinin SE (sol) ve BSE (sağ) görüntüsü. (The distribution of dentinal tubules within the dentin layer: SE image (left) and BSE image (right))

Diğer bir FIB çalışması ise, dentin-mine birleşim bölgesinde yürütülmüş olup ilgili bölgeden FIB kesiti alınmıştır. Bu birleşim bölgesi Şekil 7’de verilmektedir. Görüntülerde, özellikle de geri saçılımlı elektron (BSE) görüntüsünde mine ve dentin arasındaki morfolojik farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Malzeme kontrastı sağlayan BSE görüntüleri genellikle farklı fazlar arasındaki elementel farklılıkları da göz önüne koymaktadır. Buna göre dentin dokusunun, daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve yoğunluk açısından mineye göre daha düşük bir kimyasal kompozisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Mine-dentin arasındaki bu geçiş bölgesinde dentin tübüllerine yoğun olarak rastlanmamıştır.



Şekil 7. FIB ile kesitlenmiş mine (sol)–dentin (sağ) tabakaları arası bağ dokusu. Üst şekilde mine-dentin birleşim bölgesinin BSE görüntüsü verilmektedir. Alt şekiller birleşim bölgesinin daha yüksek büyütmedeki SE (sol) ve BSE (sağ) görüntüleridir. (The intersection between enamel (left) and dentin (right) layers which was cross-sectioned by FIB. In the upper figure, the BSE image of enamel-dentin transition zone is given. The below figures correspond to SE (left) BSE (right) images of the junction area with higher magnification.)

4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Bu çalışmada, FIB-SEM platformlarının sağladığı iyon prosesleri ve elektron görüntülemesi sayesinde dentin ve mine tabakaları gibi farklı özelliklerdeki diş dokularının iç yapılarındaki mikro-/nano-yapısal farklılıkların yüksek hassasiyette tespiti sağlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, insan dişinin farklı tabakalarının hem yüzeyden, hem de FIB ile alınan yan kesitlerden görüntülenmesi ile morfolojik ve kimyasal farklılıklar gösterilmiştir. Çift-demet platformları sayesinde yüzeyin altındaki bölgeler incelenmiş olup, dentin tabakasının tübüllerden, mine tabakasının ise prizmalardan oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca mine-dentin birleşim bölgesinden alınan kesitte, iki tabaka arasındaki morfolojik ve kimyasal farklılıklar net olarak gösterilmiştir. Böylece FIB-SEM çift demet sistemlerinin diş dokularında çok pratik ve bilgi sağlayıcı sonuçlar sağlayabileceği gösterilmiştir.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışmada dental malzemelerin temininde emeği geçen Dt.Dr. Burak Kıtıkı'ye teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKÇA (REFERENCES)

- [1] M. Sezen, «Focused Ion Beams (FIB) — Novel Methodologies and Recent Applications for Multidisciplinary Sciences,» %1 içinde *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*, InTech, 2016.
- [2] L. Giannuzzi ve F. Stevie, *Introduction to Focused Ion Beams: Instrumentation, Theory, Techniques, and Practice*, New York: Springer, 2004.
- [3] J. Orloff, M. Utlaut ve L. Swanson, *High Resolution focused ion beams*, New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [4] A. M. CA Volkert, «Focused Ion Beam Microscopy and Micromachining,» *MRS Bulletin*, cilt 32, pp. 389-399, 2007.
- [5] S. Kumar, *Textbook of dental anatomy and tooth morphology*, New Delhi: Jaypee Brothers, 2004.
- [6] S. S. Meltem Sezen, «3D Electron Microscopy Investigations of Human Dentin at the Micro/Nano-Scale using Focused Ion Beams based Nanostructuring,» *RSC Advances*, cilt 5, p. 7196 – 7199, 2015.