T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI

FARKLI SPEKTROMETRİK TEKNİKLER KULLANARAK SAFRA KESESİ TAŞLARININ MİKROYAPISAL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

Hatice GEDİK

Danışman: Prof. Dr. Sevil DURDAĞI

TEZ JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Sevil DURDAĞI
Doç. Dr. Tuba AKKUŞ
Dr. Öğr. Üyesi Melek Bahadır FİDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ERZİNCAN, 2026

© 2026 [Hatice GEDİK] Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Sevil DURDAĞI danışmanlığında, Hatice GEDİK tarafından hazırlanan bu çalışma 30.01.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği (3/0) ile kabul edilmiştir.

Başkan:	Prof. Dr. Sevil DURDAĞI	İmza :
Üye:	Doç. Dr. Tuba AKKUŞ	İmza :
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Melek Bahadır FİDAN	İmza :

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunun …. / …. / 20.... tarih ve …../…….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

"Farklı Spektrometrik Teknikler Kullanarak Safra Kesesi Taşlarının Mikroyapısal ve Kimyasal Karakterizasyonunun Yapılması" isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 30.01.2026

(İmza)

Hatice GEDİK

ÖZET

FARKLI SPEKTROMETRİK TEKNİKLER KULLANARAK SAFRA KESESİ TAŞLARININ MİKROYAPISAL VE KİMYASAL KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

Hatice GEDİK

Yüksek Lisans Tezi
Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Fizik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sevil DURDAĞI
2026, 114 Sayfa

Safra kesesi taşları (insan safra kesesinin içinde gelişen çakıl benzeri maddeler) yetişkinlerde en ağrılı safra yolu hastalıklarından biridir ve yüksek insidansa sahiptir. Safranın bileşimi su, kolesterol, yağlar, safra tuzları, proteinler ve bilurabini içerir. Safra genellikle kolesterolü çözebilir ancak çok fazla kolesterol varsa sonunda taşlara dönüşen kristallere dönüşür. Bazı durumlarda bilurabin seviyesi çok yüksekse bu da taş oluşumuna neden olabilir. Safra kesesi taşları, safra aşırı doygunluğu, çekirdeklenme ve başlatma ve taş birikmesiyle taş büyümesi gibi karmaşık bir dizi olaydan sonra safra kesesinin içinde oluşan ve gelişen sert kimyasal parçacıklardır. Farklı safra kesesi taşlarının kendine özgü nedenleri ve oluşum mekanizmaları vardır. Safra kesesi taşlarının bileşimi, yaş, diyet, coğrafi bölge, obezite, kilo kaybı ve etnik köken gibi faktörlerden etkilenir. İdeal bir safra kesesi taşı sınıflandırma sistemi tanımlamak zordur; ancak, bunlar ana kimyasal bileşimlerine göre genel olarak gruplandırılabilir. Safra taşı hastalığının etyopatogenezinde yer alan anahtar faktörler, kimyasal, yapısal ve elementel kompozisyon analizler ile belirlenebilir. Hem mikroskobik hem de spektroskopik olmak üzere farklı tamamlayıcı analitik teknikler uygulayarak, safra kesesi taşlarının ultra yapısı ve eser elementlerin tanımlanması yapılabilir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometre (FTIR) ve X-ışını kırınımı (XRD) gibi yüksek hassasiyetli teknikler ile biyokimyasal analizler yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometre (FTIR); Mikroyapı analizi; Safra kesesi taşları; Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışını kırınımı (XRD).

ABSTRACT

MICROSTRUCTURAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF GALLBLADDER STONES USING DIFFERENT SPECTROMETRIC TECHNIQUES

Hatice GEDİK

Master's Thesis

Erzincan Binali Yıldırım University, Institute of Science and Technology, Department of Physics

Advisor: Prof. Dr. Sevil DURDAĞI

2026, 114 pages

Gallstones (gravel-like substances that develop inside the human gallbladder) are one of the most painful biliary tract diseases in adults and have a high incidence. Bile is composed of water, cholesterol, fats, bile salts, proteins, and bilurabin. Bile is generally able to dissolve cholesterol, but if there is too much cholesterol, it forms crystals that eventually form into stones. In some cases, if bilurabin levels are too high, this can also lead to stone formation. Gallstones are hard chemical particles that form and develop inside the gallbladder after a complex series of events, including bile supersaturation, nucleation and initiation, and stone growth through stone accumulation. Different gallstones have unique causes and formation mechanisms. The composition of gallstones is influenced by factors such as age, diet, geographic region, obesity, weight loss, and ethnicity. It is difficult to define a perfect gallstone classification system; however, they can be broadly grouped according to their primary chemical composition. Key factors involved in the etiopathogenesis of gallstone disease can be determined by chemical, structural, and elemental compositional analyses. Ultrastructure and trace element identification of gallstones can be achieved by applying various complementary analytical techniques, both microscopic and spectroscopic. Biochemical analyses can be performed using high-sensitivity techniques such as scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), and X-ray diffraction (XRD).

Keywords: Fourier transform infrared spectrometry (FTIR); Microstructure analysis; Gallstones; Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi hazırlarken her konuda desteklerini esirgemeyen, her aşamasında bana yol gösteren çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevil DURDAĞI'na her daim yanımda olduğu için çok teşekkür ederim. Sizin gibi bir hocanın öğrencisi olduğum için çok şanslıyım. Her zaman sizin yolunuzda ilerleyip sizin gibi bir akademisyen olmak için çabalayacağım. Saygıdeğer hocam, hayatınız boyunca hep iyi yerlerde mutlu olmanız dileğiyle. Çalışmalarım sırasında bana destek olan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücekgazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Doç. Dr. Orhan ÇİMEN ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücekgazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr. Ferda Keskin ÇİMEN hocalarıma da teşekkürlerimi sunuyorum. Maddi ve manevi destekleriyle hayatıma her zaman anlam ve güzellik katan başta babam ve annem olmak üzere tüm aileme her daim yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hatice GEDİK
Ocak, 2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
TABLOLAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
1.1. Araştırmanın Amacı 1
1.2. Araştırmanın Önemi 2
1.3. Araştırmanın Kapsamı 4
1.4. Varsayımlar 6
1.5. Sınırlılıklar 7
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR 9
2.1. Kaynak Özetleri 9
2.2. Kuramsal Temeller 20
2.2.1. Safra taşları 20
2.2.2. Safra taşı oluşumunun patofizyolojisi 22
2.2.2.1. Kolesterol safra taşları 23
2.2.2.2. Bilurabin safra taşları 25
2.2.2.3. Karışık safra taşları 26
2.2.3. Safra taşı hastalığının komplikasyonları 27
2.2.4. Safra taşlarının epidemiyolojisi 28
2.2.5. Safra taşı hastalığını etkileyen faktörler 28
2.2.5.1. Yaş 28
2.2.5.2. Cinsiyet, doğum sayısı ve oral kontraseptifler 29
2.2.5.3. Genetik 29
2.2.5.4. Obezite ve vücut yağ dağılımı 29
2.2.5.5. Hızlı kilo kaybı 30
2.2.5.6. Diyet 30
2.2.5.7. Fiziksel aktivite 30
2.2.5.8. İlaçlar 31
2.2.5.9. Diyabet 31

2.2.6. Safra taşlarının farklı spektrometrik tekniklerle analizi 31
2.2.6.1. Safra taşlarının morfolojisinin makro seviyede analizi 32
2.2.6.1.1. Optik mikroskopi 32
2.2.6.2. Safra taşlarının elementel bileşiminin analizi 32
2.2.6.2.1. Floresan mikroskobu 32
2.2.6.2.2. X-ışını floresan analizi 33
2.2.6.2.3. Parçacık(proton) kaynaklı X-ışını emisyonu 34
2.2.6.2.4. Nötron aktivasyon analizi 34
2.2.6.2.5. Atomik absorpsiyon spektroskopisi 34
2.2.6.3. İzotop ve radikallerin tanımlanması ve analizi 35
2.2.6.3.1. Yüksek çözünürlüklü gama ışını spektrometrisi 35
2.2.6.3.2. Elektron paramanyetik rezonans 36
2.2.6.4. Faz bileşiminin incelenmesi 36
2.2.6.4.1. Raman spektroskopisi 36
2.2.6.4.2.Kızılötesi spektroskopisi 37
2.2.6.4.3.Toz X-ışını kırınımı 38
2.2.6.5. Taramalı elektron mikroskopisi ve x-ışını enerji ayırımlı spektrometri 38
2.2.6.6. Transmisyon elektron mikroskobu ve x-ışını enerji ayırımlı spektrometri 39
2.2.7. Vücutta safra taşlarının araştırılmasının klinik yöntemleri(İn-Vivo)……....40
2.2.7.1. Ultrasonografi 40
2.2.7.2. X-ışını bilgisayarlı tomografi 40
2.2.7.3. Manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi 41
3. YÖNTEM 42
3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi(FTIR) 42
3.1.1. FTIR spektroskopisi nedir? 42
3.1.2. FTIR nasıl çalışır? 43
3.1.3. FTIR spektroskopisine kılavuz 43
3.1.4. FTIR' ın temel avantajları 44
3.1.5. FTIR' ın sınırlamaları 45
3.2. X-Işını Kırınımının(XRD) Prensibi, Analizi Ve Uygulamaları 46
3.2.1. X-ışını kırınımı nedir? 46
3.2.2. XRD ilkesi 47
3.2.3. Bragg yasası 49
3.2.4. XRD deseninin özellikleri 49
3.2.5. Tek kristal XRD 51

3.2.6. XRD analizi ve bir XRD grafiğinin yorumlanması 53
3.2.7. Gelişmiş analiz teknikleri 53
3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 54
3.3.1. Taramalı elektron mikroskobunun çalışma prensibi 55
3.3.2. Numune nasıl hazırlanır? 56
3.3.3. Taramalı elektron mikroskobu nasıl çalışır? 57
3.3.4. Taramalı elektron mikroskobunun parçaları 59
3.3.5. Elektron-madde etkileşimi 60
3.3.6. Geri saçılmış ve ikincil elektronlar 62
3.3.7. Taramalı elektron mikroskobundan elde edilebilen bilgiler 63
3.3.8. Taramalı elektron mikroskobunun avantajları ve dezavantajları 64
3.4. Numune Hazırlama 65
3.5. Etik Beyanı 68
4. BULGULAR 69
4.1. Mikroyapısal Özellikler 69
4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi 73
4.2.1. Kolesterol safra taşları 76
4.2.2. Kalsiyum karbonat safra taşları 79
4.2.3. Fosfat safra taşları 80
4.2.4. Bilurabin safra taşları 81
4.2.5. Karışık safra taşları 81
4.3. X-Işını Kırınım (XRD) Analizi 85
4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 100
KAYNAKÇA 106

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Safra taşlarının yeri ve bileşimi.....23
Tablo 4.1. İncelenen safra taşları ve safra taşı tiplerinin dağılımına ilişkin bazı bilgiler.....71
Tablo 4.2. Safra taşlarına ait titreşim bantları ve titreşim frekans değerleri 77
Tablo 4.3. Literatürde bildirilen farklı safra taşlarının FTIR spektroskopisi absorpsiyon pikleri 78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Safra taşlarının sınıflandırılması 20
Şekil 2.2. Safra taşları 21
Şekil 2.3. (a) Kolesterolün kimyasal yapısı ve (b) bilurabin 23
Şekil 2.4. Hepatositte kolesterol metabolizması 24
Şekil 2.5. Kolesterol ve kahverengi bilurabin safra taşlarının oluşumunda rol oynayan etiyolojik faktörler 25
Şekil 2.6. Safta taşlarının patogenezi ve bunların oluşumunu ve büyümesini etkileyen faktörler 26
Şekil 2.7. Safra kesesi taşlarının küresel yaygınlığı 28
Şekil 3.1. Farklı fonksiyonel grupların kızılötesi (IR) spektrumu 42
Şekil 3.2. Kızılötesi (IR) ışık moleküler titreşimleri başlatabilmekte olup gerekli enerji, bağların gücüne ve kütlelere bağlıdır 43
Şekil 3.3. FTIR spektrometrelerinin temel unsuru olan interferometrenin gösterimi 44
Şekil 3.4. Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrumu analizi 45
Şekil 3.5. a) Yapıcı ve yıkıcı girişimin diyagramı b) XRD analiz deneyinin basitleştirilmiş düzeni 48
Şekil 3.6. Saf Cu için toz XRD deseninin örneği 50
Şekil 3.7. Yaygın bir XRD enstrümantal düzeninin diyagramı 51
Şekil 3.8. Tek kristal XRD verileri ile toz XRD verileri 52
Şekil 3.9. Kırınım uzayında toz kırınımı verisi ve tipik toz kırınımı tepe noktaları 52
Şekil 3.10. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 55
Şekil 3.11. Taramalı elektron mikroskobunda farklı sinyallerin, ikincil elektronların, geri saçılan elektronların ve X-ışınlarının tipik uzaysal çözünürlüğü 56
Şekil 3.12. Taramalı elektron mikroskobunun enstrümantasyonu 58
Şekil 3.13. Taramalı elektron mikroskobu 60
Şekil 3.14. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenen safra taşlarına bir örnek 62
Şekil 3.15. Kolesterol taşlarının çekilen fotoğrafları 66
Şekil 3.16. Kalsiyum karbonat taşlarının çekilen fotoğrafları 67
Şekil 3.17. Karışık taşlarının çekilen fotoğrafları 67
Şekil 3.18. Fosfat taşlarının çekilen fotoğrafları 67
Şekil 3.19. Bilurabin taşlarının çekilen fotoğrafları 68

Şekil 4.1. Safra taşları kesildikten sonraki kesit fotoğrafları.....72
Şekil 4.2. Nicolet iS5 FTIR spektrometre cihazı.....75
Şekil 4.3. Kolesterol taşlarının FTIR spektrumu.....76
Şekil 4.4. Kalsiyum karbonat taşlarının FTIR spektrumu.....79
Şekil 4.5. Fosfat taşlarının FTIR spektrumu.....80
Şekil 4.6. Bilurabin taşlarının FTIR spekturumu 81
Şekil 4.7. Kolesterol-bilurabin karışık taşlarının FTIR spektrumu 82
Şekil 4.8. Kolesterol-kalsiyum karbonat-fosfat karışık taşlarının FTIR spektrumu.....83
Şekil 4.9. Kolesterol-bilurabin-kalsiyum karbonat-fosfat karışık taşlarının FTIR spektrumu.....83
Şekil 4.10. Farklı safra taşı türlerinin tek bir FTIR spektrumu üzerinde gösterimi 84
Şekil 4.11. Malvern Empyrean X-ışını kırınım spektrometresi.....86
Şekil 4.12. Kolesterol monohidrat tipindeki safra taşının XRD deseni.....88
Şekil 4.13. Susuz kolesterol tipindeki safra taşının XRD deseni 88
Şekil 4.14. Kolesterol-bilurabin karışık tipteki safra taşının XRD deseni 89
Şekil 4.15. Kalsiyum karbonat bazlı karışık tipteki safra taşının XRD deseni 90
Şekil 4.16. Quanta 450 taramalı elektron spektrometresi (SEM).....93
Şekil 4.17. Kolesterol taşlarının SEM görüntüleri 94
Şekil 4.18. Bilurabin (pigment) taşlarının SEM görüntüleri 95
Şekil 4.19. Kalsiyum karbonat taşlarının SEM görüntüleri.....97
Şekil 4.20. Fosfat-kalsiyum stearat ve protein taşlarının SEM görüntüleri.....98
Şekil 4.21. Karışık tipteki taşların SEM görüntüleri 99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

d	Düzlemler arası aralık
hkl	Miller indeksleri
h	Planck sabiti
n	Kırınım mertebesi
NA	Objenin elektron sağlama yeteneğinin ölçüsü
λ	X-ışını dalga boyu
θ	Bragg açısı
R	Bir cihazın ayırma gücü

Kısaltmalar

AAS	Atomik absorpsiyon spektroskopisi
AES	Atomik emisyon spektroskopisi
BSE	Geri saçılmış elektronlar
BT	X-ışını bilgisayarlı tomografi
CaBr	Kalsiyum bromit
CoHA	Kalsiyum hidroksiapatit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EBSD	Kırınımlı geri saçılmış elektronlar
EDX	Enerji ayırımlı X-ışını
ESEM	Çevresel taramalı elektron mikroskobu
EPR	Elektron paramanyetik rezonans
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre
ICP	Endüktif olarak eşleşmiş plazma
IR	Kızılötesi spektroskopisi
LIBS	Lazer kaynaklı bozulma spektroskopisi
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NAA	Nötron aktivasyon analizi
ODF	Yönelim dağılım fonksiyonu
PAS	Fotoakustik Spektroskopi
PIXE	Proton (partikül) kaynaklı X-ışını emisyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TGA/DTA	Termogravimetrik/diferansiyel termal analiz
TOF-SIMS	Uçuş zamanlı sekonder iyon kütle spektrometrisi
US	Ultrasonografi
WDS	X-ışını dalga ayırımlı spektrometri
XRF	X-ışını floresan analizi
XRD	X-ışını kırınımı

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Amacı

Safra kesesi taşları (kolelitiazis), safrada anormal derecede yüksek kolesterol veya bilurabin (hemin bir parçalanma ürünü) seviyelerinin neden olduğu, safra kesesinde veya safra yollarında oluşan kitlelerdir. Safra taşları yaygındır (küresel yetişkin nüfusun yaklaşık %10-20'si) ve safra taşı olan kişilerin >%20'si (genellikle yetişkinlikte) yaşamları boyunca semptomlar geliştirir (safra kolik veya enfeksiyonlar dahil) (Costa vd., 2024). Safra taşı hastalığı safra kesesinde ve/veya safra kanallarında safra taşlarının neden olduğu semptomların veya komplikasyonların ortaya çıkmasıyla tanımlanır. Klinik bir bakış açısı ve tedavi algoritmalarında asemptomatik taşları olanlar genellikle safra taşı hastalığı olarak sınıflandırılmaz. Safra taşı hastalığı yüksek maliyetlerle ilişkili gastrointestinal durumlar arasındadır (Shaffer., 2005).

Safra kesesi taşları bileşimlerine ve yerlerine göre sınıflandırılır. Safra kesesi taşlarının %90'ından fazlası esas olarak kolesterolden oluşur (kolesterol safra taşları). Diğer taş tipleri (%10'dan az) siyah ve kahverengi bilurabin taşları ile temsil edilir. Safra kesesindeki taşlar (kolesistolitiyazis) kolesterol ve siyah bilurabin safra taşlarından (polimerize kalsiyum bilurabinattan oluşur) oluşur. Buna karşılık bilurabin ve kalsiyum yağ asidi sabunları içeren kahverengi bilurabin taşları enfekte safra kanallarında oluşur. Safra kanalı taşları ekstrahepatik taşlar (koledokolitiyazis) ve intrahepatik taşlar (hepatolitiyazis) olarak sınıflandırılır. Bu birincil safra taşlarından safra kesesinden kaynaklanan ve kendiliğinden veya kolesistektomi (yani safra kesesinin cerrahi olarak çıkarılması) sırasında ortak safra kanalına giren safra kanallarındaki ikincil taşlar ayırt edilebilir.

Safra kesesi taşları asemptomatik veya semptomatik olabilir; yalnızca semptomları veya komplikasyonları olan safra taşları, safra taşı hastalığı olarak tanımlanır. Safra taşları bileşimlerine göre baskın varlığı temsil eden kolesterol safra taşları ve bilurabin (pigment) taşları olarak sınıflandırılır. Siyah bilurabin taşları kronik hemolizden kaynaklanabilir; kahverengi bilurabin taşları ise genellikle tıkalı ve enfekte safra kanallarında gelişir. Tedavi için safra taşlarının safra yollarındaki lokalizasyonu bileşimden daha önemlidir. Safra taşları için risk faktörleri kadın cinsiyeti, yaş, gebelik, fiziksel hareketsizlik, obezite ve aşırı beslenmedir. Metabolik sendromda yer alan faktörler safra taşı geliştirme riskini artırır ve yaşam tarzı değişiklikleriyle birincil önlemenin temelini oluşturur. Tanı esas olarak klinik semptomlara,

abdominal ultrasonografiye ve karaciğer biyokimya testlerine dayanır. Semptomlar genellikle safra kesesi taşlarının üç yaygın ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden komplikasyonun (akut kolesistit, akut kolanjit ve safra pankreatiti) başlangıcından önce gelir. Safra kesesi taşlarının genetiği ve patofizyolojisi hakkındaki bilgimiz son zamanlarda artmış olsa da, mevcut tedavi algoritmaları ağırlıklı olarak invaziv olmaya devam etmektedir ve cerrahiye dayanmaktadır. Bu nedenle gelecekteki çabalarımız, özellikle risk altındaki hastalarda, yeni önleyici stratejilere odaklanmak olmalıdır.

Bu çalışmanın amacı, safra taşını detaylı incelemek, neden olan faktörlerin belirlenmesi ve oluşum sürecini anlayabilmektir. Çalışmaya kolesistektomi ameliyatı için başvuran 50 ile 60 arasında hasta seçilmiştir. Bu hastaların hepsinden ameliyat öncesinde karaciğer fonksiyon testleri ve tam kan sayımı istenmiştir ki bu testler ameliyat öncesi rutin testler olup ek bir maliyet getirmemiştir. Ayrıca yine tüm hastaların ameliyat öncesi rutin olarak taş yerini tespit etmede kullanılan radyolojik görüntüleri de istenmiştir. Ameliyatlardan çıkarılan taşlar, Fourier dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-Işını difraktometresi (XRD) kullanılarak mikroyapısal ve bileşimsel özelliklerine göre analiz edilmiştir. Ayrıca SEM ile de yüzey görüntülemesi yapılmış, kristal oluşum süreci detaylandırılmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışması Kohort araştırması (prospektif veya retrospektif) (İnsidans araştırmaları) ve Deneysel Araştırma tipinde bir çalışma olup, araştırma Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Fen Edebiyat Fakültesi ve Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Safra taşları üzerinde yapılacak bu araştırma ile taş oluşumuna neden olan faktörler belirlenirken taş oluşumunu önleyici tedbirler de önerilebilecektir. Bu nedenle bu çalışma Erzincan ve çevresindeki il veya ilçe popülasyonunda safra taşlarının mineralojisini, kimyasını ve mikro yapılarını araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

1.2. Araştırmanın Önemi

Safra, farklı kimyasalların bir karışımından oluşur. Safra taşları ise safranın aşırı yoğunlaşması ve farklı kimyasalların çözünmediği durumlarda oluşur. Safra taşları küçük kristaller olarak başlar, çakıl taşına benzeyecek şekilde büyür ve sonunda çakıl taşı boyutuna ulaşabilir. Kristalleşme ise sıvı safradaki maddelerin oranı değiştikçe oluşur. İki tür safra taşı vardır:

Birinci tür safra taşı kolesterolden oluşur ve en yaygın gözlemlenen tipidir. Safra, sağlık için önemli olan ancak aşırı miktarda bulunduğunda kalp hastalığına neden olabilen yağlı bir madde olan kolesterol açısından zengindir. Aslında safra, vücudun aşırı kolesterolden kurtulmasının bir yoludur. Öte yandan safra, safra kesesinde depolandığında kolesterolün küçük kristaller halinde ayrıldığı kadar çok kolesterol içerebilir. Bu kristaller birleşerek bir safra taşı oluşturabilir. İkinci tür safra taşı olan bilurabin taşları, safra taşı olan her on kişiden yaklaşık üçünde bulunur. Kırmızı kan hücrelerinin dönüşümünden kaynaklanan bir atık ürün olan bilurabin, karaciğer tarafından safraya atılır ve bazı durumlarda safra kesesinde bilurabin taşları oluşturabilir. Oluşan taş türü, kişinin yaşam tarzı, etnik kökeni ve tıbbi geçmişi tarafından belirlenir. Bazı safra taşları karışık yapıda olabilir. Bazen safra kesesinde sadece tek bir taş bulunur. Ancak sıklıkla birkaç tane vardır ve nadir durumlarda kelimenin tam anlamıyla düzinelerce küçük taş olabilir. Taşların boyutu ve miktarı genellikle bir kişinin sorun yaşayıp yaşamayacağını belirlemese de hangi komplikasyonların ortaya çıkabileceğini belirleyebilir.

Safra taşı hastalığına bağlı birçok risk faktörü vardır. Bunlara örnek olarak yaşlanmak, kadın olmak ve safra taşı olan yakın bir aile üyesine sahip olmak verilebilir. Ek olarak, iltihaplı bağırsak hastalığı olan veya her hafta 1,5 kg'dan fazla hızlı kilo kaybı yaşayan kişilerde safra taşı oluşma olasılığı daha yüksektir. Ancak fazla kilolu kişilerde kilo vermenin sağlık avantajları safra taşı riskinden çok daha fazladır. Safra taşı kilo verme ameliyatı geçiren kişilerde de oluşabilir. Risk sağlıklı kiloya sahip kişilerde bile karın (göbek) yağının bir göstergesi olan artan bel ölçüsüyle daha da artmaktadır. Kalıtsal orak hücre hastalığı ve kalıtsal sferositozis rahatsızlıkları olan kişilerde safra taşı oluşma riski artmakta ve bu durumlarda safra taşları ailelerde kalıtsal olarak görülebilmektedir.

Safra kesesi taşları, safra kesenizde oluşan katı madde topaklarıdır. Bunlara kolelitiazis de denmektedir. Safra adı verilen sindirim sıvısı sertleşip taşa dönüştüğünde oluşurlar. Safra kesesi, karaciğerinizin altında bulunan küçük bir organdır. Karaciğer tarafından üretilen safrayı depolar. Safra; kolesterol, safra tuzları ve sarımsı bir bilurabin gibi çeşitli maddelerden oluşur. Safra kesesi taşları bir kum tanesi kadar küçük veya bir golf topu kadar büyük olabilir. Safra kesesinde tek bir büyük taş, yüzlerce küçük taş veya aynı anda her iki boyutta da oluşabilir. Safra kesesi taşları genellikle herhangi bir belirtiye neden olmaz. Ancak bazı durumlarda safra kesesi taşları safra taşıyan tüpleri (safra kanalları) tıkar. Bu durum safra kanalları, pankreas veya karaciğerde yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilir.

Kolesterol taşları, safra kesesi olması gerektiği gibi boşalmadığında oluşur. Ayrıca safra, çok fazla kolesterol, çok fazla sarımsı bilurabin, yeterli safra tuzu olmaması gibi farklı etkenlere bağlı olarak meydana gelir. Sağlık uzmanları bilurabin taşlarının neden oluştuğunu bilmeseler de, sağlıklı karaciğer dokusunun yerini yara dokusunun aldığı karaciğer hastalığı (siroz) olanlarda, safrayı taşıyan damarlarda enfeksiyon (safra yolu enfeksiyonu) olanlarda, orak hücreli anemi gibi ebeveynden çocuğa geçen (kalıtsal) kan bozuklukları olan hastalarda daha sık görülebileceğini öngörülmektedir.

Profesör Fu ve arkadaşları (Fu vd., 1984) safra taşlarını profil yapısına ve kimyasal bileşenlerine göre 8 türe ayırmıştır. Bunlar arasında radyal, radyal yıllık halka benzeri, kaya tabakası benzeri stromatolit, döküm amorf, kum yatağı benzeri stromatolit, silt benzeri, siyah ve kompleks taşlar yer almaktadır. Son yıllarda kızılötesi spektroskopinin uygulanmasıyla safra kesesi taşları kolesterol taşları, bilurabin taşları, karışık taşlar ve diğer nadir taşlar (kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat ve yağ asidi kalsiyum taşları dâhil) olarak sınıflandırılmıştır. Dahası yapılan 2020 sonrası çalışmalarda safra kesesi taşları 8 tipe ve ondan fazla alt tipe ayrılmıştır. Bunlara kolesterol taşları, bilurabin taşları, kalsiyum karbonat taşları, fosfat taşları, kalsiyum stearat taşları, protein taşları, sistin taşları ve karışık taşlar dâhildir. Karışık taşlar, iki veya ikiden fazla türde materyal bileşeni olan ve her bir bileşenin içeriğinin benzer olduğu taşlardır.

1.3. Araştırmanın Kapsamı

Fizikçiler/kimyacılar tarafından safra taşlarının analizleri doğru yapılırsa ve taştan gerekli tüm bilgileri toplayabilirlerse, taş oluşumu ve büyümesinin neden(ler)ini belirlemede hekimlere yardımcı olabileceklerdir. Bu amaçla doktorlar, olası bir metabolik hastalık veya risk faktörleri hakkında doğru bilgi sağlayabilecekler ve metabolik bozukluklar, kan ve idrar biyokimyasına bakarak taş yapısı hakkında analize başvurmadan kabaca tahmin yürütebileceklerdir. Literatüre baktığımızda, taş analizlerinde kristalin fazları ve yapısal özellikleri hakkında nitel ve nicel bilgiler verildiğini görmekteyiz. Bu tür çalışmalarda taşın tüm bölümlerinin (çekirdek, iç katmanlar, çevresel katmanlar ve yüzey) kompozisyonunun doğru belirlenmesi gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışma ile safra taşları sadece yüzeysel değil aynı zamanda kesitsel analizlere de tabi tutularak literatürdeki büyük bir boşluk doldurulmuş olacaktır. Aynı zamanda bu çalışma ile safra taşı olan hastalarda herhangi bir nüks veya diğer hastalıkları (sarılık veya siroz gibi) önlemek için taş analizlerinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamak adına yapılmıştır.

Yine literatüre baktığımızda safra taşlarının bir ya da iki spektrometrik teknikle analizi yapılırken bu çalışmada taşları oluşturan elementlerin büyük bir doğrulukla tanımlanmasına olanak sağlayabilmek için 3 farklı spektrometrik teknikle analizleri gerçekleştirilmiş, veriler karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Ayrıca safra taşları ile kan ve idrar tahlillerinde bazı değerler arasında (bilurabin gibi) bir bağlantı olup olmadığı sonrasında araştırılacaktır. Dahası ilerideki araştırmalarda safra taşlarının safrada ya da safra kanalında yerinin belirlenmesinde kullanılan görüntüleme yöntemlerinden elde edilen veriler ile (yani safra taşının oluştuğu yer ile) taş türü ve elementel dağılımı arasındaki ilişkide ortaya konmaya çalışılacaktır. Böylece hem literatüre hem de bilime katkı sağlanması planlanmaktadır.

Bu çalışma ve bundan sonra safra taşları ile ilgili yapılacak çalışmalarla; Erzincan ve ilçeleri için, kolesistolitiyazis paterni hakkında önemli bilgilerin sağlaması hedeflenmektedir. Hastalığın altında yatan çok sayıda moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma ile literatürdeki büyük bir boşluk doldurulmuş olacak ve eldeki verileri kullanarak sağlık çalışanları hastalığın tekrar etme ihtimalini azaltmanın yollarını arayacaklardır. Buda ekonomik anlamda ciddi bir fayda sağlayacaktır. Bundan sonra yapılacak araştırmalar ile birlikte bölgede görülme sıklığı ve nedenleri araştırılacaktır. Çok yönlü, çok parametreli, çok değişkenli bir çalışma olacaktır. Hem ulusal ekonomiye (sağlık harcamaları azaltılarak) hem de literatüre yeni ve büyük bir katkı getirmesi planlanmaktadır. Taş türlerini belirlemek bu çalışmanın esasını oluşturmaktadır. Bu çalışmayı yaparken dikkatli literatür taraması sonunda kolesterol taşı olan hastaların çoğunlukla 30-50 yaş aralığında, kadın, bilurabin taşı olan hastalara göre daha yüksek vücut kitle indeksine sahip hastalar olduğu ancak bilurabin, kalsiyum karbonat, fosfat taşı olan hastaların ise çoğunlukla 40-60 yaş aralığında erkek hastalar olduğu bulunmuştur.

Safra kesesi taşı oluşumu araştırmaları için doğru sınıflandırma ön koşuldur. Safra kesesi taşlarının yapısı ve bileşimi, taş oluşumu süreci hakkında bilgi sağlar. Bu araştırma ile farklı safra kesesi taşı tiplerinin karakteristik mikro yapı ve morfolojilere sahip olduğu ve farklı safra kesesi taşı tiplerinin oluşum mekanizmasının aynı olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma, safra kesesi taşı oluşumu üzerine daha fazla araştırma için nesnel bir temel sağlarken, aynı zamanda safra kesesi taşlarının tedavisi ve önlenmesinde de büyük öneme sahip olacaktır.

Safra taşlarının oluşumunun altında yatan çeşitli bozukluklar veya hastalıklar olabilir. Taşa özgü tedaviyi sunmak, taş oluşumunun etiyolojisini ortaya çıkarmak, nüksü önlemek,

bireyselleştirilmiş tedaviyi sağlamak için safra taşı bileşenleri hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Taş hastalığının temel değerlendirmesinde ise safra taşı analizi önerilmektedir. Spektroskopik analizler ile cerrahi olarak çıkarılan veya kendiliğinden düşen taşların kalitatif kompozisyonlarını bulabiliriz. Taş bileşimi ve yapısı, kristalleşme sürecine yol açan geçmiş koşullar dolayısıyla etiyoloji hakkında da bilgi edinebiliriz. Bu çalışmamızda safra taşlarının oluşumu ve büyümesi kimyasal ve fiziksel olarak farklı spektrometrik teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Multdisiplener bir çalışma olup, çalışmaya Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nın yanı sıra Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'da destek vermiş, ölçümler Temel Bilimler Araştırma laboratuvarında alınmıştır.

1.4. Varsayımlar

Safra kesesi taşı çalışmalarının kimyasal ve faz bileşimleri, hastalık gelişiminin risk faktörlerini önleme ve doğru şekilde değerlendirme yollarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Önemli sayıda araştırma, farklı etnik köken (genetik faktörler), çevresel koşullar ve su ve gıda kalitesiyle ilişkilendirilebilen safra kesesi taşlarının olası bileşimsel özelliklerini belirlemeye adanmıştır. İz elementlerin metabolizmada önemli bir rol oynadığına ve konsantrasyonlarının bölgeye ve yaşam koşullarına bağlı olarak değişebileceğine inanılmaktadır. Bölgesel farklılıklar düşünüldüğünde Erzincan ve çevresinden toplanacak taşların analizi önem arz etmektedir. Ayrıca bu türden safra kesesi taşlarında Mn, Fe, Cu, Pb, Ti, Zn, Ni ve Cr gibi ağır metallerin konsantrasyonundaki artış, endemik kontaminasyonun göstergesi de olabilir ki bu konu bir sonraki araştırmamız açısından önem arz etmektedir.

Safra kesesi taşlarının bileşimi hakkında çok miktarda bilgiye rağmen, şu anda oluşumlarının nedenleri ve mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir ve bu da daha fazla araştırma gerektirdiğinin bir başka kanıtıdır. Kolesterol kristalleşmesinin safra kesesi taşı oluşumunun başlangıcı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Ancak vücutta kolesterol kristallerinin varlığının safra kesesinde taşların ortaya çıkmasına yol açmadığı da bilinmektedir. Kalsiyum safra kesesi taşlarındaki ana biyometaldir; konsantrasyonu kalsiyum karbonat taşlarında neredeyse %30 ağırlık oranına ulaşır. Deneysel verilerin yorumlanması, kolesterol taşlarının çekirdeklerinin kalsiyum karbonatları, bilurabinat ve palmitat ve/veya safra bilurabinleri tarafından oluşturulabileceğini göstermektedir. Safra bilurabinlerinin, proteinlerin ve inorganik

tuzların taşlarda kolesterol kristalleriyle birlikte çökelmesinin nedenleri belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca belirli durumlarda tek veya çoklu taşların oluşma nedenleri de bilinmemektedir.

Bir veya iki araç (kimyasal bileşenler, profil yapısı ve kimyasal bileşenler veya kızılötesi spektroskopi) kullanarak yapılan geleneksel sınıflandırma kaba ve çok doğru değildir. İşte tam bu noktadan hareketle bu çalışmada safra kesesi taşları için geleneksel sınıflandırmayı sorgulamayla işe başlayıp, sistematik bir sınıflandırma şeması geliştirebileceğimizi düşünüyoruz. FTIR, Taramalı elektron mikroskobu ve X-ışını spektrometresi kullanılarak safra kesesi taşlarının görünüm, profil yapısı, bileşen içeriği ve dağılımı, mikro yapısına göre sınıflandırılmasıyla yapılacak olan yeni sistematik sınıflandırma şeması ile geleneksel sınıflandırmanın eksikliğini gidermeyi ve dolayısıyla daha doğru bilgiler sunmayı hedefliyoruz. Bu araştırma ile farklı safra kesesi taşı tiplerinin karakteristik mikro yapı ve morfolojilere sahip olduğunu, farklı safra kesesi taşı tiplerinin oluşum mekanizmasının aynı olmadığını gösterilmiştir. Bu çalışma safra kesesi taşı oluşumu üzerine daha fazla araştırma için nesnel bir temel sağlarken, aynı zamanda safra kesesi taşlarının tedavisi ve önlenmesinde de büyük öneme sahip olacaktır.

1.5. Sınırlılıklar

Safra taşlarının etiyolojisi ve patafizyoljisi iyi anlaşılamakla birlikte, bu taşların nasıl oluştuğu ve neden tekrarladığı hakkında çok fazla yeterli bilgi bulunmamaktadır. Oluşum sürecinin fiziksel ve kimyasal olarak incelenebilmesi adına safra taşları ile ilgili yapılan çalışmalar Türkiye'de çok sınırlıdır. Bu tez çalışmasından hareketle şunları söyleyebiliriz:

- Her safra taşının hikâyesi kendine özgü olduğundan sonuçlar, hastalardan alınan bazı kişisel verilerle (yaş, cinsiyet, kan ve idrar tahlilleri, taş oluşum yeri, beslenme alışkınlıkları, ilaç tüketim sıklığı vb.) birlikte değerlendirilmelidir.
- Örneklem sayısı mümkün olduğunca çok tutulup istatistiksel olarak sonuçlar analiz edilmelidir.
- Örnekler uzun vadede Erzincan ilinin farklı bölgelerinden toplanmalıdır.

- Sonuçları karşılaştırmak için hem bölgesel hem de Türkiye'nin genel safra taşı haritası çıkarılmalıdır.
- Kristalleşme ve çekirdeklenme süreçleri kimyasal olarak iyi analiz edilerek, bu süreci durdurabilecek ilaçlar üzerinde çalışılmalıdır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kaynak Özetleri

Safra taşları, hastaların temelde hiçbir semptomu olmadığı ve yaklaşık %80'inin tıbbi geçmişinde herhangi bir sorun bulunmadığı için sessiz taşlar olarak da adlandırılmaktadır (Festi vd., 2010). Taş küçükse, safra kanalı yoluyla ince bağırsağa güvenli bir şekilde atılmaktadır veya safra kanalında ağrı hissetmeden kalır ancak safra taşı büyüdüğünde kanalı tıkar ve hasta bulantıyla birlikte kusmanın eşlik ettiği artan bir ağrı hissetmeye başlamaktadır. Bu durumda bakteriyel enfeksiyon veya karaciğer apsesi gelişebilir ki bu durumda özellikle bilurabin veya karma taşlar için hastalıkları tedavi edecek etkili bir ilaç bulunmamaktadır. Bu yüzden safra kesesinin cerrahi yöntemle (laparoskopi) çıkarılması, günümüzde safra taşı hastalığına yönelik tek çözüm gibi görünmektedir.

Safra kesesi taşları; tıpta kolelitiazis olarak adlandırılmakta olup organizmalarda safra kesesi ve safra kanalındaki minerallerin kristalleşmesi olarak düşünülmektedir ve her yaş grubundan insanda görülebilen, dünyada yaygın sağlık sorunlarından biridir. Örneğin; ABD, Avrupa, Asya ve Çin'de safra taşı hastalığının görülme sıklığı sırasıyla %15, %5,9-21,9, %4-15 ve %3-11 olarak bildirilmiştir (Qiao vd., 2013, Stinton vd., 2012).

Safra bileşiminde değişkenliğe uğrayabilir ve safranın birincil lipit bileşenleri safra asitleri, fosfolipitler ve kolesteroldür. Safranın diğer önemli bileşenleri arasında su, lipitler, elektrolitler (Na ve K), yağ asitleri, polisakkaritler, kalsiyum karbonat ve proteinler bulunmaktadır (Carulli vd., 1984). Litojenik safra, bir bireyi kolesterol safra taşlarına yatkın hale getirmekle birlikte (Wittenburg vd., 2010), kolesterol safra taşlarındaki kristal nükleasyon sürecini safra kesesi içinde normalde yavaşlatmaktadır. Aşırı doymuş safra, günlerce metastabil kalmakta ve safra taşı oluşumu sırasında bu metastabillik kaybolmaktadır ki böylece kristal oluşumu saatler içinde gerçekleşmektedir. Ayrıca safra taşının büyümesi, safra/taş arayüzünde ek çözünmeyen çökelticilerin birikmesi veya kolesterol kristallerinin aglomerasyonu süreci yoluyla meydana gelmektedir (Heuman vd., 1999).

Safra taşı hastalığı, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Örneğin Hindistan'ın güney kesimine kıyasla kuzey kesiminde görülme sıklığı daha yüksektir (Mohan vd., 2005). Safra taşları safra kesesinin bir diğer yan ürünü olan

çok fazla kolesterol veya bilurabin olduğunda meydana gelmekte ve safra taşları başlangıçta bir kum tanesi kadar küçükken zamanla giderek büyüyebilmektedir. Bazı kişilerde tek bir safra taşı bulunurken, bazılarında aynı anda birden fazla (çok sayıda küçük taştan oluşan) safra taşı bulunmaktadır. Yeterince erken tedavi edilmezlerse, şiddetli ağrıya neden olmakta ve kanalları tıkayarak daha fazla komplikasyona yol açmaktadır (Dutta vd., 2005).

Uzun süredir var olan safra kesesi taşları safra kesesi kanseri için en yüksek risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Singh vd., 2008). Safra kesesi taşlarının patogenezi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, doğru patogenezin ortaya çıkarılması, taşların içindeki karmaşık bileşimsel bilgilerin ve konsantrasyon/içerik değişimlerinin hatasız bir şekilde belirlenmesini gerektirmektedir.

Safra taşları bileşenlerine göre kabaca kolesterol taşları, bilurabin taşları ve karışık taşlar olarak sınıflandırılmaktadır. Öte yandan, bilurabin taşları kahverengi ve siyah taşlar olarak da adlandırılmaktadır. (Chowdhury vd., 2011, Soloway vd., 1977). Beyaz taşların ana kimyasal bileşeni kolesterol olup siyah ve kahverengi taşlar farklı oranlarda kolesterol ve bilurabin içermektedir. Safra taşlarında bulunan diğer bileşikler arasında kalsiyum karbonat (kalsit, aragonit veya vaterit formunda), fosfat tuzları, fosfolipitler, yağ tuzları, polisakkarit ve proteinler ile potasyum, kalsiyum, manganez, demir, bakır, çinko, klor ve kükürt gibi küçük/iz elementler bulunmaktadır (Alatise vd., 2010, Gümüş vd., 2011, Iordanidis vd., 2013, Kaloustian vd., 2005). Gelişme yerlerine göre, çoğu kolesterol tipi ve siyah olan safra kesesi taşları safra kanalındaki safra taşları olarak ayrılmakta olup çoğu safra kesesinden salgılanan safra tarafından süpürülmekte ve öncelikli olarak kalsiyum bilurabinattan oluşmaktadır.

Mevcut safra taşı sınıflandırma sistemleri, isimlendirme açısından çeşitlilik göstermektedir ve coğrafi konumlara, çalışma yöntemlerine, bileşime, yapıya ve renge göre kategorilere ayrılmaktadır. Geleneksel olarak safra taşları kolesterol taşları, bilurabin taşları ve karışık taşlar olmak üzere üç ana türe ayrılmaktadır (Lee vd., 2009). Bilimsel teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, kalsiyum karbonat taşları, fosfat taşları, kalsiyum stearat taşları, protein taşları ve sistin taşları gibi mevcut sınıflandırma sistemine yeni safra taşı sınıfları eklenmiştir (Qiao vd., 2013). Ayrıca Sri Lanka nüfusunda safra taşlarının etiyopatogenezinin, farklı beslenme alışkanlıkları nedeniyle batı nüfusundan farklı olduğu bildirilmiştir (Jayasoma vd., 2022). Ancak bilurabin ve karışık kolesterol taşları, Sri Lanka da dahil olmak üzere bazı Güney Asya popülasyonlarında

en yaygın türler olarak bilinmektedir. Ayrıca tek bir nüfus içinde safra taşlarının karakteristik çeşitliliğinin nedenleri henüz ortaya konmamıştır.

Safra taşları genellikle kolesterol içeriklerine göre üç ana türe ayrılmakta olup genel literatürde karşımıza çıkan gruplama: kolesterol taşları (kolesterol içeriği ≥ %70), bilurabinli taşlar (kolesterol içeriği ≤ %30) ve karma taşlar (%30 ≤ kolesterol içeriği ≤ %70) (Kim vd., 2003, Ravnborg vd., 1990, Reshetnyak vd., 2012 , Sun vd., 2001) şeklindedir. Kimyasal analizler, kolesterol taşlarının tipik olarak kolesterolden oluştuğunu, bilurabinli taşların ise çoğunlukla çeşitli bilurabinat tuzlarından oluştuğunu ve karışık taşların çoğunlukla kolesterol veya bilurabinat tuzları veya her ikisinin kalsiyum fosfatlar, kalsiyum karbonatlar, yağ asitleri, fosfolipitler ve eser elementler gibi diğer bileşenleri içerdiğini ortaya koymuştur (Chandran vd., 2005). Son yıllarda safra taşlarının patogenezini aydınlatmaya yönelik çok sayıda araştırma yapılmış ve bunların bileşimi ve morfolojisinin analizi için farklı yaklaşımlar kapsamlı bir şekilde bildirilmiştir (Giannossi vd., 2012). Safra taşı oluşumunun incelenmesi aslında çağdaş tıbbın önemli bir konusudur.

Safra taşları kolesterol, bilurabin veya karışık tipte mevcut olup safra taşlarının bileşimi ve özellikleri dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Örneğin; kolesterol batı yarımkürede baskınken, bilurabin/karışık tip Güney Asya ülkelerinde baskındır ve bu ülkelerde kolesterol tipine doğru bir kayma görülür. Hindistan yarımadasında da safra taşlarının bileşiminde geniş farklılıklar bildirilmiştir (Ashok vd., 2003, Ashok vd., 2012 Gokulakrishnan vd., 2001, Jayanthi vd., 1998). Kolesterol safra taşları Hindistan'ın kuzey, doğu ve batı kesimlerinde baskınken, bilurabin safra taşları Güney Hindistan'da yaygın olduğu bildirilmiştir (Ashok vd., 2002). Bir ülke içindeki bu geniş farklılıklardan sorumlu mekanizma net olmamakla birlikte çeşitli safra taşı türlerinin oluşum mekanizmasını açıklamak için farklı teoriler önerilmiştir (Admirand vd., 1968).

Bilurabin safra taşlarının patogenezi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bunlar muhtemelen safranın bilurabin, fosfat, kalsiyum karbonat ve diğer anyonların kalsiyum tuzlarıyla aşırı doygunluğunun sonucudur. Hemolitik anemi bilurabin safra taşı oluşumunun kanıtlanmış bir nedenidir ve taşların patogenezi daha az anlaşılmıştır (Trotman vd., 1980). Safra sistemindeki bakteriyel enfeksiyon da kişiyi bilurabin veya karma safra taşlarına yatkın hale getirmektedir (Cetta vd., 1991). Güney Hindistan mutfağının ayrılmaz bir parçası olan tamarindus indicanın (demirhindi), bilurabin safra taşı oluşumu için önemli bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir

(Chandran vd., 2013, Rautray vd., 2005). Ayrıca daha önce PIXE analizi (Rautray vd., 2007) ile bilurabin safra taşlarındaki ve demirhindideki (Garcinia camborginia) yüksek demir içeriği gösterilmiş ve muhtemelen demirin bilurabin safra taşı oluşumu için çekirdeklenme alanı olarak hizmet ettiği varsayılmıştır.

Karışık safra taşları hem kolesterol hem de kalsiyum bilurabinattan oluşmaktadır. Muhtemelen kolesterol ve bilurabin taşlarının aynı patojenik mekanizması bu safra taşlarının oluşumunda rol oynamaktadır (Cussler vd., 1970, Holzbach vd., 1984). Bu bilinen faktörlerin bazılarının yanı sıra, jeolojik konum, glikoproteinler, yağ asitleri gibi diğer bileşenler, kişinin beslenme alışkanlıkları ve karaciğerle ilişkili hastalıklar bu tür safra taşlarının çekirdeklenmesinden ve oluşumundan sorumlu olabilmektedir (Völzke vd., 2005). Safra kesesinde farklı tuzlar ve çözünemeyen maddeler halinde birikselerde safra taşlarının ancak oluşum mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış karmaşık bir süreçtir. Bakteriyel özelliklerin safra taşı oluşum sürecini yönettiği bildirilmiş olup bu nedenle de (Kaufman vd., 1989, Stewart vd., 2006, Swidsinski vd., 2001), safra taşı hastalığı insanlar için ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Safra taşı oluşum süreci tıbbi olarak kolelitiyazis olarak adlandırılmaktadır ve genellikle yavaş veya uzun süren bir süreçle birlikte ağrı veya başka semptomlara neden olmamaktadır (Gurusamy vd., 2014, Reshetnyak vd., 2012). Sonuç olarak safra taşlarının canlı organizmada oluşumu sıklıkla uzun bir süreç almaktadır ve taş oluşumundan konsolidasyona ve/veya konkresyona kadar olan süreci izlemek te oldukça zordur (Kleiner vd., 2002). Safra taşlarını tedavi etmenin günümüzdeki en etkili yöntemi safra kesesinden ve/veya safra kanalından cerrahi olarak çıkarılması olsa da, safra taşı oluşumunun altında yatan nedenleri belirlemek ve safra taşı hastalığı için cerrahi olmayan bir tedavi geliştirmek safra taşı bileşenlerinin tanımlanmasında esas olmalıdır (Sikkandar vd., 2011, Yoo vd., 2008).

İnsan safra taşları çeşitli şekillerde (tetrahedral, oval veya düzensiz şekillerde), boyutlarda ve kristalden amorf yapıya kadar çeşitli yapılarda bulunmakta olup renkleri krem beyazı ve sarıdan siyah ve kahverengiye kadar değişebilmektedir. Taşlar, boyutları birkaç milimetre ile 5 cm aralığında farklı değerler alabilmekte olup tek veya çoklu olarak ortaya çıkabilmektedirler. Saf kolesterol taşları genellikle tek, beyazımsı ve 2,5 cm'den daha büyüktür. Karışık taşlar genellikle daha küçüktür, sayıca çoktur ve çeşitli şekil ve renklerde görülmektedirler.

Safra taşı oluşumunun patolojik bir mineralizasyon süreci olduğu kabul edilmektedir. Bir mekanizma olarak, safra taşlarının, kolesterol konsantrasyonunun safra asitleri ve fosfolipitlerle

karışık misel solüsyonunda tutulabilecek seviyeyi aşması durumunda oluştuğuna inanılmaktadır. Kolesterol kristal nükleasyonu kolesterol safra taşı oluşumundaki en erken adım olarak kabul edilmektedir (Chowdhury vd., 2011, Kaur vd., 2010, Venneman vd., 2010). Kolesterolün sulu çözeltilerde çözünürlüğünün son derece düşük olduğu iyi bilinmektedir ancak safra kesesi safrasında çözünürlükte önemli bir artış, kolesterolün safra tuzları ve fosfolipitlerle (esas olarak fosfatidilkolin) birlikte karışık misel halinde dahil edilmesiyle açıklanabilmektedir (Venneman vd., 2010).

Safra taşları safradaki bileşenlerin değişimi sonucu oluşup safra taşlarının çekirdeklenmesi ve kristalleşmesi, safradaki çözünmüş bileşenlerin içeriği kritik seviyelere ulaştığında meydana gelmektedir. Bu nedenle safra taşları birden fazla kristalin bileşikten oluşurken, kolesterol ve kalsiyum bilurabinat ana parametreleri göstermektedir (Parviainen vd., 2016, Qiao vd., 2013, Weerakoon vd., 2015). Ayrıca kalsiyum karbonatlar, kalsiyum fosfatlar-palmitatlar ve stearatlar gibi kalsiyum yağ asitleri de minör bileşenler olarak bulunmaktadır (Ha vd., 2018).

Safra taşının oluşumundan/çekirdeklenmesinden ve büyümesinden çeşitli koşullar sorumlu olup hastanın beslenmesi önemli bir faktördür ve bu sayede çeşitli mineraller safra taşlarının oluşumuna/çekirdeklenmesine ve büyümesine neden olabilmektedir. Çeşitli mineraller arasında magnezyum (Mg), taş oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Saris vd., 2000) Temel biyolojik işlevlerde birçok temel rolü vardır ve eksikliği insan vücudunda çeşitli biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır (Saris vd., 2000). Magnezyum alımı, magnezyum homeostazından korunmada önemlidir ancak ortalama Mg alımı yıllar içinde azalmıştır (Chakraborti vd., 2002).

Mg eksikliği insülin hipersekresyonuna ve dislipidemiye neden olabilmekte ve bu da safra taşı oluşumunu kolaylaştırabilmektedir (Fawcet vd., 1999, He vd., 2006, Touyz vd., 2004). Pathak ve arkadaşları granüler ve granüler olmayan safra taşlarını incelemiş ve Mg'nin safra taşının çekirdeklenme noktasından konsantrasyon değişimine bağlı olarak safra taşının daha fazla büyümesini engelleyen veya buna izin veren önemli minerallerden biri olduğunu göstermiştir (Pathak vd., 2018). Bildiğimiz kadarıyla insan kan hücrelerinde hayati bir rol oynayan Ca, Na ve K gibi diğer temel minerallerin safra taşlarının çekirdeklenmesi ve büyümesindeki rolü/fonksiyonu araştırılmamıştır ve bu nedenle de ayrıntılı bir inceleme gerektirmektedir.

Safra taşlarının oluşum mekanizması ve temel nedensel faktörleri tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte taşların safradaki kolesterolün aşırı doygunluğu ve kusurlu bilurabin konjugasyonu nedeniyle kalsiyum bilurabinatın çökelmesine yani mineralize olduğuna inanılmaktadır (Vítek vd., 2012) ve bakteriyel aktivitelerin de oluşum sürecini destekleyebileceği düşünülmektedir (Swidsinski vd., 2001) Önceki çalışmalar safra taşı oluşumunun hem tıbbi hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı çok faktörlü bir süreç olduğunu göstermiştir (Parviainen vd., 2016, Rautray vd., 2007).

Etnik köken, genetik faktörler, yaş, cinsiyet, beslenme, bakteriyel enfeksiyonlar, obezite ve karaciğer hastalıkları (siroz) taş oluşumu için risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Gurusamy vd., 2014, Nakeeb vd., 2002, Rautray vd., 2007, Stinton vd., 2012). Çevresel faktörler de safra taşı oluşumu için olası bir faktör olarak önerilmektedir (Parviainen vd., 2018, Parviainen vd., 2016). Safra taşları genellikle inorganik bileşenlere kıyasla daha fazla miktarda organik bileşen içermekte olup (Ashok vd., 2003, Athanasiadou vd., 2013). kalsiyum, tüm safra taşı türlerindeki ana inorganik katyondur (Golovanova vd., 2006). Eser elementlerin safra taşı oluşumundaki rolü hakkında spekülasyonlar olsa da, kesin mekanizma henüz net olarak anlaşılamamıştır.

Safra taşı veya biliyer litiazis, dünyada önemli sosyoekonomik maliyeti olan en yaygın gastrointestinal hastalık olmakla birlikte safra taşlarıyla bağlantılı sorunlar, giderek değişen insan beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı düzeni ve ayrıca kolesistektomi cerrahi müdahalesinden sonra tekrarlamaları nedeniyle sürekli artmaktadır (Ciaula vd., 2019, Jaunoo vd., 2010, Portincasa vd., 2016, Shirah vd., 2018). Safra taşlarının oral tıbbi tedavisi - ursodeoksikolik asit gibi safra tuzları içeren ilaçlar- standart farmakopedeki ilerlemeyle karşılaştırıldığında oldukça sınırlı (Bernades vd., 1982) olmakla birlikte taşların %90'ından fazlası kolesterol tipinde olup (kolesterol ≥ %70) diğerleri, kalsiyum bilurabinat ve $CaCO_3$ içeren ve kolesterol oranları %70'ten az olan karışık ve bilurabin safra taşlarıdır (Kim vd., 2003, Lammert vd., 2016, Wang vd., 2008). Kolesterol safra taşları safra kolesterolünün hepatik hipersekresyonu, kolesterolün hızlandırılmış nükleasyonu ve kristalleşmesiyle safra kesesinin hipomotilitesi gibi çeşitli faktörlerin neticesinde aşırı doymuş safrada kolesterolün çökelmesi sonucu gelişmektedir (Wang vd., 2008).

Safra taşlarının yapısal analizi için optik fotoğrafçılık, radyografi, taramalı elektron mikroskobu, Fourier dönüşümü kızılötesi absorpsiyon, Fourier dönüşümlü Raman saçılması,

Raman spektroskopisi ve X-ışını kırınımı (Kleiner vd., 2002, Kodaka vd., 2004, Liu vd., 2002, Zheng vd., 1986, Zhou vd., 1997) gibi çok sayıda spektroskopik ve analitik teknik uygulanırken, elementel kompozisyonun analizi için atomik emisyon spektroskopisi (AES), lazerle indüklenen parçalanma spektroskopisi (LIBS), endüktif olarak eşleşmiş plazma (ICP), atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), nötron aktivasyon analizi (NAA), protonla indüklenen X-ışını emisyonu (PIXE) ve X-ışını floresansı (XRF) kullanılmıştır (Al-Kinani vd., 1984, Singh vd., 2008, Singh vd., 2009). Her tekniğin diğerine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Yukarıdaki tekniklerin çoğu özellikle elementel analiz teknikleri, yoğun zaman ve emek ile birlikte özel numune hazırlama protokolleri gerektirmektedir. Öte yandan bunların çoğu doğası gereği yıkıcıdır (numune tahrip olmaktadır) ve safra taşı gibi biyolojik materyallerde oldukça gerekli olan sonrasında tekrarlanabilir analizler için yeterli numune kalmamaktadır.

Safra taşı bileşenlerinin ayrıntılı bir analizini sağlamak için çeşitli analitik tekniklerin bir kombinasyonu uygulanmaktadır (Parviainen vd., 2016). Toz X-ışını kırınımı (XRD), safra taşlarındaki ana kristal fazları belirlemek için geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Ramana vd., 2017). Kolesterolün hem susuz hem de monohidrat formları (Craven 1976, Shieh vd., 1977), kalsiyum bilurabinat (Bonnett vd., 1978, Sutor vd., 1977) ve $CaCO_3$ polimorfları (kalsit, aragonit, vaterit) gibi başlıca safra taşı bileşenlerinin kristal yapıları geçmişte zaten belirlenmiş olup (Sevcík vd., 2018) bu teknik kullanılarak toplanan X-ışını difraktogramları, safra taşlarının sınıflandırılmasında büyük destek sağlamaktadır. Çünkü kolesterolün karakteristik zirveleri kolesterol safra taşı XRD desenlerinde açıkça fark edilirken, bilurabine atıfta bulunan ek zirveler karışık safra taşı difraktogramlarında gözlemlenmektedir (Dowais vd., 2021). Bilurabin safra taşları ise, kristalin olmayan yapıları nedeniyle bu teknikle derinlemesine karakterize edilmesi zor olan taşlar olup XRD desenleri yoğun yansıma tepeleri yerine yalnızca geniş kırınım tepeleri sunmaktadır (Bakthavatchalam vd., 2019).

Safra taşlarındaki kolesterol içeriğini belirlemek ve kolesterolün susuz mu yoksa monohidrat formunda mı olduğunu belirlemek için, termogravimetrik/diferansiyel termal analiz (TGA/DTA) (Alexander vd., 1993, Ramana vd., 2017) ile kaydedilen suyun kütle kaybını izleyerek ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) (Kaloustian vd., 2003) kullanılarak erime sıcaklığını ve entalpiyi inceleyerek termal analiz teknikleri de kullanılmaktadır.

Safra kesesi taşlarının kimyasal bileşenlerini ölçmek için önceki çalışmalarda çeşitli gelişmiş spektroskopik teknikler uygulanmıştır (Singh vd., 2020). Lazer kaynaklı bozulma

spektroskopisi (LIBS), herhangi bir ön numune hazırlama adımına gerek kalmadan uygulanabilen hızlı bir teknik olup; numunenin darbeli lazer ablasyonu ve ardından numunede bulunan tüm elementlerin spektral imzasının optik emisyon tespitinden oluşmaktadır (Pathak vd., 2012) Safra taşlarının LIBS spektrumları, farklı yoğunluklarda mineral ve organik elementlere sahip çeşitli atomik çizgiler sunmakta ve bu da onu safra taşlarının kompozisyonel analizi için kullanışlı hale getirmektedir (Gazali vd., 2021, Singh vd., 2008, Singh vd., 2009). Fotoakustik spektroskopi (PAS), moleküler analiz için bir başka ilginç teknik olması nedeniyle; emilen olay elektromanyetik radyasyonların optik enerjisinin radyasyon dışı geçişler yoluyla ısı enerjisine dönüştürüldüğü zaman akustik bir sinyalin üretildiği fotoakustik fenomene dayanmaktadır (Rosencwaig vd., 1976). Birkaç çalışmada PAS'ın, farklı moleküler emilim bantlarına karşılık gelen spektral tepe noktaları sunarak safra taşlarının moleküler bileşimleri hakkında daha fazla ayrıntı sağlama yeteneği gösterilmiştir ki bu tepe noktalarından kolesterol, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, safra asidi veya bilurabinin oluşumu belirlenebilmiştir (Gazali vd., 2019).

Kimyada yaygın bir teknik olan Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, diğer analitik yöntemlere göre avantajları nedeniyle son zamanlarda biyomedikal araştırmalarda yapısal analiz için kullanılmaktadır (Bazin vd., 2012, Bunaciu vd., 2014, Krafft vd., 2006). Bu spektral teknik çok hızlı olmakla birlikte, yalnızca küçük bir numune miktarı gerektirmekte, son derece hassas, duyarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamaktadır. Bu nedenle FTIR safra taşı analizi için ideal bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Kleine vd., 2002, Qiao vd., 2013, Sikkandar vd., 2011).

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) safra taşlarının sınıflandırılması ve kimyasal analizi için ilk tercih edilen tekniktir (Ha vd., 2018). Kristalinitelerinden bağımsız olarak her türlü safra taşını analiz etmek için etkili bir şekilde uygulanabilmektedir. Ayrıca FTIR yalnızca az miktarda numune ve çok basit bir numune hazırlama gerektirirken, çevre dostu, hızlı, ucuz ve tahribatsız olma gibi avantajlara sahiptir. FTIR spektrumları 4000–400 cm^{-1} spektral bölgesinde kaydedilmekte ve IR spektrum veri tabanlarıyla karşılaştırıldıktan sonra kolesterol, kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat veya kalsiyum bilurabinatın fonksiyonel kimyasal gruplarına karşılık gelen belirli titreşim bantlarına atanabilen farklı emilim tepeleri belirlenebilmektedir (Bakthavatchalam vd., 2019, Dowais vd., 2021, Singh vd., 2020). Gazali ve arkadaşları, safra taşı örneklerinin kimyasal bileşimini LIBS ve PAS kullanarak analiz etmiş ve ardından elde edilen LIBS spektrumlarına PCA uygulayarak safra taşlarını sınıflandırmıştır

(Gazali vd., 2021). Bildiğimiz kadarıyla bu, FTIR'yi PCA ve PLS modellemesi gibi kemometrik yöntemlerle birlikte kullanarak safra taşlarının kimyasal analizi için bir yöntem geliştiren ilk çalışmadır.

Uçuş zamanlı sekonder iyon kütle spektrometrisi (TOF-SIMS), organik ve inorganik malzeme ve proses karakterizasyonu için eşit derecede uygun, köklü ve yaygın olarak uygulanan bir yüzey analitik tekniğidir. TOF-SIMS'in çalışma prensibi ve uygulamaları için farklı çalışmalar bulunabilir (Vickerman vd., 2001). Bu teknik biyomalzemeler de dâhil olmak üzere çeşitli malzemeler hakkında moleküler özgüllüğe sahip kimyasal bilgiler sağlamaktadır. TOF-SIMS'in en büyük avantajı, hedef malzemelerin yalnızca elementel bilgilerini değil, aynı zamanda moleküler ve yapısal bilgilerini de sağlamasıdır. Ayrıca çok küçük bir alan elementel ve moleküler bileşim açısından taranabilmektedir. Safra kesesi ve böbrek taşlarının TOF-SIMS ile incelenmesi ilgi çekicidir. Son zamanlarda uçuş zamanlı sekonder iyon kütle spektrometrisi (TOF-SIMS), idrar taşlarını, sistin taşlarını ve kolesterol taşlarını incelemek için kullanılmaktadır (Ghumman vd., 2010, Ghumman vd., 2012). Ghumman ve ark. (Ghumman vd., 2012) ayrıca, Ga^+ birincil iyonlarını bombardıman parçacıkları olarak kullanarak TOF-SIMS ile sistin ve kolesterol taşlarını da incelemiştir. Ayrıca Ghumman ve arkadaşları (Ghumman vd., 2010), safra taşlarının tanımlanması için TOF-SIMS'i kullanmış olup kolesterol safra taşlarında nispeten yoğun karakteristik parçacıklar $[M–OH]^+$ ile birlikte kolesterolün deprotone edilmiş moleküllerini $[M–H]^+$ tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışmalarında ana ve eser elementlerin tespitini ve bunların mekânsal dağılımları hakkında bir bilgi sunamamışlardır.

Düşük vakum altında çalışan ve iletken olmayan, kaplanmamış ve/veya hidratlanmış numunelerin (Danilatos vd., 2013, Muscariello vd., 2005) orijinal morfolojilerini ve yapılarını etkilemeden görüntülenmesine ve analizine olanak tanıyan çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) ticari olarak mevcuttur. ESEM özel elektron dedektörlerinin numune odasındaki gazlı ortamlara dayanabilmesi sayesinde ıslak ve/veya kaplanmamış numunelerin kullanımına olanak tanımaktadır. Ayrıca kaplama gerektirmediğinden orijinal numune yüzeyinin doğrudan gözlemlenmesi de mümkündür. Herhangi bir ciddi numune işleme ihtiyacının olmaması nedeniyle ESEM, safra taşları gibi ileri biyomedikal araştırmalar için önemli bir araç haline gelmiştir (Manero vd., 2003, Rosso vd., 2013).

Hem X-ışını kırınımı (XRD) hem de enerji dağılımlı X-ışını (EDX) analizi, farklı safra taşlarının mineralojik ve kimyasal karakterizasyonunu doğrulamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cavalu vd., 2015, Weerakoon vd., 2015) XRD analizi, X-ışınlarının elastik saçılmasıdır ve bir X-ışını kaynağı kullanarak kristal yapıyı ve kristal bilgilerini tanımlamak için uygulanırken, EDX analizi X-ışınlarının emilimiyle bir elektron kaynağı kullanarak her bir elementin bileşiminin ve konsantrasyonunun kimyasal tanımlanması için kullanılmaktadır. Her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Yapılan bazı çalışmalarda EDX analizi, farklı numunelerin mimarisinin ve element ayrıntılarının araştırılması için yüksek çözünürlüklü görüntüleme, yarı kantitatif element analizi ve nitel X-ışını element haritaları sağlamak üzere ESEM ile birleştirilmiştir (Goldstein vd., 2003, Piburn vd., 2013). Araştırılan alandaki element bileşimi yüksek bir hassasiyetle belirlenebilmektedir. Lityumdan uranyuma ve ötesine kadar değişen atom numaralarına sahip çoğu element tespit edilebilmektedir.

Geçmişte safra taşı analizinde geleneksel SEM-EDX kullanılmış olsa da (Agarwal vd., 1993, Athanasiadou vd., 2013), safra taşlarının ESEM-EDX analizi için bugüne kadar çok fazla çalışma bildirilmemiştir. Bu nedenle Cheng 2016 yılında yaptığı çalışmada (Cheng vd., 2016), kronik veya akut safra taşı hastalığı olan 36 Tayvanlı hastadan izole edilen safra taşlarını, FTIR mikrospektroskopisi kullanılarak analiz etmiş ve dört ana türe göre sınıflandırılmalarını sağlamıştır (Kim vd., 2003, Ravnborg vd., 1990, Sun vd., 2001). Daha sonra farklı safra taşı türlerinin mikro yapısal özellikleri, yüzey topografisi ve element bileşimleri ESEM-EDX ile gözlemlenmiştir. Ayrıca safra taşı veya akut çamur yüzeyinde bulunan bakteriler de geleneksel SEM ile tespit etmiştir.

Safra taşlarının X-ışını kırınımı toz analizi, safra taşlarını oluşturan belirli kristal bileşenlerin orantılılığını belirlemek için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Lee vd., 2009, Palchik vd., 2005). Öte yandan EPR spektroskopisi, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin ve diğer paramagnetik komplekslerin doğrudan tespiti için potansiyele sahip tek tekniktir. İltihaplanma sırasında yerinde oluşan bilurabin serbest radikalleri hücre hasarlarına neden olabilmekte ve patolojik süreçleri başlatılabilmektedir (Liu vd., 2002). Yapılan bir çalışmada, bilurabin, kalsiyum bilurabinat kompleksleri ve geçiş metal iyonlarının EPR sinyalleri ürettiğinden yola çıkarak EPR spektroskopisi ile safra taşlarının kimyasal bileşenleri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Wu vd., 1997). Ayrıca başka bir çalışmada, bilurabin serbest radikallerinin kinetik kalsifiye olmaya yatkın olduğu bulunmuştur (Liu vd., 2002).

Sonuç olarak safra taşlarının canlı organizmalarda oluşumu sıklıkla uzun bir süreç almakta ve taş oluşumundan konsolidasyona (birleşmeye) ve/veya konkresyona (katılaşmaya) kadar olan süreci izlemek oldukça zordur. Safra taşlarını tedavi etmenin günümüzdeki en etkili yöntemi cerrahi olarak çıkarılması olsa da, safra taşı oluşumunun altında yatan nedenleri belirlemek ve safra taşı hastalığı için cerrahi olmayan bir tedavi geliştirmek için bileşenlerinin tanımlanması esastır. Safra taşlarının oluşumu çekirdeklenmeden itibaren çeşitli süreçleri içermektedir. Safra taşlarının in vivo oluşumu yıllar almaktadır ve çekirdeklenmeden safra kesesinde çözünmeyen maddenin konsolidasyonuna kadar patogenezini izlemek daha öncede vurgulandığı gibi oldukça zordur. Safra kesesi suyu ve sodyumu emmekte ve safrayı yoğunlaştırmaktadır. Kolesterol safra taşları, safradaki kolesterol konsantrasyonu safranın onu çözeltide tutma kapasitesini aştığında oluşmaktadır. Safra taşlarının kimyasal bileşimi ve safra taşı içindeki farklı bileşenlerin/elementlerin dağılımı, patogenezlerini ve dolayısıyla önlenmesini anlamak için önemlidir.

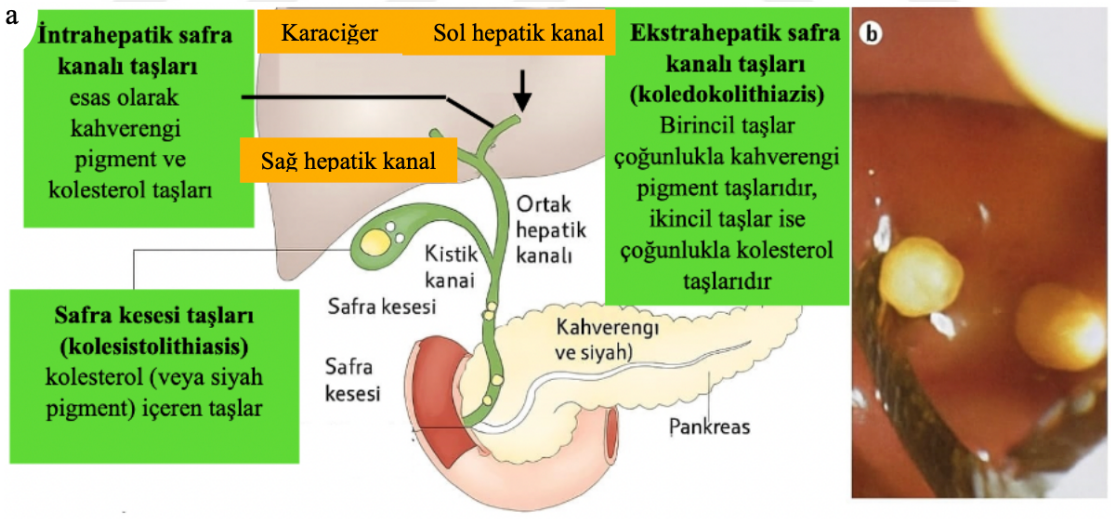
Yapılan bu tez çalışmasında; SEM, XRD, FTIR spektroskopisi gibi yüksek hassasiyetli teknikler kullanılarak safra taşı patogenezinin iyi anlaşılması ve hastalığa karşı etkili bir koruma politikasının geliştirilmesinde yardımcı olmak amaçlanmaktadır. Ayrıca safra taşlarının yapısal ve moleküler analizi, oluşumunun kökeni, etiyolojisi ve metabolik temeli hakkında önemli kanıtlar elde edip, belirli bireyleri safra taşı oluşumuna yatkın hale getiren risk faktörlerinin nasıl belirlenebileceği ileriki aşamalarda araştırılacaktır. Safra taşları üzerinde yapılacak bu türden araştırmalar ile nedensel faktörler belirlenebilecek ve taş oluşumuna karşı önleyici tedbirler zamanında alınabilecektir.

2.2. Kuramsal Temeller

2.2.1. Safra taşları

Safra taşları, safra kesesi içinde oluşabilen sindirim sıvısı safranın sertleşmiş tortularıdır. Boyut ve şekilleri kum tanesi kadar küçük bir formdan golf topu kadar büyük bir forma kadar değişkenlik göstermektedir. Safranın kimyasal yapısında bir veya daha fazla bileşenin çökelmesiyle sonuçlanan dengesizlik olduğunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1.). Şekil 2.1.a.'da safra ağacındaki safra taşlarının olası lokalizasyonları gösterilmiştir. Taşların farklı renkleri, kolesterol taşları (sarı) ve bilurabin taşları (kahverengi ve siyah) dâhil olmak üzere bileşimlerini göstermektedir. Şekil 2.1.b.'de ise dormia sepeti ile taş alımı sırasında safra kanalındaki sekonder kolesterol taşlarının (tipik sarı renkte) endoskopik görünümü verilmiştir.

Safra taşı hastalığının modern toplumda sıklıkla önemli bir rahatsızlık olduğu düşünülmektedir. Ancak safra taşları insanlar tarafından uzun yıllardır biliniyor olmalı ki MÖ 1000 yılına dayanan Mısır mumyalarının safra keselerinde bulunmuşlardır. Safra taşı yaygınlığında coğrafi farklılıklar olmasına rağmen dünya çapında bir tıbbi sorundur.

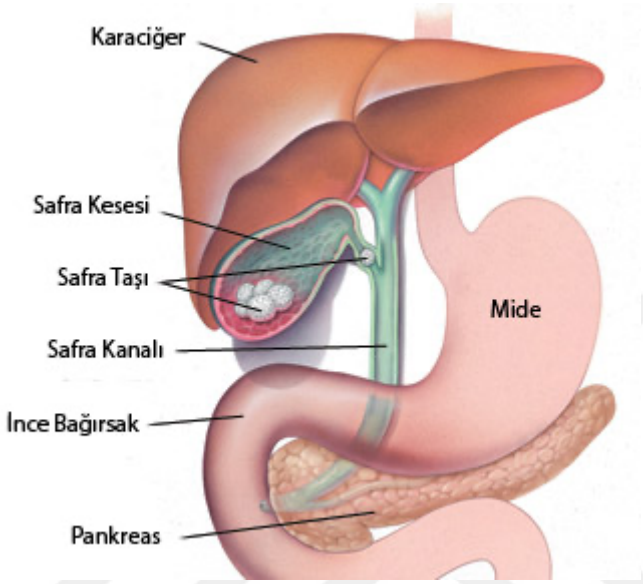


Şekil 2.1. Safra taşlarının sınıflandırılması

Çoğu durumda safra taşları herhangi bir soruna neden olmaz. 10 kişiden 7'sinde hiçbir belirti görülmemekle birlikte en yaygın belirtileri şunlardır:

- Karın ve sırt ağrısı - ağrı genellikle seyrek görülür ancak şiddetlidir.
- Yağlı bir yemek yedikten sonra artan karın ağrısı.

Safra taşı olan çoğu kişide ciddi bir komplikasyon görülmez (Şekil 2.2.). Ancak taşlar uzun yıllar boyunca safrada yerleşikse, yaklaşık on kişiden birinde sarılık (ciltte ve göz aklarında sarı renk değişikliği), pankreatit (pankreas iltihabı) veya enfeksiyonlar gelişebilir.



Şekil 2.2. Safra taşları

Safra taşlarıyla ilgili bazı özel komplikasyonlar şunlardır:

- Obstrüktif sarılık veya kolestaz: Safra kanallarındaki akışın tıkanması, kanda bilurabin (safra bileşenlerinden biri) seviyelerinin yükselmesine neden olur ve bu da sarılığa (cilt ve göz aklarının sararmasına) yol açar.
- Biliyer kolik: Sistik kanalın (safra kesesinin boynu) tıkanması şiddetli ağrı ve ateşe neden olur. İltihaplanma yoktur.
- Kolesistit: Safra kesesinin iltihaplanmasıdır ve enfeksiyonla birlikte görülebilir. Genellikle ağrı, bulantı ve kusma görülür.
- Kolanjit: Safra kanalının iltihaplanması ve enfeksiyonudur; safra kanalı tıkanıp ince bağırsaktan gelen bakterilerle enfekte olursa ortaya çıkabilir.
- Pankreatit: Bazen safra kanalının alt ucundaki taşlar pankreas bezinin iltihaplanmasına neden olur ve bu çok ağrılı bir durum olabilir.

- Safra taşı ileusu: Safra taşları bağırsağa geçer ve burada ince veya kalın bağırsakta tıkanıklığa neden olabilir.

Bu komplikasyonlar genellikle hastanede acil tedavi gerektirmekle birlikte bunları önlemek için ameliyat nadiren iyi bir fikir olarak kabul edilmektedir. Hazımsızlık, dolgunluk, mide bulantısı ve yağlı gıda intoleransı belirtileri safra taşlarından dolayı oluşmamakla birlikte ameliyatla da iyileşmez.

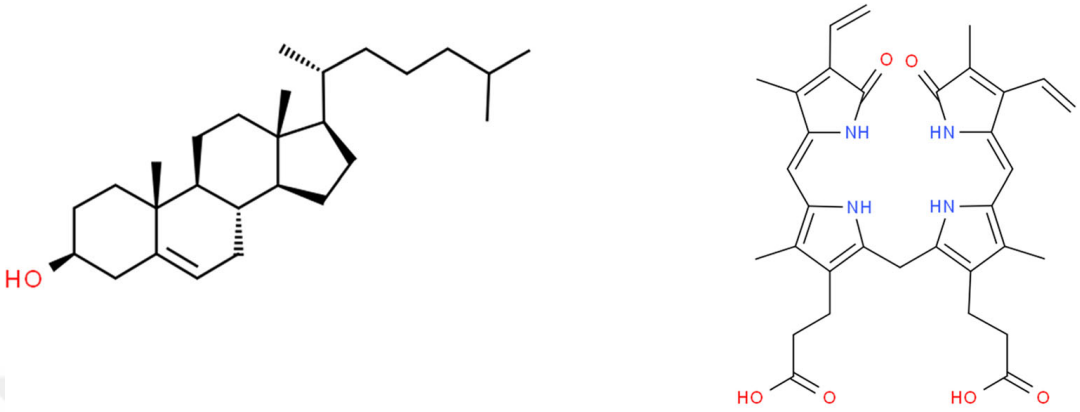
Safra taşları semptomlara neden olmadıkça tıbbi tedaviye gerek olmayabilir. Tedavi safra taşlarının boyutuna ve konumuna bağlı olup şunları içerebilir:

- Diyet değişiklikleri: Yağlı yiyeceklerin ve süt ürünlerinin sınırlandırılması veya tamamen kesilmesidir.
- Ameliyat: Ağrı atakları yaşanıyorsa, doktor safra kanalındaki taşları veya tüm safra kesesini çıkarmak için bir ameliyat önermektedir.
- Litotripsi: Özel bir makine, taşları parçalamak için ses dalgaları üretmektedir. Bu tedavi büyük ve çıkarılması zor taşları olan kişiler için kullanılmaktadır.
- İlaçlar: Bazı ilaçlar safra taşlarını eritebilmektedir ancak bu tedavinin yan etkileri olduğundan her zaman başarılı sonuçlar vermediğinden sıklıkla kullanılmamaktadır. Hastada sarılık, safra kesesi ya da safra kanalında enfeksiyon gibi komplikasyonlar varsa acil tedavi gerekmektedir.

2.2.2. Safra taşı oluşumunun patofizyolojisi

Safra taşları safra kesesinde depolanan safranın taş benzeri madde parçalarına dönüşmesiyle oluşmaktadır. Safra, çoğu omurgalının karaciğer hepatositleri tarafından salgılanan acı sarı veya yeşil bir sıvı olup daha sonra safra kesesinde depolanarak yağların sindiriminde kullanılmaktadır. Kasılma sırasında safra kesesi safrayı ortak safra kanalına itmekte ve bu kanal da onu ince bağırsağa taşıyıp burada yağ sindirimi görevini yerine getirmektedir. Safranın bileşimi; su, kolesterol, yağlar, safra tuzları, proteinler ve bilurabin içermektedir. Safra genellikle kolesterolü çözebilmektedir (Şekil 2.3.a.) ancak çok fazla kolesterol varsa, kristaller oluşturmakta ve sonunda taşlara dönüşmektedir. Bazı durumlarda bilurabin seviyesi (Şekil 2.3.b.) çok yüksekse, bu da taş oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Farklı safra taşı türlerinin kendine özgü nedenleri ve oluşum mekanizmaları vardır. İdeal bir safra taşı sınıflandırma sistemi tanımlamak zordur; ancak ana kimyasal bileşimlerine göre genel olarak gruplandırılmaktadırlar. Temelde üç ana türe ayrılırlar: (i) kolesterol taşları, (ii) bilurabin taşları ve (iii) karışık taşlar.



(a) **(b)**

Şekil 2.3. (a) Kolesterolün ve (b) bilurabinin kimyasal yapısı

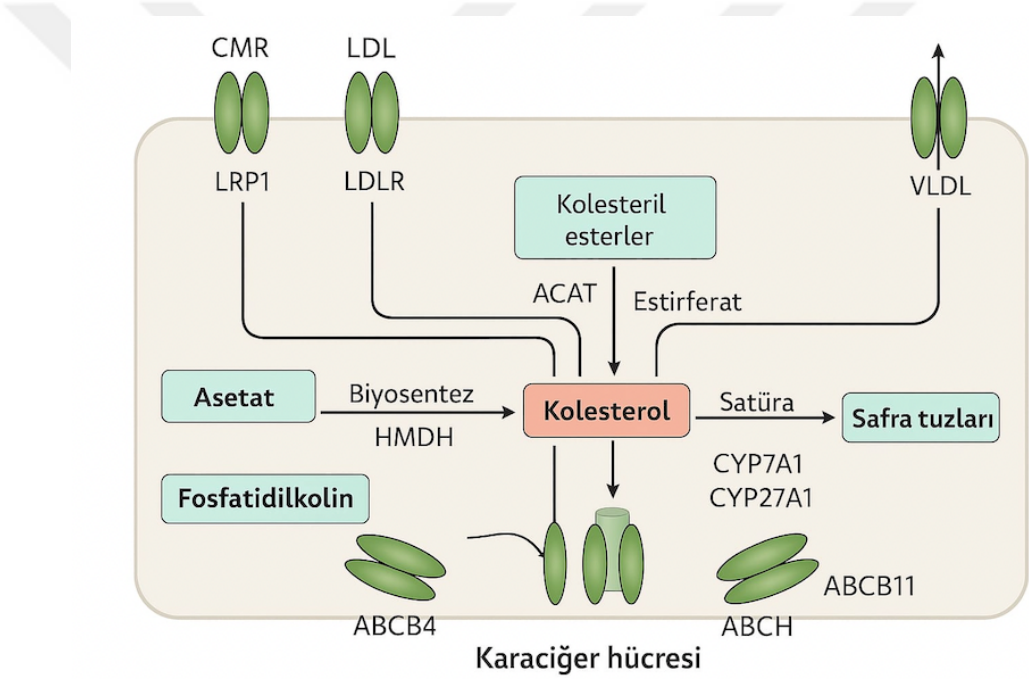
2.2.2.1. Kolesterol safra taşları:

Kolesterol (beyaz kristal toz), karaciğer hücreleri tarafından safraya salgılanan maddelerden biri olup karaciğer vücuttaki fazla kolesterolü atmaktadır. Kolesterolün kimyasal formülü C_27H_46O'dur ve kimyasal yapısı Şekil 2.3.a.'da gösterilmiştir. Esas olarak en yaygın safra taşı türüdür (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Safra taşlarının yeri ve bileşimi

Konum	Tip	Ana Kimyasal Bileşim	Morfoloji
Safra Kesesi	Saf kolesterol taşları	Ağırlıkça > % 95 kolesterol	Açık sarı sert ve küresel, pürüzsüz veya morular yüzeyli
	Siyah bilurabin taşları	Polimerize kalsiyum bilurabinat	Siyah yumuşak kırılgan ve pürüzsüz bir yüzeye sahip küçük küre
Ortak Safra Kanalı	Karışık kolesterol taşları	Ağırlıkça > % 50 kolesterol kalsiyum bilurabinat	Açık sarıdan kahverengiye kadar sert ve küresel, pürüzsüz yüzeyli
İntrahepatik Safra Kanalı	Kahverengi bilurabin taşları	Monomerik kalsiyum bilurabinat	Kahverengi yumuşak kırılgan, sert ve küresel, çok yönlü bir yüzeye sahip

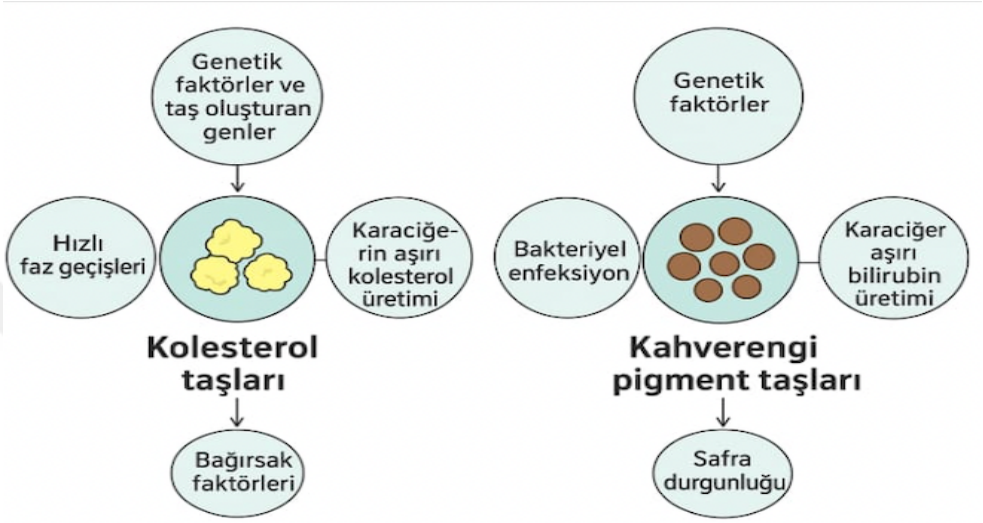
Yağlı kolesterol safra kanallarından taşınabilmesi için safrada çözünmektedir. Karaciğer ise çok fazla kolesterol (safra asitleri ve lesitin miktarından daha fazla) salgılarsa, kolesterolün bir kısmı çözünmeden kalabilmektedir. Benzer şekilde karaciğer yeterli safra asidi ve lesitin salgılamazsa, kolesterolün bir kısmı da çözünmemektedir. Dolayısıyla her iki durumda da çözünmeyen kolesterol birbirine yapışmakta ve kolesterol parçacıkları oluşturmaktadır ki bu parçacıklar boyut olarak büyümekte ve sonunda daha büyük safra taşları oluşturmaktadır. Yani kolesterol safra taşlarının oluşumunun, safra kolesterol homeostazının bozulmasının bir sonucu olduğunu söyleyebiliriz ki (Şekil 2.4.) bu durumda safradaki kolesterolün çözünürlüğünün hem fiziksel hem de kimyasal dengesi bozulmaktadır. Şekil 2.4'ten de görüleceği üzere kolesterolün hepatik alımı, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein 1 (LRP1) aracılığıyla gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4. Hepatositte kolesterol metabolizması

Şekil 2.5.'de, kolesterol safra taşı oluşumunda rol oynayan ve kolesterol kristalleşmesini ve safra taşı oluşumunu teşvik etmek için birlikte çalışan beş temel kusur gösterilmektedir. Şekil 2.5.a.'da, hepatik kolesterol hipersekresyonu, kolesterol safra taşı oluşumunun başlıca nedeni olup büyük ölçüde genetik yatkınlığa bağlıdır. Safra kesesi hipomotilitesi ve hızlı faz geçişleri bunun sonraki sonuçlarıdır. Kolesterol safra taşı oluşumuna katkıda bulunan bağırsak faktörleri arasında kolesterol emiliminin artması ve safra tuzlarının emiliminin azalması yer almaktadır.

Şekil 2.5.b.'de, kahverengi bilurabin safra taşları, bilurubin glukuronidin serbest biluribin ve glukuronik aside hidrolizine neden olan aşırı bakteriyel β-glukuronidazın bir sonucudur. Serbest bilurubinat kalsiyumla birleşerek suda çözünmeyen kalsiyum bilurabinat oluşturmaktadır. Ölü bakteriler ve parazitler, kalsiyum bilurubinatın çökelmesini hızlandıran çekirdekler olarak işlev görmektedirler. Safra kesesindeki mukus jeli, bu kompleks çökeltileri hapsederek makroskobik taşlara dönüşmelerini desteklemektedir.



Şekil 2.5. Kolesterol ve kahverengi bilurabin safra taşlarının oluşumunda rol oynayan etiyolojik faktörler

2.2.2.2. Bilurabin safra taşları:

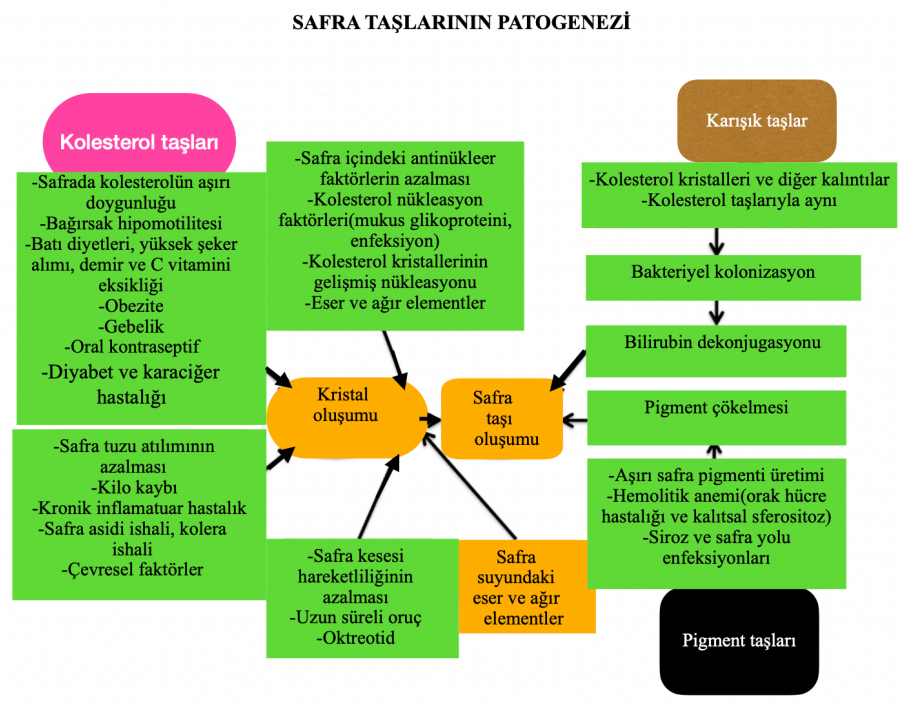
Bu tür taşlar; bilurabinin kalsiyum tuzları (kalsiyum bilurabinat gibi), fosfat, kalsiyum karbonat ve diğer anyon türlerinden oluşan kahverengi ila siyah taşlar olarak tanımlanmaktadır. Bilurabin hemoglobinden oluşan bir atık ürünü olup hemoglobin, kırmızı kan hücrelerinde (RBC'ler) vücutta oksijen taşıyan bir proteindir. Yıkım için hedeflenen eski RBC'lerinden gelen hemoglobin, bilurabine dönüştürülmekte ve kana salınmaktadır.

Bilurabin karaciğer tarafından kandan uzaklaştırılmaktadır. Karaciğer bilurabini değiştirmektedir ve değiştirilmiş bilurabini safraya salgılamaktadır. Bilurabinin kimyasal formülü $C_33H_36N_4O_6$'dır ve kimyasal yapısı Şekil 3.b.'de gösterilmiştir. Safrada çok fazla bilurabin varsa, bilurabin safra içindeki diğer kimyasal bileşenlerle birleşerek kahverengi bilurabinler oluşturmaktadır. Bilurabin safrada zayıf çözünmekte ve birbirine yapışarak boyut

olarak büyüyen ve sonunda siyah ve kahverengi renkte sert bilurabin tipi safra taşlarını oluşturan parçacıklara dönüşmektedir. Bu şekilde oluşan bilurabin safra taşlarına siyah bilurabin safra taşları denmektedir ve renkleri kahverengiden siyaha kadar değişmekle birlikte fiziksel olarak sert karakterlidirler. Kahverengi bilurabin safra taşları siyah bilurabin safra taşlarından çok daha yumuşak yapıdadır.

2.2.2.3. Karışık safra taşları:

Bu tür taşlar değişen oranlarda kolesterol ve bilurabinat tuzlarından oluşan kolesterol ve bilurabin taşlarının bir karışımıdır. Ayrıca kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat, bilurabin, kalsiyum bilurabinat, kalsiyum palmitat ve kalsiyum stearat gibi diğer bileşenlerden de oluşmaktadır. Kalsiyum içerikleri nedeniyle genellikle radyografik olarak görülebilirler. Safra taşları; safra kesesi içinde safra aşırı doygunluğu, çekirdeklenme, başlangıç ve taş birikmesiyle oluşan karmaşık bir dizi olaydan sonra oluşan ve gelişen sert kimyasal parçacıklardır. Safra taşlarının oluşumu safra stazı, enfeksiyon ve/veya mukus ile başlamakta ve boyutları yılda yaklaşık 3 mm artarak hızla birkaç santimetre çapa ulaşabilmektedir. Şekil 2.6. da kolesterol, karışık ve bilurabin safra taşlarının patogenezinin farklı nedenleri, oluşumu ve büyümesini etkileyen faktörler verilmiştir.



Şekil 2.6. Safra taşlarının patogenezi ve bunların oluşumunu-büyümesini etkileyen faktörler

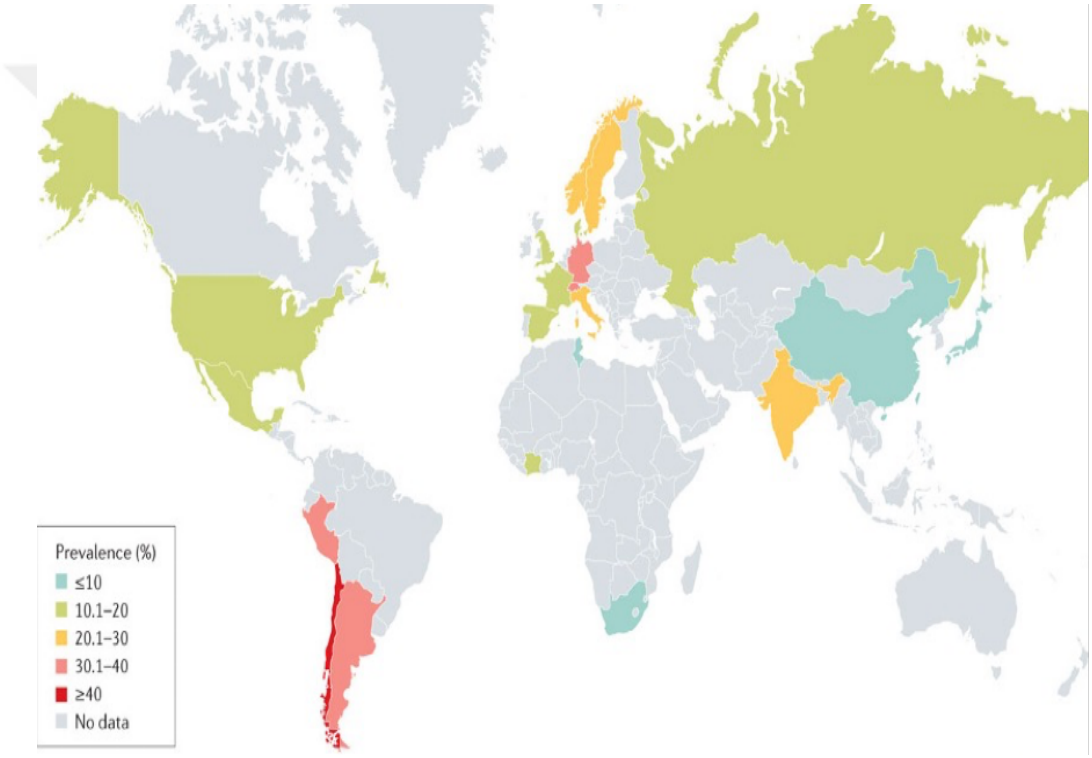
2.2.3. Safra taşı hastalığının komplikasyonları

Safra taşları, safra kesesinden ayrılıp safrayı karaciğerden ince bağırsağa taşıyan kanallardan herhangi birine yerleşirse normal safra akışını engellemektedir. Kanallar arasında (i) hepatik kanallar, (ii) sistik kanal ve (iii) ortak safra kanalı bulunmaktadır. (Şekil 2.1.) Hepatik kanallar safrayı karaciğerden dışarı taşımakta olup sistik kanal da safrayı safra kesesine ve safra kesesinden alıp ortak safra kanalı safrayı kistik ve hepatik kanallardan ince bağırsağa taşımaktadır. Bu kanallarda sıkışan safra; safra kesesinde, kanallarda ve karaciğerde iltihaplanmaya neden olmaktadır. Diğer kanallar, sindirim enzimlerini pankreastan dışarı taşıyan pankreas kanalı da dâhil olmak üzere ortak safra kanalına açılmaktadır. Çoğu zaman ortak safra kanalından geçen safra taşları pankreasta iltihaplanmaya neden olmaktadır (Afdhal 2004, Cox vd., 2018, Swobodnik vd., 1990). Bu duruma safra taşı pankreatiti denmekte olup çok ağrılı ve kritik derecede tehlike oluşturmaktadır. Safra kanallarından herhangi biri uzun süre tıkalı kalırsa, safra kesesi, karaciğer ve pankreasta ciddi hasar meydana gelmektedir. Bu ciddi sorunun ateş, sarılık ve geçmeyen ağrı gibi bazı uyarı işaretleri vardır ki tedavi edilmezse, durum ölüme yol açabilmektedir (Afdhal 2004, Cox vd., 2018, Swobodnik vd., 1990).

Şu anda safra taşı hastalıklarını tedavi etmek için etkili bir ilaç veya tedavi yöntemi mevcut değildir. Safra taşlarının ve safra kesesinin cerrahi olarak çıkarılması, safra taşı hastalıklarını tedavi etmenin tek çözümüdür. Safra kesesi ameliyatında en sık görülen komplikasyon, safra kanallarının yaralanmasıdır. Yaralanmış bir ortak safra kanalı, safrayı sızdırabilir ve ağrılı ve potansiyel olarak tehlikeli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Safra taşları üzerinde daha detaylı incelemeler, bu patogenezi bozmak için yeterli bilgi sağlayabilir ve muhtemelen önleyici bir tedavinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi, cerrahi tedaviye gerek kalmadan taşları yok etmek için daha güvenli yöntemler geliştirmeye de yardımcı olabilir. Yıllar süren araştırmalara rağmen safra taşı oluşumuna dair eksiksiz bir açıklama mevcut değildir. Safra taşlarının temel kimyasal bileşenlerinin kolesterol ve kalsiyum bilurabinat olduğu, ayrıca kalsiyum karbonat, fosfat, kolik asit türevleri, yağ tuzları, proteinler ve polisakkarit gibi diğer bileşiklerin de mevcut olduğu tespit edilmiştir (Kleiner vd., 2002, Liu vd., 2002, Singh vd., 2008). Safra taşı hastalığının ciddiyetinin taşın bileşenleriyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Liu vd., 2002, Singh vd., 2008, Singh vd., 2009). Bu nedenle taş bileşiminin belirlenmesi hem araştırma amaçları hem de hasta bakımını iyileştirmek açısından çok önemlidir.

2.2.4. Safra taşlarının epidemiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar farklı popülasyonlar arasında genel yaygınlıkta belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir. Safra taşı gelişmiş ülkelerde yaygın olan hastalıklardan biridir ancak geleneksel beslenmeyi sürdüren gelişmekte olan popülasyonlarda daha az yaygındır şekil 2.7. de, 50-60 yaş arası kadınlarda ultrasonografi ile belirlenen safra kesesi taşı yaygınlık oranları gösterilmiş olup gri bölgeler için herhangi bir veri bulunmamaktadır. Yaygınlık özellikle İskandinav ülkeleri, Şili ve Yerli Amerikalılar arasında daha yüksektir. Safra taşları Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da yaygınken, Afrika, Hindistan, Çin, Japonya, Keşmir ve Mısır'da ise daha az yaygındır.



Şekil 2.7. Safra kesesi taşlarının küresel yaygınlığı

2.2.5. Safra taşı hastalığını etkileyen faktörler

2.2.5.1. Yaş

Tüm epidemiyolojik çalışmalar ilerlemiş yaşın, safra taşı yaygınlığının artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Safra kesesi taşları yaşlı bireylerde genç bireylere göre 4-10 kat arası

daha sık görülmektedir. Safra asidi sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan kolesterol 7α-hidroksilazın aktivitesindeki düşüş nedeniyle safra kolesterol satürasyonu yaşla birlikte artmaktadır. Yani safradaki deoksikolik asit oranı, bağırsak bakterileri tarafından birincil safra asitlerinin 7α- dehidroksilasyonunun artmasıyla yaşla birlikte artmaktadır.

2.2.5.2. Cinsiyet, doğum sayısı ve oral kontraseptifler

Dünyanın tüm popülasyonlarında genel safra taşı yaygınlığından bağımsız olarak, doğurganlık çağındaki kadınların safra taşı yaşama olasılığı erkeklerden neredeyse iki kat daha fazladır. Bu baskınlık menopoz sonrası dönemde daha az oranda devam etmektedir ancak cinsiyet farkı yaş ilerledikçe azalmaktadır. Gebelik, hormon tedavisi veya kombine (östrojen içeren) hormonal kontrasepsiyon yöntemlerinin kullanımı sonucu östrojen hormonunun artan seviyeleri, safradaki kolesterol seviyelerini artırmakta ve safra kesesi hareketini azaltarak safra taşı oluşumuna neden olmaktadır.

2.2.5.3. Genetik

Hem otopsi hem de toplum çalışmaları, çevresel faktörlerle tamamen açıklanamayan ırksal farklılıkların varlığını göstermiştir. Kolesterol safra taşı yaygınlığı, Asyalı ve Afrikalı popülasyonlarda son derece düşük (%5'ten az), Avrupa ve Kuzey Amerika popülasyonlarında orta (%10-30), Yerli Amerikalı kökenli popülasyonlarda ise (Arizona'daki Pima Kızılderilileri, Şili'deki Mapuche Kızılderilileri) son derece yüksek (%30-70) olduğu bulunmuştur (Lopis, 1947). Arizona'daki Pima kabilesi, dünyada safra kesesi taşı görülme sıklığı en yüksek olan kabile olup 25 yaş üstü Pima kadınlarının %70'inden fazlasında safra taşı veya kolesistektomi öyküsü bulunmaktadır. ABD'deki bazı Hispanik popülasyonlar ise safra kesesi hastalığı açısından ortalamanın üzerinde risk altındadır.

2.2.5.4. Obezite ve vücut yağ dağılımı

Obezite safra taşı hastalığı için önemli bir risk faktörüdür ve kadınlarda erkeklerden daha fazla görülmektedir. 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMGCoA) redüktaz aktivitesindeki artışın bir sonucu olarak safra yoluyla kolesterol salgılanmasını artırarak kolesterol safra taşı riskini yükseltmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar obezitenin, litojenik riskinin genç

kadınlarda en güçlü olduğunu ve zayıflığın safra taşı hastalığına karşı koruduğunu göstermiştir (Trotman vd., 1975).

2.2.5.5. Hızlı kilo kaybı

Hızlı kilo kaybı başladıktan birkaç hafta sonra hastaların %10-25'inde çamur ve safra taşı oluşumu artmıştır (Yang vd., 1992). Bir kişi çok hızlı kilo verirse, karaciğer fazladan kolesterol salgılamakta, yağ dokusu depolarından kolesterol hızla mobilize olmaktadır. Şiddetli yağ kısıtlamalı diyetlerle ilişkili oruçta, safra kesesi kasılması azalmakta ve buna eşlik eden safra kesesi durgunluğu safra taşı oluşumunu desteklemektedir. Az miktarda diyet yağının dâhil edilmesiyle safra kesesinin boşalmasının artırılması, hızlı kilo kaybı yaşayan hastalarda safra taşı oluşumunu engellemektedir. Oruç kısa vadede safra kesesi safrasının kolesterol doygunluğunu artırırken uzun vadede safra kesesi durgunluğuna neden olmaktadır ki bu da çamurlaşmaya, sonunda safra taşı oluşumuna yol açmaktadır. Daha kısa süreli bir gece orucunun, her iki cinsiyette de safra taşlarına karşı koruyucu olabileceği tespit edilmiştir (Attili vd., 1998).

2.2.5.6. Diyet

Batı diyetiyle beslenme yani yağ alımının artması, rafine karbonhidratlar ve lif içeriğinin azalması, safra taşı oluşumu için güçlü bir risk faktörüdür (Kameda vd., 1984). Diyetle alınan kalsiyum, kolondaki sekonder safra asitlerinin yeniden emilimini önleyerek safra kesesi safrasının kolesterol doygunluğunu azaltmaktadır. C vitamini safradaki 7α-hidroksilaz aktivitesini etkilemekte olup, askorbik asidin yetişkinlerde litojenik riski azaltabileceği gösterilmiştir (Simon vd., 1998). Kahve tüketimi safra asitlerinin enterohepatik dolaşımının artması nedeniyle safra taşı yaygınlığıyla ters orantılı görünmektedir. Kahve bileşenleri; kolesistokinin salınımını uyarmakta olup safra kesesi hareketliliğini artırmakta, safra kesesi sıvısı emilimini engellemekte, safrada kolesterol kristalleşmesini azaltmaktadır (Keiner, 1965) ve muhtemelen bağırsak hareketliliğini de artırmaktadır (Lillemoe vd., 1989).

2.2.5.7. Fiziksel aktivite

Düzenli egzersiz tek başına veya diyetle birlikte kilo kontrolünü kolaylaştırmanın yanı sıra, hem obezite hem de kolesterol safra taşlarıyla ilişkili çeşitli metabolik anormallikleri

iyileştirmektedir. Bunun aksine hareketsiz yaşam tarzı kolesistektomi riskiyle pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur (Donovan vd., 1991).

2.2.5.8. İlaçlar

Tüm fibrik asit türevleri safra kolesterol doygunluğunu artırırken serum kolesterolünü düşürmektedir. Klofibrat, hepatik asil-CoA kolesterol asiltransferazın (ACAT) güçlü bir inhibitörüdür. ACAT inhibisyonu, safraya salgılanmak üzere serbest veya esterleşmemiş kolesterolün bulunabilirliğini artırarak safra taşı oluşumunu desteklemektedir (Kurtin vd., 2000). Ek olarak proton pompası inhibitörlerinin uzun süreli kullanımının, safra kesesi fonksiyonunu azalttığı ve potansiyel olarak safra taşı oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Diehl vd., 1990).

2.2.5.9. Diyabet

Diyabetli kişilerde genellikle trigliserit adı verilen yüksek yağ asidi seviyeleri bulunmaktadır. Bu yağ asitleri safra taşı riskini artırmaktadır. Diyabetik nöropati varlığında safra kesesi fonksiyonu bozulmakta ve hipergliseminin insülinle düzenlenmesi litojenik indeksi yükseltiyor gibi görünmektedir (Kurtin vd., 2000). Melatonin eksikliği safra kesesi taşlarına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır çünkü melatonin safra kesesinden kolesterol salgılanmasını engellemekte kolesterolün safraya dönüşümünü artırmakla birlikte safra kesesine oksidatif stresi azaltabilen bir antioksidandır.

2.2.6. Safra taşlarının farklı spektrometrik tekniklerle analizi

Uygun yöntemler ve element analizi için uygun yazılımlar kullanılarak numune yapısının mikro ve nano ölçekte doğru karakterizasyonu ve mevcut bilgilerin kritik bir şekilde işlenmesi, safra taşı oluşumunu önlemenin olası yollarını ve büyüme mekanizmasını belirlemek için çok önemlidir. Farklı spektrometrik yöntemler kullanılarak taşların kimyasal ve faz bileşimleri hakkındaki sonuçlar elde edilmektedir. Bazen birkaç kimyasal (spektroskopik) teknik kullanılarak, kantitatif sonuçlar karşılaştırılarak, örneklerdeki element analizine olan güvenilirlik ve duyarlılık sağlanabilir. Kızılötesi (IR) spektroskopisi ve toz X-ışını kırınımı gibi çeşitli yapısal yöntemler, kristalin ve kristal olmayan maddeleri incelememize olanak tanımaktadır. Safra taşlarının kimyasal bileşimini elde etmek için literatürde bildirilen başlıca

spektroskopik yöntemler şunlardır: floresan mikroskopisi, X-ışını floresan analizi (XRF), nötron aktivasyon analizi (NAA), proton (partikül) kaynaklı X-ışını emisyonu (PIXE), atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), yüksek çözünürlüklü gama ışını spektrometrisi ve elektron paramanyetik rezonans (EPR)'dir. Faz tanımlama için kullanılan yapısal yöntemler ise: toz X-ışını kırınımı (XRD), IR spektroskopisi ve Raman spektroskopisi bulunmaktadır. Optik mikroskopi örneklerin morfolojisini makro ölçekte incelemek için kullanılırken, çeşitli dedektörlerle donatılmış taramalı ve transmisyonlu elektron mikroskopları, safra taşı bileşenlerinin morfolojisi, element bileşimi ve yapısı hakkında bilgi sağlamaktadır.

2.2.6.1. Safra taşlarının morfolojisinin makro seviyede analizi

2.2.6.1.1. Optik mikroskopi

Safra taşlarının ilginç görüntülerini elde etmede optik mikroskopi kullanılmaktadır. Safra kesesi taşları genellikle aynı tipte olup tamamen farklı tipteki taşlar da gözlemlenmektedir. Taşlar boyut (en büyükleri 3-5 cm'ye ulaşır) ve renk bakımından farklılık göstermekte olup, bu da farklı kimyasal ve faz bileşimlerine sahip oldukları anlamına gelmektedir. Optik mikroskopi ile; düz, oval (tercih edilen şekil), 3-20 yüzlü, fasetli ve oldukça kümelenmiş yapıda olabilecekleri gibi "dut" veya "inciler" gibi farklı şekillerde safra taşları tespit edilmiştir.

2.2.6.2. Safra taşlarının elementel bileşiminin analizi

2.2.6.2.1. Floresan mikroskobu

Floresan mikroskopisi, uyarılmış atom ve molekül gruplarının ışık enerjisi emilimi yoluyla optik aralıkta görüntüler elde etmeyi mümkün kılan analitik bir yöntemdir. Temel duruma dönüş ışık emisyonu (floresans) ile birlikte gerçekleşmektedir. Optik filtreler ışık seçici olarak; spektrumu ultraviyole, görünür veya yakın kızılötesi bölgelerde iletmekte olup uyarılma ve emisyon yoluyla da kaydetmektedirler. Tek bir molekülün floresansını düşük optik bir arka plan üzerinde ve düşük gürültülü bir dedektör kullanarak da kaydetmek mümkündür. Yeşil ve mavi filtreli bir floresan mikroskobu, safra kesesi taşlarının çekirdeklerinin kimyasal bileşimindeki farklılıkların belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Bilurabin (kahverengi ve siyah) taşlarından "kırmızı" floresansın tespiti, kalsiyum bilurabinatın varlığına, karışık tip taşlardaki "yeşil" floresans ise bakır bilurabin kompleksine atfedilmiştir. Bu gözlem taşlar için farklı bir oluşum

mekanizmasını işaret etmektedir. Örneğin kahverengi taşların oluşumu bakteriyel aktiviteyle ilişkiliyken, karaciğer sirozu ve hemoliz (eritrosit yıkımı) siyah bilurabin taşlarının büyümesinden sorumlu tutulmuştur.

2.2.6.2.2. X-ışını floresan analizi

X-ışını floresan (XRF) analizi; toz, katı veya sıvı numunelerde standart kullanmadan berilyumdan uranyuma kadar olan elementlerin nitel ve nicel analizi için hızlı ve tahribatsız bir teknik olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem bir numunedeki temel elementlerin % 0,1 doğrulukla analiz edilmesi için son derece kullanışlıdır. Eser elementlerin alt tespit sınırı 0,1 ila 10 ppm arasındadır. Uyarıcı kaynak olarak senkrotron radyasyon kaynağının kullanılması, parlaklıktaki artış nedeniyle tespit sınırını iki kat düşürmeyi ve küçük numune hacimlerini incelemeyi mümkün kılmaktadır. XRF iç orbitallerden birinden bir elektronu koparan X-ışınlarına maruz bırakılan numunelerden elde edilen spektrumların analizine dayanmaktadır. Dedektör elektronların daha yüksek enerji seviyelerinden daha düşük enerji seviyelerine geçişi nedeniyle yayılan karakteristik radyasyonu kaydetmektedir. Örneğin; XRF yöntemi ayrıca safranın elementel bileşiminin araştırılması için de kullanılmaktadır. Patolojik vakalarda taşların varlığında, kalsiyum konsantrasyonunda safranın normal bileşimine kıyasla 30 kat artış bulunmuştur.

2.2.6.2.3. Parçacık (proton) kaynaklı X-ışını emisyonu

Parçacık (proton) kaynaklı X-ışını emisyonu (PIXE) yöntemi; biyolojik örneklerdeki eser elementler hakkında yüksek doğrulukla bilgi sağlamaktadır (Na'dan Cl'ye kadar olan atomlar için yaklaşık 10-20 ppm ve Ca'dan daha ağır atomlar için 1-10 ppm). Yöntem her bir element için örneklerin proton bombardımanı ve iç elektron kabuklarının iyonizasyonuyla üretilen karakteristik X-ışınlarının ölçümüne dayanmaktadır. Yayılan foton sayısı örnekteki elementin kütlesiyle orantılıdır. Foton üretim olasılığı; gelen protonların toplam sayısına (proton akımı) ve enerjilerine (genellikle 1 MeV ile birkaç on MeV aralığında) bağlıdır ve elementlerin kantitatif analizi bu iki parametrenin doğru bir şekilde bilinmesini gerektirmektedir. Proton ışınında tüm numunenin veya temsili bir kısmının bulunması önemlidir. Bu nedenle jelatin çözeltisinde homojen bir hedef oluşturmak için safra taşlarının toz haline getirilmesi gerekmektedir. Ca, Fe, Mn, Cu, Zn elementlerinin konsantrasyonları, diğer bazı yöntemlerle elde edilen değerlerle örtüşmektedir. Farklı tipteki safra taşlarının PIXE ile belirlenen kimyasal

bileşiminin ve karşılık gelen safra taşı çeşidinin karşılaştırılması neticesinde; taşlarda ve safrada bulunan elementlerin konsantrasyonları arasında bir korelasyon olmadığı sonucuna varılmıştır.

2.2.6.2.4. Nötron aktivasyon analizi

Nötron aktivasyon analizi (NAA), numunelerin nötron bombardımanından sonra radyoaktif malzemelerin spektrumlarının incelenmesine dayanmakta olup hem element konsantrasyonlarını ölçmek hem de radyoaktiviteyi belirlemek için kullanılmaktadır. 1936 yılında Hevesy ve Levi tarafından keşfedilen NAA (Hevesy ve Levi, 1935, Hevesy and Levi, 1936); katı, sıvı ve gazların neredeyse tüm elementlerinin nitel ve nicel analizine olanak tanımaktadır. İzotopları tanımlamak için nitel analizlerde yarı ömür ve kuantum enerjisi belirlenebilirken, nicel analizlerde ise (konsantrasyon ölçümleri); belirli bir süre boyunca radyasyon dozu, termal nötron akısı, ışınlama süresi, spektrumun belirli bir tepe noktası için yayıcı ve dedektörün verimliliği ve ışınlamadan sonra numunenin maruz kalma süresi belirlenebilmektedir. Radyoaktif numunelerin gama spektrumlarından, çok düşük element konsantrasyonları elde edilmektedir. Safra taşlarındaki en düşük metal konsantrasyonları, Co, Sb, Cs, Cr, Ag, Rb, Se ve I için (konsantrasyon artış sırasına göre) 2 ppb ve 10 ppm olarak bulunmuştur. Lin ve arkadaşları (Lin vd., 1990); yalnızca Na, Mg, Cl, Sc, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Cu, Se, As, Br, Rb, Sr, I, Hg elementlerinin konsantrasyonlarını ölçmekle kalmayıp, aynı zamanda her türlü taşın (kolesterol, karışık ve bilurabin siyahı) çekirdeklerinde Ca, Mg, Fe, Co, Zn, Na ve Cl'yi bulmayı ve taş çekirdeklerinin yüzeylerinde Ca ve Rb içeriğinde bazı farklılıklar tespit etmeyi başarmışlardır.

2.2.6.2.5. Atomik absorpsiyon spektroskopisi

Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), kimyasal elementlerin kantitatif ölçümü için kullanılan spektroanalitik yöntemdir. AAS, temel haldeki serbest atomların belirli dalga boylarındaki ışığı absorbe etmesi prensibine dayanmaktadır. Bu seçici absorbsiyon, karmaşık matrislerdeki element konsantrasyonlarının nicel olarak ölçülmesine olanak tanımaktadır. Herhangi bir elementte elektronlar, ayrık enerji seviyelerini işgal etmektedir. Bir atomun enerjisi, temel hali ile uyarılmış hali arasındaki enerji boşluğuna tam olarak karşılık gelen bir fotonu absorbe ettiğinde, elektronik bir geçiş meydana gelmektedir. Çoğu element için bu geçişler, spektrumun ultraviyole (UV) veya görünür (Vis) bölgelerindeki dalga boylarına

karşılık gelmektedir. AAS'de, analiz edilecek element bir ısı kaynağı ile serbest atomlara dönüştürülmekte (atomizasyon) ve o elemente özgü bir dalga boyuna sahip bir ışık demeti ısıtılmış buhardan geçirilmektedir. Işık absorbsiyonunun derecesi, Beer-Lambert yasasına göre, absorbe eden atom sayısıyla ve dolayısıyla elementin konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak tespit edilmektedir.

Safra taşlarının kimyasal analizinde, çözeltilerden numuneleri alevde atomize etme ve katıları fırında buharlaştırma yöntemlerinin her ikisi de kullanılmaktadır. Saf kolesterol ve bilurabin taşlarındaki hafif elementler olan Ca, Mg, Na, K için karşılaştırmalı analizler gerçekleştirilmiştir. Hg, Pb, As, Cr, Co, Cd gibi ağır metalleri ortaya çıkarmak için de kronik kolesistitli malign ve premalign safra kesesi karsinomu olan çeşitli hasta gruplarının safra taşları analiz edilmiştir (Mondal vd., 2016). Safra taşlarındaki en yüksek Hg ve Pb konsantrasyonları karsinomlu hastalarda tespit edilirken, diğer elementler tüm örnek kategorileri için yaklaşık olarak aynı seviyede bulunmuştur. Kolesterolde ve özellikle bilurabin taşlarında yüksek Pb içeriği (Weerakoon vd., 2015)'da tarafından tespit edilmiştir ve bu durumda sosyodemografik faktörlerle ilgili araştırmaların yoğunlaştırılması için bir gerekçe oluşturulmuştur. Safra taşlarındaki ağır elementleri analiz etmek için basit bir AAS yöntemi kullanmanın temel amaçlarından biri, diyet ve/veya çevresel koşulların rolünün değerlendirilmesiyle element konsantrasyonları ile taş oluşum mekanizması arasında bir korelasyon kurmak olmuştur.

2.2.6.3. İzotop ve radikallerin tanımlanması ve analizi

2.2.6.3.1. Yüksek çözünürlüklü gama ışını spektrometrisi

Yüksek çözünürlüklü gama ışını spektrometrisi, safra taşlarındaki radyoaktif izotopları tanımlamak için kullanılmaktadır. Gama ışınlarının enerjisi ve yoğunluğu, sintilasyon veya yarı iletken dedektörlerle donatılmış gama spektrometrelerinde, gama kuantalarının dedektör malzemesiyle etkileşiminden sonra oluşan ikincil yüklü parçacıklar (elektronlar ve pozitronlar) kullanılarak belirlenmektedir (fotoelektrik etki, Compton etkisi, elektron-pozitron çifti oluşumu). Dedektörün temel özellikleri, genellikle yüzde olarak ifade edilen çözünürlük ve algılama verimliliğidir. Yüksek saflıkta germanyum (HPGe) dedektörleri, en iyi enerji çözünürlüğünü sağlamaktadır ve dedektörün boyutuna bağlı olarak en pahalı olanlardır. Bu yöntemin uygulanması, safra taşlarında doğal radyonüklidler olarak kabul edilen ^{214}Pb (196

Bq/kg), ^{214}Bi (170 Bq/kg) ve ^{40}K (54 Bq/kg) izotoplarının yanı sıra eser miktarda uranyumun varlığının belirlenmesini mümkün kılmıştır.

2.2.6.3.2. Elektron paramanyetik rezonans

Sovyet fizikçi E. Zavoisky tarafından 1944 yılında keşfedilip geliştirilen elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopik yöntemi; elektromanyetik dalgaların eşleşmemiş elektronlar tarafından rezonans absorpsiyonuna dayanmakta olup paramanyetik merkezler hakkında bilgi sağlanmaktadır. Bu yöntem safra taşlarının önemli bir özelliği olan kristallerdeki safsızlık iyonlarının (paramanyetik merkezler) konsantrasyonunu belirlemeyi mümkün kılmaktadır. Kolesterol taşlarının EPR spektrumlarında, serbest bilurabin radikallerinin varlığını gösterirken (Cavalu vd., 2015) bilurabin sinyaline ek olarak Mn^{2+} iyonlarının varlığından kaynaklanan daha karmaşık bir sinyal ortaya çıkarılmıştır. En yüksek Cu^{2+} ve Fe^{3+} iyon konsantrasyonları siyah bilurabin taşlarında bulunmuştur. Safra taşlarındaki Ca ve Cu bilurabinat komplekslerinin yapısıda incelenmiştir. Bilurabin oksidasyonunun safra taşlarının çekirdeklenmesi ve büyümesi üzerindeki etkisinin incelenmesi, serbest bilurabin radikallerinin oluşumunun patolojik sürecin bir parçası olduğunu göstermiştir. Yaşlanma, obezite, enfeksiyonlar, inflamasyon, hematit ve pankreatit gibi hastalıkların bilurabin metabolizmasında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Tüm bu faktörler bilurabinin hızlı oksidasyonunu ve serbest radikallerin polimerizasyonunu tetikleyerek safra taşı oluşumuna yol açmaktadır.

2.2.6.4. Faz bileşiminin incelenmesi

2.2.6.4.1. Raman spektroskopisi

Raman spektroskopisi; bir numuneye odaklanmış tek renkli bir ışık demetinin (bir lazerden) etkileşimini ve buna eşlik ederek saçılan radyasyonun enerjisinde, gelen (uyarıcı) ışının enerjisine kıyasla bir değişimin varlığını tanımlamaktadır. Raman spektrumları, gelen tek renkli radyasyon ile moleküller (veya iyonlar) arasındaki esnek olmayan çarpışmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Foton enerjisindeki değişimin tahmini bir molekülün enerjisindeki değişim ve yeni bir seviyeye geçiş hakkında fikir vermektedir. Saçılan ışığın enerjisi hem azalabilmekte (Stokes saçılması) hem de artabilmektedir (anti-Stokes saçılması). Kural olarak saçılan ışığın spektral çizgileri düşük bir yoğunluğa sahip olup bu nedenle yöntem numunedeki ana bileşenleri belirlemek için kullanılmaktadır. Rezonans Raman etkisi kullanılırsa sinyallerin yoğunlukları

en az on kat artarken, numunedeki elektronik geçişlere karşılık gelen dalga boyuna sahip uyarma radyasyonu ile de iyileştirme sağlanmaktadır. Numune bileşenlerinin tam olarak tanımlanmasının önündeki oldukça ciddi bir engel, spektrumu Raman spektrumuyla örtüşen bir floresan bileşiğinin varlığı olabilir. Böyle bir zorlukla bilurabin safra taşları üzerine yapılan bir çalışmada (Liu vd., 1999) karşılaşılmış ve kolesterol taşlarının zayıf Raman saçılımları olduğu vurgulanmıştır. Molekülleri tanımlamak için, saf bileşiklerden elde edilen standart spektrumlara (referanslara) sahip veritabanları kullanılmış ve bunlar deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Raman spektroskopisinin cazip özellikleri, basit numune hazırlama ve tahribatsız etkidir ancak numunelerin lazer ışını altında eriyebileceği unutulmamalıdır. Bu yöntem taşlarda yüksek kalsiyum karbonat içeriğine (aragonit) ve bilurabine sahip iki tür minerali ortaya çıkarmakta, tanımlamakta ve ayrıca kolesterol, oksalatlar ve ürik asidi de tespit etmektedir. Raman spektrumlarının kalibrasyon eğrileri kullanılarak safra taşlarında üçlü bir karışıma sahip yapıda, kalsit, aragonit ve vateritin kantitatif analizi için kullanılabileceği belirtilmiştir (Palchik vd., 2005) ancak deneysel bir kanıt bildirilmemiştir. Raman spektroskopisi ayrıca kolesterol taşlarının mikro düzeyde homojenliğini ve saflığını değerlendirmek ve proteinlerin, metallerin bilurabin komplekslerinin ve kalsiyum tuzlarının yokluğunu doğrulamak için de faydalı bir tekniktir.

2.2.6.4.2. Kızılötesi spektroskopisi

Kızılötesi spektroskopisi (IR), kızılötesi radyasyon bir numuneden geçerken moleküllerdeki veya bunların bireysel gruplarındaki titreşimlerin uyarılmasıyla oluşan absorpsiyon spektrumlarının kaydedilmesine dayanmaktadır. Absorpsiyon yalnızca enerjisi moleküllerdeki titreşimlerin uyarılma enerjilerine karşılık gelen dalga boylarında meydana gelmektedir. Bu nedenle kızılötesi radyasyonun maksimum absorpsiyonunun gözlemlendiği dalga boyları (veya frekanslar), moleküllerde fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir. Bu özellik bileşiklerin yapısını belirlemek için kullanılmaktadır, bu nedenle kızılötesi spektroskopisi, mantıksal olarak malzemelerin faz kompozisyonunu inceleme yöntemi olarak adlandırılmaktadır. IR spektroskopisi ile safra taşı kompozisyonunun incelenmesine ilişkin ilk makalelerden biri 1960 yılında yayınlanmıştır (Chihara vd., 1960). O zamandan beri çok sayıda deneysel veri bulunmaktadır ve yöntemin geliştirilmesi sayesinde, belirli moleküler için emilim frekanslarını içeren özel tablolar kullanılarak kantitatif analiz yapmak mümkün hale gelmiştir. IR spektrum veritabanları, bilinmeyen bileşiklerin bir referansla karşılaştırarak otomatik olarak tanımlanmasına olanak tanımaktadır. IR çalışmaları ile kolesterol taşlarının safra taşlarının ana

bileşeni olduğu (numunelerin yaklaşık %85'i), diğer taşların ise yaklaşık %1,5 nin kalsiyum ve %0,5-1,0 nin ise fosfat ve kalsiyum karbonattan oluştuğu gösterilmiştir (Trotman vd., 1977). Bilurabin kalsiyum karbonat ve kalsiyum karbonat olmayan diğer taşlarda IR ile tanımlanmıştır. Bilurabin ve kolesterol taşlarının farklı oluşum mekanizmalarına sahip olduğu da öne sürülmüştür.

2.2.6.4.3. Toz X-ışını kırınımı

Toz X-ışını kırınımı (XRD), saçılma yoğunluğu ile X-ışınlarının saçılma açısı arasındaki ilişkiler aracılığıyla bileşiklerin yapısal parametrelerini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Deneysel XRD deseni kristal yapının bir "parmak izi"dir. Farklı fazların bir karışımı, her fazdan farklı kırınım desenleri kombinasyonunu vermektedir. Nitel analiz genellikle deneysel verilerin ICSD tablolarındaki standart kırınım desenleriyle (referanslar) karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir ve fazların nicel analizi, tüm fazlardan kırınım maksimumlarının bağıl yoğunluklarının ölçülmesini gerektirmektedir. Safra taşı incelemesinde XRD'nin ilk uygulamalarından biri muhtemelen 1941'de belirtilmiştir (Pepinsky vd., 1941). Safra taşlarının inorganik bileşenleri, üç kalsiyum karbonat formunun (kalsit, vaterit ve aragonit) tanımlanmasıyla bulunmuştur. Safra bilurabinleri tarafından stabilize edilen vaterit genellikle diğer iki kalsiyum karbonatı olmadan tek başına tespit edilmiştir. İn vivo üç kalsiyum karbonat formunun oluşumu farklı çökelme koşullarıyla açıklanmıştır. Kemik veya diş dokusuna yakın bir bileşime sahip küçük kalsiyum karbonat-apatit kristalleri gibi diğer inorganik bileşenler de tespit edilmiştir. Safra taşlarında faz tanımlaması için, safra taşlarından elde edilen deneysel örneklerle daha fazla karşılaştırma yapmak üzere standart XRD desenleri (referanslar) elde etmek üzere saf bileşikler sentezlenmiştir.

2.2.6.5. Taramalı elektron mikroskopisi ve X-ışını enerji ayırımlı spektrometrisi

Kimyasal/faz bileşimi ile malzemenin özellikleri arasındaki korelasyonun kurulması; numunelerdeki aynı spesifik alanlardan gerçekleştirilen görüntüleme, kırınım ve spektroskopik işlemlerin bazı kombinasyonlarını gerektirmiştir. Bu da bilimsel çalışmaları kapsamlı hale getirmiş ve patogenez çalışmalarına katkıda bulunmuştur. Analitik taramalı ve transmisyon elektron mikroskobu; karmaşık malzemelerin yerel yapısını ve kimyasını makroskobik ölçekten atomik ölçeğe kadar doğrudan incelemek için çok güçlü ve çok yönlü bir araştırma araçtır.

Modern taramalı elektron mikroskoplarında, büyük numunelerin yüzey görüntülerini elde etmek için birkaç yüz volt ile 30 kV arasında elektron ivme voltajı kullanılmaktadır. Gelen ince bir elektron demeti ile numuneler arasındaki etkileşim, ikincil ve geri saçılmış elektronların oluşumuna neden olmaktadır. İkincil ve geri saçılmış elektronlar tarafından üretilen sinyal, ilgili dedektörler tarafından toplanmakta ve analiz edilmektedir. İkincil elektronlar tarafından oluşturulan SEM görüntüleri, esas olarak yüzey yapısı (topografya) hakkında bilgi sağlarken, kimyasal bileşimdeki değişikliklerden kaynaklanan atom numarası kontrastı, geri saçılmış elektronlar kullanılarak elde edilebilmektedir. SEM görüntü yoğunluğunu modüle etmek için kullanılan bu sinyal, bilginin numunede kaynaklandığı derinliğe de bağlıdır.

X-ışını enerji ayırımlı spektrometri (EDS) veya X-ışını dalga boyu ayırımlı spektrometri (WDS), karakteristik X-ışını emisyonunu analiz etmek ve örneklerdeki elementlerin dağılımı hakkında bilgi sağlamak için dedektörlerle donatılmış bir analitik elektron mikroskobu ile yapılmaktadır. Çevresel taramalı elektron mikroskobunda X-ışını EDS ve katodolüminesans, safra taşlarındaki Ca, Mg, Na ve P'nin lokal kantitatif analizine ve kalsiyum karbonatlar, oksalatlar ve fosfatlar arasında ayrım yapılmasına olanak sağlamıştır (Iordanidis vd., 2013).

2.2.6.6. Transmisyon elektron mikroskobu ve X-ışını enerji ayırımlı spektrometrisi

Saf kolesterol taşlarının oluşumuna dair bir açıklama; uzun zaman önce önerilmiştir. Safradaki kolesterolün aşırı doygun hale gelmesinin kristalleşmeye yol açtığı şeklinde öne sürülmüştür. Ancak karışık taşların oluşum mekanizması hala belirsizdir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve numunelerin X-ışını EDS'si ile kimyasal mikro analizi (Qiao vd., 2013), kolesterol kristalleri üzerinde kalsiyum karbonat (vaterit) birikimini doğrulamamıştır. Sferülit benzeri vateritin serbest alanda oluşma olasılığının daha yüksek olduğu ve kolesterolle temasın büyüme tamamlandıktan sonra gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ek olarak bilurabin taşlarının kenarlarında demir bulunmuş, büyümelerine kanamanın eşlik ettiği ve bunun da kalsiyum karbonat çökelmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Görüntü elde etmek için daha yüksek radyasyon dozlarının gerekli olduğu, yüksek çözünürlüklü TEM ile safra taşı kristallerinin incelenmesinin ardından gösterilmiştir. Yüksek çözünürlüklü TEM ve elektron kırınımı desenleri, safra taşlarında kristal parçacıkların varlığını göstermiştir. Fazlar elektron kırınımı veya yüksek çözünürlüklü TEM görüntüleri ile tanımlanamamıştır. Kolesterolün kristalleşmesinin erken aşamaları ile doğal ve yapay safradan (model sistemde) çökeltilen çeşitli morfolojik formlarının

safra asitleri ve bilurabinlerle santrifüjlenmesinden sonra incelenmesinde kriyojenik TEM uygulamıştır.

2.2.7. Vücutta safra taşlarının araştırılmasının klinik yöntemleri (İn Vivo)

Enstrümental yöntemler safra taşlarının erken in vivo tespitinde önemli rol oynamaktadır ki bunlar: ultrasonografi (US), manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve X-ışını bilgisayarlı tomografi (BT). Tüm bu yöntemler taşların varlığı, boyutları ve yumuşak dokuların durumu hakkında tamamlayıcı bilgi sağlamaktadır. Yöntem seçimi genellikle hastanın anatomisine ve taşın boyutuna bağlıdır.

2.2.7.1. Ultrasonografi

Ultrasonografi (US); invaziv olmayan, güvenli, ucuz ve bilgilendirici olduğu için safra taşlarının tespitinde standart bir yöntemdir. US biyolojik nesnelerden (dokulardan) yansıyan bir ultrasonik dalganın kaydedilmesi ve bilgisayar analiziyle yapılan bir görüntüleme tekniğidir. Gerçek zamanlı ultrasonografi, 2 mm kadar küçük safra taşlarını %95'ten daha yüksek bir hassasiyetle tespit edebilmekte ve X-ışını muayenesinin aksine kolesterol taşlarının varlığını göstermektedir. Ultrasonografi ile bir bulamacın varlığını çok iyi göstermekte ve tek taşların boyutlarını ise iyi bir yaklaşımla tahmin edilebilirken karışımdaki küçük, orta ve büyük taşların tespiti, büyük taşların oluşturduğu gölgeler nedeniyle sorunluluk arz etmektedir. Yöntemin önemli bir sınırlaması taş bileşiminin belirlenmesinin imkansız olmasıdır.

2.2.7.2. X-ışını bilgisayarlı tomografi

X-ışını bilgisayarlı tomografi (BT), nispeten yüksek kalsiyum içeriğine sahip taşların ve safra kesesi duvarlarındaki hasarın görüntülenmesi için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem; bir nesnenin kolime edilmiş bir X-ışını demeti ile katman katman yanal taranmasına ve iletilen demetin yoğunluğunun, fotonların elektrik sinyali ürettiği özel bir dedektör sistemi tarafından kaydedilmesine dayanmaktadır. İletilen demet yoğunluğunun ölçümleri, bir X-ışını tüpü vücut etrafında bir daire çizerken alınmaktadır. X-ışını bilgileri, bir tomografik kesitteki birim hücreler (vokseller) cinsinden yoğunluk zayıflaması veya doku yoğunluğunun değerlendirilmesi için bir bilgisayara gönderilmektedir. X-ışını yoğunluk zayıflaması katsayıları, bağıl Hounsfield birimleri (HU) cinsinden ifade edilirken burada alt ölçek sınırı,

havadaki X-ışınlarının zayıflamasına karşılık gelen bin birimdir. Veriler sayesinde kesitin ekran görüntüsü elde edilmektedir. Safra taşlarının yalnızca %70-80'i BT taramasıyla tespit edilmektedir ve safra taşlarının görüntülenmesi doğrudan taşın bileşimine bağlıdır. Kalsiyum miktarı BT'nin duyarlılığında belirleyici bir rol oynamaktadır ve genellikle karışık taşların yalnızca yaklaşık %60'ı tespit edilmektedir.

2.2.7.3. Manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi

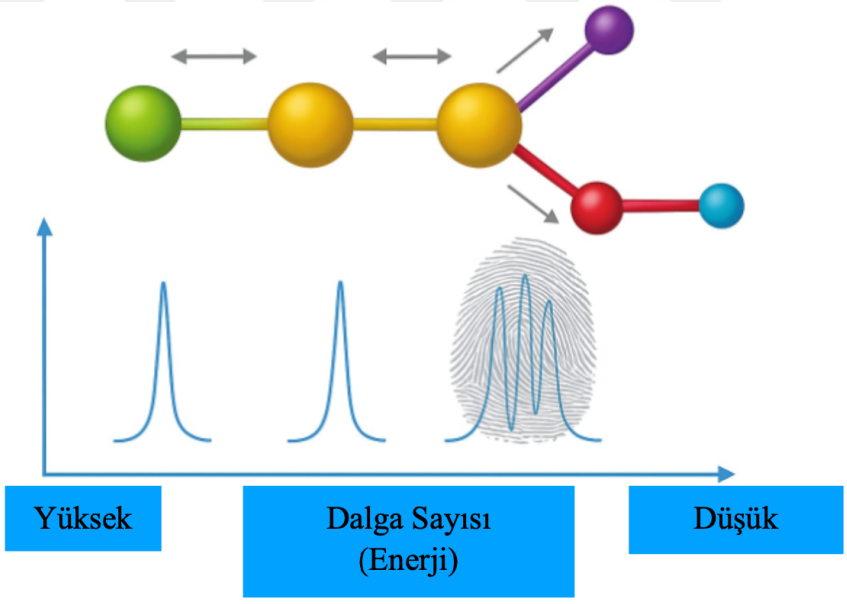
İlk olarak Wallner ve arkadaşları (Wallner VD., 1991) tarafından tanımlanan manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi (MRC), safra kanallarını incelemek, kanal tıkanıklığının nedenlerini ve safra kesesi duvarlarının durumunu belirlemek ve taşları tespit etmek için kullanışlı bir yöntem haline gelmiştir. BT'nin aksine, MRC yöntemi iyonlaştırıcı (X-ışını) radyasyonunun ve kontrast iyot içeren maddelere karşı toleranssızlığın etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu yöntem, protonları vücuda uygulanan güçlü bir harici manyetik alan içerisinde (yaklaşık 1,5 T) tespit edilebilmekte ve nükleer manyetik rezonans etkisine dayanmaktadır. Protonlardan gelen sinyal, farklı açılardan bir dilim olarak elde edilen organ ve doku görüntülerine dönüştürülmektedir. Safra taşı tespitinin hassasiyeti %91-100 doğruluğu ise %92-97 arasındadır. Taşların sınır boyutu yaklaşık 1 mm'dir ve 5 nm'den küçük taşlar MRC ile neredeyse hiç tespit edilememektedir. MRC uygulamasının temel amaçlarından biri, genellikle doğru tanı için gerekli bir koşul olan safra kanallarının hassas görüntülenmesidir.

3.YÖNTEM

3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

3.1.1. FTIR spektroskopisi nedir?

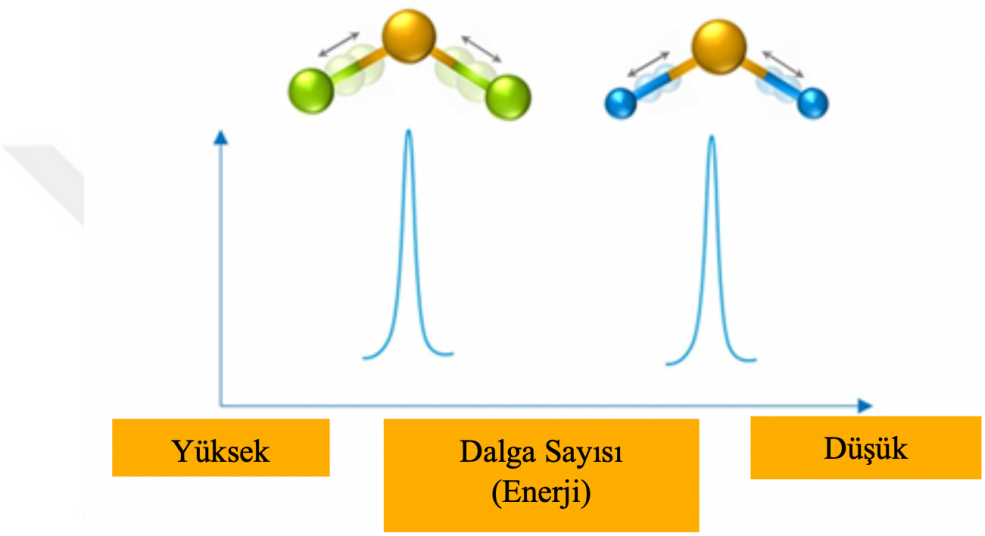
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi; çok yönlülüğü ve basitliği sayesinde dünya çapında hemen hemen her laboratuvarda kullanılan, minimum numune hazırlama süreciyle hızlı bir şekilde nitel ve nicel bilgi sağlayan, malzemelerin kızılötesi ışığı nasıl emdiğini ölçerek analiz etmek için kullanılan analitik tekniktir. Kızılötesi radyasyon numuneyle etkileşime girdiğinde, belirli frekanslar/enerjiler moleküler bağ titreşimlerine neden olabilmektedir. Bu frekanslar seçici olarak emilmekte ve ayırt edici bir moleküler parmak izi görevi gören spektrum oluşturmaktadır. FTIR hem nitel hem de nicel bilgiler sağlayarak malzemelerin tanımlanmasına ve niceliklerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır. FTIR; kimyasal bileşimi, numune kimliğini ve yapısal bilgileri belirlemek için ilaç, malzeme bilimi, çevre analizi ve adli tıp gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 3.1. Farklı fonksiyonel grupların kızılötesi (IR) spektrumu

3.1.2. FTIR nasıl çalışır?

FTIR kızılötesi ışığı bir numuneden geçirip ardından farklı dalga boylarında ne kadar ışığın emildiğini ölçerek çalışmaktadır. Numunedeki her kimyasal bağ türü, kızılötesi radyasyona maruz kaldığında belirli bir şekilde titreşmektedir. Bu titreşimler ise spektrumun her noktasında ne kadar ışık emildiğini belirlemektedir. FTIR ile ışığın tüm frekansları aynı anda ölçülmekte olup, bu sayede de taramalı kızılötesi spektroskopi tekniğine kıyasla çok daha hızlı analiz gerçekleşmektedir.

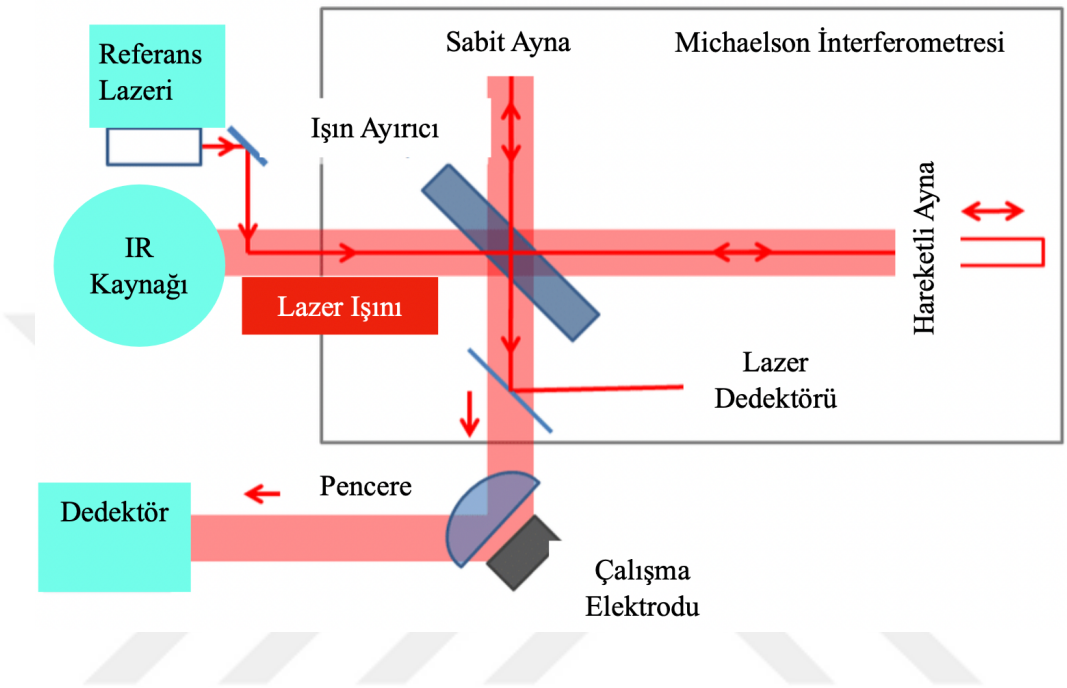


Şekil 3.2. Kızılötesi (IR) ışık moleküler titreşimleri başlatabilmekte olup gerekli enerji, bağların gücüne ve kütlelere bağlıdır

3.1.3. FTIR spektroskopisine kılavuz

Öncelikle sıvı veya katı bir numune; geniş bantlı kızılötesi ışık kaynağı, bir interferometre ve bir dedektör içeren FTIR spektrometresine yerleştirilmektedir. İnterferometre, tüm ışık verilerini interferogram (sinyal yoğunluğunun zamana göre fonksiyonu) olarak bilinen tek bir sinyal olarak toplamaktadır. Kızılötesi spektrumu ortaya çıkarmak için bu sinyal matematiksel olarak dönüştürülmelidir. Fourier dönüşümü adı verilen matematiksel bir işlem, interferogramı okunabilir bir spektruma dönüştürmekte olup sinyal yoğunluğunun frekansa göre karşılık (dalga sayısı, cm^{-1}) değişim eğrileri görülmektedir. Elde edilen FTIR spektrumu malzemede bulunan bağ türlerini ve fonksiyonel grupları ortaya çıkararak, numunenin benzersiz moleküler parmak izini sağlamaktadır. Elde edilen spektrumlar bilinen spektrum kütüphaneleriyle

karşılaştırmaları yapılarak, bilinmeyen numuneleri tanımlamaktadır. FTIR spektrumları ayrıca numune konsantrasyonunu belirlemek için de kullanılmaktadır ve bilinmeyen konsantrasyondaki numuneler önceden oluşturulmuş korelasyon eğrileri veya "miktar belirleme modelleri" ile karşılaştırılmaktadır. Kızılötesi spektroskopisinin çoğu kullanımı, yaklaşık 4 000 ila 400 cm^{-1} arasında değişen orta kızılötesi bölgesinden gelen ışık ile yapılmaktadır.



Şekil 3.3. FTIR spektrometrelerinin temel unsuru olan interferometrenin gösterimi

3.1.4. FTIR'ın temel avantajları

FTIR malzeme analizi için çeşitli pratik avantajlar sunmaktadır. Tüm kızılötesi frekansları/dalga sayılarını aynı anda yakalayarak, hızlı ve verimli bir şekilde ölçüm yapılmakta ve tarama süresi önemli ölçüde azaltılmaktadır. Minimum malzeme ile çok az hazırlık veya hiç hazırlık gerektirmeyen tekniklerle, numune hazırlama adımları basitleştirilmekte ve birçok numune doğrudan analiz edilebilmektedir. Hassas veya değerli malzemeler için ideal olan tahribatsız analizle numuneler korunmaktadır. Katılar, sıvılar, tozlar, yarı katılar, gazlar ve macunlar dâhil olmak üzere çok çeşitli malzemeleri çeşitli endüstrilerde analizi gerçekleştirilmektedir. Düşük konsantrasyonları nispeten yüksek hassasiyetle tespit ederek, eser bileşenlerin veya küçük numune boyutlarının analizi sağlanmaktadır. Tek bir FTIR spektrumuyla hem nitel hem de nicel analizler yapılmakta; bilinmeyenleri tanımlamakta,

safsızlıklar tespit edilmekte veya konsantrasyonlar ölçülmektedir. Bu avantajlar FTIR'ı hem rutin hem de araştırmaya dayalı uygulamalar için güvenilir bir araç haline getirmiştir.



Şekil 3.4. Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektrumu analizi

3.1.5. FTIR'ın sınırlamaları

FTIR güçlü bir tekniktir ancak unutulmaması gereken birkaç sınırlaması vardır:

Nem girişimi: Su IR bölgesinde güçlü bir şekilde emilmektedir. Ortaya çıkan pik ıslak numunelerdeki temel sinyalleri gizlemektedir.

Bazı numunelerin sınırlı tespiti: Azot (N_2) ve oksijen (O_2) gibi moleküller IR radyasyonunu emmemekte ve tespit edilememektedir.

Karmaşık spektrumlar: Karışımlar veya büyük moleküller örtüşen piklere neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda yorumlama, özel bilgi ve gelişmiş işlem yazılımlarının kullanımını gerektirmektedir.

Kantitatif zorluklar: Konsantrasyonların doğru ölçümü dikkatli kalibrasyon gerektirmektedir ve numune koşullarından etkilenmektedir.

Numune büyüklüğü: ATR-FTIR kullanıldığında, çıplak gözle görülebilen tüm numuneler analiz edilmektedir**.**

Heterojen katılar: ATR-FTIR numunenin yalnızca ince bir yüzey tabakasını, genellikle birkaç mikrometre derinliğinde ölçmektedir. Yığın bileşimini temsil etmeyebilir, bu da onu derinliğe bağlı özelliklere sahip veya heterojen numuneler için daha az uygun hale getirmektedir. Ancak bu özellik siyah kauçuk gibi yüksek emiciliğe sahip numuneler için ve ayrıca birçok ölçüm türü için de faydalı kılmaktadır.

Numune uyumluluğu: Bazı numuneler yeterli ATR teması sağlamak için çok sert olup ATR presi ayrıca bazı numuneleri delmektedir.

3.2. X-Işını Kırınımın (XRD) Prensibi, Analizi ve Uygulamaları

X-ışını kırınımı (XRD), kristal malzemeleri değerlendirmek ve yapısal özelliklerini belirlemek için kullanılan güçlü tahribatsız analitik tekniktir. Bilimsel araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda en yaygın kullanılan karakterizasyon tekniklerinden biri olan XRD, malzemelerin atomik ve moleküler yapıları hakkında benzersiz bilgiler sağlamaktadır. Bu teknik; DNA yapısının belirlenmesinden elektronik, enerji depolama ve ilaç uygulamaları için gelişmiş malzemeler geliştirmeye kadar birçok disiplinde malzeme anlayışımızı kökten değiştirmektedir. XRD analizi; araştırmacıların bilinmeyen malzemeleri tanımlamasına, faz dönüşümlerini izlemesine, kristal kusurlarını analiz etmesine ve belirli uygulamalar için malzeme özelliklerini optimize etmesine olanak tanımaktadır.

3.2.1. X-ışını kırınımı nedir?

X-ışını kırınımı genel olarak, atomların etrafındaki elektronlarla etkileşimler sonucunda X-ışını demetlerinin yön değiştirmesini ifade etmektedir. Ancak terim, kristal malzemelerin atomik ve moleküler yapısını incelemek için bu olgudan yararlanan XRD spektroskopik tekniğiyle eş anlamlı hale gelmiştir. X-ışınları bir kristal kafesle etkileşime girdiğinde, malzeme tanımlama ve yapısal analiz için bir "parmak izi" görevi gören benzersiz bir kırınım deseni oluşturmaktadır. Bu olgu, kristal yapılardaki atomlar arasındaki mesafeye (yaklaşık 0,1-10 nm) benzer dalga boylarına sahip elektromanyetik radyasyon olan X-ışınlarının dalga yapısından kaynaklanmaktadır. Bu benzerlik X-ışınlarının atomların periyodik dizilimi ile yapıcı bir şekilde etkileşime girmesine ve incelenen malzeme hakkında ayrıntılı yapısal bilgi ortaya çıkaran ölçülebilir kırınım desenleri oluşturmasına olanak tanımaktadır.

XRD kristalin malzemeler hakkında hem nitel hem de nicel bilgi sağladığı için özellikle değerlidir. Bu teknik; bir numunede bulunan farklı fazları tanımlayabilmekte, bunların bağıl konsantrasyonlarını belirleyebilmekte, kafes parametrelerini ölçebilmekte, kristal kalitesini değerlendirebilmekte ve tercih edilen yönelim etkilerini değerlendirebilmektedir. Diğer birçok analitik tekniğin aksine XRD tahribatsızdır, yani numune analizden sonra bozulmadan kalabilmektedir.

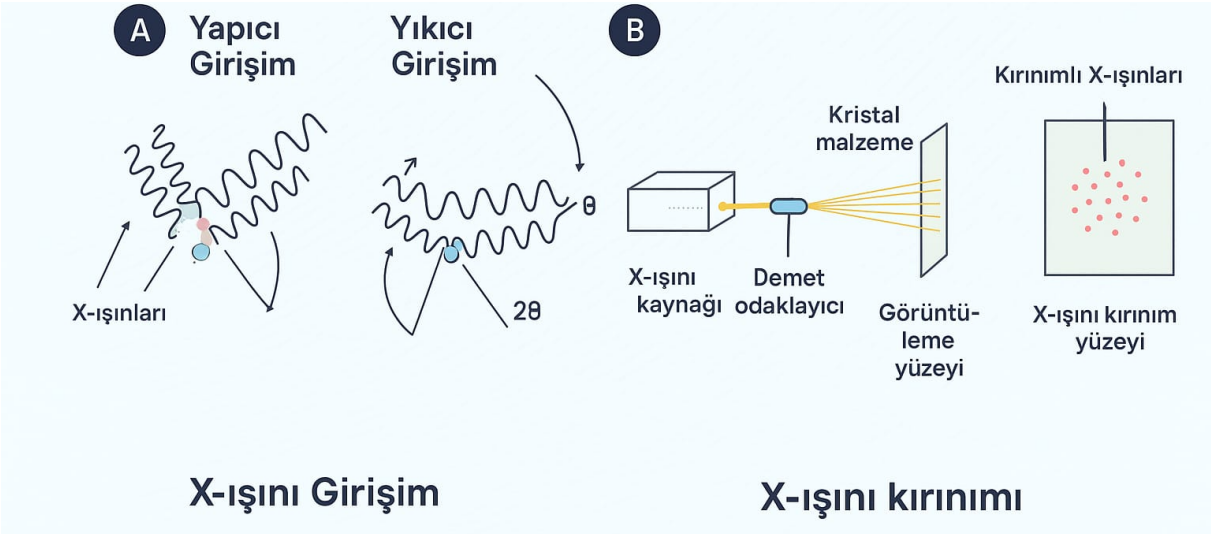
XRD analizi:
Yüksek hassasiyetle kristal yapı ve faz tanımlama,
Yapısal karakterizasyon için kafes parametreleri ve birim hücre boyutları,
Kalite değerlendirmesi için kristalit boyutu ve gerinim analizi,
Çok kristalli malzemelerde tercih edilen yönelim (doku),
Çok bileşenli sistemlerde kantitatif faz analizi,
Üretilen bileşenlerde kalıntı gerilim ölçümü,
Yarı iletken malzemelerde kristallik derecesi,
gibi önemli bilgiler sağlamaktadır.

XRD'nin çok yönlülüğü, üretimdeki rutin kalite kontrolünden malzeme geliştirmedeki en son araştırmalara kadar uzanmaktadır. İlaçlardan havacılık ve uzay sanayisine kadar uzanan endüstriler de, ürün kalitesini güvence altına almak, yeni malzemeler geliştirmek ve yapı-özellik ilişkilerini anlamak için XRD'ye ihtiyaç duyulmaktadır.

3.2.2. XRD ilkesi

İlke olarak bir kristal kafes içindeki atomlar tarafından X-ışınlarının elastik saçılmasına dayanmaktadır. Tek renkli X-ışınları kristal bir örneğe çarptığında, atomların etrafındaki elektronlarla etkileşime girerek X-ışınlarının her yöne saçılmasına neden olmaktadır. Ancak yapıcı girişim yalnızca saçılan dalgaların aynı fazda olduğu belirli açılarda meydana gelmekte ve karakteristik kırınım desenini oluşturmaktadır. Saçılma süreci, X-ışını fotonları ile atomlar etrafındaki elektron yoğunluğu dağılımı arasındaki etkileşimi içermektedir. X-ışınları bir atomla karşılaştığında, elektronların salınımına neden olmakta ve bu da gelen ışınla aynı frekansta ikincil X-ışınları üretmektedir. Bu ikincil X-ışınları her yöne yayılmaktadır ancak yalnızca belirli yönler tespit edilebilir kırınım tepeleri üreten yapıcı girişime neden olmaktadır (Şekil 3.5.).

X-ışını kaynağı: Çoğu malzeme için uygun karakteristik X-ışınları üretmek üzere bakır (Cu Kα, λ=1,54 Å) veya molibden (Mo Kα, λ=0,71 Å) hedefler kullanmaktadır. Bakır radyasyonu çoğu rutin analiz için idealken, ağır elementler içeren numuneler veya daha yüksek çözünürlük gerektiğinde molibden radyasyonu tercih edilmektedir.



Şekil 3.5. a) Yapıcı ve yıkıcı girişimin diyagramı b) XRD analiz deneyinin basitleştirilmiş düzeni

Kristal malzemesi: Keskin kırınım tepeleri üretmek için malzemenin uzun menzilli periyodik atomik dizilime sahip olması gerekmektedir. Amorf malzemeler keskin kırınım tepeleri yerine geniş ve dağınık saçılma desenleri üretmektedir.

Geometrik düzenleme: Kırınım açılarını doğru bir şekilde ölçmek için X-ışını demetinin numuneye düşme açısı, numune yönü ve dedektör konumu hassas bir şekilde kontrol edilmelidir. Modern difraktometreler de hassas açısal konumlandırma sağlamak için gelişmiş gonyometreler ve hizalama sistemleri kullanmaktadır.

Monokromatik radyasyon: Kristal monokromatörler, filtreler veya dalga boyu dağıtıcı optikler aracılığıyla doğru *d*-aralığı hesaplamalarını mümkün kılmak için X-ışını demetinin monokromatik (tek dalga boylu) olması gerekmektedir.

Kırınım süreci, paralel kristal düzlemlerden saçılan X-ışınları arasındaki yol farkının X-ışını dalga boyunun tam sayı katına eşit olması durumunda meydana gelmektedir. Bu durum saçılan dalgaların yapıcı bir şekilde girişim yapmasını ve tespit edilebilir kırınım tepeleri oluşturmasını sağlamaktadır.

3.2.3. Bragg yasası

Bragg yasası, XRD'yi yöneten temel denklemdir ve William Lawrence Bragg tarafından 1913 yılında formüle edilmiştir. Bu ilişki, paralel kristal düzlemler tarafından saçılan X-ışınlarının yapıcı girişimi için gerekli koşulları tanımlamaktadır. Matematiksel ifadesi:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \tag{3.1.}$$

şeklindedir. Burada: n = kırınım mertebesi (tam sayı: 1, 2, 3...), λ = X-ışını dalga boyu (Kα radyasyonu için tipik olarak 1,5418 Å), d = düzlemler arası aralık veya paralel kristal düzlemler arasındaki dik mesafe, θ = Bragg açısıdır (gelen X-ışını demeti ile kristal düzlemi arasındaki açıdır).

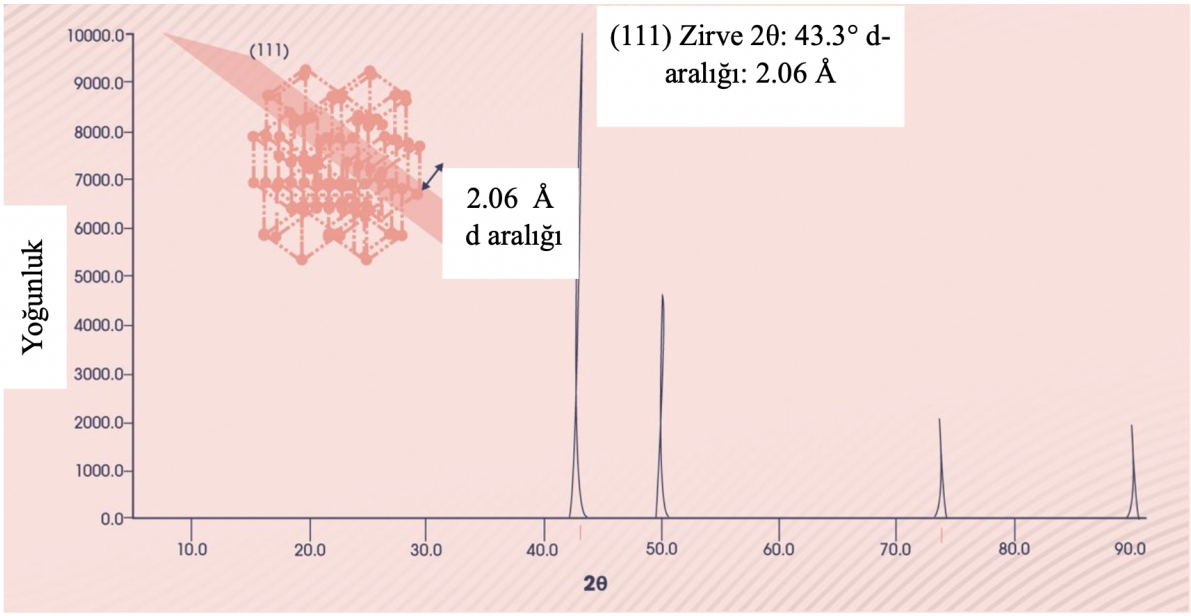
Bragg Yasası'nın Uygulamaları: d-aralığının belirlenmesi, kırınım açıları kullanılarak kristal düzlemleri arasındaki mesafelerin hesaplanmasını sağlamakta olup bu da kristal yapıların anlaşılması için olmazsa olmazdır. Birden fazla tepe noktasının ölçülmesi, hassas birim hücre boyutlarının (veya kafes parametrelerinin) belirlenmesini sağlarken, stres altındaki d-aralığı değişimlerinin izlenmesi, malzemelerdeki gerinim ve kalıntı gerilimi ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca termal veya kimyasal işlem sırasında d-aralığının nasıl değiştiğinin gözlemlenmesi, faz dönüşümleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bragg yasası DNA'nın çift sarmal yapısının belirlenmesinde de kritik öneme sahiptir.

3.2.4. XRD deseninin özellikleri

Bir XRD spektrumunda, kırınım yoğunluğunun kırınım açısına (2θ) göre değişimi verilirki burada θ, Bragg açısıdır. Her tepe noktası, Miller indeksleri (hkl) ile karakterize edilen belirli bir paralel kristal düzlem kümesine karşılık gelmektedir. Kırınım deseni, her kristal faz için benzersiz bir parmak izi görevi görerek tanımlama ve kantitatif analiz olanağı sağlamaktadır. XRD deseni (Şekil 3.6.'daki gibi), çeşitli tepe özellikleri aracılığıyla kapsamlı yapısal bilgiler sağlamaktadır. Sağladığı bilgilerden bir kaçı şu şekildedir:

Tepe konumu: Açısal konum Bragg yasası uyarınca d-aralığıyla (düzlemler arası aralık) doğrudan ilişkilidir. Tepe konumları ile kafes parametreleri, faz, bileşim, sıcaklık veya basınç değişimlerinden kaynaklanan yapısal değişiklikler tespit edilmektedir.

Tepe yoğunluğu: Yükseklik veya entegre alan, kristal yapı içindeki atom dizilimini ve farklı fazların göreceli bolluğunu göstermektedir. Yoğunluk oranları, tercih edilen yönelim etkileri hakkında bilgi sağlamakta olup nicel faz analizine olanak tanımaktadır.

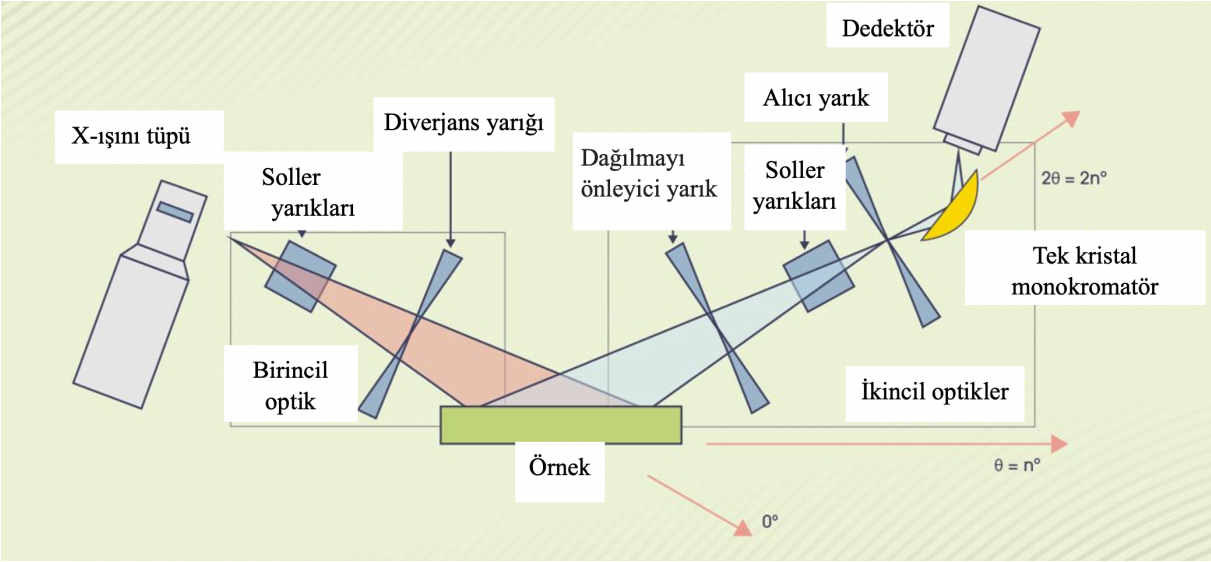


Şekil 3.6. Saf Cu için toz XRD deseninin örneği

Tepe genişliği: Kristalit boyutu ve mikrogerinim etkileri de dâhil olmak üzere kristal kalitesini ortaya koymaktadır. Dar tepeler, minimum gerinimli büyük ve iyi oluşmuş kristalleri gösterirken, geniş tepeler küçük kristalitleri veya yüksek düzeyde yapısal bozukluğu göstermektedir. Tepe şekli; ayrıntılı şekli, kristal kusurları, istifleme hataları ve diğer yapısal kusurlar hakkında bilgi sağlamaktadır. Asimetrik tepe şekilleri genellikle bileşimsel gradyanları veya yapısal bozulmaları göstermektedir. X-ışını difraktometresi bileşenleri Şekil 3.7.'de verilmiştir.

X-ışını kaynağı: Metal bir hedef elektron bombardımanı yoluyla tek renkli X-ışınları üretmektedir. En yaygın kaynak olarak karakteristik Kα radyasyonuna (λ = 1,5418 Å) sahip bakır kullanılmaktadır. X-ışını tüpü yeterli yoğunluk üretmek için yüksek voltajda (tipik olarak 30–60 kV) ve akımda (10–50 mA) çalıştırılmaktadır.

Gelişen ışın optiği: Işın diverjansını kontrol etmek için Soller yarıkları, dalga boyu seçimi için monokromatörler ve ışın konsantrasyonu için odaklama aynaları dâhil olmak üzere çeşitli optik elemanlar kullanılmaktadır. (Şekil 3.7.)

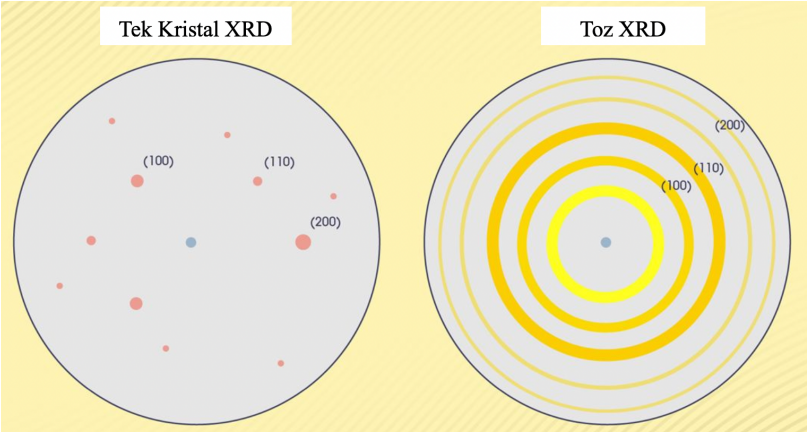


Şekil 3.7. Yaygın bir XRD enstrümantal düzeninin diyagramı

Numune tablası: Numuneyi tutma, ölçüm sırasında hassas konumlandırma ve döndürmeyi sağlamaktadır. Yani numune tablası doğru açısal konumlandırmaya ve çevresel kontrolleri yapmaktadır. Toz numuneler genellikle cam slaytlara veya kılcal borulara monte edilmektedir.
Dedektör sistemi: Modern difraktometrelerde, aynı anda çeşitli açılardan veri toplayan konum duyarlı dedektörler (PSD'ler) veya alan dedektörleri kullanılmakta ve bu sayede yüksek çözünürlük korunurken ölçüm süreside önemli ölçüde azaltılmaktadır.
Gonyometre: X-ışını kaynağı, numune ve dedektör arasındaki açısal ilişkileri kontrol eden hassas mekanik sistemdir. Modern gonyometreler 0,001°'den daha iyi açısal doğruluk sağlamaktadır. Cihaz X-ışınlarını numuneye yönlendirirken hem numuneyi hem de dedektörü θ-2θ geometrisine göre döndürerek çalıştırmakta ve dedektörün kırınım ışınlarını yapıcı girişim için doğru açıda yakalamasını sağlamaktadır.

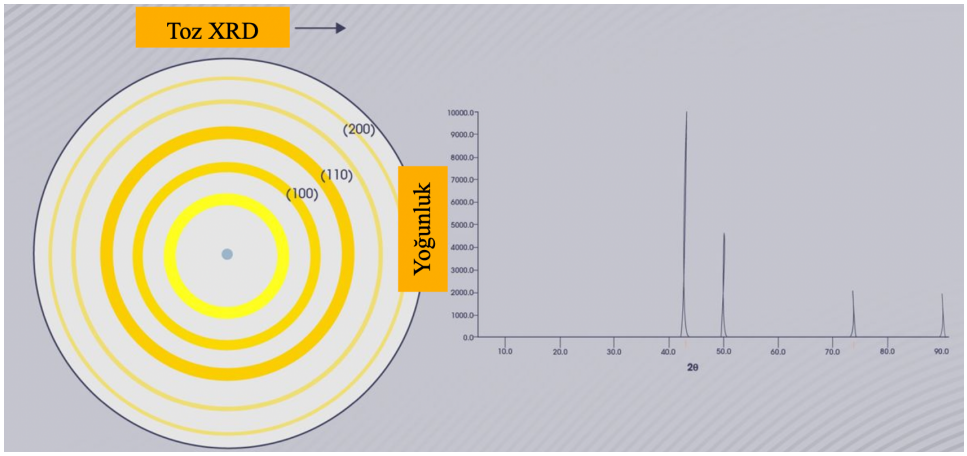
3.2.5. Tek kristal XRD

Tek bir kristal üzerinde XRD işlemi gerçekleştirilirken, dedektörde ölçülen desen genellikle çok belirgin izole tepelerden oluşan bir küme olarak sunulmaktadır (Şekil 3.8.). Her tepe noktasının dedektör düzlemindeki konumu ve bu tepe noktalarının birbirine göre yoğunluğu, tam atomik dizilimin hesaplanmasında kullanılmaktadır.



Şekil 3.8. Tek kristal XRD verileri ile toz XRD verileri

Toz tek bir kristal değil de yığın halindeki (toz halinde) mikro kristal koleksiyonu olduğunda, dedektör yine de kırınım tepelerini görür ancak bunlar her yönde dağılmış olup malzemenin kendisi de her yöne rastgele yönelmiştir (Şekil 3.8.). Bunun ürettiği simetrik halkalara Debye halkaları denmektedir. Dedektörün düzlemindeki tek kristal tepeleri; orijinal, kırınmamış X-ışını demetinin ekseninde mükemmel bir şekilde döndürülmüş ve kırınım uzayı boyunca "yayılmış" gibidir. Toz kırınımı durumunda, bu Debye halkaları yalnızca halkaların ne kadar yoğun ve birbirlerinden ne kadar uzakta oldukları hakkında yararlı bilgiler içermektedir. Bu nedenle dedektörün kendisi, ilgi alanındaki tepe yoğunluklarını toplamak için yalnızca tek bir yönde, Debye halkalarına dik olarak tarama yapmaktadır ki (Şekil 3.9.) bu da dakikalar almaktadır. Buna karşılık tek kristal deneyindeki dedektör, tamamlanması çok daha uzun süren ve çok daha gelişmiş ekipmanlar gerektiren tüm uzayı taramak zorundadır.



Şekil 3.9. Kırınım uzayında toz kırınımı verisi ve tipik toz kırınımı tepe noktaları

3.2.6. XRD analizi ve bir XRD grafiğinin yorumlanması

XRD analizi tepe tanımlama ile başlamakta ve tepe konumlarının, yoğunluklarının ve şekillerinin sistematik olarak incelenmesini gerektirmektedir. Her kristalin fazı, yapısal parmak izi işlevi gören benzersiz bir *d*-aralıkları ve bağıl yoğunluklar kümesi üretmektedir. Örneğin, Şekil 3.6. ve Şekil 3.9.'daki kırınım desenleri kullanılarak aşağıdaki analiz kümeleri tamamlanabilir.

Tepe tespiti: Modern yazılımlar, belirli bir yoğunluk eşiğinin üzerindeki tepeleri otomatik olarak tespit etmektedir. Gürültü veya enstrümantal eserlerden kaynaklanan hatalı tepeler, gerçek kırınım tepelerinden ayırt edilmektedir.
Tepe indeksleme: Her kırınım tepesi için Miller indekslerini (*hkl*) belirlemek, kristal sistemi ve uzay grubu hakkında bilgi gerektirmektedir ve her tepeyi belirli paralel kristal düzlemlerine atamalar yapmaktadır.
Veritabanı karşılaştırması: Gözlemlenen örüntülerin ICDD (Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi) gibi referans veritabanlarıyla eşleştirilmesini ve faz tanımlamasını sağlamaktadır. Veritabanı bilinen kristal fazlar için 900.000'den fazla referans örüntü içermektedir.
Nicel analiz: Pik yoğunluklarını kullanarak bağıl faz konsantrasyonlarını belirlemek, tercih edilen yönelim, emilim ve mikro yapısal etkiler dâhil olmak üzere yoğunluğu etkileyen faktörlerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini gerektirmektedir.

3.2.7.Gelişmiş analiz teknikleri

Bir X-ışını difraktogramı, mevcut tek tek fazların konsantrasyonunu nicel olarak belirlemenin ötesinde zengin bir veri yelpazesi sunmaktadır. Her faz sistematik olarak da ölçülebilen bir dizi geometrik yönelimi kapsamaktadır.

Rietveld iyileştirme: Bu gelişmiş yöntem, hesaplanan kırınım desenlerini deneysel verilere uyarlayarak doğru nicel faz analizi ve yapısal parametreler sağlamaktadır. Bu teknik kristal yapı parametrelerini, tercih edilen yönelimi ve enstrümantal faktörleri aynı anda iyileştirmektedir.
Desen ayrıştırma: Gelişmiş tepe uydurma algoritmaları, örtüşen tepeleri ayırmakta ve ayrıntılı yapısal analiz için doğru konum, yoğunluk ve genişlik bilgilerini çıkarmaktadır.
Doku analizi: Kutup figürü ölçümleri ve yönelim dağılım fonksiyonu (ODF) analizi, polikristalin malzemelerde tercih edilen yönelim etkilerini nicelleştirmektedir.

Yapısal parametre belirleme: Tek bir fazın genel yapısında küçük değişiklikler olabilmektedir. Çoğu indeksli faz atomların ölçülen düzenlerini temsil etmektedir ancak bu düzenlemeler bir dereceye kadar farklılık göstermektedir. Bu tür değişiklikler oluşum sürecindeki farklılıklardan veya oluşum sırasında farklı basınç veya sıcaklıklar gibi belirli koşullardan kaynaklanmaktadır.

Kafes parametreleri: Bragg yasası ve kristal sistem geometrisi kullanılarak tepe konumlarından hesaplanan birim hücre boyutlarıdır. Yüksek hassasiyetli ölçümler, kafes parametresi değişimlerini %0,001 kadar küçük miktarlarda tespit etmektedir.

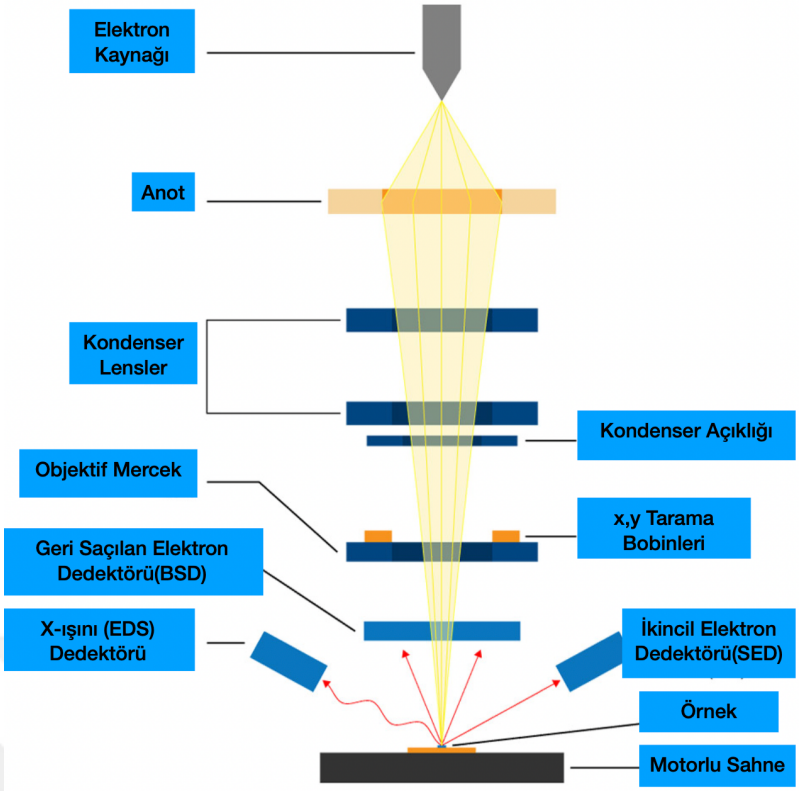
Kristalit boyutu: Scherrer denklemi kullanılarak tepe genişlemesi belirlenmekte ve tepe genişliği hacim ağırlıklı ortalama kristalit boyutuyla ilişkilendirilmektedir. Analiz, boyut ve gerinim genişleme etkilerinin dikkatlice ayrılmasını gerektirmektedir.

Mikrogerinim: Williamson-Hall analizi gibi yöntemler kullanılarak kırınım açısıyla tepe genişliği değişimleri üzerinden analiz edilmekte ve numune içindeki kafes parametresi değişimleri yansıtmaktadır.

Tercih edilen yönelim: Gözlemlenen ve hesaplanan tepe yoğunluklarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilmekte olup tercih edilen yönelim etkileri, nicel analizi önemli ölçüde etkilemektedir.

3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM); yüksek enerjili elektronlardan oluşan odaklanmış bir ışın demetinin kullanıldığı ve incelenen katı numunelerin yüzeyinde bir dizi sinyalin üretildiği analitik bir tekniktir. 10 ila 300.000'in üzerinde bir büyütme aralığıyla numuneleri birkaç nanometrelik bir çözünürlüğe kadar analiz edebilmemize olanak veren; yalnızca yüzey topografisini değil, aynı zamanda bir malzeme içindeki kimyasal bileşimi, kristal yönelimini ve gerilim dağılımını da ortaya çıkarabilen spektrometrik bir tekniktir. Işık mikroskoplarının görüntüleme için ışığı kullanırken, elektron mikroskopları da elektronları kullanmaktadır. SEM'ler çok ince bir numuneden geçen elektronları tespit eden TEM'lerin aksine, bir numunenin yakın yüzey bölgesinden yansıyan veya düşen elektronları kullanarak bir görüntü oluşturmaktadır. Elektronlar ışıktan önemli ölçüde daha küçük bir dalga boyuna sahip olup ışık mikroskoplarından daha iyi çözünürlük oluşturmaktadırlar.



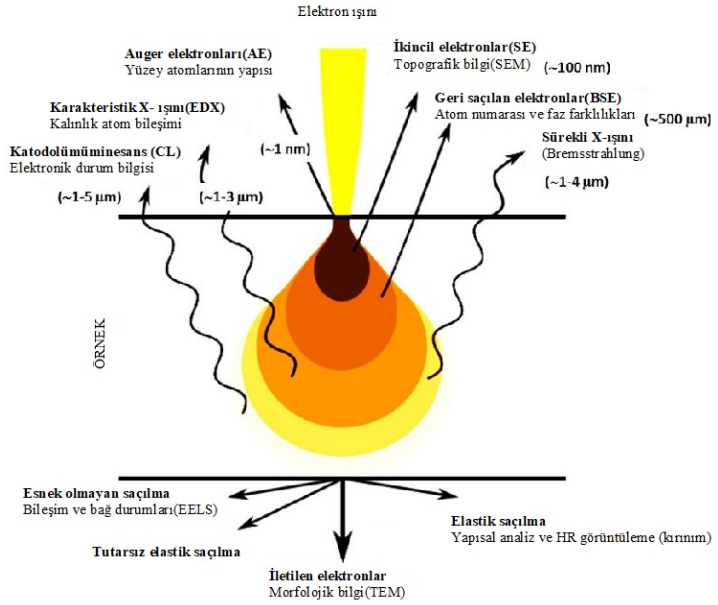
Şekil 3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, 5 nm'lik çok küçük bir nokta boyutuna sahip bir ışın halinde odaklanan elektronları yayan bir elektron tabancasından oluşmaktadır (Şekil 3.10.). Elektronlar birkaç yüz eV ile 50 keV aralığındaki enerji değerlerine hızlandırılmakta ve ardından saptırma bobinleri tarafından numunenin yüzeyi taranmaktadır. Elektronlar yüzeye çarpıp nüfuz ettikçe, numuneden elektron ve foton emisyonuyla sonuçlanan çok sayıda etkileşim meydana gelmekte ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, serbest kalan elektronların bir katot ışın tüpü (CRT) üzerinde toplanmaktadır. Taramalı elektron mikroskobunda üretilen başlıca görüntüler üç türdür: ikincil elektron görüntüleri, geri saçılmış elektron görüntüleri ve elementel X-ışını haritaları.

3.3.1. Taramalı elektron mikroskobunun çalışma prensibi

Elektronlar bir taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile hızlandırıldığında, yanlarında önemli miktarda kinetik enerji taşımaktadır. Bu enerji katı numunedeki olay elektronları yavaşlatıldığında elektron-numune etkileşimleri tarafından oluşturulan çeşitli sinyaller olarak kaybolmaktadır. Bu sinyaller: SEM görüntülerinin üretiminden sorumlu olan ikincil

elektronlar, geri saçılmış elektronlar (BSE), kırınımlı geri saçılmış elektronlar (EBSD), fotonlar (element analizi ve sürekli X-ışınları için kullanılan karakteristik X-ışınları), görünür ışık ve ısıdan oluşmaktadır. Numuneler genellikle ikincil elektronlar veya geri saçılmış elektronlar kullanılarak görüntülenmekte olup ilki numune morfolojisi ve topografisini görüntülemek için daha kullanışlıyken, ikincisi çok fazlı numunelerdeki kompozisyonel kontrastları görüntülemek (yani hızlı faz ayrımı için) için daha kullanışlıdır.



Şekil 3.11. Elektron – madde etkileşimi sonucu: üretilen farklı sinyal türleri

Olay elektronları ile farklı atom orbitallerindeki (kabuklardaki) elektronlar arasındaki esnek olmayan çarpışmalar X-ışınları üretmektedirler. Belirli bir elementin çeşitli kabuklarındaki elektronların enerji seviyeleri arasındaki farka karşılık gelen tutarlı bir dalga boyuna sahip X-ışınları, uyarılmış elektronlar daha düşük enerji seviyelerine bozundukça üretilmektedirler. Bir mineraldeki elementler bir elektron demetiyle "uyarılabilmaktadır" ve bu da belirgin X-ışınları emisyonuna neden olmaktadır. Aynı malzemelerin tekrar tekrar analiz edilmesi taramalı elektron mikroskobunun "tahribatsız" yapısı sayesinde mümkündür.

3.3.2. Numune nasıl hazırlanır?

SEM'de görüntü oluşturmanın vakum koşullarına ve elektronlara bağımlı olması nedeniyle, bazı numune hazırlama adımları gereklidir. Örneğin; vakum koşulları numunelerin tamamen

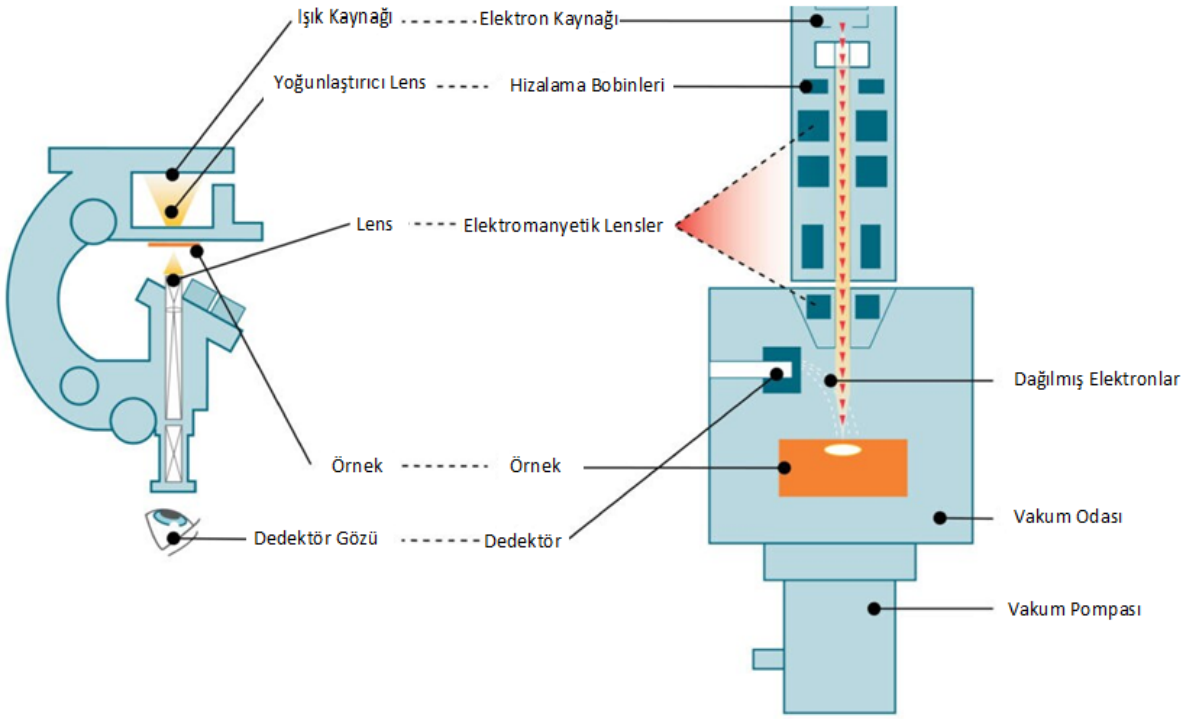
kurutulmasını gerektirirken, yüksek iletkenlikleri nedeniyle tüm metaller doğrudan doğal hallerinde kullanılabilmektedir. Elektriği iletmek için her ametal numuneye ince bir iletken malzeme tabakası uygulanmalıdır ki, bu amaçla kullanılan araca "püskürtme kaplayıcı" denmektedir. Elektrik alan ve argon gazı, püskürtme kaplayıcının kaplama işlemini kontrol ederken, numune vakum altına alınmış minyatür bir odada tutulmaktadır.

Görüntüleme kuru ve yüksek vakumlu ($<10^{-4}$ Pa) bir ortamda gerçekleştiğinden, su içeren numunelerin görüntülenmesi zordur ve iletken bir numune gereklidir (aksi takdirde, arka plandaki bazı şarj sorunlarının bulanık bir görüntüsü ve numunede elektronların toplandığı bazı parlak alanlar oluşacaktır). İletken olmayan numunenin fotoğrafını çekebilmek için, üzerine altın ve demir gibi ince bir metal tabakası püskürtülmektedir.

3.3.3. Taramalı elektron mikroskobu nasıl çalışır?

SEM'de elektron tabancasından elektron demeti salınmakta olup, bir veya iki kondansatör mercek tarafından yaklaşık 0,4-5 nm çapında odaklanma sağlanmaktadır. Elektron sütununun saptırma bobinleri tarafından x ve y eksenleri boyunca büküldükten sonra, demet numuneyle temas etmektedir. Bu açı kayması, dikdörtgen bir numune görüntü alma deseni olan raster taramasını garanti etmektedir. Elektron demeti malzemeyle temas ettiğinde saçılma ve emilim nedeniyle enerji kaybı yaşanmaktadır.

İkincil elektronlar, geri saçılan elektronlar ve ayırt edici X-ışınları gibi sinyaller, bir taramalı elektron mikroskobunun elektron demeti, numune içindeki çeşitli derinliklerdeki atomlarla etkileşime girdiğinde üretilmektedir. Taramalı elektron mikroskobunda, bu sinyallerin her birini almak için ayrı bir dedektör kullanılmaktadır (Şekil 3.12.). Işın elektronlarının esnek olmayan saçılması, düşük enerjili ikincil elektronların numunenin atomlarının değerlik veya iletkenlik bantlarından dışarı atılmasına neden olmaktadır. Numunedeki atomlarla elastik saçılma etkileşimleri yoluyla ışından yansıyan elektronlara geri saçılan elektronlar denmektedir. Bir numunedeki çeşitli elementlerin bolluğu, atom numarasıyla orantılı olan geri saçılan elektron sinyalinin gücü ölçülerek belirlenebilmektedir.



Şekil 3.12. Işık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobunun karşılaştırılması

İç kabuktaki bir elektron elektron demeti tarafından uyarıldığında, daha yüksek enerjili bir elektron oluşan bu boşluğu doldurmakta ve enerji açığa çıkararak karakteristik X-ışınlarının salınmasına neden olmaktadır. Enerji ayırımlı X-ışını spektroskopisi, numunedeki elementlerin miktarını ve dağılımını belirlemek için bu X-ışınlarının enerjisini veya dalga boyunu ölçmektedir. Numunenin dağılımı numune tarafından emilen elektron demetinin algılanmasıyla gösterilmektedir. Elde edilen görüntü numunenin taranan bölgesini temsil eden bir sinyal yoğunluğu haritasıdır. SEM, EDS dedektörlerinin eklenmesiyle element analizi de gerçekleştirmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri yakalamak için numunenin yüzeyi elektriksel olarak iletken olmalı ve statik elektrik birikimini önlemek için topraklanmalıdır. Numuneleri numune tutucuya yapıştırmak için iletken bir yapıştırıcı kullanılmaktadır. Metallerle çalışırken numune hazırlama için numuneyi tablaya yalnızca iletken bir şekilde monte etmek yeterlidir. Altın, platin, krom veya grafit gibi elektriksel olarak iletken bileşikler genellikle iletken olmayan malzemelerin yüzeylerine son derece ince katmanlar halinde uygulanmaktadır. Kaplama maddelerin vakumda püskürtülmesi veya buharlaştırılmasıyla yapılmaktadır. Ayrıca tipik bir

taramalı elektron mikroskobunun nasıl çalıştığına dair ayrıntılı bir açıklaması şu şekilde yapılabilir:

Elektron tabancası tek renkli elektron akışı üretmektedir. İlk olarak kondansatör mercek elektron ışınını yoğunlaştırmaktadır. Işın oluşturulmakta ve ışındaki akım miktarı kondansatör mercek tarafından sınırlandırılmaktadır. Kondansatör açıklığı ve mercek yüksek açılı elektronları filtrelemek için birlikte çalışmaktadır. Işın, kondansatörün açıklığı tarafından daraltılmakta ve bu da belirli yüksek açılı elektronların filtrelenmesine neden olmaktadır. Tipik olarak ince prob akım düğmesi, elektronları ikinci kondansatör mercek aracılığıyla dar, sıkı bir şekilde odaklanmış, tutarlı bir ışına odaklamak için kullanılmaktadır. Belirli yüksek açılı elektronlar da bir objektif açıklığı tarafından ışından uzaklaştırılmaktadır. Işın, bir bobin ızgarası tarafından taranmakta ve tarama hızı (genellikle mikrosaniye aralığındadır) ışının her yerde ne kadar kalacağını belirlemektedir. Işın son mercek olan objektif mercek tarafından numunenin istenen alanına odaklanmaktadır. Işın numuneye çarptığında onunla etkileşime girdiğinde üretilen radyasyonları tespit etmek için çeşitli cihazlar kullanılmaktadır. Bu cihazlar ışın bir sonraki bekleme noktasına ilerlemeden önce etkileşimleri saymakta ve parlaklığı etkileşim sayısına bağlı olan bir CRT üzerinde bir piksel göstermektedir (etkileşimler ne kadar fazlaysa, piksel o kadar parlaktır). Tarama hızı bir saniyede tüm desenin 30 taramasına olanak tanımaktadır.

3.3.4. Taramalı elektron mikroskobunun parçaları

Elektron kaynağı: 1-40 kV voltaj aralığında, termal ısı kullanılarak elektronlar üretilmekte olup elektronlar, görüntü oluşturmak ve istatistiksel analiz yapmak için kullanılabilen bir ışın üzerinde odaklanmaktadır. Tungsten filamentler, lantan hekzaborür ve alan emisyon tabancaları (FEG'ler) üç ana elektron kaynağıdır.

Mercekler: Kaynaktan gelen elektron ışını, kolondan geçmeden önce birden fazla kondansatör mercek tarafından odaklanmakta olup bir elektron noktası oluşturmaktadır.

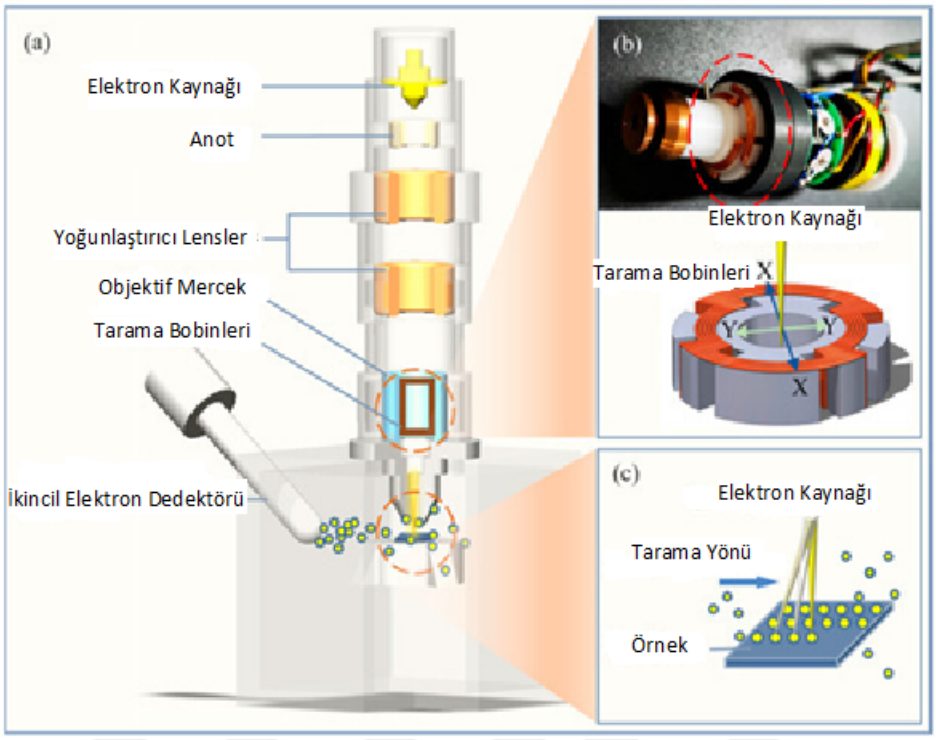
Tarama bobini: Işınlayıcı ışını nesnenin yüzeyine yönlendirmek için kullanılmaktadır.

Dedektör: İkincil elektronlar, geri saçılan elektronlar ve kırınıma uğrayıp geri saçılan elektronların ayrı ayrı tanımlanıp analiz edilebilmesi için birden fazla dedektör kullanılmakta olup dedektör performansı, voltaj hızına ve numune yoğunluğuna son derece duyarlılık göstermektedir.

Görüntüleme cihazı

Güç kaynağı

Vakum sistemi



Şekil 3.13. SEM'in ana bileşenleri ve görüntüleme prensipleri

3.3.5. Elektron-madde etkileşimi

Yüksek miktarda enerjiye sahip birincil elektron bir atomla temas ettiğinde, elektron ya atom elektronlarıyla elastik olmayan saçılma ya da atom çekirdeğiyle elastik saçılma yaşamaktadır. Bir elektron elastik olmayan bir şekilde başka bir elektronla çarpıştığında, ilk elektron sahip olduğu enerjinin bir kısmını diğer elektrona vermektedir. İletilen enerji miktarı yeterli olduğunda, diğer elektron kendini numuneden serbest bırakmaktadır. "İkincil elektron" (SE) terimi, gelen elektronun başlangıçta çarptığı atomun orbitallerinden birinden yayılan bir elektronu ifade etmektedir (eğer yayılan elektronun enerjisi 50 eV'den azsa). SE resimleri ikincil elektronların düşük enerjisi nedeniyle topografik farklılıklara karşı son derece hassastır.

Geri saçılmış elektronlar, elastik olarak saçılmış ve esasen gelen veya ana elektronlarla neredeyse aynı enerjiye sahip olan yüksek enerjili elektronlardır. Geri saçılmış elektronlar, yüksek enerjili gelen elektronlar saçıldığında oluşmaktadır. Numune malzemesinin atom

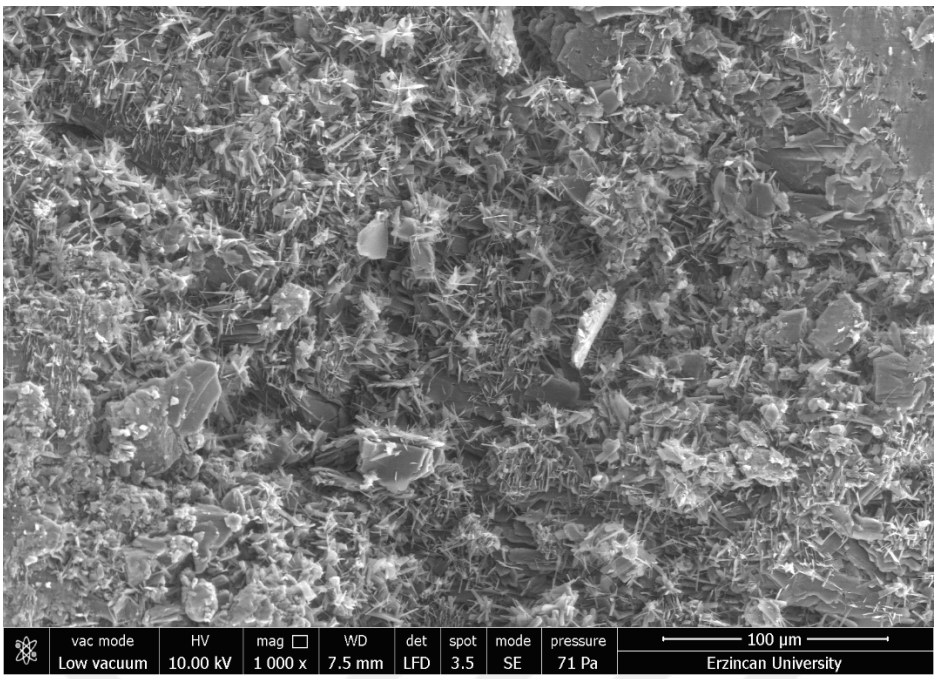
numarası ne kadar yüksekse, numunenin geri saçılma olasılığı o kadar yüksektir. Geri saçılmış görüntüler element tanımlaması için kullanılamasa da, atom numarası bakımından büyük ölçüde farklılık gösteren numune bölgeleri arasında değerli bilgiler içeren kontrastlar üretmektedir. Bu kontrastlar numunenin geniş bir değer aralığına sahip bölümleri arasında ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla BSE görüntüsü topografik kontrasta ek olarak, atom numarası kontrastı da sağlamaktadır. Taramalı elektron mikroskobundaki bir diğer elektron etkileşimi, birincil elektronun numunedeki bir atomla çarpışarak çekirdek elektronunu dışarı atmasıdır. Uyarılmış atom kimyasal karakterizasyon için kullanılan ayırt edici bir X-ışını fotonu veya bir Auger elektronu üreterek temel durumuna bozunmaktadır.

Salınan karakteristik X-ışını veya Auger elektronlarının enerjisi, gelen atomun kimyasına özgüdür ve dolayısıyla bunların incelenmesi, incelenen numunenin kimyası hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Elektron demetini belirli noktalara yoğunlaştırarak, kimyasal değişimler hakkında bilgiler elde etmek mümkündür. Ancak, karakteristik X-ışını hakkındaki bu tür bilgilerin (ve dolayısıyla kimya hakkındaki bilgilerin) yaklaşık bir mikron derinlikten üretildiği ve bu nedenle ışın boyutu yanal ölçekte daha dar olsa da, bilginin bu derinlik üzerinden ortalamasının alındığı unutulmamalıdır. Kimyasal analiz yetenekleriyle birleştirilen taramalı elektron mikroskobu, yalnızca toplu ve nanoyapılı malzeme ve cihazların morfolojisi ve mikro yapılarının bir görüntüsünü sunmakla kalmamakta, aynı zamanda kimyasal bileşim ve dağılım hakkında da kapsamlı bilgiler sağlamaktadır.

Görüntülemede kullanılan elektron demetinin dalga boyları ve sistem etrafındaki sayısal açıklık, bir cihazın ayırma gücünün teorik sınırını belirlemektedir. Bir cihazın ayırma gücü R, şu şekilde tanımlanır:

$$R = \lambda/2NA \tag{3.2}$$

Burada; NA, kondansatörün veya objektifin elektron sağlama yeteneğinin ölçüsü olup λ, kullanılan elektronların dalga boyudur. Sayısal açıklık her objektif ve kondansatör merceğinin üzerine yazılıdır.



Şekil 3. 14. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenen safra taşlarına bir örnek

3.3.6. Geri saçılmış ve ikincil elektronlar

Bir madde içindeki elektronların etkileşimi sonucu; birçok farklı türden elektron, foton veya ışın üretilmektedir. Geri Saçılmış (BSE) ve ikincil (SE) elektronlar, taramalı elektron mikroskobunda görüntüleme için kullanılan iki elektron biçimidir. Işın ve numune arasındaki elastik etkileşimlerden sonra, ana elektron ışınının bir parçası olan BSE'ler yansıtılmaktadır. Tersine ikincil elektronlar numunenin atomlarından kaynaklanmakta ve numune ile elektron ışını arasındaki elastik olmayan etkileşimlerin sonucu olarak oluşmaktadır. BSE'ler ve SE'ler, numunenin çeşitli kısımlarından kaynaklandıkları için çeşitli bilgiler sağlamaktadır. BSE görüntülerinde atom numarası ve parlaklık arasında açık bir korelasyon vardır; atom numarası ne kadar yüksekse, malzeme o kadar parlak görünmektedir. SE görüntüleme ile daha fazla yüzey ayrıntısı elde edilmektedir. Elektron-madde etkileşimleri neticesinde tespit edilen X ışınları, element analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Herhangi bir malzemenin yaydığı X-ışınlarının enerjisi, o malzemenin parmak izi olarak düşünülmekte ve bir numunenin elementel yapısını, o numuneden yayılan X-ışınlarının enerjisini ölçerek belirlemek mümkün olmaktadır.

"Elektronlar nasıl tespit edilmektedir?" sorusuna cevap arayalım. Geri saçılan elektronları ve ikincil elektronları tespit etmek için ayrı ayrı dedektörler kullanılmaktadır. Geri saçılan elektronlar, elektron ışınına eş merkezli olarak katı hal dedektörlerini numunenin üzerine yerleştirerek tespit edilmektedir. Çeşitli elementler değişen sayıda elektron yansıttığından, bir görüntü oluşturmak için geri saçılan elektronlar da kullanılmaktadır. Sonuç olarak bir numunedeki farklı bileşenler geri saçılan elektronlara farklı miktarlarda enerji katacağından, bir numunedeki çeşitli bileşenlerin dağılımı, geri saçılan elektronların yoğunluğu ve ışın konumu kullanılarak taramalı elektron mikroskobu ile görüntü oluşturmaktadır. Geri saçılan elektronlar, daha ağır olan ve daha fazla elektron yansıtan elementlerin görüntüde daha parlak görünmesini sağlayarak kimyasal bileşimdeki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. SEM malzemeleri tanımlamak için yararlı olsa da, element bolluğunu ölçmek için element dağılım spektrumu (EDS) gerekmektedir.

Şimdi de "Bu durumda veriler nasıl yorumlanmaktadır?" sorusuna cevap arayalım. Kullanılan dedektöre bağlı olarak, malzemenizi nanometre ölçeğinde incelemenize olanak tanıyan çeşitli SEM görüntüleri oluşturulmaktadır. En yaygın olarak numuneden elastik olmayan saçılma yoluyla yayılan ikincil elektronlar dedektör tarafından tespit edilmektedir. Numunenin topografyasının gri tonlamalı görüntüleri; ışının konumu ile tespit edilen ikincil elektron sayısının birleştirilmesiyle oluşturulmakta ve bu sinyal gücünü göstermektedir. Çeşitli elementler farklı sayıda elektron yansıttığından, görüntü oluşturmak için geri saçılan elektronlar da kullanılmaktadır. Sonuç olarak bir numunedeki farklı bileşenler, geri saçılan elektronlara farklı miktarlarda enerji katacaktır. Bir numunedeki çeşitli bileşenlerin dağılımı, geri saçılan elektronların yoğunluğu ve ışın konumu kullanılarak oluşturulan SEM görüntüsünden belirlenmektedir. Geri saçılan elektronlar; daha ağır olan ve daha fazla elektron yansıtan elementlerin görüntüde daha parlak görünmesini sağlayarak, kimyasal bileşimdeki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. SEM malzemelerin tanımlanmasında kullanışlı olsa da, element bolluğunun ölçülmesi için element dağılım spektrumu (EDS) verilerine de ihtiyaç duyulmaktadır.

3.3.7. Taramalı elektron mikroskobundan elde edilebilen bilgiler

Topografya: Bir nesnenin yüzey özelliklerini veya "nasıl göründüğünü" yalnızca birkaç nanometre içinde tanımlamaktadır.

Morfoloji: Nesnenin bileşen parçalarının şeklini, boyutunu ve düzenlenmesini ayrıca numunenin yüzeyinde mevcut olan veya kimyasal aşındırma ya da taşlama ile görünür hale getirilen özelliklerini birkaç nanometre içinde tanımlamaktadır.
Bileşim: Numuneyi oluşturan elementler ve bileşikleri ayrıca kristalografik bilgiyi (numunenin atomlarının düzenlenmesi ve düzen derecesi), mikrometreden büyük tek kristal parçacıkları için tanımlamaktadır.

3.3.8. Taramalı elektron mikroskobunun avantajları ve dezavantajları

Çok yönlülüğü nedeniyle katı malzemelerin incelenmesi söz konusu olduğunda taramalı elektron mikroskobu ile karşılaştırılabilecek başka bir araç yoktur. Katıların karakterize edilmesi gerektiğinde taramalı elektron mikroskobu vazgeçilmezdir. Çoğu taramalı elektron mikroskobu kullanımı "sezgisel" olan nispeten basit arayüzlere sahiptir. Birçok kullanım için genellikle minimum numune hazırlama yeterlidir. Veriler çeşitli kullanımlar için hızlı bir şekilde elde edilmektedir. Modern SEM'lerden gelen veriler kolayca aktarılmaktadır. Bunların yanı sıra bazı önemli avantajları şunlardır:

Çözünürlük: 15 nm çözünürlüğe sahip dijital görüntüler elde edilmekte ve bu da; çatlaklar, korozyon, taneler ve tane sınırları gibi mikro yapıların özelliklerini tanımlamak için yararlı bilgiler sağlamaktadır.
Büyütme için izlenebilir standart: Görüntüler, bilinen bir referansa göre alındığı için; kaplama kalınlığı, tane boyutu ve parçacık boyutu gibi unsurlar açısından kolayca analiz edilmektedir.
Kimyasal analiz: X-ışını çizgi taramaları ve haritalamaya ek olarak, enerji ayırımlı spektroskopi (EDS) ile taramalı elektron mikroskobu (SEM) birlikte kullanıldığında, nitel element analizi yapabilmektedir.

Yukarıda verilen bu bilgiler; ürün kusurlarının analizi, yabancı bileşenlerin elementel yapısının belirlenmesi, kaplama kalınlığının ölçülmesi ve tane-parçacık boyutunun ölçülmesi gibi birçok analiz için kullanılmaktadır.

SEM'de analiz yapabilmek için katı numuneler gereklidir ve bunlar mikroskop haznesine yerleştirilmelidir. Yatay boyutlar için tipik üst sınır yaklaşık 10 cm iken, dikey boyutlar için tipik üst sınır yaklaşık 40 mm'dir. Çoğu ekipmanın vakum gereksinimleri, numunelerin 10^{-5} ila

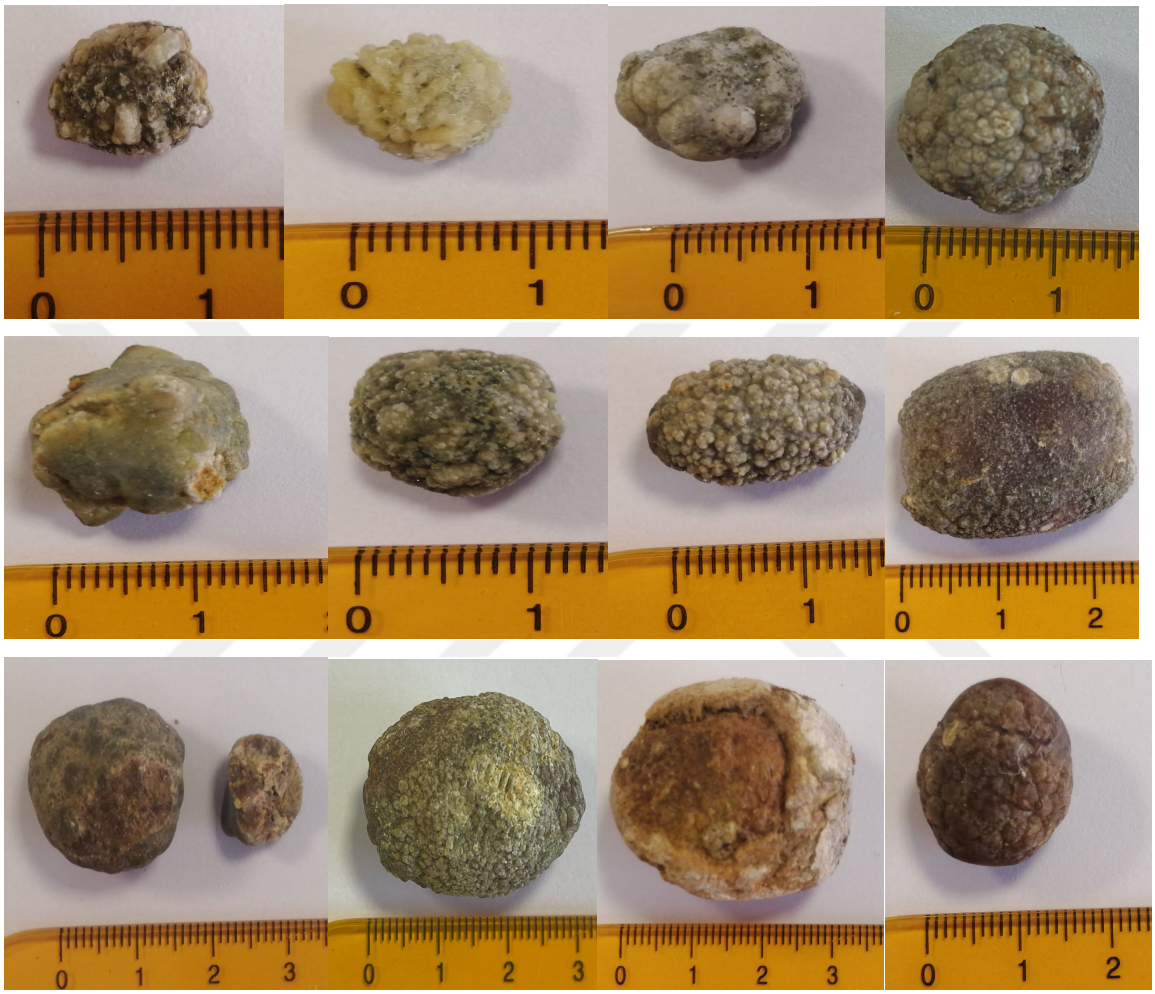
10^{-6} torr aralığında kararlı olmasını gerektirir. Geleneksel SEM; hidrokarbonlarla doymuş kayalar, kömür gibi "ıslak" numuneler, organik bileşikler veya şişmiş killer ve düşük basınçta parçalanma olasılığı olan maddeler dâhil olmak üzere düşük basınçlarda buharlaşma olasılığı olan numunelerin incelenmesi için uygun değildir. Ancak "düşük vakum" ve "çevresel" SEM'ler (ESEM) de vardır ki bu cihazlarla numunelerin çoğu sorunsuz bir şekilde incelenebilmektedir. Birçok ekipman 11'den düşük atom numaralı elementleri (Na) tespit edememektedir ki SEM'deki EDS dedektörleri de çok hafif elementleri (H, He ve Li) tespit edememektedir. Çoğu SEM'de kullanılan katı hal X-ışını dedektörleri (EDS) hızlı ve kullanımı kolay olsa da, kullanılan dalga boyu ayırımlı X-ışını dedektörlerinin (WDS) enerji çözünürlüğü ve düşük bolluktaki elementlere karşı duyarlılığı yetersizdir. Elektriksel olarak yalıtkan numuneler, mikroskop düşük vakum moduna sahip olmadığı sürece, iletken bir malzemeyle kaplanmadan tipik SEM'lerde incelenememektedir.

3.4. Numune Hazırlama

Bu tez çalışması için; Şubat 2025 ile Nisan 2025 tarihleri arasında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda, safra kesesi malignitesi kanıtı olmaksızın semptomatik safra kesesi hastalığı nedeniyle kolesistektomi geçiren 52 hastadan safra taşı örnekleri toplanmıştır. Tüm hastalar yazılı ve bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma için etik kurul onayı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Hastaların tümünden ameliyattan önce normal karaciğer fonksiyon testleri ve normal tam kan sayımları istenmiştir.

Numune hazırlama adımları safra taşı analizinde kritik bir rol oynamakta olup bu nedenle örnek hazırlamada gösterilecek hassasiyetle olası hatalardan kaçınılmıştır. Çıkarılan safra taşı örnekleri ameliyattan hemen sonra steril kaplara konulmuş ve taşlar deiyonize su ile temizlendikten sonra steril gazlı bez üzerinde hava ile kurutulmuştur. Kurutulan örnekler daha sonra kuru şişelere aktarılmıştır. Numuneler daha sonra yüzeydeki kan pıhtılarını gidermek için izopropil alkol (%70) kullanılarak temizlenmiş ve deiyonize suyla birkaç kez yıkanmıştır. Toplanan tüm safra taşları, nemini gidermek için 50 ºC'de fırında bir saat kurutulmuş ve taş örneklerinin fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflandıktan sonra, taşlar saklama şişelerine geri konulmuş ve bir hastadan çıkarılan birden fazla safra taşı tek bir örnek olarak kabul edilmiştir. Büyük taşlar (>10 mm), numune merkezine (çekirdeğine) ulaşmak için steril bir testere

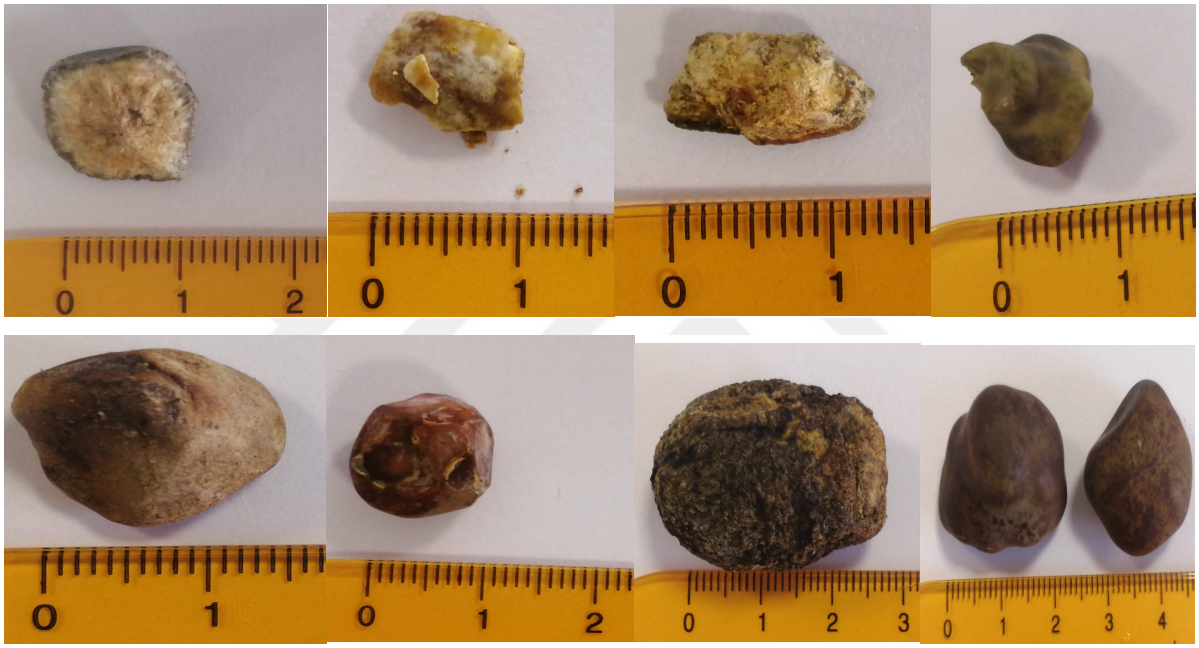
kullanılarak kesilmiş olup merkez ve yüzey örnekleri ayrı ayrı fotoğraflanmıştır. Safra taşlarının renk, boyut, şekil ve taş sayısı gibi dış ve kesitsel morfolojik özellikleri çıplak gözle incelenmiş ve yüksek hassasiyet ve çözünürlükte fotoğrafları çekilmiştir. Merkez, orta tabaka ve kabuk olarak belirgin katmanlaşma gösteren seçilmiş safra taşları ayrılmıştır. Çekilen tüm fotoğraflar Şekil 3.15 ile 3.19. arasında verilmiştir.



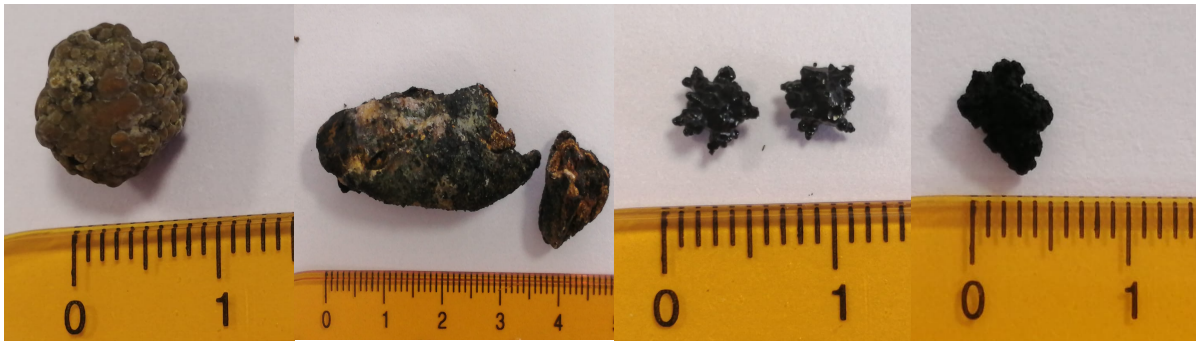
Şekil 3.15. Kolesterol taşlarının çekilen fotoğrafları



Şekil 3.16. Kalsiyum-karbonat taşlarının çekilen fotoğrafları



Şekil 3.17. Karışık taşlarının çekilen fotoğrafları



Şekil 3.18. Fosfat taşlarının çekilen fotoğrafları



Şekil 3.19. Bilurabin taşlarının çekilen fotoğrafları

3.5. Etik Beyanı

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda safra taşı numuneleri toplanırken, tüm hastalara numune toplama işlemleri ve sonrasında yürütülecek adımlar anlatılmıştır. Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Girişimsel olmayan Klinik olmayan Etik Kurulu'ndan (ERC) izinler alınarak çalışma süresince 1975 Helsinki Bildirgesi'nde (2013 yılında yapılan düzenlemelerle) belirtilen ilkelere uyulmuştur. Gizliliği korumak için hasta kimlikleri silinmiş ve her safra taşına yeni bir kod verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikroyapısal Özellikler

Safra taşı veya biliyer litiazis; dünyada önemli sosyoekonomik maliyeti olan en yaygın gastrointestinal hastalık olmakla birlikte safra taşlarıyla bağlantılı sorunlar, giderek değişen insan beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı düzeni ve ayrıca kolesistektomi cerrahi müdahalesinden sonra tekrarlamaları nedeniyle sürekli artmaktadır. Safra taşlarının oral tıbbi tedavisi (ursodeoksikolik asit gibi safra tuzları içeren ilaçlar) standart farmakopedeki ilerlemeyle karşılaştırıldığında oldukça sınırlı olup taşların %90'ından fazlası kolesterol tipinde (kolesterol ≥ %70), diğerleri ise; kalsiyum bilurabinat, $CaPO_4$ ve $CaCO_3$ içeren ve kolesterol oranları %70'ten az olan karışık ve bilurabin safra taşlarıdır. Kolesterol safra taşları; safra kolesterolünün hepatik hipersekresyonu, kolesterolün hızlandırılmış nükleasyonu ve kristalleşmesiyle safra kesesinin hipomotilitesi gibi çeşitli faktörlerin bir sonucu olarak aşırı doymuş safrada kolesterolün çökelmesiyle gelişmektedir. Safra taşı patogenezinin iyi anlaşılması, hastalığa karşı etkili bir koruma sağlamaktadır ve safra taşlarının yapısal ve moleküler analizi; oluşumunun kökeni, etiyolojisi ve metabolik temeli hakkında önemli kanıtlar elde edilmesine, belirli bireyleri safra taşı oluşumuna yatkın hale getiren risk faktörlerinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

Gelişme yerlerine göre; safra kesesi taşları (çoğu kolesterol tipi ve siyah taşlar) veya safra kanalında safra taşları (çoğu safra kesesinden salgılanan ve esas olarak kalsiyum bilurabinattan oluşan safra tarafından süpürülür) olmak üzere safra taşları ikiye ayrılmaktadır. Safra taşlarının oluşumu, çekirdeklenmeden itibaren çeşitli süreçleri içermektedir. Safra taşlarının in vivo oluşumu yıllar almakta ve çekirdeklenmeden safra kesesinde çözünmeyen maddenin konsolidasyonuna kadar patogenezini izlemek ise oldukça zordur. Safra kesesi, suyu ve sodyumu emerken safrayı yoğunlaştırmaktadır. Kolesterol taşları, bilurabin ve kalsiyum karbonat gibi kalsiyum tuzlarından oluşup daha az miktarda protein ve diğer eser mineraller içermektedir. Kolesterol taşları, safra taşlarının dörtte üçünden fazlasının temel bileşenidir ve bu taşların çoğu kolesterol içermektedir. Yani kolesterol safra taşları, safradaki kolesterol konsantrasyonu safranın onu çözeltide tutma kapasitesini aştığında oluşmaktadır. Safra taşlarının kimyasal bileşimi ve safra taşı içindeki farklı bileşenlerin/elementlerin dağılımı, patogenezlerini ve dolayısıyla önlenmesini anlamak için önemlidir.

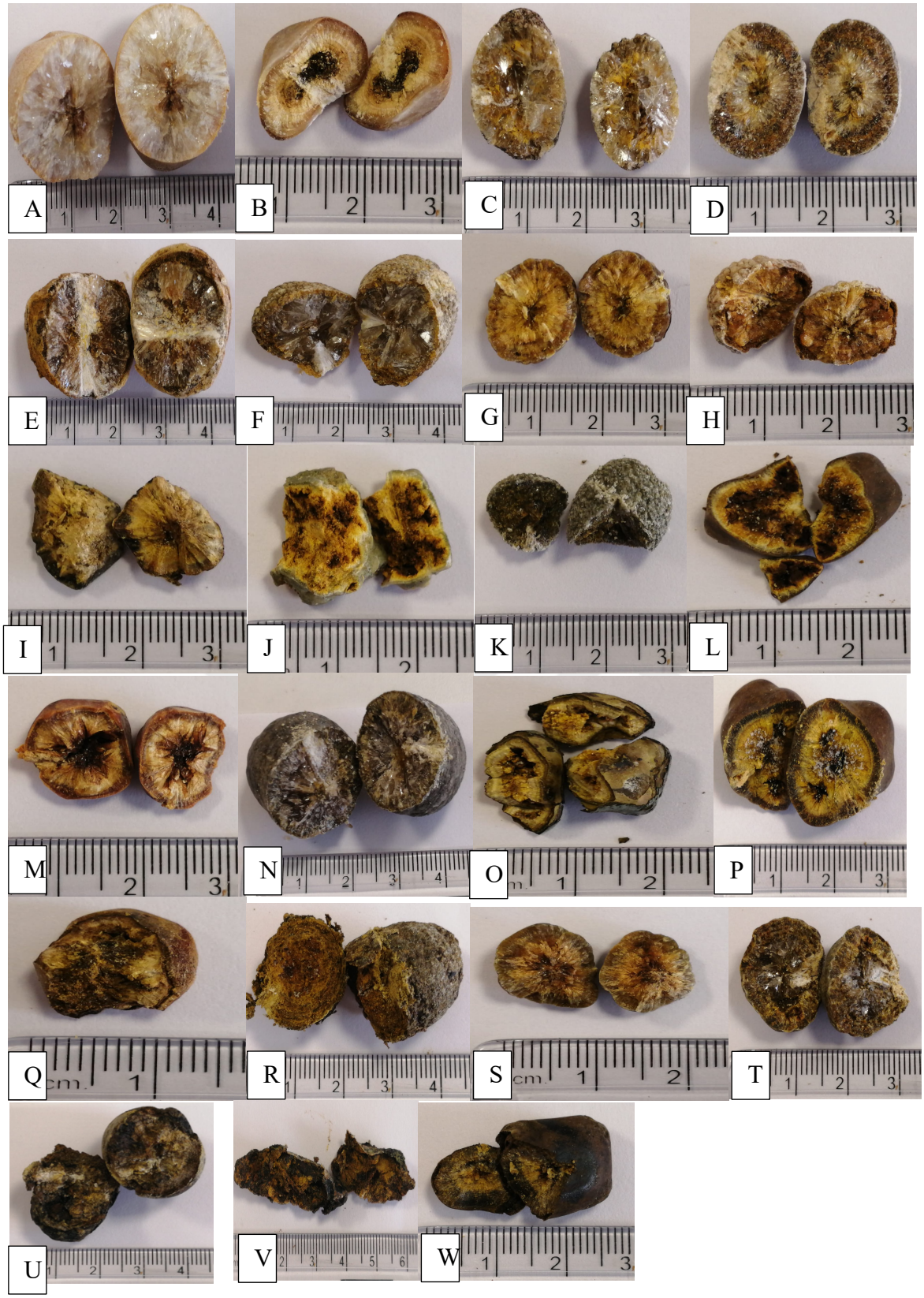
İnsan safra taşları çeşitli şekillerde (tetrahedral, oval veya düzensiz şekillerde), boyutlarda ve kristalden amorf yapıya kadar çeşitli yapılarda bulunmakta olup renkleri kremsi beyaz ve sarıdan siyah ve kahverengiye kadar değişmektedir. Taşların boyutları da birkaç milimetreden 5 cm'ye kadar değişmekte, tek veya çoklu olarak da bulunmaktadırlar. Saf kolesterol taşları genellikle; tek, beyazımsı ve 2,5 cm'den daha büyükken, karışık taşlar ise genellikle daha küçük, sayıları çok olup ve çeşitli şekil ve renklerde bulunabilmektedirler. Farklı sınıflardan seçilmiş safra taşlarının görünümü, Şekil 3.15.'- 3.19 aralığında verilmiş olup, taşların; çeşitli şekil, boyut, renk ve belirgin morfolojisi gösterilmektedir. Bu çalışmada analiz edilen safra taşları, yaygın kronik 32 kadın (yaş: 24-80) ve 20 erkek (yaş: 37-68) olmak üzere toplam 52 Erzincan ili merkez veya çevre ilçelerden gelen hastalardan, uzman cerrahlar tarafından laparoskopik kolesistektomi yoluyla çıkarılmıştır. 52 hastadan elde edilen safra taşları, katı kitleler halinde olup tüm hastalardan örnek analizi için bilgilendirilmiş onam alınmış ve bu çalışmadaki tüm prosedürler Helsinki Bildirgesi'ndeki yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

İncelenen örnekler öncelikle morfolojik ve iç yapısal özelliklerine göre kolesterol taşları (n=17; %32,7), kalsiyum karbonat taşları (n=6; %11,5), fosfat taşları (n=8; %15,4), karışık taşlar (n=12; %23,1) ve bilurabin taşları (n=9; %17,3) olmak üzere beş gruba ayrılmıştır (Tablo 4.1.). Tablo 4.1. de incelenen safra taşlarının cinsiyete, yaşa ve taş grubuna göre dağılımı gösterilmiştir. Kadın hasta oranı % 61,5, erkek hasta oranı ise %38,5'tir. Safra taşı hastalığı riskinin kadın hastalarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kadın hastaların %40,6'sında kalsiyum karbonat kolesterol tipi taşlar gözlenirken, erkek hastaların çoğunda kompozit kolesterol grubu taşlar gözlenmiştir. Kolesterol taşları belirlenirken; yüzeylerinin düzgün olduğu ve renklerinin çoğunlukla soluk beyaz veya sarıdan sarımsı kahverengiye kadar değiştiği bir aralık esas alınmıştır. Bilurabin taşlarının belirlenmesinde çoğunlukla siyah ve kahverenginin farklı tonlarının hâkim olduğu koyu renkler esas alınmıştır. Karışık taşların belirlenmesinde ise çoğunlukla sarıdan kahverengiye, siyahtan yeşile kadar farklı renklerin durumu esas alınmıştır (Çimen vd., 2025, Ha vd., 2018, Jayasoma vd., 2022, Liu vd., 2002).

Tablo 4.1. İncelenen safra taşı tiplerinin dağılımına ilişkin bazı bilgiler

	Kadın	**Erkek**
Numune sayısı	32	20
Örnek (%)	61,50	38,50
Ortalama yaş(yıl)	52.28	52,45
Minimum yaş(yıl)	24	37
Maksimum yaş(yıl)	80	68
>50 yaş (%)	50	60
Kolesterol grubunun ortalama yaşı	47,4	55,3
Karışık grubun ortalama yaşı	56,3	46,7
Fosfat grubunun ortalama yaşı	61,7	48,8
Bilurabin taşı grubunun ortalama yaşı	60,5	57,9
Kalsiyum karbonat taşı grubunun ortalama yaşı	48,6	39
Kolesterol grubundan örnekler (%)	40,6	20
Karışık grubundan örnekler (%)	28,1	15
Fosfat grubundan örnekler (%)	9,4	25
Bilurabin grubundan örnekler (%)	6,3	35
Kalsiyum karbonat taşı grubundan örnekler (%)	15,6	5

Çalışmada incelenen taşların boyutları ve bir hastadan çıkarılan taş sayısı diğer hastalarla kıyaslandığında değişkenlik göstermiştir. Saf kolesterol taşlarının çapları 0,77 ile 3,2 cm arasında değişirken, çoğunun polihedral bir şekle sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15.). Tek parça olarak çıkarılan kolesterol taşlarında ise durum farklı olup, genellikle küresel veya oval bir yapı ile karşılaşılmıştır. Öte yandan, incelenen örneklerdeki bilurabin taşlarının çoğunun amorf ve kırılgan olduğu, çaplarının 3 mm'den küçük olduğu ve çok sayıda taştan oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.15.). Küçük boyutlu bilurabin taşları ağırlıklı olarak pürüzlü bir yüzey görünümü sergilerken, diğerleri düzensiz bir şekil göstermiştir. Karışık taşların şekilleri konusunda net bir sonuca varılamamıştır; farklı tipler düzensiz, yuvarlak veya oval olarak kaydedilmiştir. Hatta birkaç mm'den 2 cm'ye kadar değişen boyutlarda birçok taş gözlemlenmiştir. Kolesterol ve karışık taşların çoğunda, koyu renkli bir merkez tespit edilmiştir. İncelenen safra taşı fotoğraflarına bakıldığında Şekil 3.15.'de verilen taşların keskin yüzeyli beyaz kalsiyum karbonat taşları olduğu görülmektedir. Şekil 3.16.'da gösterilen taşlar beyaz/beyazımsı renkte ve pürüzlü yüzeyli olmaları nedeniyle kolesterol sınıfına dâhil edilmiş olup, yapılarının büyük kısmını kolesterol oluşturmaktadır. Şekil 3.17.'deki safra taşları sarımsı/sarımsı-açık kahverengi renkte olmaları nedeniyle karışık taşlar olarak sınıflandırılmaktadır. Kolesterol çevresinde bilurabin tuzlarından sonra en bol bulunan faz olup, taşın merkezinden ziyade yoğunlaşmıştır ve bu durum Şekil 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Safra taşları kesildikten sonraki kesit fotoğrafları

Şekil 3.18.'de ise verilen taşlar dış yüzeyleri pürüzlü ve koyu renkli olması nedeniyle fosfat grubuna dahil edilmiştir. Bu taşlar yapı olarak karışık kolesterol taşlarına benzemekle birlikte

(Şekil 3. 17.), kolesterol ve bilurabin yine bunlarda da başlıca faz olarak belirlenmiştir. Safra taşlarında gözlenen orta kısımlardaki siyah rengin nedeni, bakır bilurabinat formundaki Cu'nun varlığıdır (Liu vd., 2025, Singh vd., 2020) (Şekil 4.1.A., 4.1.F., 4.1.I. numaralı taş gibi). Şekil 3. 19.'da gösterilen (kodlanan) safra taşları; siyah, düzensiz şekilleriyle kolayca ayırt edilebilmiş ve diğer taşlara göre daha sert bir yapıya sahip olduğu gözlemlendiğinden bilurabin taşı olarak sınıflandırılmıştır.

Kesit görünümlerine bakıldığında, orta bölgede radyal bir mineral/mineral dizilimi görülmüş olup (Şekil 4.1.B., 4.1.D., 4.1.E., 4.1.G., 4.1.M.,4.1.P., 4.1.S.,), genel olarak üç katmanlı bir yapı (kabuk, orta kısım ve çekirdek) ve bu bölgelerle tezat oluşturan farklı kalınlıklarda eşmerkezli bir halka deseni gözlenmiştir. Şekil 4.1. de incelenen safra taşlarının kesit görünümleri verilmekte olup; Şekil 4.1.C., 4.1.H. 4.1.J., 4.1.K., 4.1.L., 4.1.N., 4.1.O., 4.1.Q., 4.1.R., 4.1.T., 4.1.U., 4.1.V., 4.1.W., gibi bazı taşlarda rastgele dairesel düzenlemeler gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.1.P., Şekil 4.1.Q., Şekil 4.1.R.'de taşların; sarı-kahverengi kristallenmesi, katmanlı-eşmerkezli birikintiler halinde iç yapısı yoğun bir kabuk ve belirgin bir merkezi kısma sahip agregat tespit edilmiştir. Şekil 4.1.B., Şekil 4.1.G., Şekil 4.1.M., Şekil 4.1.P., Şekil 4.1.S.'de verilen taşlarda; aragonit heliktitler (dallanmış silindirik veya konik dendritik uzantılara sahip mineral agregatları) veya koralitler (birbirine bağlı, aralarında bulunan bireysel dendrit dalları ve kümelerinden oluşan agregatlar) gibi nadir bir morfolojik yapıya rastlanmıştır.

4.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi

IR spektroskopisi; IR ışığının maddeyle etkileşiminin incelenmesi olup IR ışığı, 12800 ile 10 cm^{-1} aralığında değişen dalga sayısıyla karakterize edilmektedir. IR ışığı, atomlar arasındaki moleküler bağlar ve bağların uçlarında bulunan atom türlerine bağlı olarak, belirli frekansların moleküller tarafından soğurulmaktadır. IR bölgesindeki foton enerjileri, kovalent bağlı atomların titreşimsel uyarılmasına neden olmaktadır. Kovalent bağların genellikle esneyebilen, bükülebilen, dönebilen ve makas gibi hareket edebilen sert yaylar gibi davrandığı düşünülmektedir. Daha yüksek enerjili orta-kızılötesi radyasyon, moleküller tarafından soğurulduğunda temel titreşimleri harekete geçirerek, onları temel durumdan ilk titreşim durumuna yükseltmektedir. Buna karşılık, NIR (yakın IR) spektroskopisi, bu temel titreşimlerden üretilen "üst tonlar" ın kombinasyon bantlarından oluşmaktadır. IR ve FTIR arasındaki fark, FTIR' nin ham sinyal olarak interferogramdan oluşturulmasıdır. Bu durum; ışık

yoğunluğunu, dispersif cihazlarda olduğu gibi dalga boyunun bir fonksiyonu olarak değil, interferometre içindeki bir aynanın konumuna bağlı olarak temsil etmektedir. Bu "FT" dir. Sinyalin dalga sayısının bir fonksiyonu olarak yoğunluğu elde etmek için, önce Fourier dönüşümünden (FT) geçirilmesi gerekmektedir. FTIR spektrumlarının elde edilmesi, geleneksel dispersif cihazlara göre çok daha hızlıdır. FT yöntemi; çok daha iyi bir sinyal-gürültü oranı gösteren spektrumlar üretmekte ve dalga boyu ölçeği çok hassas bir referans lazerle kalibre edildiğinden, IR'den daha yüksek dalga boyu doğruluğu sağlamaktadır.

Artık farklı boyut ve formlardaki gaz, sıvı ve katı numunelerin aynı temel cihazla analiz edilmesini sağlayan çok çeşitli FTIR cihazları ve çok yönlü değiştirilebilir aksesuarlar bulunmaktadır. Normal camın orta-IR geçirgen olmadığını, bu nedenle tüm cihaz optiklerinin ve örnekleme aksesuarlarının diğer uygun IR optik malzemelerden yapılması gerektiğinide belirtmek gerekir. Katı numuneler için geliştirilen ilk IR teknikleri; analitin öğütülmesini, yüksek basınç altında küçük, katı ve şeffaf bir diske, genellikle potasyum bromür (KBr) gibi IR geçirgen substratlarla karıştırılmasını gerektiriyordu. Bunlar daha sonra geçirgenlik ölçümleri için bir tutucuya monte ediliyordu. Sıvı (su içermeyen) numuneler genellikle küçük bir ara parça ile iki IR geçirgen disk arasında ince filmler halinde oluşturuluyordu. Bu türden yöntemler hem zaman hem de tekrarlanabilirlik sorunlarını beraberinde getirmektedir.

Son 30 yılda "ATR" (zayıflatılmış toplam yansıma) tekniği başta olmak üzere, alternatif tekniklerin kullanımında artış olmuştur. ATR; numune hazırlığı gerektirmeden, kristal pencereye yerleştirilen az miktarda sıvı veya katı numunenin yerleştirilmesine ve spektrumun birkaç saniye içinde toplanmasına olanak tanımaktadır. Katı numuneler için araştırmaların çoğu ATR ile yapılmaktadır. Dağınık yansıma için yansıtıcı yarım küre veya gaz numunesi için sızdırmaz hücreler gibi yeni cihaz türleri de özel uygulamalar için mevcuttur.

Bu tez çalışmasının ikinci aşamasında klasik çalışma koşullarında, önce arka plan "boş" bir spektrum alınmıştır. Temel sayma spektrumu ya da başka deyişle bu boş spektrum, tüm ışık huzmesi yolundaki (optik ve atmosferik) absorbans değerlerini içermektedir. Numune daha sonra analiz edilmiş ve yalnızca numuneye özgü spektral değerleri elde etmek için boş spektrum ana spektrumdan çıkarılmıştır. Hem dalga sayısı çözünürlüğü (tipik olarak 4 ila 16 cm^{-1}) hem de eş zamanlı taramalar (tipik olarak 8 ila 64) için, kabul edilebilir sinyal-gürültü dengesi elde etmek adına uygulamaya özgü optimizasyon şartları sağlanmıştır. Şekil 4.2.'de Temel Bilimler

Araştırma Laboratuvarında bulunan Nicolet iS5 FTIR spektrometre cihazının fotoğrafı verilmiştir.



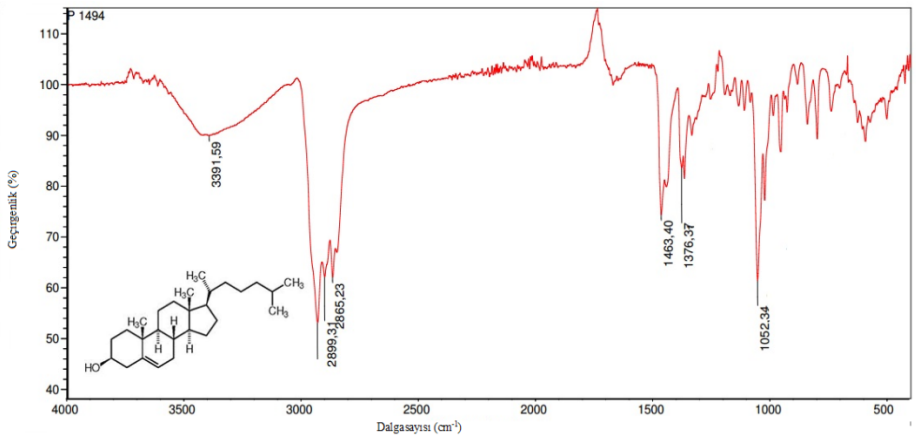
Şekil 4.2. Nicolet iS5 FTIR spektrometre cihazı

Bir hastadan alınan birden fazla safra taşı tek bir örnek olarak kabul edilmiştir. Çekirdek, orta katman ve kabuk olarak belirgin katmanlanma gösteren seçilmiş safra taşları ayrılarak toz haline getirilmiştir. Safra taşlarının kimyasal bileşikleri, KBr pelet tekniği kullanılarak 4 cm^{-1} nominal enerji çözünürlüğüne sahip 4000-400 cm^{-1} frekans aralığında Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Her ölçüm için KBr diskleri oluşturmak üzere ince toz haline getirilmiş numuneler hazırlanmıştır. Her numune çoklu taramaya tabi tutulmuş ve ortalama spektrum uygun yazılım kullanılarak geçirgenlik modunda elde edilmiştir. Spektrumların tanımlanmasında ayrıca otomatik karşılaştırmalar yapılmış olup karşılaştırma sonucu 0,000 ile 1,000 arasında skor değerleri elde edilmiş ve 1,000 puanın karşılığı bilinmeyen spektrum ile referans spektrum arasında mükemmel bir benzerlik olarak

alınmıştır. Sonuçların doğruluğundan emin olmak adına, spektrumların görsel incelemesi yapılmıştır Farklı numunelerin FTIR spektrumlarına eğri uydurma analizinin uygulanması Orgin programında, Gauss-Lorenzian fonksiyonuna sahip bir eğri uydurma algoritması kullanılarak, FTIR spektrumlarının 3000-2800 ve /veya 1700-1500 cm^{-1} bölgesindeki tepe yoğunluklarının nicel olarak tahmin edilmesi için kullanılmıştır. Çünkü bu bölge safra taşlarının sınıflandırılması için uygun bir bölgedir. En iyi eğri uydurma prosedürü, minimum standart hata değerini sağlayabilmek için tekrarlamalı (peak fitting) pik uydurmalar, gerçekleştirilmiştir. Bir bileşenin bağıl oranı, karşılık gelen tepe noktasının kesirli alanının tüm tepe noktalarının alanlarının toplamına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü değeri 800'ün üzerinde olan spektrumlar bu çalışmada sunulmuştur. Her gruptan safra taşlarının fotoğrafları toplanarak aynı grupta ortak bir morfolojinin varlığını belirlemek için birbirleriyle karşılaştırılmış, ardından safra taşları sınıflandırılmıştır. Safra taşlarında bulunan farklı fonksiyonel gruplar, spektrumların önceki çalışmalarda bildirilen kolesterol, bilurabin, kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi referans materyallerle karşılaştırılmasıyla bu Tablo 4.2. oluşturulmuştur.

4.2.1. Kolesterol safra taşları

Saf kolesterol safra taşının FTIR spektrumu ve kolesterolün kimyasal yapısı Şekil 4.3.'de gösterilmiş olup *y* ekseni geçirgenliği-absorbansı *x* ekseni ise dalgasayısını (cm^{-1}) temsil etmektedir.



Şekil 4.3. Kolesterol taşlarının FTIR spektrumu

Tablo 4.2. Safra taşlarına ait titreşim bantları ve titreşim frekans değerleri

Frekans (cm^{-1})	FTIR Bandı Atamaları
	Kolesterol kaynaklı bantlar
1054	C-C gerilmesi
1375	CH_3'ün simetrik C-H bükülmesi
1463	CH_2'nin C-H bükülmesi
2865	CH_2'nin C-H simetrik gerilmesi
2899	CH_3'ün C-H simetrik gerilmesi
2929	CH_3'ün C-H asimetrik gerilmesi
3418	CH_2'nin C-H asimetrik gerilmesi
3672	Suyun OH grubuna ait kristalizasyon
	Bilurabin kaynaklı bantlar
478	C-C-C bükülmesi
668	Laktat halkası deformasyonu
839	C-H düzlem dışı bükülmesi
926	C-C halka gerilmesi
1022	C-C-H düzlem bükülmesi
1190	C-H düzlem içi bükülmesi
1234	C-O-C gerilmesi
1463	CH_2 bükülmesi (pirol halkası deformasyonu)
1573	C=C gerilmesi
1624	C=O karbonil gerilmesi
1656	OC=O gerilmesi
3389	Gerilme titreşimi ve NH grubun modu
	Kalsiyum Karbonat kaynaklı bantlar
668	CO_3^{2-}
740	$CaCO_3^{2-}$ modifikasyonu
799	C-O
839	$CaCO_3^{2-}$ ün C-O bükülmesi
879	CO_3^{-} 'ün CO bükülmesi
882	$CaCO_3^{2-}$ ün C-O bükülmesi
1463	C-O gerilmesi
	Fosfat kaynaklı bantlar
592	PO_4^{3-} ün P-O bükülmesi
952	PO_4^{3-} ün soğurma bandı
1169	P=O'nın P-O gerilmesi
1166	C-C gerilmesi
1233	PO_2^{-} asimetrik gerilmesi

Tablo 4.3.'de de bu çalışmada elde edilen kolesterol safra taşlarının FTIR absorpsiyon tepe değerleri ile önceki çalışmalardan elde edilen veriler arasındaki karşılaştırmalar gösterilmiştir. Kolesterol safra taşının FTIR spektrumu, 2929 cm^{-1} de bir CH_2 asimetrik gerilme emilim bandı, 2865 cm^{-1} de bir CH_2 simetrik gerilme emilim bandı bu taşlarda büyük miktarda kolesterol bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca safra taşlarında kolesterolün varlığı, 2929-2937 cm^{-1} de

güçlü bir *ν*C-H titreşim bandı, 1463 cm^{-1} de C-H deformasyon bandı (CH_2 asimetrik bükülme emilim bandı) ve kolesteroldeki halka deformasyonuna atfedilen 1050-1054 cm^{-1} de keskin bir absorpsiyon tepe noktası ile karakterize edilmiştir. Geniş bir OH gerilme modu absorbsiyon bandı 3418 cm^{-1} de merkezlenmiştir (Tablo 4.3.).

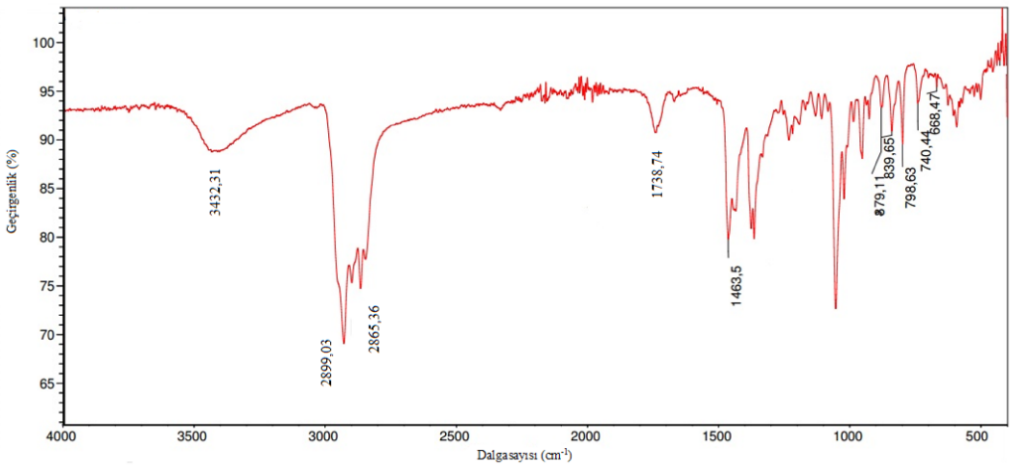
Tablo 4.3. Literatürde bildirilen farklı safra taşlarının FTIR spektroskopisi absorpsiyon pikleri

Bileşik	Bu çalışmada gözlemlenen soğurma pikleri (cm^{-1})	Jayasoma vd., (2022)	Kothai vd., (2009)	Sikkandar vd., (2011)	Ramana Ramya vd., (2017)
Kolesterol	1052	1051	1052	1052	1051
	1376	1367	1371	1367	1373
	1463	1463	1463	1464	1461
	2865	2865	-	2866	2864
	2899	2931	2899	2899	2898
	2929	-	2933	2936	2919
	3391	3417	3396	3392	3396
Bilurabin	478	-	465	-	-
	668	-	-	-	-
	839	868	832	877	-
	926	948	923	936	982
	1022	1039	1021	1023	1044
	1190	1171	1167	1171	1175
	1234	1247	1244	1250	1244
	1463	1443	1463	-	-
	1573	1564	1570	1574	1569
	1624	1622	1626	1627	1614
	2865	-	2866	-	-
	2928	-	2933	-	-
	3389	-	3396	-	-
Karbonat	668	686	-	**-**	-
	740	700	-		-
	799	712	-		-
	839	856	819		837
	879	-	879		-
	882	-	882		-
	1463	1460	1443		1444
Fosfat	592	602	-		563
	952	-	994		962
	1022	1030	-		-
	1169	-	1166		1175
	1233	-	1228		

Ayrıca diğer çalışmalarda bulunan ve Tablo 4.3.'de verilen 2353 cm^{-1} deki bant ise, havanın CO_2 absorbsiyonunu temsil eden bir yapay sinyaldir. Kolesterol taşlarına ait spektrumlarda başka anlamlı absorbsiyon tepe noktaları gözlenmemiştir ki bu da taşların saf kolesterolden oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.3.).

4.2.2.Kalsiyum karbonat safra taşları

Kalsiyum karbonat taşları, ana fazlar olarak farklı kalsiyum karbonat polimorfları içermekle birlikte, kolesterol ve kalsiyum bilurabinat ikincil bileşenler de spektrumlar üzerinde görülmektedir (Şekil 4.4.). Bu çalışmada elde edilen kalsiyum karbona ait bantlar önceki çalışmalarla uyumluluk sergilemiştir (Tablo 4.3.). Safra taşlarının incelenmesinden sonra, 1628 ve 3445 cm^{-1} civarında pikler gözlemlenmiştir (Ha vd., 2018). 1624 cm^{-1} de benzer bir pik bildirirken, Hermida vd., (2021) kalsiyum için 3400 cm^{-1} de bir IR piki bildirmiştir. Bazı bantlar sadece bizim çalışmamıza özgü olduğundan, hatalı sonuçları tespit edebilmek için kalsiyum bantları dikkatlice incelenmiştir. Bazı piklerimiz ise literatürle ile farklılık göstermekte olup bu farklılıkların muhtemel nedenleri; diyet, genetik yapı veya her ikisinin bir kombinasyonundaki değişim olabilir. Türkiye'de yapılan çalışmalar neticesinde safra taşı türleri için bir kütüphane geliştirmemiş olup bu konuda ciddi çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca kalsiyum karbonat tipi taşlar için 1463, 879 ve 740 cm^{-1} de, kalsit tipi kalsiyum karbonatın karakteristik absorbsiyon pikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Kalsiyum karbonatın 839–849 cm^{-1} (aragonit), 874–879 cm^{-1} (kalsit) ve 878–888 cm^{-1} (vaterit) civarında karakteristik $\nu_2CO_3^{2-}$ bantlarına sahip üç polimorfu olduğu bildirilmiştir.

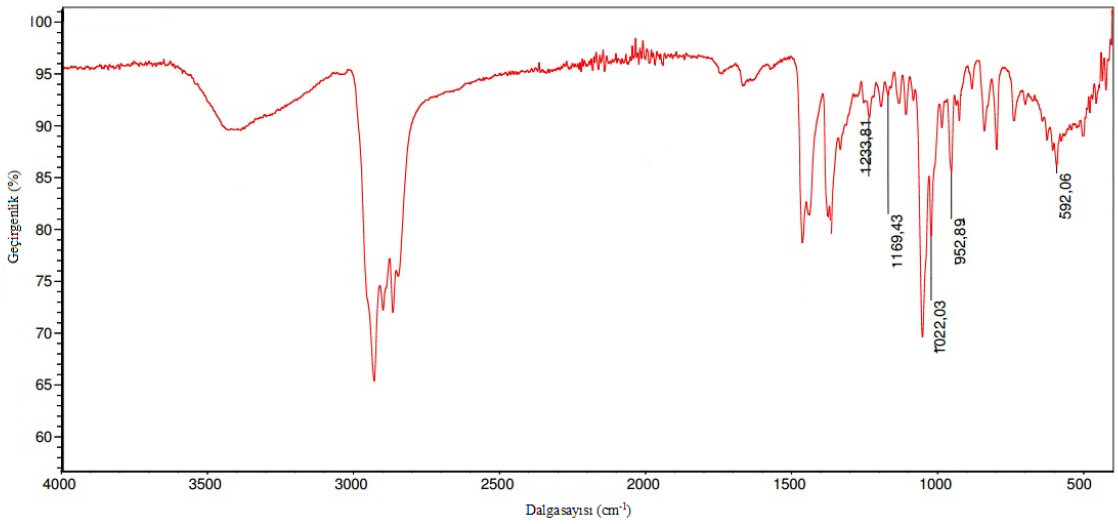


Şekil 4.4. Kalsiyum-karbonat taşlarının FTIR spektrumu

Bununla birlikte, aragonitin karakteristik $v_4CO_3^{2-}$ bandı 700 cm^{-1} de iken, kalsit ve vateritin karakteristik $v_4CO_3^{2-}$bandları sırasıyla 713 cm^{-1} ve 744 cm^{-1} de bulunmuştur (Weir vd., 1961). Şekil 4.5.'den de görüleceği üzere, 879 cm^{-1} de bir tepe noktası ve 740 cm^{-1} de ise bir başka tepe noktası tespit edilmiş olup bu bizlere kolesterol-kalsiyum karbonat karışık taşında esas olarak kalsitin biriktiğini göstermiştir. Kalsiyum genellikle taşın içinde dağılmış olup bazen esas olarak çekirdek ve yüzeyde dağılmış kalsiyum karbonat veya kalsiyum stearat formundan oluşmaktadır. Kalsiyum karbonat taşlarının ana element bileşimi karbon, oksijen ve kalsiyum olup kalsiyum karbonat kristalleri sıklıkla bilurabinata yapıştığı için bu oran kalsiyum karbonat bileşiğindekinden farklılık arz etmektedir. Kalsiyum karbonat taşlarının yüzeyinde mukoid madde veya bilurabinat ile sarılmış düzensiz kalsiyum karbonat kristalleri bulunmaktadır (Qiao vd., 2012).

4.2.3. Fosfat safra taşları

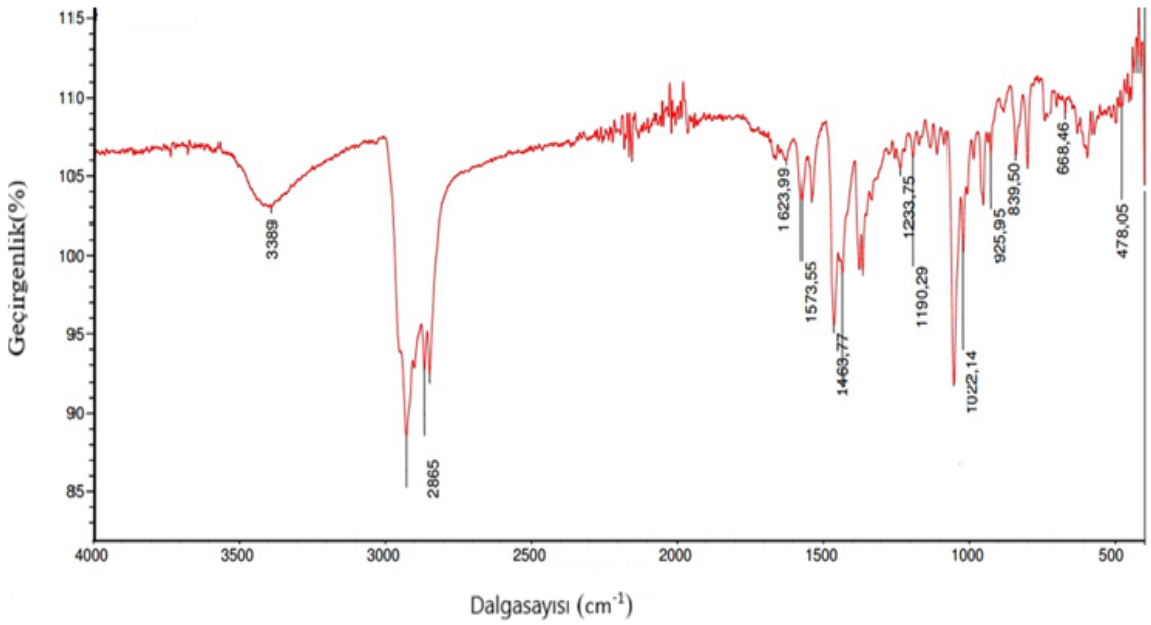
Fosfat taşları esas olarak, bilurabinat parçacıklarına yapışmış farklı boyutlardaki küre veya pürüzlü soğan biçimli kristallerden oluşmaktadır. SEM fotoğrafları ile bir sonraki bölümde gösterilecektir (Şekil 4.20.). Fosfat taşlarının ana element bileşimi karbon, oksijen, kalsiyum ve fosfor olup bunların yanı sıra az miktarda başka elementler de bulundurabilirler. Bazı durumlarda yüzeyde ve çekirdekte kolesterol kristalleri görülmektedir. Fosfat taşlarının 1233, 1169, 1022, 952, 592 cm^{-1} de fosfatın karakteristik absorbsiyon pikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Fosfat taşlarının FTIR spektrumu

4.2.4. Bilurabin safra taşları

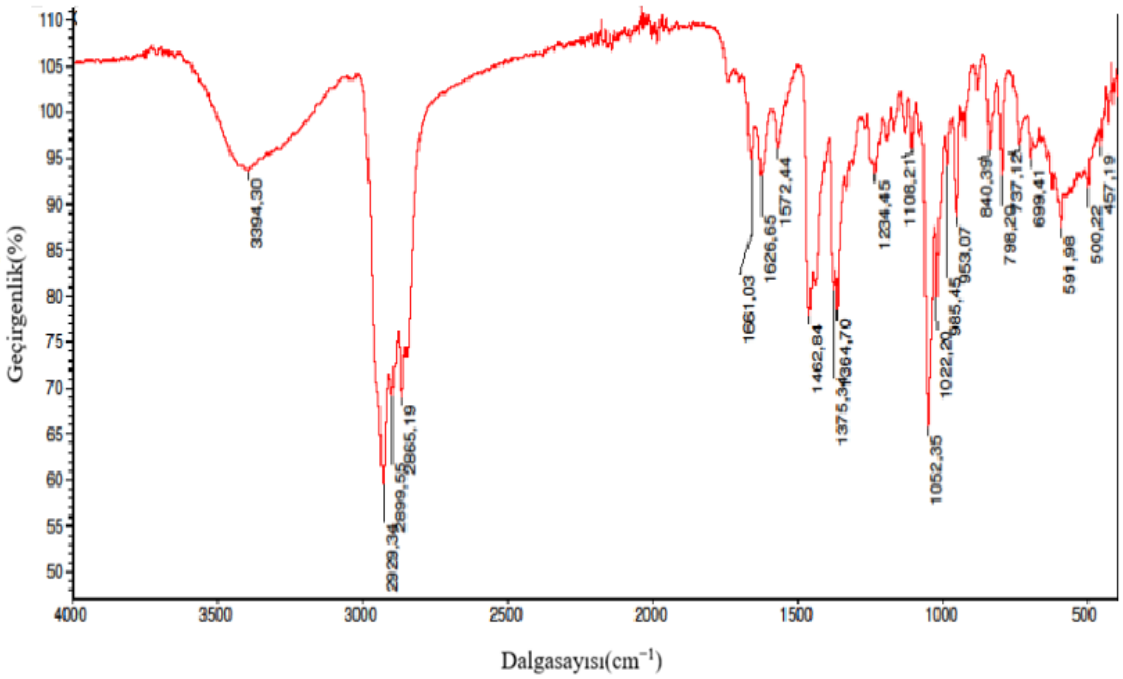
Safra taşlarında genellikle iki formda kalsiyum bilurabinat bulunmaktadır. Baskın olan form 2865, 1624 ve 1573 cm^{-1}'de karakteristik bantlara sahip nötr kalsiyum bilurabinattır. İkinci form ise; her zaman nötr bilurabinattan daha az miktarda bulunan ve serbest bilurabine benzeyen; tepe noktaları sırasıyla hidrojen bağı ve serbest karboksil gruplarına karşılık gelen 3389 ve 1703 cm^{-1}'de bantları bulunan kalsiyum bilirubanttır. (Şekil 4.7). Kolesterol ve serbest bilurabinin taş oluşumu esnasında aynı taşta olduğu durumlarda, tepe noktaları Şekil 4.8.'de de görülebileceği gibi 3398 cm^{-1}' de ki gibi ara bir konuma hafifçe kaymıştır.



Şekil 4.6. Bilurabin taşlarının FTIR spektrumu

4.2.4. Karışık safra taşları

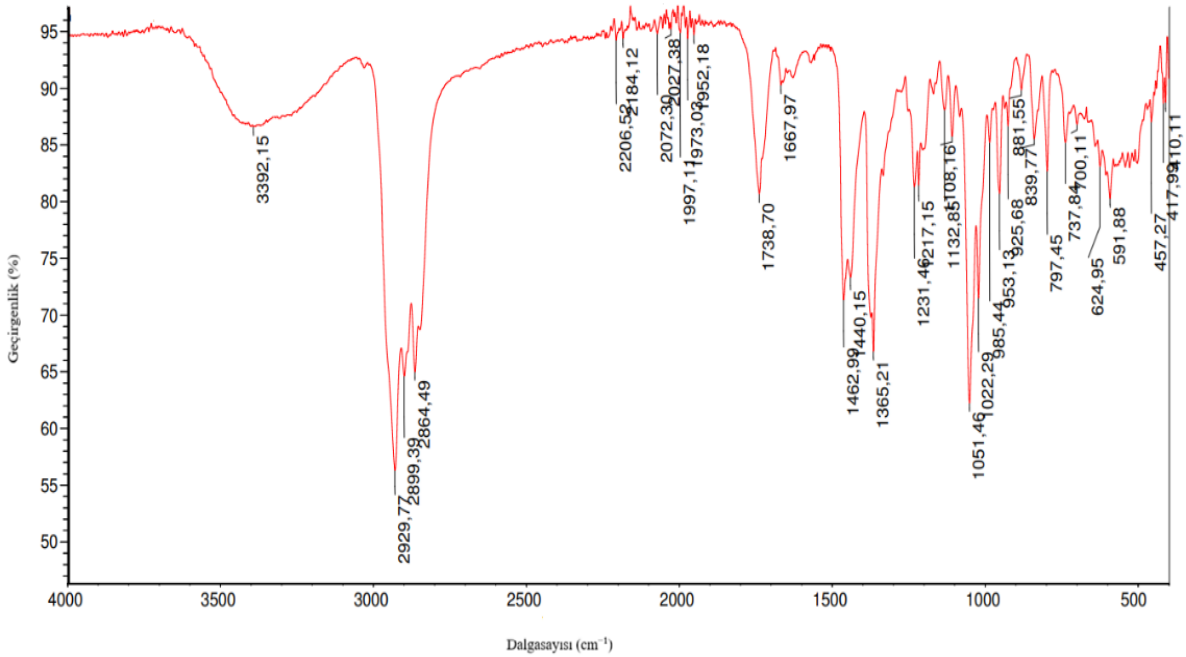
Bazı karışık taşların FTIR spektrumlarında (Şekil 4.7.); kolesterol için 3000–2800 cm^{-1} (2929, 2899 ve 2865 cm^{-1}) aralığında bilurabin için 1700–1500 cm^{-1} (1661, 1624-1626 ve 1574 cm^{-1} de üçlü pikler) aralığında karakteristik bantlar görülmüştür. Bu durum taşların hem kolesterol hem de kalsiyum bilurabin bileşenlerinin karışımından oluştuğunu göstermektedir.



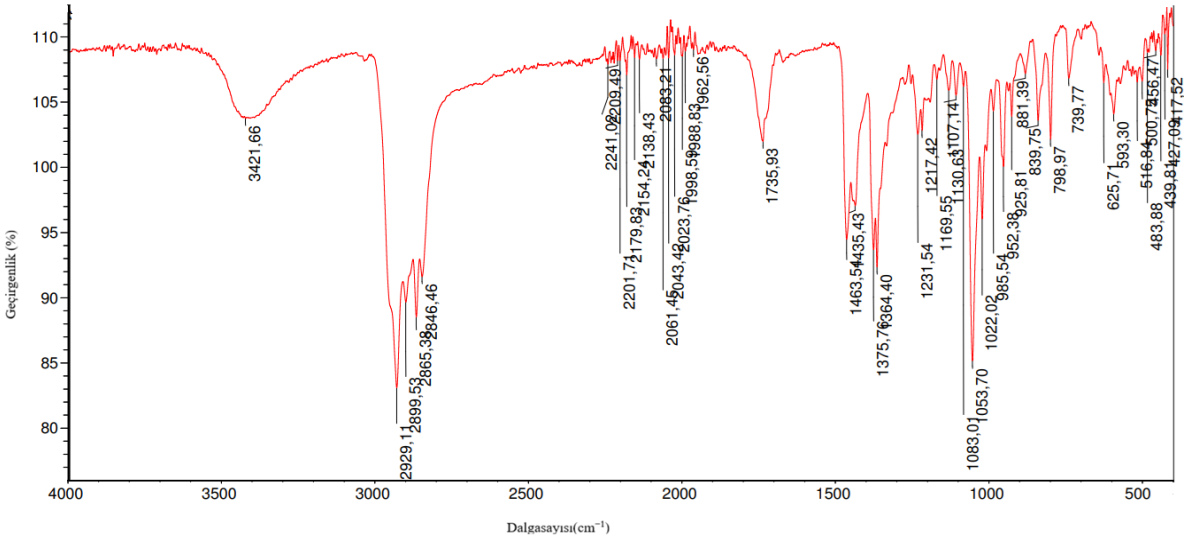
Şekil 4.7. Kolesterol-bilurabin karışık taşlarının FTIR spektrumu

Bir diğer karışık taşın FTIR spektrumu Şekil 4.8.'de verilmiş olup, bilurabin için 1662, 1627 ve 1573 cm^{-1}'de üçlü tepeler ve CaHA için 1051 ve 953 cm^{-1}'de iki baskın tepe görülmektedir. Bu nedenle bu taşları CaBR–CaHA karışık safra taşları olarak sınıflandırılmıştır. Burada 1100 ve 900 cm^{-1} arasındaki yoğun geniş tepeler, CaHA'nın PO_4^{3-} gruplarının ν_1, ν_3 ve ν_4 titreşim modlarına atanmıştır.

Safra taşlarında FTIR analiziyle bulunan taş bileşenlerinin ve karışımlarının çeşitliliği Şekil 4.9.'da gösterilmektedir. Genellikle safra kesesi taşları FTIR spektrumlarından da görlebileceği gibi; kolesterol, bilurabinat, kalsiyum karbonat ve/veya kalsiyum fosfatlardan oluşur ve çeşitli oranlarda da protein içerebilir. Kalsiyum palmitat veya kalsiyum stearat da sıklıkla bulunabilir ancak bu çalışma kapsamında bu türden FTIR spektrumları tanımlanmamıştır. Safta taşlarının Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'dan da görüleceği üzere birden fazla bileşen içerebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

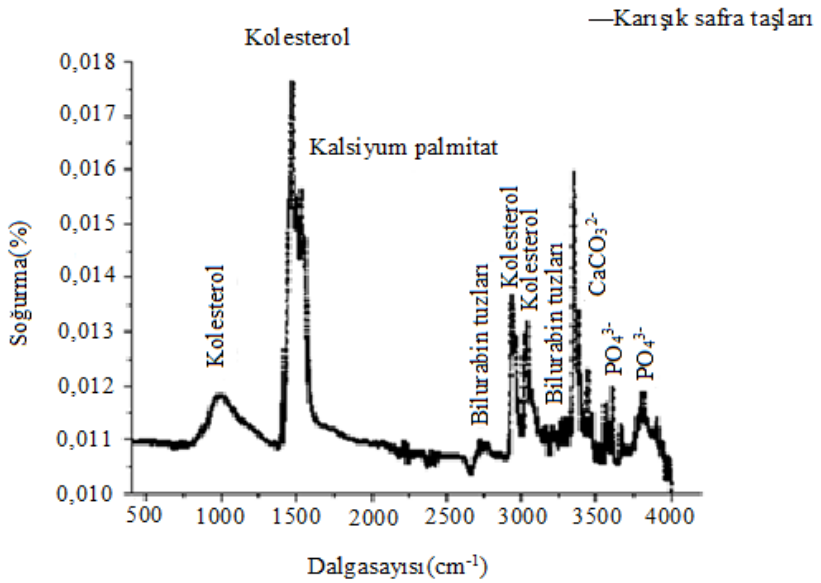


Şekil 4.8. Kolesterol-kalsiyum karbonat-fosfat karışık taşlarının FTIR spektrumu



Şekil 4.9. Kolesterol-bilurabin-kalsiyum karbonat-fosfat karışık taşlarının FTIR spektrumu

Safra taşlarının patogenezi çok faktörlü olup kimyasal bileşiminin doğru tespit edilmesi, oluşum mekanizmasını belirlemek için önemlidir. Bu çalışmada safra taşlarının etiyopatogenezini belirlemeye bilmek için FTIR spektrometresi kullanılarak ölçümler alınmıştır. Erzincan ve çevresinde üç sık gördüğümüz ana türün (kolesterol, pigment ve karışık taşlar) yanı sıra, bu çalışma kohortunda kalsiyum bilurabinat, kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi birden fazla kimyasal bileşiğede rastlanmıştır. Bu durum bize, bu hastalarda safrada kalsiyum tuzu çökelmesinin etiyolojisini araştırmanın önemini vurgulamaktadır. Amorf formda kalsiyum bilurabinatın varlığı, bilurabinatın polimerler olarak çökelmesinin yüksek olasılığını göstermektedir. Kimyasal bileşiklerin tanımlanması, numuneler için elde edilen dalga sayılarının daha önceki çalışmalarla çarpraz eşleştirilmesiyle yapılmıştır. Yorumlamadaki hataları en aza indirmek için mümkün olan en iyi eşleştirme sağlanmıştır. 1463, 1376 ve 1052 cm^{-1}'deki absorpsiyon pikleri kolesterol için parmak izi dalga sayıları olarak alınmıştır. 1658, 1624, 1573 ve 1234 cm^{-1}'deki absorpsiyon pikleri ise kalsiyum bilurabinatı tespit etmek için kullanılmıştır. Kalsiyum fosfatı tanımlamak için 1022, 952 ve 592cm^{-1}'de üçlü geniş tepe kullanılmıştır. Kalsiyum karbonatı tespit etmek için 1463, 879 ve 668cm^{-1}'deki absorpsiyon tepeleri kullanılmıştır. Orgin programında verilen çizdirilmesinden sonra farklı safra taşı türlerinin tek bir FTIR spektrumu üzerinde gösterimi Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı safra taşı türlerinin tek bir FTIR spektrumu üzerinde gösterimi

4.3. X-Işını Kırınım (XRD) Analizi

FTIR analizi safra taşı bileşimi hakkında önemli bilgiler sağlamakta olup safra taşı oluşum mekanizmasının araştırılması için de etkili bir araçtır. Ancak numune gereksinimi çok küçük olduğundan (1,2 mg), FTIR analizi, özellikle heterojen dağılıma sahip amorf taşlar olmak üzere karmaşık taşlar için bazen doğru sonuçlar vermemektedir. Protein taşları, amid ve kalsiyum bilurabinatın titreşim bantlarının örtüşmesi nedeniyle, bilurabin taşı olarak değerlendirilebilirler. İki taş türü arasında ayrım ancak X-ışını spektrometresi ile yapılmaktadır. Safra taşlarının X-ışını kırınımı toz analizi, taşları oluşturan belirli kristal bileşenlerin oranını belirlemek için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.

X-ışını kırınımı (XRD); malzemelerin yapısını, özellikle atomik veya moleküler düzeyde analiz etmek için tahribatsız bir tekniktir. Kristal veya kısmen kristal (yani periyodik yapısal düzene sahip) malzemeler için en iyi sonucu vermektedir. XRD, X-ışınlarının nanometre mertebesinde dalga boylarına sahip bir ışık türü olduğu gerçeğine dayanmaktadır. X-ışınları bu uzunluk ölçeğinde yapıya sahip bir maddeden saçıldığında, girişim meydana gelmekte olup bu da daha yüksek ve daha düşük yoğunluklu bir desenle sonuçlanmaktadır. Toz kırınımlı XRD'de, tek bir kristal yerine numune genellikle ince öğütülmüş bir toz formunda olan birçok kristalitin karışımından oluşmaktadır. Desen artık her biri tek bir kristal deseninde tek bir noktanın sahip olacağı aynı 2θ saçılma açısına sahip eşmerkezli halkalardan oluşmaktadır. Toz kırınımı en yaygın olarak iki tamamlayıcı teknik olarak şu şekilde kullanılır:

1- Tek kristal kırınımına alternatif olarak kullanılmaktadır. Toz numunesi üretmek, tek kristal üretmekten çok daha kolaydır. Keskin noktaları halkalara dönüştüren "toz ortalaması" işlemi sırasında değerli bilgiler kaybolsa da, kristal yapılar nispeten küçük oldukları ve tepe noktaları arasında aşırı örtüşme olmadığı sürece, bu teknik başarı ile uygulanmaktadır. Rietveld ayrıştırma yöntemi, genellikle gözlemlenen desene yol açma olasılığı en yüksek olan kristal yapıyı belirlemek için kullanılmaktadır. Tek kristal kırınımında olduğu gibi; bazen kristalit boyutlarının yanı sıra mikroskobik gerilmeler ve kusurların ayrıntılarını belirlemek için tek tek tepe noktalarının şekilleri ve genişlikleride analiz edilmektedir.

2- Faz tanımlaması, çoğunlukla mineralojide kullanılmaktadır. Genellikle bir mineral veya kil numunesi, farklı kristal fazlarının bir karışımından oluşmaktadır. Bir toz kırınım deseninin

"parmak izi", hangi faz veya fazların mevcut olduğunu belirlemek için, bilinen desenlerinin oluşturduğu bir veri tabanıyla karşılaştırılmaktadır.

Bu çalışmada kolesterol, karışık ve bilurabin safra taşlarındaki kristal fazını doğrulamak için X-ışını toz kırınımı tekniği kullanılmıştır. Safra taşlarının kristal faz kompozisyonunu belirleyebilmek için; X-ışını kırınım analizi öncesinde ince gözenekli bir toz elde etmek amacıyla, tüm taşlar akik havan ve tokmak kullanılarak toz haline getirilmiştir. XRD ölçümleri X-ışını jeneratörüne sahip 3. nesil Malvern Empyrean ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11.). Ölçümler esnasında benimsenen analitik koşullar şunlardır: (CuK) tüp 40 mA akım, 45kV voltaj ve 15 derece/sn hız.



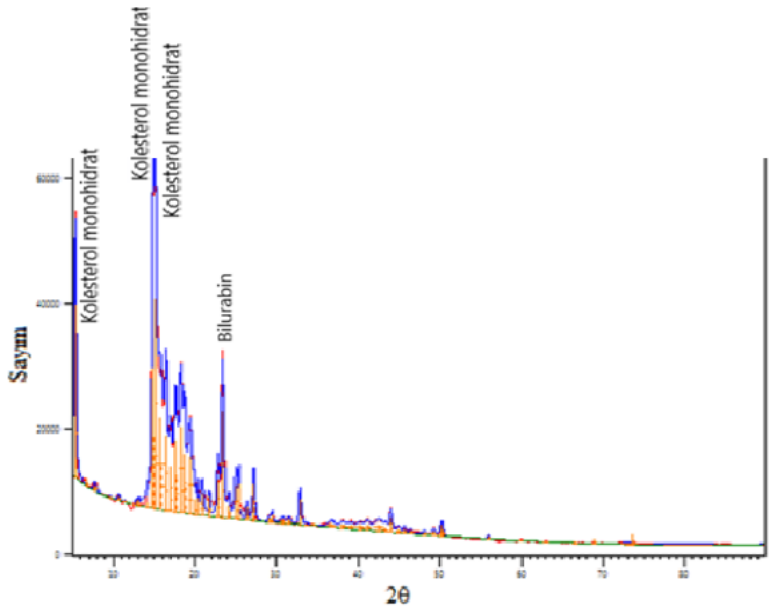
Şekil 4.11. Malvern Empyrean X-ışını kırınım spektrometresi

Yansıma tepe noktalarının HighScore Plus'takilerle karşılaştırılmaları yapılarak, difraktometrik profillerinin niteliksel yorumu yapılmıştır. HighScore Plus programıyla kullanıcılar tüm olası kristalografik analizleri yapmaktadır. HighScore paketi içerisinde; faz tanımlama, indeksleme,

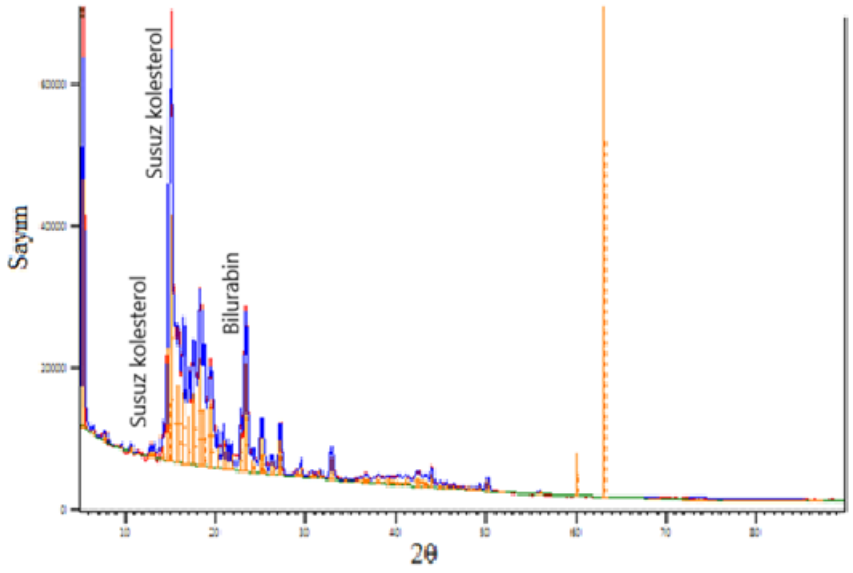
klasik ve klasik olmayan Rietveld iyileştirmeleri, toz kırınım verilerinden kristal yapıların çözülmesi ve istatistiksel yöntemlerin uygulanması ve büyük veri kümelerinin otomatik analizi gibi işlemlerin yapılması mümkündür. İlaveten mevcut fazları belirlemek amacıyla, numunenin kırınım desenini referans desenleri içeren bir veri tabanıyla karşılaştırmayı mümkün kılan, MATCH açık kaynaklı yazılımı da bu çalışmada kullanılmıştır. Böylece safra taşlarının fazları, elementleri veya yoğunlukları gibi ek bilgilere de ulaşılmıştır. Niteliksel analize ek olarak Rietveld iyileştirmeside yapılmıştır.

Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de farklı safra taşı tiplerinin, hem susuz hem de monohidrat formundaki kristalize kolesterolün yoğun yansıma XRD desenleri gösterilmiştir. Elde edilen XRD deseni, literatürde bildirildiği gibi kolesterol monohidratın varlığını kanıtlamıştır. Kolesterol monohidratın zirve değerlerinden biri 5,3° de, diğer karakteristik zirveler ise 14,7° ve 14,9° de tespit edilmiştir. Susuz kolesterole karşılık gelen zirveler 12,9° ve 14,0° da karakteristik tepeler olarak gözlenmiştir. Bu çalışma ile kolesterol safra taşlarının iki aşamada oluştuğu düşüncesi bizlerde hâkim kılınmıştır. Muhtemelen ilk aşamada safra kolesterol mikrokristalleri içeren çökeltiler oluştururken, ikinci aşamada kolesterol mikrokristalleri daha sonra makroskobik safra taşlarına dönüşmektedir. Çözünmeyen kolesterolün varlığı, safradaki kolesterol seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Genellikle safra taşları, konjuge olmayan bilurabin ve diğer safra tuzlarının aşırı doygunluğu nedeniyle oluşmaktadır (Jones vd., 2025)

Bu yoğun çizgilerin yanı sıra, bilurabinatın (kalsiyum bilurabinat, bakır bilurabinat ve diğer tuzlar) karakteristik yansıma çizgisi, kolesterole göre farklı yoğunluklarda $2\theta=23°$ de gözlemlenmektedir. Bilurabin taşlarının, kolesterol baskın olanlara kıyasla daha yoğun kırınım desenleri gösterdiği bilinmektedir. Bu sonuçlar, kolesterolün kristalleşme aşaması ile safra taşlarının mikro element bileşimi arasında bazı korelasyonların varlığını göstermiştir (Bassi vd., 1994, Kaur vd., 2010, Lee vd., 2010, Palchik vd., 2005). Oluşan ve büyüyen taşların çekirdeğinde çöken kolesterolün kesin kristal formu ise bu çalışmada belirlenememiştir.



Şekil 4.12. Kolesterol monohidrat tipindeki safra taşının XRD deseni

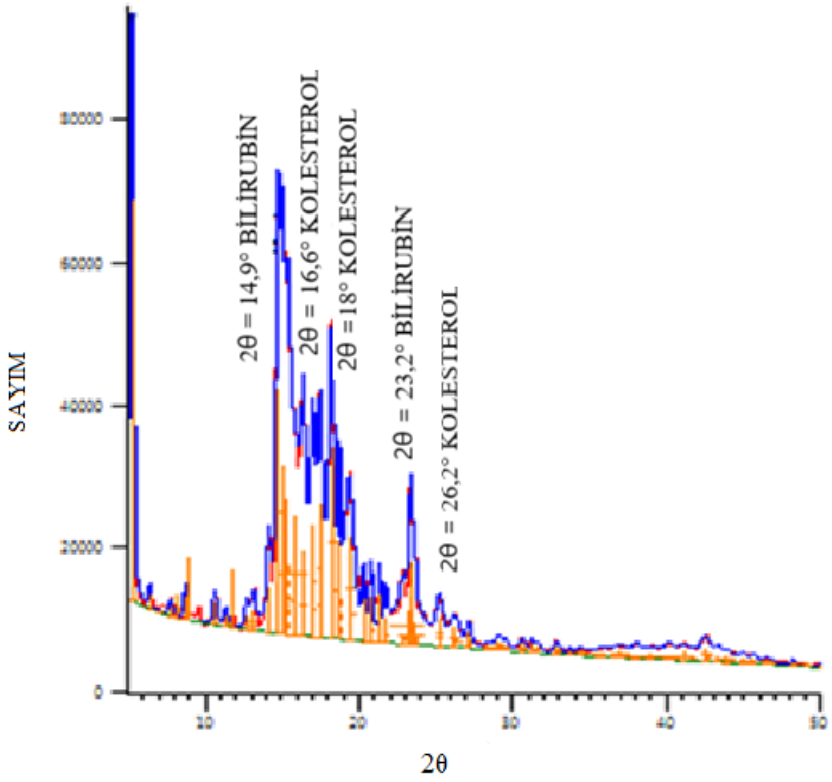


Şekil 4.13. Susuz kolesterol tipindeki safra taşının XRD deseni

Bu çalışmaya dâhil edilen safra taşları XRD analizleri sonucunda; karışık, bilurabin, kolesterol, kalsiyum karbonat ve fosfat taşları olmak üzere beş ayrı grupta sınıflandırılmıştır. Bu teknik kullanılarak toplanan X-ışını difraktogramlarına dayanarak; XRD'nin safra taşlarının sınıflandırılmasında büyük ölçüde yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çünkü

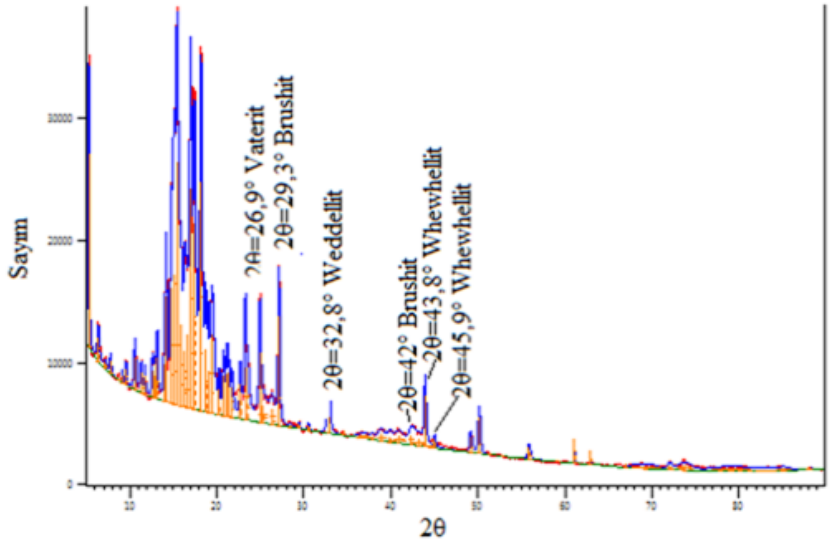
kolesterolün karakteristik zirveleri XRD desenlerinde açıkça fark edilmiş ve bilurabin için bulunan ek zirveler, karışık safra taşı difraktogramlarında gözlemlenmiştir. Bilurabin safra taşları ise, kristal olmayan yapıları nedeniyle bu teknikle derinlemesine karakterize edilmesi zor olup, bu çalışmada bilurabin taşlarının XRD desenleri yoğun yansıma tepeleri yerine yalnızca geniş kırınım tepeleri olarak sunulmuştur.

Bilurabin taşları grubunu temsil eden numunelerin XRD deseni, Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. Genellikle bilurabin taşları, XRD desenleri geniş kırınım tepeleri gösterdiğinden ve bu da ayrıntılı bir karakterizasyon yapmayı zorlaştırdığından, zayıf kristalli bir karakter sergilemektedir. Ancak incelediğimiz numunenin XRD deseni, 2θ = 16,6°, 18° ve 26,2°'de kolesterolün karakteristik yansımalarını ve 2θ = 14,9° ve 23,2°'de bilurabinin karakteristik yansımalarını göstermiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Kolesterol-bilurabin karışık tipteki safra taşının XRD deseni

Kalsiyum karbonatın farklı polimorf formlarının indirgenmiş kristal fazları için; 26,9°'de vaterit için karakteristik, 29,3° ve 42° brushit, 32,8° weddellit için tipik ve 43,8° ve 45,9°'de whewhellit için karakteristik bantlar (Şekil 4.15.) belirlenmiştir.



Şekil 4.15.Kalsiyum karbonat bazlı karışık tipteki safra taşının XRD deseni

Bu çalışmada hem saf kolesterol ihtiva eden taşlarda hem de karışık safra taşlarında bulunan kristal fazlarını belirlemek için ayrıntılı XRD analizleri yapılmıştır. Saf kolesterol taşının XRD analizi, standart desenle tutarlı D-aralık değerleri vermiş olup 5,33° ((100) düzlemi), 14,11° ((101) düzlemi), 15,39° ((102) düzlemi), 16,90° ((001) düzlemi), 18,19° ((200) düzlemi), 19,31° ((201) düzlemi) ve 21,30° de ((211) düzlemi) belirgin kırınım pikleri gözlenmiştir. Bu Miller indeksleri, analiz edilen örneklerdeki kolesterolün kristal yapısını doğrulamıştır.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere dayanarak XRD'nin, safra taşlarında bulunan kristal fazlarının tanımlanması için değerli bir araç görevi görerek, hem kimyasal hem de mineralojik karakterizasyona olanak tanıyabileceğini söyleyebiliriz. Daha da önemlisi elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak, XRD sonuçlarının FTIR analizi ile tanımlanan diğer tüm kimyasal bileşiklerin varlığını doğruladığını da söyleyebiliriz. Bu analiz ayrıca safra taşlarının çeşitli bileşimini de vurgulamaktadır. Hem saf kolesterolün hem de karışık safra taşlarının varlığı, potansiyel olarak farklı oluşum yollarını düşündürmektedir. Ek olarak; karışık taşlarda bilurabin ve kalsiyum tuzlarının varlığı, kristal oluşum sürecini etkileyen faktörlerin sanıldığından daha karmaşık bir etkileşim içerdiğini düşündürmektedir. Tüm bu sonuçlar ışığında, çeşitli kimyasalların nasıl etkileşime girdiğini ve safra taşı oluşumuna nasıl katkıda bulunduğunu doğru belirleyebilmek için daha fazla araştırma gerekmektedir.

4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi:

SEM; malzemelerin yüzey özelliklerini gözlemlemek için yaygın olarak kullanılan çok yönlü gelişmiş bir cihaz olup yüksek enerjili elektronlar kullanılarak numune uyarılmakta, çıkan elektronlar/X-ışınları ise analiz edilerek malzemenin topografisi, morfolojisi, bileşimi, tanelerin yönlenmesi, kristalografik yapıları vb. hakkında bilgiye sahip olunmaktadır. Morfoloji şekil ve boyutu gösterirken, topografi bir nesnenin yüzey özelliklerini veya "nasıl göründüğünü", dokusunu, pürüzsüzlüğünü veya pürüzlülüğünü göstermektedir. Benzer şekilde; bileşim, malzemeyi oluşturan elementler ve bileşikler anlamına gelirken, kristalografi, malzemelerdeki atomların düzenlenmesi anlamına gelmektedir. SEM bir parçacığın ayrıntılı görsel görüntüsünü yüksek kalite ve 1 nm uzamsal çözünürlükle elde etmektedir ve bu tür cihazların büyütmeleri 300.000 kata kadar çıkmaktadır. SEM yalnızca bir malzemenin yüzey görüntülerini görselleştirmek için kullanılsa da, numunenin kristalografik, manyetik ve elektriksel özelliklerini karakterize etmekte ve numune yüzeyinin diğer moleküllerle modifiye edilmesinden sonra parçacığın herhangi bir morfolojik değişikliğinin olup olmadığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca numunenin içerdiği element ve bileşik türleri ve bunların göreceli oranlarının yanı sıra tek kristal parçacıklardaki atomların düzeni ve düzen derecesi hakkında da bilgi edinebileceğimiz çok amaçlı bir araçtır. Biyolojik örneklerin, böbrek taşları ya da diş yapıları hakkında güvenilir bilgiler sağladığınıda, daha önce yaptığımız çalışmalara dayanarak söyleyebiliriz (Alaıkhtarlu., 2024, Al-jameel., 2024, Khaleel., 2025).

SEM'de numunenin yüzeye sabitlenmesi gereken özel bir numune tutucu bulunmaktadır ve numuneyi tutucuya yapıştırmak için genellikle karbon bant kullanılmaktadır. Önce çift taraflı karbon bant tutucuya sabitlenmekte ve ardından ince bir tabaka veya az miktarda malzeme karbon bandın üzerine yerleştirilmektedir; çünkü ince tabaka karbon banda düzgün bir şekilde yapışarak şarj sorununu azaltmakta ve iyi bir görüntü elde edilmesine yardımcı olmaktadır. SEM kullanılırken yüzeyde aşırı şarjı önlemek için numunelerin elektriksel olarak iletken olması gerekmekte olup aşırı şarj, aşırı parlaklığa ve kötü görüntülere neden olmaktadır. Bu nedenle polimerler gibi iletken olmayan numuneler genellikle ince bir karbon veya metal tabakasıyla (örneğin altın veya platin) püskürtülerek kaplanmaktadır ki bu metaller elektronları kolayca yansıtmakta ve elektronlar için iletken bir yüzey sağlamaktadır. Şarj sorununu azaltmak için iletken olmayan malzemelerin püskürtülmesi gerekmektedir. Bundan sonra numuneyi örten sap, numune tutucuya sabitlenerek numune tutma odasına yerleştirilmektedir.

SEM cihazı; kaynaktan salınan birincil elektronların, numunenin atomik elektronlarına enerji sağladığı ve bu elektronların daha sonra ikincil elektronlar (SE'ler) olarak salınabileceği ve numunenin her noktasından bu ikincil elektronların toplanmasıyla bir görüntü oluşturulabileceği prensibine dayanmaktadır. Yüksek çözünürlük elde etmek ve elektronların gaz molekülleriyle etkileşimini önlemek amacıyla SEM'in vakum altında çalışması temel bir gerekliliktir. Ek olarak elektron tabancasından üretilen ve yayılan birincil elektronlar, 1-40 keV aralığında ısıtma veya yüksek enerji uygulama yoluyla hızlandırılmaktadır. Bu yayılan elektronlar, vakumlu bir kolon içindeki manyetik alan mercekleri ve metal yarıklar tarafından monokromatik bir ışına (100 nm veya daha az çapa) odaklanmakta ve hapsedilmektedir. Sınırlı birincil elektronlar, tarama bobinleri tarafından bir raster deseninde numune yüzeyi boyunca taranmaktadır. Birincil elektron demeti numune yüzeyine çarptığında, numunenin yüzeye yakın alanıyla belirli bir derinliğe kadar birçok farklı şekilde etkileşime girmektedir. Numunelere doğru hızlandırılan elektronlar önemli miktarda kinetik enerjiye sahip olup, bu enerjiyi numunenin içinde kaybederken elektronların numune ile etkileşimlerinden doğan çeşitli sinyaller üretmektedir. Numunede hem elastik hem de elastik olmayan saçılmalar gerçekleşmektedir. Elektronların saçılması ve etkileşim hacmi, analiz edilen numunenin atom numarasına, atom konsantrasyonuna ve gelen elektron enerjisine (hızlandırma voltajı) bağlıdır. Elektron enerjisinin (hızlandırma voltajının) artırılması, etkileşim hacmini ve saçılma sürecini artıracaktır ki; eğer elementin atom konsantrasyonu ve atom numarası yüksekse, etkileşim hacmi ve saçılma düşük olacaktır. Benzer şekilde elektron ışınının geliş açısı da etkileşim hacmi ve saçılma sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle elektron ışınının geliş açısı, incelenen malzemenin atom numarası ve hızlandırma voltajı, numunenin içindeki etkileşimlerin gerçekleştiği hacim için ana faktörlerdir. Daha yüksek atom numarasına sahip malzemeler daha fazla elektronu emmekte veya durdurmaktadır ki böylece daha küçük bir etkileşim hacmi oluşturmaktadır. Benzer şekilde yüksek voltaj uygulanırsa, yüksek enerjili elektronlar üretilmekte ve böylece numunenin içine daha fazla nüfuz ederek daha büyük bir etkileşim hacmi oluşturmaktadır. Geliş açısı ne kadar büyükse (normalden ne kadar uzaksa), etkileşim hacmi o kadar küçük olmaktadır.

Bu tez çalışmasının son aşamasında safra taşı bileşenlerinin ve mikroyapısının dağılımı SEM kullanılarak gözlemlenmiştir. Yıkandıktan ve 60°C'de iki saat boyunca kurutulduktan sonra; taşlar birden fazla parçaya ayrılmış ve bir veya iki parça (10-20 mm boyutunda) örnek alınarak metal pimlere monte edilmiş, elektro-iletken bir yapıştırıcı kullanılarak örnek masasına sabitlenmiş ve ince bir altın tabakasıyla kaplanmıştır. Taşların yüzey morfolojisi, Temel

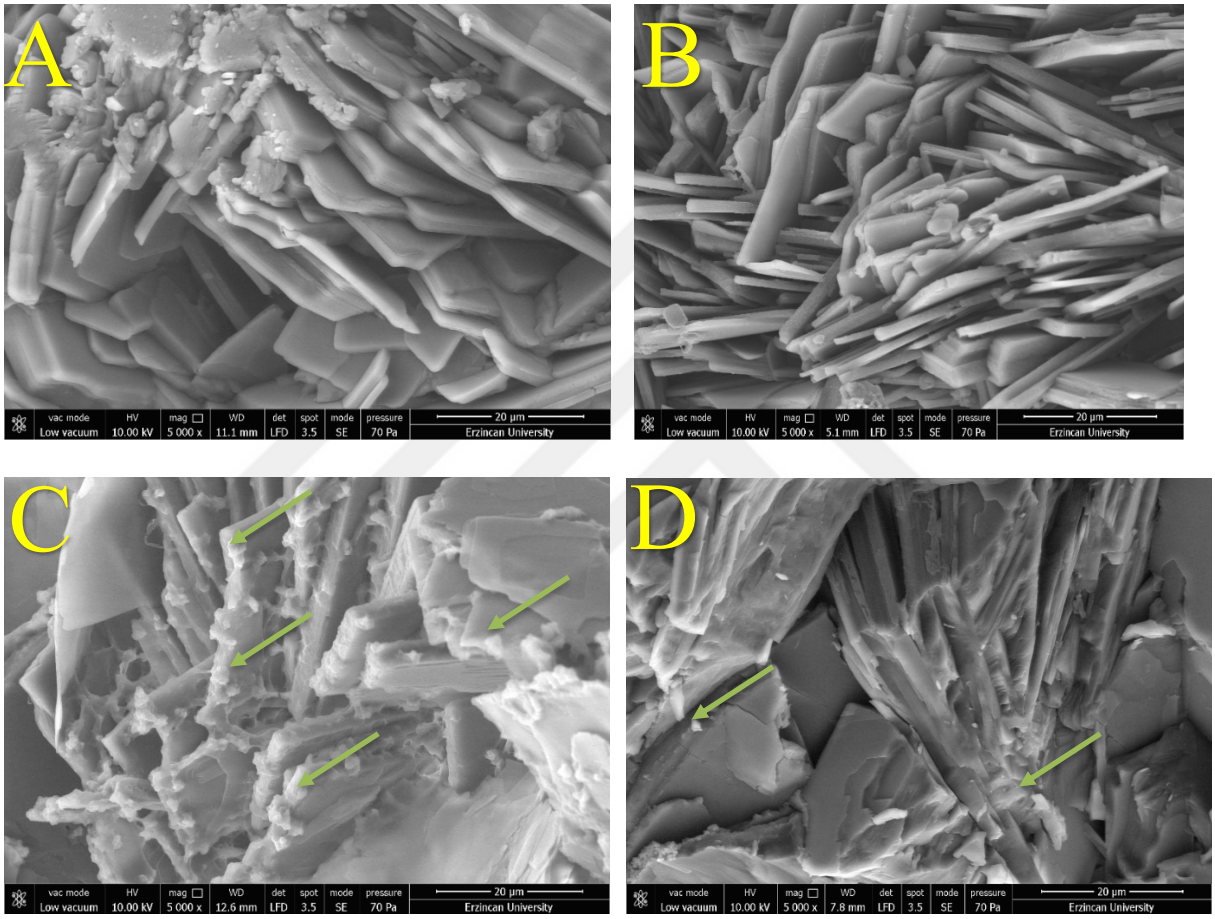
Bilimler Araştırma Laboratuarındaki alan emisyonlu FEI Quanta FEG 450 yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Quanta 450 taramalı elektron spektrometresi (SEM)

FEI Quanta FEG 450 yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu ile, numune hazırlama adımlarına ihtiyaç duymadan görüntüler alınmaktadır. 30kV'da ikincil elektronlarla minimum görüntüleme çözünürlüğü: Yüksek vakum çalışma modunda 1 nm veya daha iyi, düşük vakumlu çalışma modunda ise 5 nm veya daha iyi sonuçlar vermekte olup ayrıca -20 C ile +60 C arasında hassas sıcaklık kontrolü sağlanmaktadır. Bu çalışmada her bir safra taşının içeriği ve mikro yapısı, 1000, 3000, 5000 ve 10000 kat büyütme ile analiz edilmiştir. Seçilen bazı safra taşı örneklerinin SEM görüntüleri, Şekil 4.17-4.21. aralığında farklı ayrıntılar ve büyütmelerle birlikte sunulmuştur. Şekillerden de görülebileceği gibi, safra taşının tipi değiştiğinde SEM görüntülerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Kolesterol tipi taşlarda laminer veya radyal olarak üst üste binen sıkıca istiflenmiş plaka benzeri kolesterol kristalleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.17.). Şekil 4.17.A.'da sıkıca paketlenmiş (lamellar) benzeri kolesterol kristalleri, Şekil 4.17.B.'de levha şeklinde kolesterol kristalleri, Şekil 4.17.C.'de plaka benzeri kolesterol kristalleri üzerinde az miktarda bilurabin kristalleri, Şekil 4.17.D.'de lameller benzeri kolesterol kristalleri üzerinde az miktarda bilurabin kristalleri gösterilmiştir. Az sayıda da olsa bazı kolesterol tipi taşların yüzeyine yapışmış bilurabinat kristalleri Şekil 4.17.C ve D'de gözlemlenmiştir.

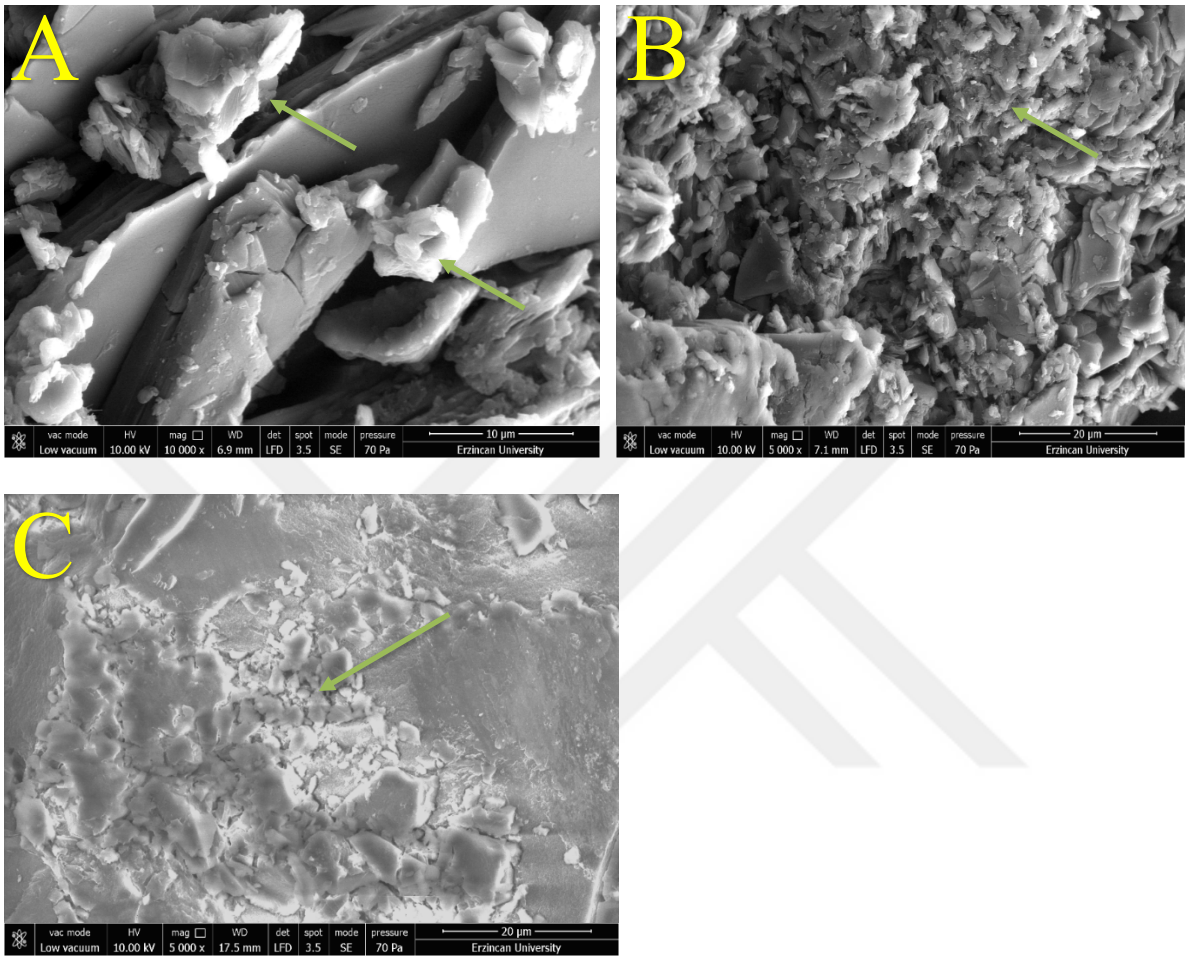


Şekil 4.17. Kolesterol taşlarının SEM görüntüleri

Çekirdekten dışarı büyüyen sıkıca istiflenmiş kolesterol kristallerinin radyal dağılımı SEM' de lamine, kordon benzeri ve düzensiz bir yapıda gözlenirken kolesterol monohidrat taşları kolesterol taşlarının tek kristal formu olup levha benzeri yüzey morfolojisi göstermiştir.

Farklı boyutlarda, düzensiz yapıda, pürüzlü bulbiform kristallerden oluşan bir mikro yapıya sahip olan bilurabin taşlarında, küre veya küme benzeri düzensiz bilurabin kristalleri

gözlemlenmiştir (Şekil 4.18.). Şekil 4.18.A.'da düzensiz kümeler halinde bilurabin kristalleri, Şekil 4.18.B.'de düzenli kümelenmiş bilurabin kristalleri ve Şekil 4.18.C.'de ise parçalanmış bilurabin kristalleri gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Bilurabin (pigment) taşlarının SEM görüntüleri

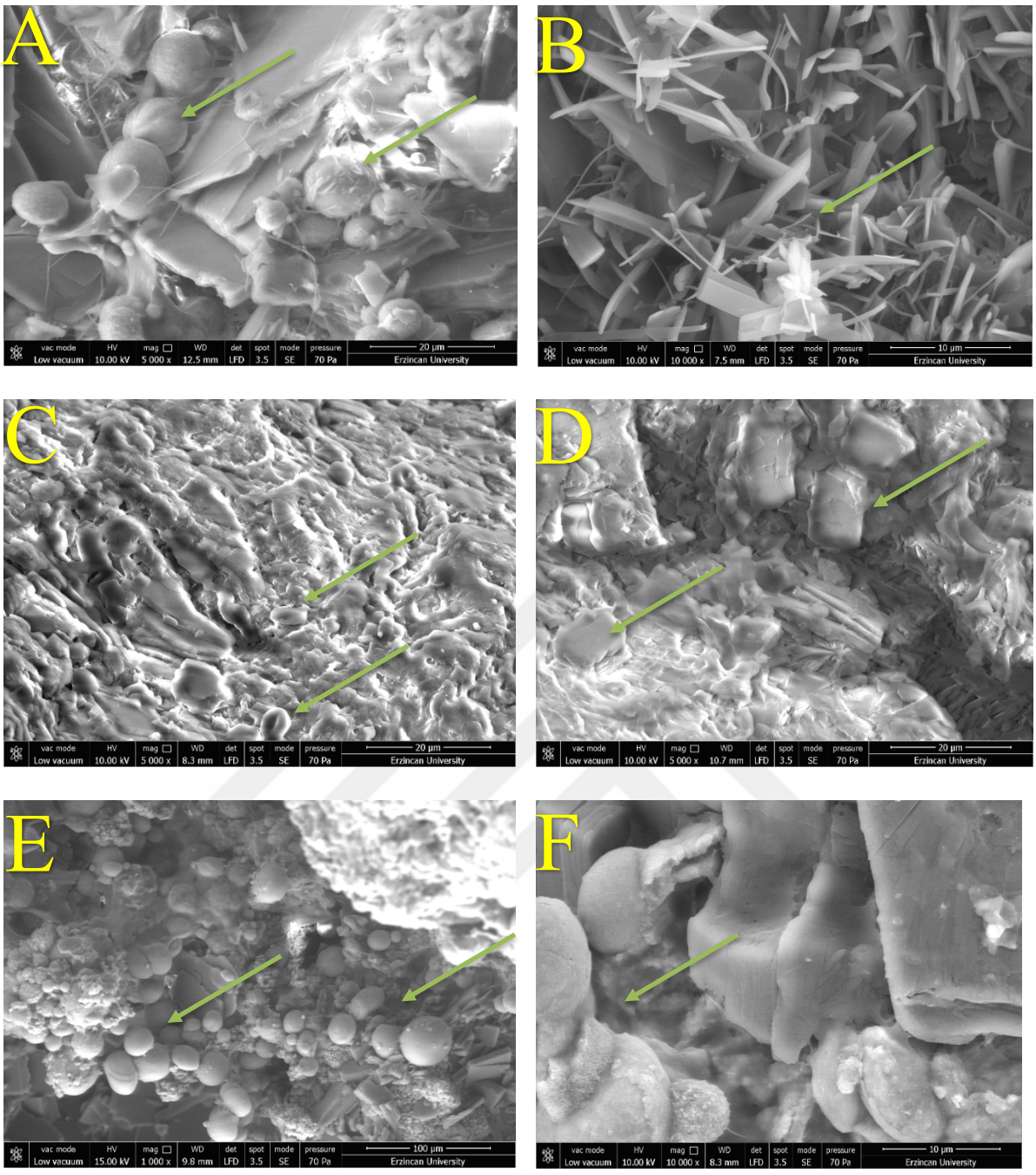
Daha önce yapılan çalışmalarda da (Cavalu vd., 2015, Jayasoma vd., 2022, Qiao vd., 2013) benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır. Bazı bilurabin taşlarının yüzeyinde çizgi benzeri proteinler ve küresel şekilli belirsiz nesneler gözlemlenmiş olup bunun muhtemel kaynağı olarak bakterilerin olabileceği düşünülmüştür. Çünkü proteinler, safra taşı oluşumunda önemli ön-nükleasyon kümeleri olarak belirtilmiştir (Binette vd., 2000; Sun vd., 2001). Belki de safrada rastgele yüzen çökeltiler, taş oluşumunu tetikleyen proteinlerle birlikte çekirdeklenme merkezleri olarak işlev görmektedir. Ayrıca Şekil 4.18.'de küresel şekilli belirsiz nesnelerin kaynağı olarak bakterilerin düşünülmesinin nedeni, bilurabin taşlarının oluşumunda bakteriyel enfeksiyonların rolünün önemli olmasıdır.

Kalsiyum karbonat taşları farklı şekillere sahip çeşitli kalsiyum karbonat kristallerinden meydana gelmekte olup kristal şekilleri en yaygın olarak soğan biçimli gözlemlenmiş, bunun yanı sıra elips, demet benzeri, iğne biçimli, alıç benzeri, küp, düğme, lameller, kırık odun benzeri, çubuk ve iğne şeklindeki kristaller de tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Şekil 4.19.A'da pürüzlü ve pürüzsüz yapıda soğan benzeri kalsiyum karbonat kristalleri, Şekil 4.19.B.'de iğne benzeri kalsiyum karbonat kristalleri, Şekil 4.19.C.'de alıç (düğme) benzeri kalsiyum karbonat kristalleri, Şekil 4.19.D.'de kübik yapıda kalsiyum karbonat kristalleri, Şekil 4.19.E.'de elipsoid ve küre benzeri şekilde kalsiyum karbonat kristalleri, Şekil 4.19.F.'de mantar benzeri kalsiyum karbonat kristalleri gösterilmiştir.

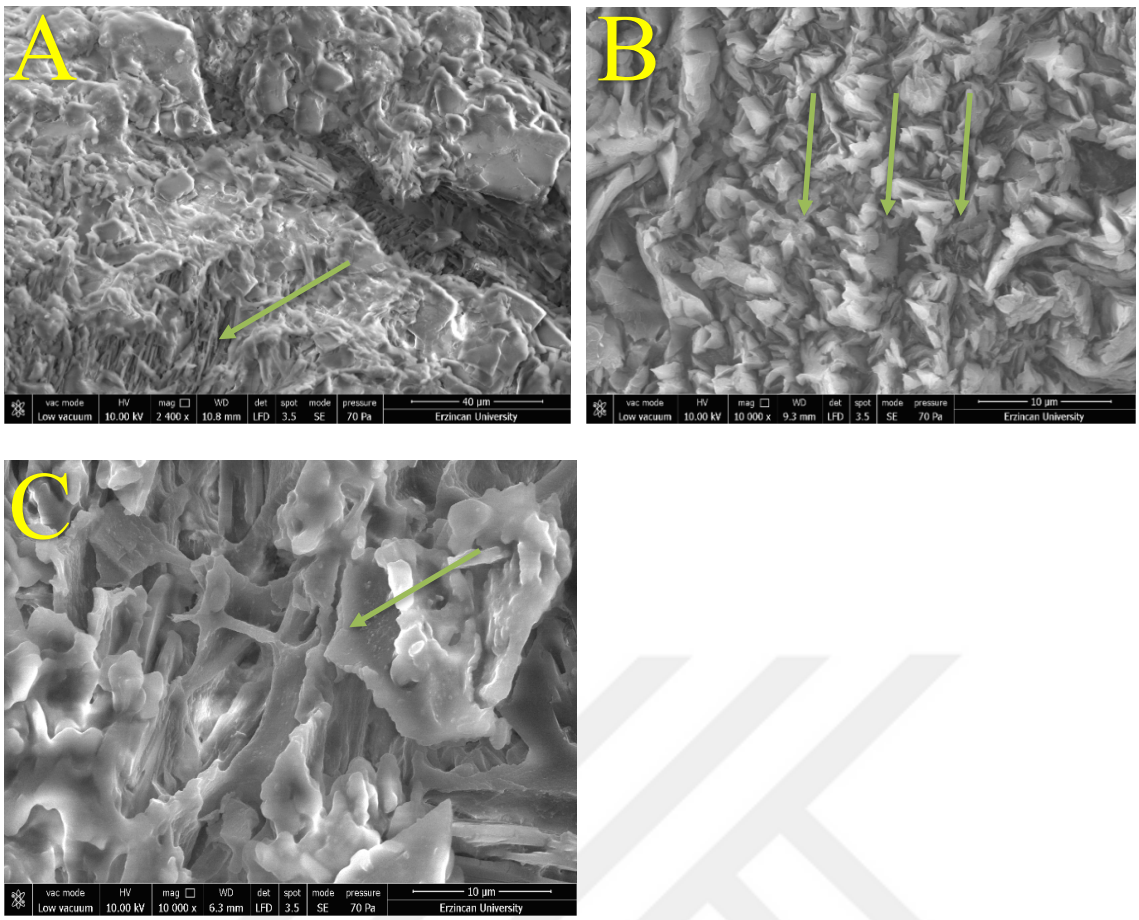
Fosfat taşları çoğunlukla farklı boyutlardaki ekin küresi veya pürüzlü soğan biçimli kristallerden ve bunlara yapışmış bilurabinat parçacıklarından oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). Kalsiyum stearat taşlarına genellikle yapışmış bilurabinat parçacıklarıyla ağsı bir yapıya sahip iken, protein taşları sıklıkla yapışmış bilurabinat parçacıklarıyla petek veya krizantem yaprağı yapısına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.20.A.'da ağ yapısı şeklinde kalsiyum stearat kristalleri, Şekil 4.20.B.'de kademeli düzenlenmiş ağ şeklinde kalsiyum stearat kristalleri (protein kristalleri), Şekil 4.20.C.'de ise mercan biçimli protein ve billirubin kristalleri gösterilmiştir.

SEM altında incelenen karışık taşların şekli ve mikro yapısı, karışımdaki farklı bileşenlerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Kolesterol-bilurabinat karışık taşları, esas olarak plaka benzeri veya lameller kolesterol kristalleri ve düzensiz bilurabinat parçacıklarından oluştuğu belirlenmiştir.

Bilurabinat-kalsiyum karbonat karışık taşları esas olarak düzensiz bilurabinat parçacıkları ve birçok farklı şekilde kalsiyum karbonat kristallerinden oluştuğu tespit edilmiştir.

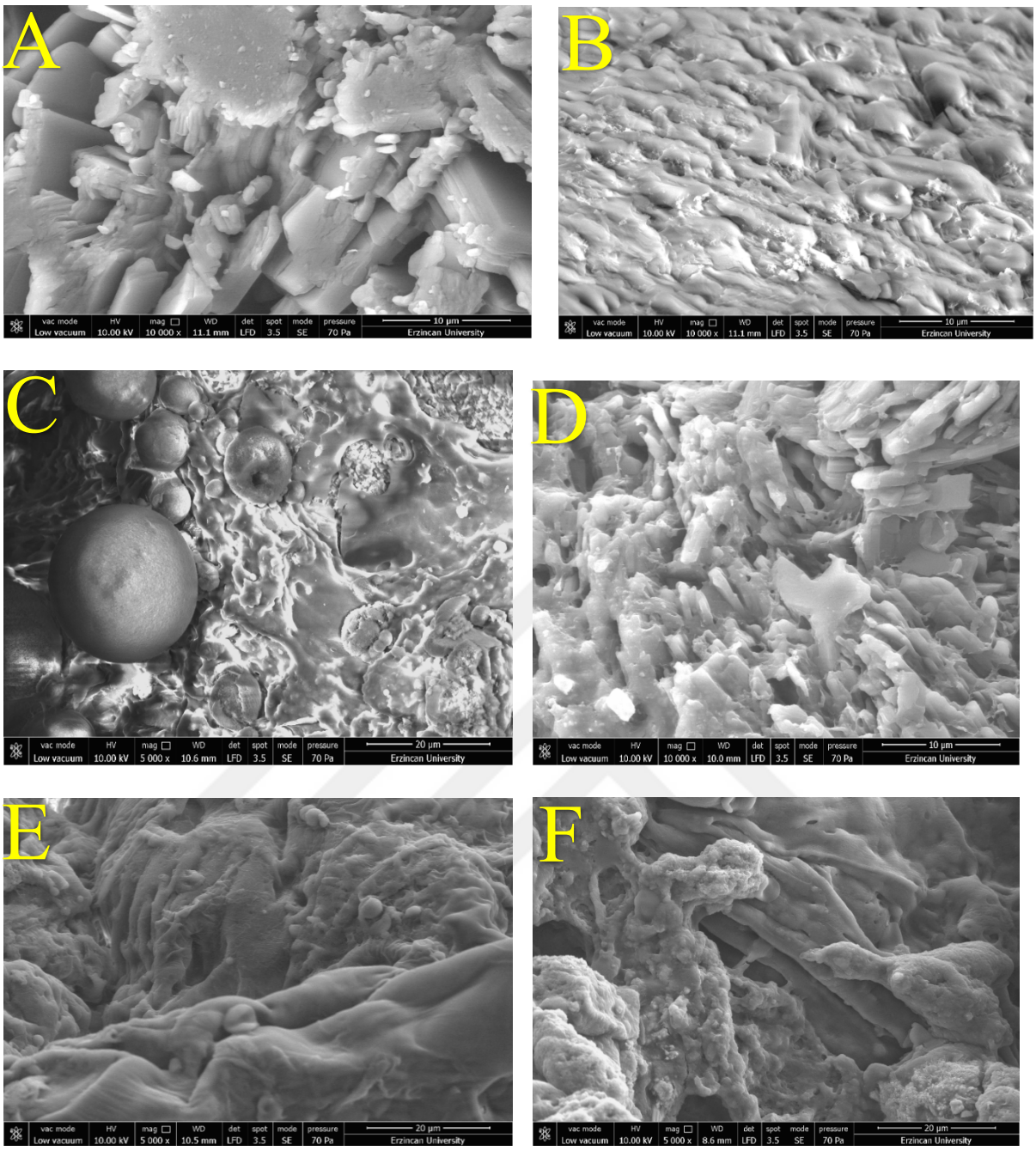


Şekil 4.19. Kalsiyum-karbonat taşlarının SEM görüntüleri



Şekil 4.20. Fosfat-kalsiyum stearat ve protein taşlarının SEM görüntüleri

Kolesterol-kalsiyum karbonat karışık taşları esas olarak plaka benzeri veya lameller kolesterol kristalleri ve birçok farklı şekilde kalsiyum karbonat kristallerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Bilurabinat-fosfat karışık taşları esas olarak düzensiz bilurabinat parçacıkları ve fosfat parçacıklarından oluştuğu belirlenmiştir. Karışık taşların SEM görüntülerine bakarak (Şekil 4.21.), laminer veya radyal örtüşen düzende, pul benzeri veya iğne benzeri bilurabinat kristallerinin birikintisine sahip olduğunu da söyleyebiliriz. Plaka benzeri kolesterol kristalleri, düzensiz bilurabinat parçacıklar, kalsiyum karbonat kristalleri ve kalsiyum sterat ağ yapısı bu çalışmada gözlemlenmiştir. Şekil 4.21.A.'da kolesterol-bilurabin karışık kristalleri, Şekil 4.21.B.'de yuvarlak şekilli bilurabin ve $CaCO_3^{2-}$ karışık kristalleri, Şekil 4.21.C.'de kolesterol-$CaCO_3^{2-}$ karışık kristalleri, Şekil 4.21.D.'de billirubin-kalsiyum stearat karışık kristalleri, Şekil 4.21.E.'de kolesterol-billirubin-$CaCO_3^{2-}$ karışık kristalleri, Şekil 4.21.F.'de kolesterol-bilurabin-fosfat karışık kristalleri gösterilmiştir.



Şekil 4.21.Karışık kristallerin SEM görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Safra taşları ilk olarak 1507 yılında Antonio Benivenius tarafından safra kesesinde veya safra yollarında anormal kitleler şeklinde katı safra birikintileri şeklinde tanımlanmıştır. Bu birikintilerin boyutu, şekli, rengi ve bileşimi, oluşturan maddenin çözünürlüğüne ve doygunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Bugün safra taşlarının nasıl oluştuğu ile ilgili çok fazla bilgiye sahibiz. Fizyolojik olmayan kolesterol aşırı doygunluğu, hızlandırılmış kolesterol çekirdeklenmesi/kristalleşmesi, safra kesesi hipomotilitesi ve bağırsaktan gelen kolesterol miktarının artması gibi bazı nedenler oluşumu anlatırken temel nedenler olarak sıralanmaktadır. Unutulmamalı ki kristallerin safra taşı oluşturacak şekilde büyümesi esnasında, hem safra kesesi mukusunun aşırı salgılanması hem de safra kesesi tarafından eksik boşaltımla birlikte jel oluşumu gibi çoklu parametrlere göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca bu yüzyılda semptomatik safra taşlarının cerrahi tedavisinde teknik gelişimler artmaktadır. Cerrahi yöntemlerle taş çıkarımı temel tedavi yöntemi olarak benimsenmiş gibi görünüyor. Ancak safra taşlarının önlenmesine de yeterli önem verilmelidir ki önümüzdeki yüzyıllarda artan farkındalık ve sürdürebilir sağlık hizmeti yaklaşımına rahat geçiş yapabilelim. İşte bu noktadan hareketle, safra taşlarının fizikokimyasal, biyokimyasal analizlerinin yanısıra genetik ve moleküler biyolojik kanıtlarla birlikte değerlendirilerek önleyici çalışmalar yapılabilir. Etkili önleme stratejilerinden birkaçını şu şekilde sıralayabiliriz: Genetik ve çevresel risk faktörleri sistematik olarak profillendirilebilir, orta ve yüksek düzeyde hasta grupları ayrılabilir, nüks grubu belirlenebilir, yüksek kalorili diyet veya hızlı kilo kaybı gibi dışsal faktörlerden kaynaklanan hastalarda tetikleyici faktörler denetim altına alınabilir, gebelikte risk altında olan hastalar belirlenebilir. Taş bazlı ürolojik ve gastroenterolojik bozuklukların tanısında rutin klinik uygulamaların yanısıra FTIR, XRF, XRD ve SEM gibi tekniklerinin potansiyel kullanımıda göz ardı edilmemelidir. Çeşitli taş örnekleri incelenebilir, element içerikleri ölçülebilir ve ilgili hasta klinik bilgileriyle ilişkilendirmelerde yapılabilir. Bu tekniklerle; taş örneklerinin ayrıntılı elementel yapılarının analizleri sağlanabilir ve deneysel verilere dayanarak taş oluşum hipotezleri oluşturulabilir.

Safra taşı hastalığının mekanizması, etiyolojisi ve patogenezi doğru anlaşılırsa ancak doğru tedavi yöntemleri önerilebilir. Bu nedenle de safra taşlarının yapısal özelliklerinin ayrıntılı olarak belirlenmesi oldukça gereklidir. Farklı fiziksel yöntemlerin (spektroskopik tekniklerin) farklı sonuçlar verebileceği akılda tutulmalı ve sonuçların diğer spektrometretrik yöntemlerle

de ayrıca kontrol edilmesi uygun olacaktır. İşte bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında safra taşı hastalığının etiyopatogenezinde rol oynayan faktörleri doğru tanımlayabilmek için; taşların karakteristik mikro yapılarını, morfolojilerini, ana kimyasal bileşenlerini, farklı elementel bileşimlerini ya da dağılımlarını belirleyebilmek adına FTIR, XRD ve SEM gibi spektrometrik teknikler kullanılmıştır. Çoklu analitik yöntemlerin uygulanması, geleneksel sınıflandırmadan daha zor olsada doğru bir sınıflandırma yöntemi olacaktır.

İlk olarak bu çalışmada taşlarının rengi, morfolojisi ve bileşimine dayanarak sınıflandırma yöntemleri önerilmiştir. Taşların dokusu, iç organizasyonu ve rengine dayalı morfolojik kriterler göz önünde bulundurularak safra taşları beş gruba ayrılmıştır (Şekil 3.15-3.19.). Yüzey beyaz veya açık kahverengi, taş yuvarlak ve sayıca bir ya da çoklu ise saf kolesterol (Şekil 3.15.) taşı olarak kabul edilmiştir. Bu türden taşların kesit yüzeyleri parlak ve taşın merkezinden dışa doğru bir yayılım göstermiştir (Şekil 4.1.A., 4.1.C., 4.1.E., 4.1.F.). Ayrıca kolesterol taşlarının bazılarının merkesinde kahverengi bir merkez bölge tespit edilmiştir (Şekil 4.1.B., 4.1.D.). Koyu kahverengi veya kahverengi-siyah renkteki taşlar, bilurabin taşlarını yani bilurabinin türevlerini içeren taşları göstermiştir (Şekil 4.1.I ve 4.1.L.). Kalsiyum karbonat açısından zengin taşlar ise; zayıf organize, kırılgan, gri ile kahverengi-siyah veya bazen açık sarı-kahverengi arasında değişen farklı renklerde, kompakt konsantrik bir yapıda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.J. ve 4.1.O.). Kalsiyum fosfat açısından zengin taşlarda, içyapı genellikle düzensiz ve rengi koyu kahverengiden siyaha kadar değişik renglerde belirlenmiştir (Şekil 4.1.Q. ve 4.1.V.). Hem kolesterol hem de bilirubanttan oluşan taşlar siyah taş olarak tespit edilmiş olup yüzeyler arasında belirgin sınırlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.W.). Diğer karışık taşlarda (kolesterol-bilurabin-karbota ve veya fosfat içeren) ise siyah belirsiz bir radyal yapı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.U.). Siyah taşların içi ve dışı tamamen siyah renkte olup, düzensiz şekillerinin ve yapılarının yanısıra, küçük ve nispeten çok sayıda taştan oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.18.).

Bazı taşların yüzeyleri tek başına bilgi içermediğinden çoğu taşı keserek inceledik. Kolesterol bilurabant taşların kesit görüntüsünde, açık kahverengi kolesterol kristalinin dış ve iç katmanları arasında yer alan koyu kahverengi bilurabant yapısı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.G. ve 4.1.M.). Koyu kahverengi lamine yapıdaki bilurabant taşı ağaç gövdesini andıran bir dizi sıralama içermektedir (Şekil 4.1.S.). Şekil 4.1.E., 4.1.K., 4.1.J., 4.1.N. ve 4.1.R.'de görüldüğü gibi; taş kesitleri, bazen düzensiz, bazen konsantrik veya radyal, farklı renklere sahip farklı yapıların bir dizisini ortaya çıkarabilir ki, bu da hem farklı bir bileşimi hem de litogenik

faktörlerin evrimini düşündürmektedir. Bu türden bir sınıflama nispeten kaba bir muayene olup büyük ölçüde muayene edenin deneyimine bağlıdır ve bu da doğruluğunu yorumlayıcı ekseninde değişken hale getirmektedir.

Hızlı, yüksek hassasiyetli, tekrarlanabilir ve analizlerde sadece küçük bir numune gerektirdiği için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR), bileşen analizine dayalı safra taşı sınıflandırmasında giderek daha fazla kabul görmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasının diğer bir aşamasında safra taşı oluşum mekanizmasının araştırılması için etkili bir araç olan FTIR ile analizler yürütülmüştür. Safra taşlarında kolesterol baskın bir kimyasal bileşen olup, FTIR spektrumları Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Safra taşı örneklerindeki kolesterol, CH_2 ve CH_3 gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklan 2800 ve 3000 cm^{-1} aralığındaki güçlü bantların varlığıyla karakterize edilmiştir. Safra taşlarının FTIR spektrumunda görünen bantlar 2929, 2865, 1463, 1375 ve 1054 cm^{-1}'dedir ve bunlar safra taşı örneklerinde yüksek kolesterol içeriğinin varlığını gösteren ana ve güçlü bantlardır. Kolesterol molekülünün –OH gerilmesinden kaynaklanan yaklaşık 3418 cm^{-1}'de geniş ve yoğun bir bant gözlemlenmiştir. Kolesterol molekülünden kaynaklanan bantların yoğunlukları güçlüdür ve bu da kolesterolün baskın bir molekül olarak varlığını kanıtlamaktadır. Bilurabinden kaynaklanan 1624 ve 1656 cm^{-1}' deki karakteristik bantların bilurabin/bilurabinat tuzlarından kaynaklandığını söyleyebiliriz. Kolesterol molekülünden kaynaklanan bantların yoğunlukları güçlü iken (bu da kolesterolün baskın bir molekül olarak varlığını gösterir), bilurabin tuzlarından kaynaklanan bantların yoğunlukları orta düzeyde ve nispeten daha zayıf olup bu da bilurabin tuzlarının safra taşlarında ikincil bir bileşen olarak varlığını göstermiştir. 839 cm^{-1} ve 1463 cm^{-1}'deki bantların varlığı, safra taşında $CaCO_3^{2-}$'nin varlığını göstermektedir, bu bantlar, $CaCO_3^{2-}$'teki $CaCO_3^{2-}$ ün C-O bükülmesinden ve C-O gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Safra taşlarının FTIR analizlerine dayanarak; tespit edilen ana bileşenin kolesterol olduğunu, $CaCO_3^{2-}$'ün küçük bileşenler halinde bulunduğunu, bu bileşenlerin saf kolesterol safra taşının oluşumundan sorumlu olduğunu söyleyebiliriz.

FTIR spektroskopik yöntemi, çok sayıda safra taşı örneğinin rutin analizi için zaman, personel ve ekonomik açıdan pratik bir yöntemdir. Ancak bu çalışma, safra taşı bileşenlerinin absorbsiyon bantlarının sıklıkla üst üste bindiğini ve bağlı suyun absorbsiyonunun kalsiyum bilurabinat safra taşlarının FTIR spektrumunun yorumlanmasını zorlaştırdığını ortaya koymuştur. Safra taşlarının yalnızca FTIR kullanılarak sınıflandırılmasında dikkatli olunmalıdır ve FTIR spektrumunun yorumlanmasına gereken özen gösterilmelidir. Öyle ki

safra taşlarının bileşenlerini ve oluşumunun etiyolojisini anlamak için çeşitli analitik teknikler kullanılarak daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

FTIR'de analiz esnasında örnek gereksinimi çok küçük olduğundan (1,2 mg), özellikle heterojen dağılıma sahip amorf taşlar gibi karmaşık taşlar için bazen doğru sonuçlar vermemektedir. Protein taşları, amid ve kalsiyum bilurabinatın titreşim bantlarının örtüşmesi nedeniyle FTIR analizi yoluyla bilurabin taşı olarak değerlendirilebilir (Liu vd., 2002). Bu yüzden benzer hataların önüne geçebilmek için X-ışını kırınım spektrometresi gibi farklı bir analiz yolu gerekmektedir.

Tez çalışmasının bu aşamasında bahsedilen elverişsiz noktalar göz önüne alınıp, safra taşları X-ışını kırınım (XRD) spektrometresi ile analiz edilmiştir. XRD desenlerine dayanarak, karışık ve bilurabin safra taşlarının, susuz ve monohidrat kolesterol formlarıyla birlikte kalsiyum bilurabinat kompleks oluşumuna sahip yapıda olduğunu doğruladığımızı söyleyebiliriz. Bilurabin taşlarında kalsiyum bilurabinat ve az miktarda kolesterol olduğunu gözlemledik. Hem saf kolesterolde hem de karışık safra taşlarında bulunan kristal fazları belirlemek için XRD analizi yapılmıştır. Şekil 4.12'dende görülebileceği üzere, kristalleşmiş kolesterolün (001) düzlemine karşılık gelen 16,88°'lik bir 2θ açısında (5,24 Å'lik d-aralığı) keskin bir tepe noktası belirlenmiştir. Saf kolesterol taşı için XRD analizlerinden, standart desenle tutarlı d-aralık değerleri bulunmuş olup 5,34° ((100) düzlemi), 14,12° ((101) düzlemi), 15,32° ((102) düzlemi), 16,88° ((001) düzlemi), 18,09° ((200) düzlemi), 19,34° ((201) düzlemi) ve 21,14° ((211) düzlemi)'nde belirgin kırınım tepeleri gözlemlenmiştir. Bu Miller indeksleri bize analiz edilen örneklerdeki kolesterolün kristal yapısını doğrulamıştır. Şekil 4.1.5.'de karışık safra taşları için elde edilen XRD desenlerini gösterilmiştir. Çalışmada tanımlanan diğer bileşenlere kıyasla kolesterol için daha yoğun yansıma çizgileri tespit edilmiştir. Kolesterol, kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfatın varlığı da XRD verileri ile doğrulanmıştır. XRD'nin hem kimyasal hem de mineralojik karakterizasyona olanak tanıyarak safra taşlarında bulunan kristal fazların tanımlanmasında önemli bir spektrometrik teknik olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca XRD sonuçlarımız ile daha önce FTIR analizi ile tanımladığımız diğer tüm kimyasal bileşiklerin varlığını doğrulamış olduk. Bu tez çalışması ile safra taşlarının çeşitli bileşime sahip olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Hem saf kolesterol hem de karışık safra taşlarının incelemelerine dayanarak; potansiyel olarak farklı kristal oluşum mekanizmalarının olduğunu, bilurabin ve kalsiyum tuzlarını içeren karışık taşlarda düşünüldüğünde, kristalleşme sürecini etkileyen

faktörlerin daha karmaşık bir süreç içerisinde ilerlediğini söyleyebiliriz. Çeşitli kimyasallar nasıl etkileşime girmekte ve safra taşı oluşumuna nasıl katkı sağlamakta sorularının cevaplanamsı için daha fazla araştırma gerekmektedir.

SEM, güçlü büyütmesi, geniş alan derinliği, yüksek çözünürlüğü ve güçlü boyut algısı nedeniyle taşın mikro yapısının değerlendirilmesi için uygundur. Seçilen safra taşı örneklerinin SEM görüntüleri, Şekil 4.17-4.21 farklı ayrıntılar ve büyütmelerle birlikte verilmiştir. Kolesterol ağırlıklı safra taşının mikro yapısını incelediğimizde; laminer veya radyal yapıda, kordon benzeri, düzensiz veya kademeli bir dizilimle bir araya gelerek üst üste binip, sıkıca istiflenip, plaka benzeri veya lameller şeklinde kolesterol kristallerinden meydan geldiğini Şekil 4.17.'de görmekteyiz. Plaka benzeri kolesterol monohidrat kristallerinin kristalleşmesi ve çökelmesi bizlerde kolesterolün safra taşlarının oluşumuna yol açmasının çok faktörlü olduğunu düşündürmektedir. Yani taşın oluşumu aralıklı bir süreç olup, aşırı doymuş kolesterol önce kristalleşip bir çekirdek etrafında çökelir ki ardından da kıvrımlı katmanlar halinde birikir. Sonuç olarak, kolesterol kristalleri katmanlı, kordon benzeri bir yapıda düzenlenip sonunda da kolesterol taşı oluştururlar. Bazen az miktarda bilurabinat kristali (beyaz oklarla işaretlenmiş hem fosfat hem de kalsiyum bilurabinat) Şekil 4.17.A ve 4.17.C.'de verilmiştir. SEM karışık taşların laminer veya radyal örtüşen bir düzene ve Şekil 421.'de gösterildiği gibi pul benzeri veya iğne benzeri bilurabinat birikintilerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Karışık taşların çoğu belirgin katmanlı yapı göstermiş olup buda bizlere taşların oluşumunun uzun süreli ve aralıklı bir süreç olduğunu ve birçok faktörün birleşik etkisinin sonucunda meydana geldikleini düşündümüştür. Farklı tipteki safra kesesi taşlarının mikro yapısı birbirine benzemeyip kendi içlerinde ise belirli özelliklere sahip olup bu özellikler de, oluşum mekanizmalarına dair önemli objektif kanıtlar sunmaktadır. Bilurabinli safra taşları, farklı boyutlarda küre benzeri ya da küme benzeri, düzensiz, pürüzlü, gevşek bi şekilde düzenlenmiş bilurabinat kristallerden oluşan bir mikro yapıya sahip olup Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Profilin çevresinde ve merkezinde az sayıda bilurabinat partikülüne yapışmış düzensiz kristaller Şekil 4.20.'de halinde fosfat parçacıklarının bilurabinatla sarılmış olduğu görülmüştür. SEM, kalsiyum karbonat taşlarının çeşitli kalsiyum karbonat kristallerinden oluştuğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.19.). Kristal şekilleri ise yaygın olarak elips, demet benzeri, iğne şeklinde, alıç benzeri, küp şeklinde, düğme şeklinde, lamelli, kırık odun benzeri, çubuk, iğne şeklinde gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, safra kesesi taşlarının 5 tipe ayrılabileceğini ve farklı tipteki taşlara sahip hastaların farklı klinik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, farklı taş tiplerinin farklı oluşum mekanizmalarına sahip olabileceğini de öne sürmekteyiz. Bu nedenle safra taşı olan hastaların safra taşları, ameliyat sonrası doğru bir şekilde analiz edilmeli ve sınıflandırılmalıdır. Bu yalnızca bireysel tedavi ve önleme için değil, aynı zamanda farklı taş tiplerinin farklı bölgelerdeki dağılımını analiz etmek ve buna uygun önleyici stratejiler geliştirmek için de büyük önem taşımaktadır. Ayrıca safra kesesi taşı oluşumu üzerine yapılacak daha ileri araştırmalar için önemli veriler sağlayabilir. Doğru sınıflandırma safra taşı oluşumu araştırması için bir ön koşuldur. Bu çalışma geleneksel sınıflandırmaya kıyasla daha doğru olan safra taşları için yeni bir sistematik sınıflandırma sunmaktadır. Safra taşlarının yapısı ve bileşimi, taş oluşum süreci hakkında bilgi vermektedir. Bu tez çalışması, farklı tipteki safra kesesi taşlarının karakteristik mikro yapılarına ve morfolojilerine, ayrıca farklı element bileşimine ve dağılımına sahip olduğunu ve farklı tipteki safra kesesi taşlarının oluşum mekanizmasının aynı olmadığını göstermektedir. Bu çalışma, safra kesesi taşı oluşumu üzerine yapılacak daha ileri araştırmalar için objektif bir temel sağlarken, safra kesesi taşlarının tedavisi ve önlenmesi açısından da büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

Admirand, W. H., & Small, D. M. (1968). The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *The Journal of clinical investigation*, *47*(5), 1043-1052.

Alaıkhtarlu, A. (2024). Farklı spektrometrik teknikler kullanarak böbrek taş türlerinin belirlenmesi ve analiz sonuçlarının karşılaştırılması. *Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.*

Alatise, O. I., Obiajunwa, E. I., Lawal, O. O., & Adesunkanmi, A. R. (2010). Particle-induced X-ray emission (PIXE) analysis of minor and trace elements in gallstones of Nigerian patients. *Biological trace element research*, *134*(1), 13-24.

Alexander, K. S., Dollimore, D., Dunn, J. G., Gao, X., & Patel, D. (1993). The determination of cholesterol, calcium carbonate and calcium oxalate in gallstones by thermogravimetry. *Thermochimica acta*, *215*, 171-181.

Al-Jameel, M. (2024). *Tüketilen farklı içeceklerin diş yüzeyinde oluşturabileceği erozyonun taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmesi. Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.*

Al-Kinani, A. T., Harris, I. A., & Watt, D. E. (1984). Analysis of minor and trace elements in gallstones by induction of characteristic ionising radiation. *Physics in Medicine & Biology*, *29*(2), 175.

Ashok, M., Rautray, T., Nayak, P., Vijayan, V., Jayanthi, V., & Narayana Kalkura, S. (2003). Energy dispersive X-ray fluorescence analysis of gallstones. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *257*(2), 333-335.

Ashok, M., KALKUPA, S. N., Kennedy, V. J., Markwitz, A., Jayanthi, V., Nair, K. G. M., & Vijayan, V. (2002). Trace element analysis of south Indian gallstones by PIXE. International Journal of PIXE, 12(03n04), 137-144.

Ashok, M., Krishnan, A., Choudhury, G., Kalkura, N. S., & Jayanthi, V. (2012). Regional differences in composition of cholesterol gallstones in India. Journal of Medical Science and Research, 3(1), 3.

Athanasiadou, D., Godelitsas, A., Sokaras, D., Karydas, A. G., Dotsika, E., Potamitis, C., Zervou, M., S,Xanthos., E, Chatzitheodoridis., E, Gooi HC.,. & Becker, U. (2013). New insights into the chemical and isotopic composition of human-body biominerals. I: Cholesterol gallstones from England and Greece. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *27*(2), 79-84

Bakthavatchalam, J. Venkataraman, R.J. Ramana, M. Jain, B. Singh, A. K. Thanigai, V. Velyoudam, S. Manickam Neethirajan, M.K. Tiwari, A.K. Agarwal, N.S. Kalkura (2019) 381–387. Morphological and elemental mapping of gallstones using synchrotron microtomography and synchrotron X-ray fluorescence spectroscopy, *JGH Open.* 3

Bassi, N., Del Favero, G., Meggiato, T., Scalon, P., Ghiro, S., Molin, M., Pilotto, A., Vigneri, S., Savarino, V.,Mela GS., & Di Mario, F. (1994). Are morphology and composition of gallstones related? An X-ray diffraction study. *Current therapeutic research*, *55*(10), 1169-1175.

Bazin, D., & Daudon, M. (2012). Pathological calcifications and selected examples at the medicine–solid-state physics interface. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *45*(38), 383001.

Bernades, P., Bertrand, L., Bouvry, M., Colin, R., Geffroy, Y., Hecht, Y., Klepping, C., Lambert, R., Levy, V.G.,Michel, H., Paliard, P., Paris, J., & Quinton, A. (1982). Treatment of cholesterol gallstones with ursodesoxycholic acid (author's transl). *La Nouvelle Presse Medicale*, *11*(8), 587-589.

Binette, J. P., & Binette, M. B. (2000). The proteins and the formation of gallstones. *Clinica chimica acta*, *296*(1-2), 59-69.

Bonnett, R., Davies, J. E., Hursthouse, M. B., & Sheldrick, G. M. (1978). The structure of bilurabin. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *202*(1147), 249-268.

Bunaciu, A. A., Fleschin, S., & Aboul-Enein, H. Y. (2014). Biomedical investigations using Fourier transform-infrared microspectroscopy. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *44*(3), 270-276.

Carulli, N., Loria, P., Bertolotti, M., De Leon, M. P., Menozzi, D., Medici, G., & Piccagli, I. (1984). Effects of acute changes of bile acid pool composition on biliary lipid secretion. *The Journal of clinical investigation*, *74*(2), 614-624.

Cavalu, S., Popa, A., Bratu, I., Borodi, G., & Maghiar, A. (2015). New evidences of key factors involved in "Silent Stones" etiopathogenesis and trace elements: microscopic, spectroscopic, and biochemical approach. *Biological trace element research*, *168*(2), 311-320.

Cetta, Francesco. (1991). The role of bacteria in pigment gallstone disease. *Annals of surgery*, *213*(4), 315.

Chakraborti, S., Chakraborti, T., Mandal, M., Mandal, A., Das, S., & Ghosh, S. (2002). Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review. *Molecular and cellular biochemistry*, *238*(1), 163-179.

Chandran, A. P., Sivarajan, R. R., Srinivas, M., Srinivasan, V., & Venkataraman, J. (2013). Risk factors for choledocholithiasis in a south Indian population: A case–control study. *Indian Journal of Gastroenterology*, *32*(6), 381-385.

Chandran, P., Garg, P., & Pundir, C. S. (2005). Correlation between chemical components of billary calculi and bile & sera and bile of gallstone patients. *Indian Journal of clinical biochemistry*, *20*(2), 81-85.

Cheng, C. L., Chang, H. H., Chen, T. H., Tsai, P. J., Huang, Y. T., Huang, P. J., & Lin, S. Y. (2016). Spectral and morphological classification of different chronic and acute Taiwanese gallstones via FTIR, SEM and ESEM-EDX microanalyses. *Digestive and Liver Disease*, *48*(5), 519-527.

Chihara, G., Kobayashi, E., Mizushima, A., Shirakuma, K., & Kameda, H. (1960). Medical and biochemical application of infrared absorption spectra. IV. Studies on gall stones by infrared spectra and their new classification. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *8*(9), 771-777.

Chowdhury, A. H., & Lobo, D. N. (2011). Gallstones. *Surgery (Oxford)*, *29*(12), 610-617.

Costa, C. J., Nguyen, M. T. T., Vaziri, H., & Wu, G. Y. (2024). Genetics of gallstone disease and their clinical significance: A narrative review. *Journal of clinical and translational hepatology*, *12*(3), 316.

Cox, M. R., Eslick, G. D., & Padbury, R. (Eds.). (2018). *The management of gallstone disease: a practical and evidence-based approach*. Springer.

Craven, B. M. (1976). Crystal structure of cholesterol monohydrate. *Nature*, *260*(5553), 727-729.

Cussler, E. L., Evans, D. F., & DePalma, R. G. (1970). A model for gallbladder function and cholesterol gallstone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *67*(1), 400-407.

Çimen, O., Keskin Çimen, F., Durdağı, S., Gedik, H.(2025). Differentiation of gallbladder stones according to their external structure and cross-sectional morphological features such as color, size and shape. *Journal of anatolian physics and astronomy*, 4(1), 24-31.

Danilatos, G. D. (2013). Electron scattering cross-section measurements in ESEM. *Micron*, *45*, 1-16.

Di Ciaula, A., Garruti, G., Frühbeck, G., De Angelis, M., De Bari, O., Wang, D. Q. H., F. Lammert., & Portincasa, P. (2019). The role of diet in the pathogenesis of cholesterol gallstones. *Current medicinal chemistry*, *26*(19), 3620-3638.

Diehl, A. K., Sugarek, N. J., & Todd, K. H. (1990). Clinical evaluation for gallstone disease: usefulness of symptoms and signs in diagnosis. *The American journal of medicine*, *89*(1), 29-33.

Dutta, U., Nagi, B., Garg, P. K., Sinha, S. K., Singh, K., & Tandon, R. K. (2005). Patients with gallstones develop gallbladder cancer at an earlier age. *European journal of cancer prevention*, *14*(4), 381-385.

Donovan, J. M., & Carey, M. C. (1991). Physical-chemical basis of gallstone formation. *Gastroenterology Clinics of North America*, *20*(1), 47-66.

Dowais, R., Al Sharie, S., Araydah, M., Al Khasawneh, S., Haddad, F., & AlJaiuossi, A. (2021). Pearl-white gallstones: A report of a case and a chemical analysis by FTIR and XRD. *International Journal of Surgery Case Reports*, *87*, 106449.

Fawcett, W. J., Haxby, E. J., & Male, D. A. (1999). Magnesium: physiology and pharmacology. *British journal of anaesthesia*, *83*(2), 302-320.

Festi, D., Reggiani, M. L. B., Attili, A. F., Loria, P., Pazzi, P., Scaioli, E.,Capodicasa S., Ramano F., Roda E., & Colecchia, A. (2010). Natural history of gallstone disease: expectant management or active treatment? Results from a population-based cohort study. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *25*(4), 719-724.

Fu, P., Zhang, S., Dai, K., Zheng, K., Zhang, C., Xue, Y. S., ... & Wang, T. F. (1984). Gallstone classified based on sectional structure and chemical composition. *Chin J Surg22 (5)*, 258-260.

Gazali, Z., Kumar, R., Rai, P. K., Rai, P. K., Rai, A. K., & Thakur, S. N. (2021). Discrimination of gallbladder stone employing laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and photoacoustic spectroscopy (PAS). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *260*, 119948.

Gazali, Z., Thakur, S. N., & Rai, A. K. (2019). Compositional study of gallbladder stone using photoacoustic spectroscopy. *Optics & Laser Technology*, *111*, 696-700.

Ghumman, C. A. A., Carreira, O. M., Moutinho, A. M., Tolstogouzov, A., Vassilenko, V., & Teodoro, O. M. (2010). Identification of human calculi with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, *24*(2), 185-190.

Ghumman, C. A. A., Moutinho, A. M. C., Santos, A., Tolstogouzov, A., & Teodoro, O. M. N. D. (2012). TOF-SIMS study of cystine and cholesterol stones. *Journal of mass spectrometry*, *47*(5), 547-551.

Gokulakrishnan, S., Ashok, M., & Jayanthi, V. (2001). Analysis of gallstone: a critical appraisal on various techniques. *Gastroenterol Today*, *3*, 145-148.

Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. springer.

Golovanova, O. A., Bel'Skaya, L. V., & Berezina, N. Y. (2006). Quantitative spectral trace element analysis of pathogenic biominerals from residents of the omsk region. *Journal of Applied Spectroscopy*, *73*(6), 886-891.

Gurusamy, K. S., & Davidson, B. R. (2014). Gallstones. *Bmj*, *348*.

Gümüş, M., Yüksel, H., Evliyaoğlu, O., Kapan, M., Böyük, A., Önder, A., & Aldemir, M. (2011). Effects of ellagic acid on copper, zinc, and biochemical values in serum and liver of experimental cholestatic rats. *Biological Trace Element Research*, *143*(1), 386-393.

Ha, B. J., & Park, S. (2018). Classification of gallstones using Fourier-transform infrared spectroscopy and photography. *Biomaterials research*, *22*(1), 18.

He, K., Liu, K., Daviglus, M. L., Morris, S. J., Loria, C. M., Van Horn, L., ... & Savage, P. J. (2006). Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults. *Circulation*, *113*(13), 1675-1682.

Hermida, F. J. (2021). Analysis of human urinary stones and gallstones by fourier transform infrared attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*, *88*(1), 215-224.

Hevesy, G., & Levi, H. (1935). Artificial radioactivity of dysprosium and other rare earth elements. *Nature*, *136*(3429), 103-103.

Hevesy, G., & Levi, H. (1936). Action of slow neutrons on rare earth elements. *Nature*, *137*(3457), 185-185.

Holzbach, R. T. (1984). Animal models of cholesterol gallstone disease. *Hepatology*, *4*(S2), 191S-198S.

Iordanidis, A., Garcia-Guinea, J., Giousef, C., Angelopoulos, A., Doulgerakis, M., & Papadopoulou, L. (2013). Characterization of Gallbladder stones from cholelithiasis patients of northern greece, using complementary techniques. *Spectroscopy Letters*, *46*(4), 301-306.

Jaunoo, S. S., Mohandas, S., & Almond, L. M. (2010). Postcholecystectomy syndrome (PCS). *International journal of surgery*, *8*(1), 15-17.

Jayanthi, V., Palanivelu, C., Prasanthi, R., Mathew, S., & Srinivasan, V. (1998). Composition of gallstones in Coimbatore District of Tamil Nadu State. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, *17*(4), 134-135.

Jayasoma, K., Koralegedara, N. H., Dharmapala, A., & Chandrajith, R. (2022). Microstructural and geochemical characterization of gallstones: implication for biomineralization. *Biological Trace Element Research*, *200*(12), 4891-4902.

Kaloustian, J., De La Porte, P. L., El-Moselhy, T., Lafont, H., & Portugal, H. (2005). Thermal analysis and microscopical characterization of cholesterol in gallstones. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, *82*(2), 331-338.

Kaloustian, J., Pauli, A. M., Lechene de la Porte, P., Lafont, H., & Portugal, H. (2003). Thermal analysis of anhydrous and hydrated cholesterol. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, *71*(2), 341-351.

Kameda, H., Ishihara, F., Shibata, K., & Tsukie, E. (1984). Clinical and nutritional study on gallstone disease in Japan. *Japanese journal of medicine*, *23*(2), 109-113.

Kaufman, H. S., Magnuson, T. H., Lillemoe, K. D., Frasca, P., & Pitt, H. A. (1989). The role of bacteria in gallbladder and common duct stone formation. *Annals of surgery*, *209*(5), 584.

Kaur, T., & Kaur, S. (2010). Pathophysiological conditions in cholelithiasis formation in North Indian population: spectroscopic, biophysical, and biochemical study. *Biological trace element research*, *138*(1), 79-89.

Keiner, F. (1965). The effect of coffee on gallbladder contractions. *Die Medizinische Welt*, *34*, 1907-1912.

Khalel,M. (2025). Enerji ve sporcu içeceklerinin diş yüzeyinde erozyon oluşturma potansiyelinin ve kalsiyum-fosfat iyonlarının kaybının taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDAX) ile belirlenmesi. *Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü , Erzincan.*

Kim, I. S., Myung, S. J., Lee, S. S., Lee, S. K., & Kim, M. H. (2003). Classification and nomenclature of gallstones revisited. *Yonsei medical journal*, *44*(4), 561-570.

Kleiner, O., Ramesh, J., Huleihel, M., Cohen, B., Kantarovich, K., Levi, C., Polyak, B., Marks, R.S., Cohen, Z., Mor, S... & Mordechai, S. (2002). A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy. *BMC gastroenterology*, *2*(1), 3.

Kodaka, T., Sano, T., Nakagawa, K., Kakino, J., & Mori, R. (2004). Structural and analytical comparison of gallbladder stones collected from a single patient: studies of five cases. *Medical Electron Microscopy*, *37*(2), 130-140.

Krafft, C., & Sergo, V. A. L. T. E. R. (2006). Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Journal of Spectroscopy*, *20*(5-6), 195-218.

Kurtin, W. E., Schwesinger, W. H., & Diehl, A. K. (2000). Age-related changes in the chemical composition of gallstones. *International journal of surgical investigation*, *2*(4), 299-307.

Lammert, F., Gurusamy, K., Ko, C. W., Miquel, J. F., Méndez-Sánchez, N., Portincasa, P., Van Erpecum, K.J., Van Laarhoven, C.J., & Wang, D. Q. H. (2016). Gallstones. *Nature reviews Disease primers*, *2*(1), 1-17.

Lee, S. K., & Kim, M. H. (2010). Natural history of gallstone; an important and old issue, but still debatable. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *25*(4), 651-652.

Lee, T., & Chen, J. G. (2009). Biomimetic gallstone formation: crystallization of calcium carbonate by the evolving taurocholate− lecithin− cholesterol complex lipid system. *Crystal Growth and Design*, *9*(8), 3737-3748.

Lillemoe, K. D., Magnuson, T. H., High, R. C., Peoples, G. E., & Pitt, H. A. (1989). Caffeine prevents cholesterol gallstone formation. *Surgery*, *106*(2), 400-407.

Lin, S. M., Ker, C. G., Tseng, C. L., & Yang, M. H. (1990). Instrumental neutron activation analysis of gallstones. *International journal of radiation applications and instrumentation. Part A. Applied radiation and isotopes*, *41*(12), 1217-1222.

Liu, G., Xing, D., Wang, H. M., & Xing, J. (2002). Study of protein in human gallstones by fourier transform infrared spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Guangxue Xuebao*, *22*(4), 441-446.

Liu, G., Xing, D., Wang, H., & Wu, J. (2002). Vibrational spectroscopic study of human pigment gallstones and their insoluble materials. *Journal of molecular structure*, *616* (1-3), 187-191.

Liu, J. S., Huang, C. S., & Lien, H. H. (2002). Structural analysis of gallstones with thin-section petrographic microscopy: a study of 100 gallstones from Taiwanese patients.

Liu, X. T., & Hu, J. (2002). Relationship between bilurabin free radical and formation of pigment gallstone. *World Journal of Gastroenterology*, *8*(3), 413*Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *140*(6), 387-390.

Liu, J. X., Liu, Y., Shen, Q. H., Lv, H., Li, W., & Ren, L. (2025). Study on the correlation of electron spin resonance with pigment gallstones and trace Cu2+, Fe3+ in diet. *Scientific reports*, *15*(1), 8993.

Manero, J. M., Gil, F. J., Padros, E., & Planell, J. (2003). Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field. *Microscopy research and technique*, *61*(5), 469-480.

Mohan, H., Punia, R. P. S., Dhawan, S. B., Ahal, S., & Sekhon, M. S. (2005). Morphological spectrum of gallstone disease in 1100 cholecystectomies in North India.

Mondal, B., Maulik, D., Mandal, M., Sarkar, G. N., Sengupta, S., & Ghosh, D. (2017). Analysis of carcinogenic heavy metals in gallstones and its role in gallbladder carcinogenesis. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, *48*(4), 361-368.

Muscariello, L., Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Cafiero, G., & Barbarisi, A. (2005). A critical overview of ESEM applications in the biological field. *Journal of cellular physiology*, *205*(3), 328-334.

Nakeeb, A., Comuzzie, A. G., Martin, L., Sonnenberg, G. E., Swartz-Basile, D., Kissebah, A. H., & Pitt, H. A. (2002). Gallstones: genetics versus environment. *Annals of surgery*, *235*(6), 842-849.

Palchik, N. A., & Moroz, T. N. (2005). Polymorph modifications of calcium carbonate in gallstones. *Journal of crystal growth*, *283*(3-4), 450-456.

Parviainen, A., Marchesi, C., Suárez-Grau, J. M., Garrido, C. J., Pérez-López, R., Nieto, J. M., & Cobo-Cárdenas, G. (2018). Unraveling the impact of chronic exposure to metal pollution through human gallstones. *Science of the Total Environment*, *624*, 1031-1040.

Parviainen, A., Suárez-Grau, J. M., Pérez-López, R., Nieto, J. M., Garrido, C. J., & Cobo-Cárdenas, G. (2016). Combined microstructural and mineralogical phase characterization of gallstones in a patient-based study in SW Spain-Implications for environmental contamination in their formation. *Science of the Total Environment*, *573*, 433-443.

Pathak, A. K., Rai, N. K., Kumar, R., Rai, P. K., Rai, A. K., & Parigger, C. G. (2018). Gallstone magnesium distributions from optical emission spectroscopy. *Atoms*, *6*(3), 42.

Pepinsky, R. (1941). X-ray diffraction analysis of calcium salts in gallstones. Phys. Rev, 60, 168.

Peter, A., Cozmuta, L. M., Nicula, C., Cozmuța, A. M., Vulpoi, A., Barbu-Tudoran, L., K, Magvari., M, Todea., L, Baia... & Pop, F. G. (2020). Multi-analyses of gallstones and correlation between their properties with the laboratory results. *Analytical biochemistry*, *593*, 113587.

Piburn, G., & Barron, A. R. (2013). An introduction to energy dispersive X-ray spectroscopy. *Physical methods in chemistry and nano science*, 90-98.

Portincasa, P., Di Ciaula, A., de Bari, O., Garruti, G., Palmieri, V. O., & Wang, D. H. (2016). Management of gallstones and its related complications. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, *10*(1), 93-112.

Qiao, T., Ma, R. H., Luo, X. B., Feng, Y. Y., Wang, X. Q., Zheng, P. M., & Luo, Z. L. (2012). Tiny cystine stones in the gallbladder of a patient with cholecystolithiasis complicating acute cholecystitis: a case report. *European Journal of Medical Research*, *17*(1), 6.

Qiao, T., Ma, R. H., Luo, X. B., Yang, L. Q., Luo, Z. L., & Zheng, P. M. (2013). The systematic classification of gallbladder stones. *Plos one*, *8*(10), e74887.

Ramya, J. R., Arul, K. T., Epple, M., Giebel, U., Guendel-Graber, J., Jayanthi, V., ... & Kalkura, S. N. (2017). Chemical and structural analysis of gallstones from the Indian subcontinent. *Materials Science and Engineering: C*, *78*, 878-885.

Rautray, T. R., Vijayan, V., & Panigrahi, S. (2007). Analysis of Indian pigment gallstones. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, *255*(2), 409-415.

Rautray, T. R., Vijayan, V., Ashok, M., Kennedy, J. V., Jayanthi, V., Ibrarullah, M. D., & Panigrahi, S. (2005). *Pixe analysis of gallstones. International Journal of PIXE*, 15(03n04), 147-152.

Ravnborg, L., Teilum, D., & Pedersen, L. R. (1990). Gallbladder Stones Classified by Chemical Analysis of Cholesterol Content Frederiksberg, 1987–1988. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *25*(7), 720-724.

Reshetnyak, V. I. (2012). Concept of the pathogenesis and treatment of cholelithiasis. *World journal of hepatology*, *4*(2), 18.

Rosso, F., Papale, F., & Barbarisi, A. (2012). Environmental scanning electron microscopy gold immunolabeling in cell biology. In *Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols* (pp. 517-523). Totowa, NJ: Humana Press.

Saris, N. E. L., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A., & Lewenstam, A. (2000). Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica chimica acta*, *294*(1-2), 1-26.

Sevcík, R., Sasek, P., & Viani, A. (2018). Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO. sub. 3 polymorphs: vaterite, aragonite and calcite. *Journal of Materials Science*, *53*(6), 4022-4034.

Shaffer, E. A. (2005). Epidemiology and risk factors for gallstone disease: has the paradigm changed in the 21st century?. Current gastroenterology reports, 7(2), 132-140.

Shieh, H. S., Hoard, L. G., & Nordman, C. E. (1977). Crystal structure of anhydrous cholesterol. *Nature*, *267*(5608), 287-289.

Sikkandar, S., Jayakumar, S., Gunasekaran, S., Renugadevi, T. S., & Alwar, B. (2011). Study on the analysis of human gallstones using Fourier transform infrared spectroscopic technique. *Int J ChemTech Res*, *3*(1), 149-154.

Simon, J. A., & Hudes, E. S. (1998). Serum ascorbic acid and other correlates of gallbladder disease among US adults. *American journal of public health*, *88*(8), 1208-1212.

Singh, V. K., Jaswal, B. S., Sharma, J., & Rai, P. K. (2020). Analysis of stones formed in the human gall bladder and kidney using advanced spectroscopic techniques. *Biophysical reviews*, *12*(3), 647-668.

Singh, V. K., Rai, A. K., Rai, P. K., & Jindal, P. K. (2009). Cross-sectional study of kidney stones by laser-induced breakdown spectroscopy. *Lasers in medical science*, *24*(5), 749-759.

Singh, V. K., Rai, V., & Rai, A. K. (2009). Variational study of the constituents of cholesterol stones by laser-induced breakdown spectroscopy. *Lasers in medical science*, *24*(1), 27-33.

Soloway, R. D., Trotman, B. W., & Ostrow, J. D. (1977). Pigment gallstones. *Gastroenterology,* 72(1), 167-182.

Singh, V. K., Singh, V., Rai, A. K., Thakur, S. N., Rai, P. K., & Singh, J. P. (2008). Quantitative analysis of gallstones using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics*, *47*(31), G38-G47.

Stewart, L., Grifiss, J. M., Jarvis, G. A., & Way, L. W. (2006). Biliary bacterial factors determine the path of gallstone formation. *The American journal of surgery*, *192*(5), 598-603.

Stinton, L. M., & Shaffer, E. A. (2012). Epidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer. *Gut and liver*, *6*(2), 172.

Sun, Y., Yang, Z., Shen, G., Zhou, Y., Zhou, X., Wu, J., & Xu, G. (2001). Progress in the study on the composition and formation mechanism of gallstone. *Science in China Series B: Chemistry*, *44*(5), 449-456.

Sutor, D. J., & Wilkie, L. I. (1977). The crystalline salts of calcium bilurabinate in human gallstones. *Clinical Science and Molecular Medicine*, *53*(1), 101-103.

Suvorova, E. I., Pantushev, V. V., & Voloshin, A. E. (2017). Methods of chemical and phase composition analysis of gallstones. *Crystallography Reports*, *62*(6), 817-830.

Swidsinski, A., & Lee, S. P. (2001). The role of bacteria in gallstone pathogenesis. *Front Biosci*, *6*(1), 93-103.

Swobodnik, W., Soloway, R. D., & Ditschuneit, H. (Eds.). (2012). Gallstone disease: *pathophysiology and therapeutic approaches*. Springer Science & Business Media.

Trotman, B. W., Bernstein, S. E., Bove, K. E., & Wirt, G. D. (1980). Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia: description and characteristics of a mouse model. *The Journal of clinical investigation*, *65*(6), 1301-1308.

Trotman, B. W., Morris III, T. A., Sanchez, H. M., Soloway, R. D., & Ostrow, J. D. (1977). Pigment versus cholesterol cholelithiasis: identification and quantification by infrared spectroscopy. *Gastroenterology*, *72*(3), 495-498.

Trotman, B. W., Petrella, E. J., Soloway, R. D., Sanchez, H. M., Morris III, T. A., & Miller, W. T. (1975). Evaluation of radiographic lucency or opaqueness of gallstones as a means of identifying cholesterol or pigment stones: correlation of lucency or opaqueness with calcium and mineral. *Gastroenterology*, *68*(6), 1563-1566.

Touyz, R. M. (2004). Magnesium in clinical medicine. *Front Biosci*, *9*(1-3), 1278-1293.

Venneman, N. G., & van Erpecum, K. J. (2010). Pathogenesis of gallstones. *Gastroenterology Clinics*, *39*(2), 171-183.

Vickerman, J. C., & Briggs, D. (2001). ToF-SIMS: surface analysis by mass spectrometry. *(No Title)*.

Vítek, L., & Carey, M. C. (2012). New pathophysiological concepts underlying pathogenesis of pigment gallstones. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, *36*(2), 122-129.

Völzke, H., Baumeister, S. E., Alte, D., Hoffmann, W., Schwahn, C., Simon, P., John, U., & Lerch, M. M. (2005). Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion*, *71*(2), 97-105.

Wallner, B. K., Schumacher, K. A., Weidenmaier, W., & Friedrich, J. M. (1991). Dilated biliary tract: evaluation with MR cholangiography with a T2-weighted contrast-enhanced fast sequence. *Radiology*, *181*(3), 805-808.

Wang, H. H., Portincasa, P., & Wang, D. Q. (2008). Molecular pathophysiology and physical chemistry of cholesterol gallstones. *Front Biosci*, *13*(4), 401-423.

Weerakoon, H., Navaratne, A., Ranasinghe, S., Sivakanesan, R., Galketiya, K. B., & Rosairo, S. (2015). Chemical characterization of gallstones: an approach to explore the aetiopathogenesis of gallstone disease in Sri Lanka. *PLoS One*, *10*(4), e0121537.

Weir, C. E., & Lippincott, E. R. (1961). Infrared studies of aragonite, calcite, and vaterite type structures in the borates, carbonates, and nitrates. *Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry*, *65*(3), 173.

Wittenburg, H. (2010). Hereditary liver disease: gallstones. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *24*(5), 747-756.

Wu, J. G., Zhou, X. S., Xu, Z., Shen, T., Xu, Y. Z., Li, W. H., ... & Shi, N. (1997). A spectroscopic investigation of the formation mechanism of pigment gallstones. *Biospectroscopy*, *3*(5), 381-391.

Yoo, E. H., Oh, H. J., & Lee, S. Y. (2008). Gallstone analysis using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, *46*(3), 376-381.

Zhou, X. S., Shen, G. R., Wu, J. G., Li, W. H., Xu, Y. Z., Weng, S. F., Soloway, R.D., Fu, X.B., Tian, W., Xu, Z., Shen T., Xu, G.X., & Wentrup-Byrne, E. (1997). A spectroscopic study of pigment gallstones in China. *Biospectroscopy*, *3*(5), 371-380.