

İyon Katkılı β -Trikalsiyum Fosfat Tozlarının Mikrodalga Destekli Sentez Tekniği ile Üretimi ve Antibakteriyellik Özelliklerinin İncelenmesi

Azade YELTEN COŞKUN^{1,2}, Yağmur GÖÇTÜ², Batur ERCAN²

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 34320 Avcılar, İstanbul.

² Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 06800 Çankaya, Ankara.

Sorumlu yazar* e-posta: azade.yelten@iuc.edu.tr
yagmur.goctu@metu.edu.tr
baercan@metu.edu.tr

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6089-6257>
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8312-3679>
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1657-1142>

Geliş Tarihi: 15 Şubat 2023 ; Kabul Tarihi: 27 Kasım 2023

Öz

β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), ortopedi uygulamalarında sıklıkla kullanılmakta olan kalsiyum fosfat (CaP) esaslı biyoseramik malzemelerden biri olup biyoemilebilir karakterdedir ve implantasyon alanına bağlı olarak macun, kaplama, toz, granül vb. formlarda uygulanabilmektedir. β -TCP üretimi için genellikle tercih edilen yaş kimyasal yöntemlerde, üretim sürelerinin uzun ve çok adımlı olması ve proses parametrelerinin kontrol edilmesinde güçlükler yaşanması nedeniyle farklı sentez yollarının geliştirilmesi yönünde araştırmalar ağırlık kazanmıştır. Bu çalışmada, β -TCP tozları deneysel sürecin çok daha kısa ve pratik olması yönleriyle ön plana çıkan mikrodalga destekli sentez tekniği ile elde edilmiştir. Hazırlanan Ca ve P kaynak çözeltileri reaksiyona sokulduktan sonra mikrodalga ışımasına tabi tutulmuş, ışıma sonrası ürünün santrifüj edilmesiyle açığa çıkan yaş çökelti kurutulmuş ve nihai olarak 900°C'de ısıtılma işlem görmesi sağlanmıştır. Böylelikle antibakteriyellik ve kemik gelişimini destekleme özellikleri sergilemesi beklenen Ce⁺³ ve SeO₃⁻² katkı β -TCP tozları üretilmiştir. Tozların karakterizasyonu kapsamında; X-Işını Difraksiyonu (XRD) ile kimyasal faz analizi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS) ile mikroyapı ve elementel haritalama incelemeleri, vücut benzeri sıvı (Simulated Body Fluid, SBF) içerisinde 37°C'de 14 gün tutma suretiyle biyoaktivite davranışının belirlenmesi ve Staphylococcus aureus (S. aureus, ATCC 25923) kullanılarak yapılan bakteri etkileşim testleri doğrultusunda antibakteriyellik özelliklerinin tayin edilmesi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen tozlar, yüzeylerinde 1X SBF çözeltisinde 14 gün bekletilme sonucunda CaP esaslı birikintiler oluşturmuştur ve bu durum örneklerin biyoaktif karakterde olduğunu göstermektedir. Ayrıca, iyon katkısına bağlı olarak bakteri koloni sayısında azalma tespit edilmesi de tozların antibakteriyellik özelliğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler
 β -Trikalsiyum fosfat tozu;
Mikrodalga destekli sentez;
İyon katkılama;
Biyoaktivite davranışı;
Antibakteriyel özellikler

Investigation of Antibacterial Properties of Ion-Doped β -Tri-calcium Phosphate Powders Produced via Microwave-Assisted Synthesis Technique

Keywords
 β -Tri-calcium phosphate powders;
Microwave-assisted synthesis;
Ion-doping;
Bioactivity behavior;
Antibacterial properties

Abstract

CaP-based bioceramic materials are widely used in orthopedic applications. β -tri-calcium phosphate (β -TCP) is a bioresorbable member of the CaP-based compounds and can be implemented as putty, coating, powders, granules, etc. depending on the implantation area. β -TCP is usually produced with wet chemical synthesis systems. However, long synthesis durations, processes with multiple steps, and difficulties in controlling the process parameters yield the researches to develop novel production methods. Recently, the microwave-assisted synthesis technique has drawn attention due to its advantages such as being a shorter and more practical experimental procedure. In this study, β -TCP

powders were fabricated via the microwave-assisted synthesis method. Ca and P source solutions were prepared, and following their reaction microwave radiation was applied. The obtained product was centrifuged to separate the precipitate, and then this wet part was dried, and finally calcined at 900°C. In this way, Ce³⁺ and SeO₃⁻² doped β -TCP powders, which may show antibacterial properties and induce bone regeneration were achieved. Chemical phase analysis with X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscope (SEM), and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) observations to investigate the microstructure and elemental mapping, immersion in the Simulated Body Fluid (SBF) for 14 days at 37°C to determine the bioactivity behavior, and bacteria interaction studies by using Staphylococcus aureus (S. aureus, ATCC 25923) to evaluate the antibacterial activity of the synthesized powders were done within characterization. Formation of the CaP-based precipitates on the surfaces of the powders depending on immersion in 1X SBF solution showed the bioactive character of the products. Moreover, a reduction in the number of bacterial colonies proved that the ion-doped powders exhibited antibacterial properties.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Kalsiyum fosfat (CaP) esaslı malzemeler, kemik, çene, yüz ve diş cerrahisinde kullanılan implantlarda ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında yoğun olarak tercih edilmektedir. β -trikalsiyum fosfat (β -TCP, β -Ca₃(PO₄)₂) bileşiği de en sık kullanılan apatit ailesi üyelerinden biridir. CaP bileşiğinin vücut sıvısındaki çözünürlüğü (Ca/P) molar oranına bağlı olarak değişmektedir. Bu oran, β -TCP için 1,5 olup malzemenin vücut sıvıları ile temas haline geçtiğinde daha hızlı emilim göstermesini sağlamaktadır. Nitekim β -TCP biyobozunur doku iskelesi uygulamaları için ideal bir biyoseramik malzeme olarak tanımlanmaktadır. β -TCP partikülleri vücut sıvıları ile çok hızlı tepki verme özelliğine sahip olduğu için hasarlı bölgede kemik doku gelişimini indükleyerek hastanın iyileşme sürecini kısaltmaktadır (Hench 1991, Hench 1998, Orvloskii vd. 2002, Ratner vd. 2004). β -TCP partikülleri, klinik uygulamalarda kemik içerisinde farklı sebeplerle oluşan boşluk ve çatlakları iyileştirebilmek için greft (dolgu malzemesi) olarak kullanılmakta olup yaş kimyasal çöktürme, sol-jel metodu, katı-hal reaksiyonları, hidrotermal sentez gibi çeşitli yöntemlerle üretilebilmektedir (Hench 1998, Kumta vd. 2005, Chaair vd. 2017, Yelten ve Yılmaz 2018, Bohner vd. 2020). Ancak bahsedilen yöntemler; uzun ve kompleks proses aşamaları, özellikle yaş metotlarda dikkate alınması gereken proses parametrelerinin çokluğu ve bu parametrelerin kontrolü noktasında karşılaşılan zorluklar, partikül boyutlarında heterojenlik ve aglomerasyon oluşma riski gibi üretimi kısıtlayıcı yönleri sahiptir. Öte taraftan mikrodalga destekli sentez yöntemi,

geleneksel metotların aksine daha kısa proses süreleri, saf, homojen ve mikron altı boyutlu partiküllerin üretimi, daha düşük enerji sarfiyatı ve üretim parametrelerinin daha rahat kontrol edilebilirliği gibi önemli avantajlar taşımaktadır (Sha vd. 2011, Nazir vd. 2013, Shavandi vd. 2015). Mikrodalga destekli sentez işlemi, CaP esaslı bileşiklerin üretilmesinde yaygın olarak kullanılan geleneksel yaş kimyasal sentez proseslerine göre çok daha kısa süre içerisinde uniform partiküllerin elde edilmesine fırsat tanımaktadır. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile hedef reaksiyon sıcaklığına dakikalar içerisinde ulaşılarak reaksiyon tamamlanmakta olup ürün eldesi sağlanmaktadır. Söz konusu yöntemde ısı, mikrodalgaya maruz kalan malzemenin bünyesinde oluştuğu için malzemenin kendisi bir ısı kaynağı haline gelmektedir. Böylelikle, ısı tüm malzeme hacmine seri ve homojen bir şekilde ulaşmaktadır. Prosesin çok kısa bir zaman diliminde gerçekleşmesi sayesinde tane büyümesine ya da kabalaşmasına fırsat tanınmadan mikron altı boyutlu partiküllerin sentezlenmesi mümkün olmaktadır (Kalita ve Verma 2010, Sha vd. 2011, Shavandi vd. 2015, Zhou ve Bhaduri 2012, Sabu vd. 2019). Mikron altı boyutlu β -TCP partikülleri, implant operasyonu kapsamında enfeksiyon meydana gelme riskini en aza indirebilmek ve aynı zamanda kemik oluşumunu da hızlandırmak adına çeşitli elementler ile katkılandırılabilir. Seryum (Ce) içeren bileşiklerin bakteriyostatik özellikleri sayesinde implant uygulamalarında meydana gelebilecek olası enfeksiyonların önüne geçmesi beklenmektedir (Ciobanu vd. 2015, Gopi vd. 2014, Ciobanu vd. 2016). Selenyum (Se) ise vücutta kansere karşı

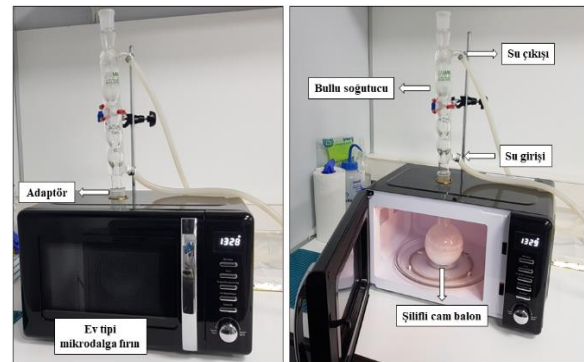
koruyucu, antioksidan ve antibakteriyel özellikler göstermekte olup çift yönlü bir biyolojik etki sunmaktadır. Hem kanser tedavisinde tümörün tekrar oluşumunu engelleme etkisi hem de antibakteriyel olması sebebiyle (Wei vd. 2017, Sun vd. 2017, Uskokovic vd. 2017) Se katkısına yönelik araştırmalar son zamanlarda artarak devam etmektedir. Bu çalışmada, mikrodalga destekli sentez yöntemi kullanılarak seryum (Ce^{+3}) ve selenit (SeO_3^{-2}) iyonları ile katkılandırılmış mikron altı boyutlu β -TCP partikülleri üretilmiştir. Antibakteriyel özellikler kazandırması sebebiyle söz konusu iyonlar ile katkılandırılan β -TCP partiküllerine kimyasal faz ve mikroyapı analizlerinin yanısıra *in vitro* (vücut dışı) biyoaktivite ve bakteri etkileşim testleri de yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

β -TCP (β - $Ca_3(PO_4)_2$) tozu üretimi mikrodalga destekli sentez yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ev tipi bir mikrodalga fırın modifiye edilmiştir. Mikrodalga fırının üst kısmında bir delik açılarak reaksiyon sırasında kaybedilen suyun geri akışı (refluxing) için bullu soğutucu kullanılmış olup mikrodalga fırın, çalışma süresi boyunca su sirkülasyonu ile desteklenmiştir. Kalsiyum (Ca) kaynağı kalsiyum nitrat tetrahidrat ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, Sigma-Aldrich, ACS Reagent, 99%) ve fosfor (P) kaynağı ise diamonyum hidrojen fosfat ($(NH_4)_2HPO_4$, Sigma-Aldrich, ACS Reagent, $\geq 98\%$) çözeltileridir. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile β -TCP tozu üretimi için kullanılan deney düzeneğine ait fotoğraf Şekil 1'de yer almaktadır. Deneyin ilk etabında, Ca ve P kaynağı çözeltilerinden oluşan karışım, β -TCP fazının sitokiyometrisi ile uyumlu olarak (Ca/P) molar oranı 1,5 olacak şekilde hazırlanmıştır. Uygun miktarda sulu amonyak (Isolab, NH_4OH , 25%) ilavesi yapılarak karışımın pH değerinin 8 seviyesinde tutulması sağlanmıştır. Katkılama işlemi Ce^{+3} iyonlarının (molce %1) Ca^{+2} ve selenit (SeO_3^{-2}) iyonlarının (molce %1) ise fosfat (PO_4^{-3}) iyonlarıyla yer değiştirmesi doğrultusunda gerçekleştirilmektedir (Gopi vd. 2014, Wang vd. 2012). Bunun için Ce^{+3} kaynağı olan seryum (III) nitrat heksahidrat ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Aldrich, 99%

trace metals basis) Ca kaynağı çözeltisine; (SeO_3^{-2}) kaynağı olan sodyum selenit ($Na_2(SeO_3)$, Sigma, 99%) ise P kaynağı çözeltisine ilave edilmektedir. Böylelikle çözeltiler konsantrasyonları; (Ca+Ce)/P ve Ca/(P+Se) molar oranı yine β -TCP fazının sitokiyometrisi ile uyumlu olarak 1,5'i koruyacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler mikrodalga fırına alınmış ve 5 dakika 800 W mikrodalga gücü uygulanmıştır. Klasik yaş kimyasal çöktürme prosesleri *çekirdeklenme-agregatlaşma-aglomerasyon-büyüme* mekanizmasına dayanmaktadır (Mostafa 2005).

Bu bakımdan her ne kadar çöktürme prosesi sıcaklık etkisi altında gerçekleştirilebilir olsa da reaksiyon ve olgunlaştırma süreleri difüzyon sürecinden ötürü çok uzun olabilmekte ve aglomerasyon, anormal tane büyümesi gibi durumlara yol açabilmektedir (Yelten ve Yılmaz, 2018, Gungor Koc ve Ahmed, 2019, Samanta vd. 2019). Partiküler yapıdaki bir malzemeye absorbe olan mikrodalga enerjisi ise malzeme sıcaklığını çok kısa bir zaman diliminde yükseltmektedir. Isının malzemenin tüm hacmine hızlıca yayılması sayesinde partikül sentezi de oldukça seri bir şekilde gerçekleşmektedir (Kalita ve Verma 2010, Pasand vd. 2012, Hassan vd. 2016).



Şekil 1. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile β -TCP tozu üretimi için kullanılan deney düzeneği.

Bu bağlamda, ev tipi mikrodalga fırın, uygulayabileceği maksimum güçte (800 W) ve daha evvel yapılmış ön denemeler doğrultusunda belirlenen en kısa süre (5 dakika) çalıştırılarak sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mikrodalga destekli sentez sonrasında reaksiyonun gerçekleştirildiği cam balon fırın dışına alınmış ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Santrifüj ile katı/sıvı kısım ayırma ve vorteks uygulayarak saf su ile yıkama adımlarından sonra elde edilen macun kıvamındaki ıslak ürün, etüvde 70-80°C'de kurutulmuştur. Kristalin β -TCP fazının elde edilebilmesi için ham durumdaki malzeme, havan ve tokmak yardımıyla manuel olarak öğütüldükten sonra 900°C'de 1 saat kalsine edilmiştir. Çalışmanın hedefinde mikrodalga destekli sentez tekniği ile mümkün olan en kısa sürede küçük ve uniform β -TCP partiküllerini üretebilmek yer almaktadır. Dolayısıyla kalsinasyon prosesinin neden olabileceği tane büyümesi/kabalaşması ve sinterlemenin başlaması gibi durumların önüne geçebilmek için kristalin β -TCP'nin tek faz olarak eldesine imkân tanıyan düşük kalsinasyon sıcaklığı ve kısa kalsinasyon süresi parametreleri ile çalışılmıştır (Oliveira vd. 2009, Othman vd. 2017, Simsek ve Avcı 2019, Bohner vd. 2020).

Isıl işlem neticesinde açığa çıkan kristalin yapıdaki toz örneklerin faz içeriğini tayin edebilmek için 10-70° difraksiyon açısı aralığında ve 2°/dk çekim hızı koşulunda X-ışını Difraksiyonu (XRD) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu sayede mikrodalga destekli sentez prosesi sonucunda oluşan CaP esaslı bileşikler tespit edilmiştir. Üretilmiş olan toz örneklerin mikroyapı ve elementel haritalama analizleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS) kullanılarak yapılmıştır. Toz örneklerin yüzeyi analiz öncesinde ince bir altın tabakası ile kaplanarak iletkenlik sağlanmıştır.

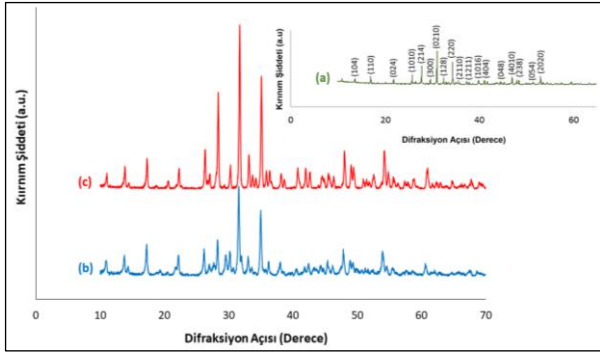
Tozların *in vitro* biyoaktivite davranışını belirleyebilmek için Prof. Tadashi Kokubo'nun (Kokubo ve Takadama 2006) protokolüne bağlı kalınarak vücut benzeri sıvı (Simulated Body Fluid, SBF) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin pH değeri 7,4 olup vücut sıvıları ile uyumludur. Toz örnekler SBF çözeltisinde vücut sıcaklığı olan 37°C'de 14 gün bekletilmiştir (Baino ve Yamaguchi 2020, Tabak 2023). Örneklerin SBF çözeltisindeki davranış literatürde genellikle 7-14-21 gün zarfında değerlendirilmekte olup çalışma bağlamında ilk 14

günde malzeme yüzeyinde biriken CaP esaslı yapılar SEM ile incelenmiştir (Rattanachan vd. 2018, Alshemary vd. 2022). Dış atmosfer ile teması önlemek için kapakları kapalı şekilde 15 ml'lik tüplere konulan toz örneklerin içerisinde bekletildiği SBF çözeltileri periyodik olarak değiştirilmiş olup örneklerin yüzeylerinde apatit tabakası birikme durumu da yine SEM ile gözlemlenmiştir.

Tozların antibakteriyellik özelliği hakkında fikir edinebilmek için *Staphylococcus aureus* (S. aureus, ATCC 25923) kullanılarak bakteri etkileşim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Zira S. aureus, cerrahi alan enfeksiyonlarına (surgical site infections, SSIs) neden olan en yaygın bakteridir. Klinik ortamda en sık karşılaşılan bakteri olan S. aureus ortopedik ekipman enfeksiyonlarının ve enfeksiyona bağlı primer cerrahide başarısızlığın en önemli sebebidir (Saadatian-Elahi vd. 2008, Chen vd. 2013, Hardstock vd. 2020). Bu kapsamda, katkısız ve iyon katkılı β -TCP partiküllerinin S. aureus kolonileri üzerindeki etkisi agarlı besiyerleri üzerinde koloni sayımı yapmak suretiyle değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

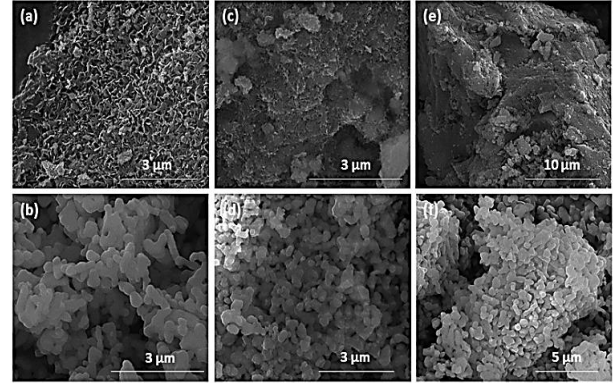
Şekil 2(a)'da verilen XRD sonuç grafiğine bakıldığında katkısız örnek için yalnızca β -TCP fazına (Whitlockite, syn. JCPDS Card No: 09-0169) ait pikler görülmektedir (Ebrahimi vd. 2012). Söz konusu fazın piklerine karşılık gelen Miller indislemeleri de grafik üzerinde yapılmıştır. Katkısız örnekte herhangi bir ikincil faz bulunmamaktadır. Yeniden üretimler gerçekleştirilerek ürün eldesinin tekrar edilebilirliği test edilmiş ve parametre optimizasyonunun uygunluğu doğrultusunda her denemede β -TCP'nin ana faz olduğu toz ürünlerin üretimi sağlanmıştır. İyon katkılı örneklerin yine Şekil 2'de yer alan XRD sonuç grafiğinde ise her iki örnek için de hakim faz β -TCP'dir. Ce^{+3} iyonu ile katkılanırılmış örnek (2b) kalsiyum seryum fosfat (Ca-Ce-(PO_4), #01-087-1161, #00-057-0028) kimyasal faz yapısında olmakla birlikte Ce(PO_4) (#01-084-0247) gibi yan fazların da varlığı belirlenmiştir. SeO_3^{-2} katkılı örnek (2c) için de yine β -TCP fazının karakteristik pikleri tespit edilmiştir.



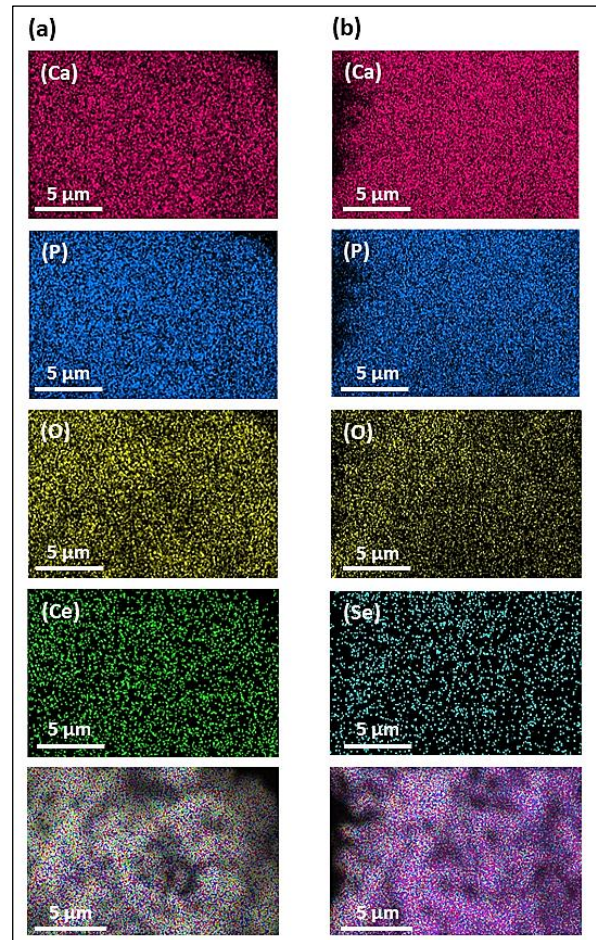
Şekil 2. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen (a) katkısız, (b) Ce^{+3} katkılı ve (c) SeO_3^{-2} katkılı β -TCP tozlarına ait XRD analizi sonucu.

Mikrodalga destekli sentez ile üretilen katkısız ve iyon katkılı β -TCP tozlarına ait SEM (FEI Nova Nano 430) görüntüleri Şekil 3'te yer almaktadır. Görüntülerde örneklerin hem ham yani ısıl işlem görmemiş, hem de 900°C 'de kalsine edilmiş mikroyapı özellikleri dikkat çekmektedir. Katkısız ham β -TCP tozlarının plaka ya da pul olarak tanımlanabilecek bir partikül şekline sahip olduğu görülmektedir. 900°C 'de 1 saat süresince gerçekleştirilen kalsinasyon işlemi sonrasında olgunlaşmaya (kristallenme) bağlı olarak partiküllerin küresele yakın bir morfoloji kazandığı gözlemlenmektedir. Katkısız β -TCP tozlarına benzer şekilde Ce^{+3} ve SeO_3^{-2} katkılı örneklerde de ham tozlar ile kalsine olan tozlar partikül şekli, boyutu ve topaklanma durumu bakımından birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmaktadır. Ham tozların partikül şekli plaka ya da pul olarak tanımlanabilirken kalsine tozların partikül şekli ise küresele yakındır. Katkılı β -TCP tozlarında katkı elementinin (Ce ve Se) dağılımını inceleyebilmek için SEM-EDS (Hitachi SU3500-Oxford Instruments x-act) analizi kullanılarak elementel haritalama yapılmıştır ve sonuçları Şekil 4'te sunulmuştur. EDS haritalaması katkı iyonlarının β -TCP yapısında homojen şekilde dağıldığını ortaya koymaktadır (Abdulaah vd. 2023, Tao vd. 2023). Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen katkısız, Ce^{+3} katkılı ve SeO_3^{-2} katkılı β -TCP tozlarının SBF çözeltisi içerisinde 37°C 'de 14 gün bekletilme sonrasında yüzeyleri üzerinde zamana bağlı olarak biriken çökeltilerin SEM görüntüleri Şekil 5'te verilmiştir. Gözlemlere göre katkısız ve iyon katkılı örnek gruplarının her birinde CaP esaslı çökelti biriktirme

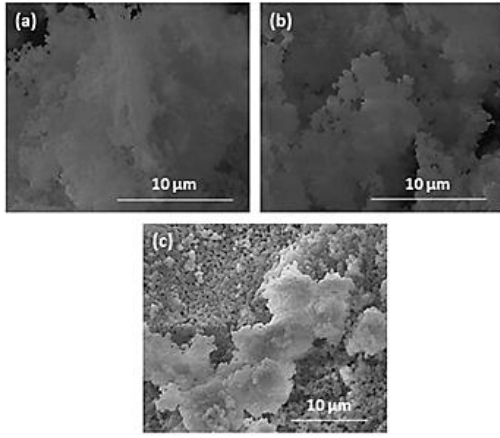
eğilimi yakın seviyelerdedir. Aglomere tabakalar şeklinde biriken bu yapıların toz yüzeyini kaplamış olduğu görülmektedir ki bu durum, örneklerin biyoaktif karakterine işaret etmektedir.



Şekil 3. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen (a,b) katkısız β -TCP tozlarına, (c,d) Ce^{+3} katkılı ve (e,f) SeO_3^{-2} katkılı tozlara ait SEM görüntüleri. (a, c, e: ham tozlar; b, d, f: kalsine tozlar)

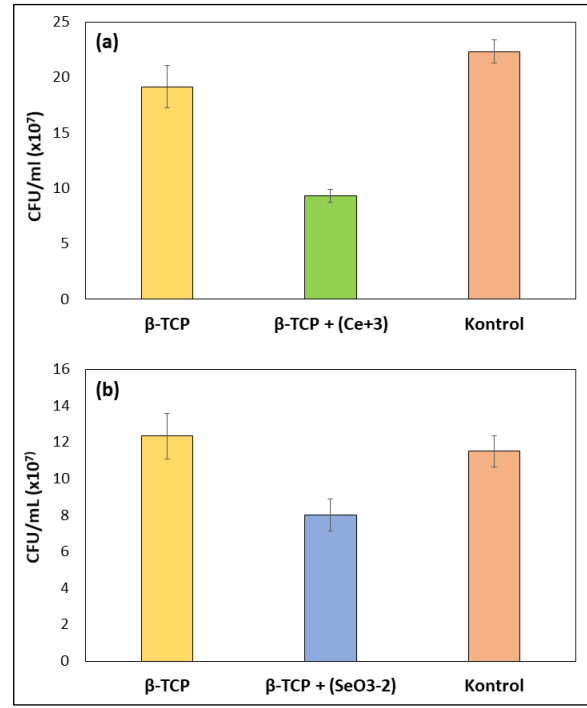


Şekil 4. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen (a) Ce^{+3} katkılı ve (b) SeO_3^{-2} katkılı β -TCP tozlarına ait SEM-EDS elementel haritalama analizi.



Şekil 5. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen (a) katkısız, (b) Ce^{+3} katkılı ve (c) SeO_3^{-2} katkılı β -TCP tozlarının SBF çözeltisi içerisinde $37^\circ C$ 'de 14 gün bekletilmesi sonrasında yüzeyleri üzerinde zamana bağlı olarak biriken çökeltiler.

Bakteri etkileşim test sonuçları (Şekil 6) ise Ce^{+3} katkılı ve SeO_3^{-2} katkılı tozların antibakteriyel özellik gösterdiğini doğrulamaktadır. Zira mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen Ce^{+3} katkılı ve SeO_3^{-2} katkılı tozların koloni sayıları katkısız β -TCP tozlarının koloni sayılarına göre çok daha düşüktür. Ce^{+3} katkılı örnekler bakteri gelişimini neredeyse yarı yarıya azaltmışken, SeO_3^{-2} katkılı numuneler daha az bir etki göstermiştir. Dolayısıyla Ce katkısının koloni oluşumunu azaltma noktasında daha etkili olduğu açıkça fark edilmektedir. Bu noktada katkı iyonlarının β -TCP'deki iyonlar ile yapısal benzerliğe sahip olma/olmama durumu, farklı katkı iyonlarının farklı antibakteriyel etki mekanizmaları göstermesi ve malzemenin emilim kinetiği üzerindeki davranışları gibi faktörler etkili olmaktadır (Albulescu vd. 2019, Maqbool vd. 2021, Kamphof vd. 2023). Örneklerin antibakteriyellik özellikleri, katkı iyonlarını birbirleri ile kıyaslamaktan ziyade katkılama yapılmış β -TCP örneğini kendi test grubundaki kontrol örneği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kontrol numuneleri, bakterinin besi yeri içerisinde katkısız β -TCP veya antibakteriyel ajan katkılı β -TCP tozu olmadan büyüdüğü örneklerdir (Duan vd. 2021, Stipnice vd. 2022). Kontrol numuneleri ile kıyaslandığı zaman katkısız β -TCP örneklerinin herhangi bir antibakteriyel ajan içermediği halde de kontrol grubuna göre benzer ya da daha iyi bir antibakteriyellik davranışı gösterdiği anlaşılmaktadır.



Şekil 6. Mikrodalga destekli sentez tekniği ile üretilen katkısız β -TCP, (a) Ce^{+3} katkılı ve (b) SeO_3^{-2} katkılı tozların koloni sayıları. (0,01 g/ml konsantrasyon) (CFU: colony forming unit)

4. Tartışma ve Sonuç

Biyoemilebilir bir malzeme olan β -TCP, antibakteriyel özellikler sergilemesi hedeflenerek Ce^{+3} ve SeO_3^{-2} iyonları ile katkılanmıştır. Katkılı β -TCP partiküllerinin üretimi için proses parametre kontrolü daha pratik bir metot olan mikrodalga destekli sentez yöntemi kullanılmıştır.

Mikrodalga destekli sentez prosesi diğer geleneksel yaş kimyasal üretim metotlarına nazaran daha az aşamalı olma, mikron altı boyutlu ve uniform partikül elde etme gibi avantajlarıyla ilgi çekmektedir.

Çalışma kapsamında, katkısız, Ce^{+3} katkılı ve SeO_3^{-2} katkılı β -TCP partikülleri mikrodalga destekli sentez tekniği kullanılarak dakikalar içerisinde üretilmiştir.

XRD sonuçları katkısız ve iyon katkılı toz örneklerdeki ana fazın β -TCP (Whitlockite) olduğunu göstermiştir.

Mikroyapı analizlerinden kalsine β -TCP partiküllerinin küresele yakın bir şekle sahip olduğu görülmüştür.

EDS elementel haritalama analizleri doğrultusunda

katkı iyonlarının β -TCP yapısında homojen bir şekilde dağıldığı belirlenmiştir.

Katkısız ve iyon katkılı örnek gruplarının her biri, biyoaktif karakterleri doğrultusunda vücut benzeri sıvı içerisinde 14 gün bekletmeye bağlı olarak CaP esaslı çökelti biriktirme eğilimi sergilemiştir.

S. aureus kullanılarak gerçekleştirilen bakteri etkileşim çalışmaları sonucunda Ce^{+3} katkılı ve SeO_3^{-2} katkılı örneklerin katkısız β -TCP'ye göre daha düşük koloni sayılarına sahip olması iyon katkılı numunelerin antibakteriyel özelliklerine işaret etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2021-34751. SEM-EDS elementel haritalama analizi için verdiği destekten ötürü Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi Alüminyum Test, Eğitim ve Araştırma Merkezi'ne (FSMVÜ ALUTEAM) de teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

Abdulaah, H.A., Al-Ghaban, A.M., Anaee, R.A., Khadom, A.A. ve Kadhim, M.M., 2023. Cerium-tricalcium phosphate coating for 316L stainless steel in simulated human fluid: Experimental, biological, theoretical, and electrochemical investigations, *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, **13(1)**, 115-126.

Albulescu, R., Popa, A.-C., Enciu, A.-M., Albulescu, L., Dudau, M., Popescu, I.D., Mihai, S., Codrici, E., Pop, S., Lupu, A.-R., Stan, G.E., Manda, G. ve Tanase, C., 2019. Comprehensive *In Vitro* Testing of Calcium Phosphate-Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications, *Materials*, **12**, 3704.

Alshemary, A.Z., Muhammed, Y., Salman, N.A., Hussain, R., Motameni, A., Gurbuz, R., Alkaabi, M.H.H. ve Abdolahi, A., 2022. In vitro degradation and bioactivity of antibacterial chromium doped β -tricalcium phosphate bioceramics, *Ceramics-Silikáty*, **66(3)**, 347-353.

Baino, F. ve Yamaguchi, S., 2020. The use of simulated body fluid (SBF) for assessing materials bioactivity in the context of tissue engineering: Review and challenges, *Biomimetics*, **5**, 57.

Bohner, M., Le Gars Santoni, B. ve Döbelin, N., 2020. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties, *Acta Biomaterialia*, **113**, 23-41.

Chaaier, H., Labjar, H. ve Britel, O., 2017. Synthesis of β -tricalcium phosphate, *Morphologie*, **101**, 120-124.

Chen, A.F., Wessel, C.B. ve Rao, N., 2013. Staphylococcus aureus screening and decolonization in orthopaedic surgery and reduction of surgical site infections, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **471**, 2383-2399.

Ciobanu, G., Bargan, A.M. ve Luca, C., 2015. New cerium (IV)-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Preparation and characterization, *Ceramics International*, **41**, 12192-12201.

Ciobanu, C.S., Popa, C.L., Predoi ve D., 2016. Cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the co-precipitation method, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **81(4)**, 433-446.

De Oliveira, D.M.P, Prants, W.T., Camargo, N.H.A. ve Gemelli, E., 2009. Synthesis and characterization of powders calcium phosphate for biomedical applications, *Seventh International Latin American Conference on Powder Technology*, November 08-10, Atibaia, SP, Brazil, 1021-1026.

Duan, M., Ma, S., Song, C., Li, J. ve Qian, M., 2021. Three-dimensional printing of a β -tricalcium phosphate scaffold with dual bioactivities for bone repair, *Ceramics International*, **47(4)**, 4775-4782.

Ebrahimi, M., Monmaturapoj, N., Suttapreyasri, S. ve Pripatnanont, P., 2012. The fabricated Collagen-based nano-hydroxyapatite / β -tricalcium phosphate scaffolds, *Advanced Materials Research*, **506**, 57-60.

Gopi, D., Ramya, S., Rajeswari, D., Karthikeyan, P. ve Kavithad, L., 2014. Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and *in vitro* studies, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **451**, 172-180.

Gungor Koc, S. ve Ahmed, R.W., 2019. Fabrication and characterization of nano-TCP doped with various ions for bone implant applications, *Journal of the Institute of Science and Technology*, **9(4)**, 2181-2189.

Hardtstock, F., Heinrich, K., Wilke, T., Mueller, S. ve Yu, H., 2020. Burden of Staphylococcus aureus infections

- after orthopedic surgery in Germany, *BMC Infectious Diseases*, **20**, 233.
- Hassan, M.N., Mahmoud, M.M., El-Fattah, A.A. ve Kandil, S., 2016. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes, *Ceramics International*, **42(3)**, 3725-3744.
- Hench, L.L., 1991. Bioceramics: from concept to clinic, *Journal of the American Ceramic Society*, **74(7)**, 1487-1510.
- Hench, L.L., 1998. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, **81(7)**, 1705-1728.
- Kalita, S.J. ve Verma, S., 2010. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization, *Materials Science and Engineering: C*, **30**, 295-303.
- Kamphof, R., Lima, R.N.O., Schoones, J.W., Arts, J.J., Nelissen, R.G.H.H., Cama, G. ve Pijls, B.G.C.W., 2023. Antimicrobial activity of ion-substituted calcium phosphates: A systematic review, *Heliyon*, **9**, e16568.
- Kokubo, T. ve Takadama H., 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, **27(15)**, 2907-2915.
- Kumta, P.N., Sfeir, C., Lee, D.H., Olton, D. ve Choi, D., 2005. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, **1**, 65-83.
- Maqbool, M., Nawaz, Q., Rehman, M.A.U., Cresswell, M., Jackson, P., Hurle, K., Detsch, R., Goldmann, W.H., Shah, A.T. ve Boccaccini, A.R., 2021. Synthesis, characterization, antibacterial properties, and *in vitro* studies of selenium and strontium co-substituted hydroxyapatite, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 4246.
- Mostafa, N.Y., 2005. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes, *Materials Chemistry and Physics*, **94(2-3)**, 333-341.
- Nazir, R., Khana, A.S., Ahmed, A., Ur-Rehman, A., Chaudhry, A.A., Ur Rehman, I. ve Wong, F.S.L., 2013. Synthesis and in-vitro cytotoxicity analysis of microwave irradiated nano-apatites. *Ceramics International*, **39(4)**, 4339-4347.
- Orlovskii, V.P., Komlev, V.S. ve Barinov, S.M., 2002. Hydroxyapatite ve hydroxyapatite-based ceramics, *Inorganic Materials*, **38(10)**, 973-984.
- Othman, R., Mustafa, Z., Kien, P.T., Ishak, N.F., Shaaban, A. ve Mohd Noor, A.F., 2017. Parameters affecting the synthesis of β -tricalcium phosphate powder using a wet precipitation method, *Journal of Mechanical Engineering and Sciences*, **11(4)**, 3197-3205.
- Pasand, E.G., Nemati, A., Solati-Hashjin, M., Arzani, K. ve Farzadi, A., 2012. Microwave assisted synthesis & properties of nano HA-TCP biphasic calcium phosphate, *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, **19(5)**, 441-445.
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. ve Lemons, J.E., 2004. Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor, Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. ve Lemons, J.E. (Eds.), *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, second ed., Elsevier Academic Press, New York-London, 1-9.
- Rattanachan, S.T., Suksaweang, S., Jiang, T.-X., WidELITZ, R.B., Chuong, C.-M. ve Srakaew, N. La-ong, 2018. Self-setting calcium phosphate enhanced with osteoconduction and bioactivity for bone cement, *Chiang Mai Journal of Science*, **45(5)**, 2132-2139.
- Saadatian-Elahi, M., Teysou, R. ve Vanhems, P., 2008. Staphylococcus aureus, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature review, *International Journal of Surgery*, **6(3)**, 238-245.
- Sabu, U., Logesh, G., Rashad, M., Joy, A. ve Balasubramanian, M., 2019. Microwave assisted synthesis of biomorphic hydroxyapatite, *Ceramics International*, **45**, 6718-6722.
- Samanta, S.K., Chanda, A. ve Nandi, S.K., 2019. Physical and mechanical characterization of crystalline pure β -tri calcium phosphate & its dopants as bone substitutes, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, **577**, 012138.
- Sha, L., Liu, Yuyan, Zhang, Qing, Hu, Min ve Jiang, Y., 2011. Microwave-assisted co-precipitation synthesis of high purity β -tricalcium phosphate crystalline powders, *Materials Chemistry and Physics*, **129**, 1138-1141.
- Shavandi, A., El-Din A. Bekhit, A., Ali, A., Sun, Z. ve Ratnayake, J.T., 2015. Microwave-assisted synthesis of high purity β -tricalcium phosphate crystalline powder from the waste of Green mussel shells (*Perna canaliculus*), *Powder Technology*, **273**, 33-39.

- Simsek, Y.E. ve Avcı, S., 2019. Synthesis and characterization of hydroxyapatite produced by microwave assisted precipitation technique, *Acta Physica Polonica A*, **135(5)**, 974-976.
- Stipniece, L., Skadins, I. ve Mosina, M., 2022. Silver-and/or titanium-doped β -tricalcium phosphate bioceramic with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Ceramics International*, **48(7)**, 10195-10201.
- Sun, J., Zheng, X., Li, D. Fan, H., Song, Z., Ma, H., Hua, X. ve Hui, J., 2017. Monodisperse selenium-substituted hydroxyapatite: Controllable synthesis and biocompatibility, *Materials Science and Engineering: C*, **73**, 596-602.
- Tabak, Y., 2023. Biyomimetik bir yaklaşım ile β -TCP/kitosan için EPD kaplama, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, **13(2)**, 347-362.
- Tao, Z.-S., Li, T.-L. ve Wei, S., 2023. Co-modified 3D printed β -tricalcium phosphate with magnesium and selenium promotes bone defect regeneration in ovariectomized rat, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **34**, 7.
- Uskoković, V., Iyer, M.A. ve Wu V.M., 2017. One ion to rule them all: combined antibacterial, osteoinductive and anticancer properties of selenite-incorporated hydroxyapatite, *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, **5(7)**, 1430-1445.
- Wang, Y., Ma, J., Zhou, L., Chen, J., Liu, Y., Qiu, Z. ve Zhang, S., 2012. Dual functional selenium-substituted hydroxyapatite, *Interface Focus*, **2**, 378-386.
- Wei, L., Pang, D., He, L. ve Deng, C., 2017. Crystal structure analysis of selenium-doped hydroxyapatite samples and their thermal stability, *Ceramics International*, **43**, 16141-16148.
- Yelten, A. ve Yılmaz S., 2018. Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders, *Ceramics International*, **44(8)**, 9703-9710.