

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**HAREKETLİ EKLEM KIKIRDAĞININ YAPISAL VE
ELEMENTEL KARAKTERİZASYONUN YAPILMASI**

TUBA ÇAYIR

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HAREKETLİ EKLEM KIKIRDAĞININ YAPISAL VE
ELEMENTEL KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

TUBA ÇAYIR

Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU
Danışman, Kocaeli Üniv.
Prof. Dr. Serdar KÜÇÜK
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Recep Taygun GÜRAY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Prof. Dr. Orhan GÜRLER
Jüri Üyesi, Uludağ Üniv.
Doç. Dr. Nilgün DEMİR
Jüri Üyesi, Uludağ Üniv.

Abusolu
Serdar Küçük
R. Zeynep
Orhan Gürlük
Nilgün Demir

Tezin Savunulduğu Tarih: 02.07.2018

ETİK

KKAEK 2010/20 proje numaralı uzmanlık tezi için kullanılan biyolojik numunelerin aynısı “Hareketli Eklem Kıkırdağının Yapısal ve Elementel Karakterizasyonun Yapılması” isimli tezde de kullanılmıştır. Tezde kullanılan biyolojik numuneler evrensel ve etik ilkelere uygun kriterlere sahiptir. KOCAELİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU tezde kullanılan numuneler için onay vermişlerdir.



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, hareketli eklem kıkırdağında zamanla yaşa bağlı olarak meydana gelen hastalıkların sonucunda kemik kıkırdak yapısında ne gibi değişiklikler olduğunu anlayabilmek ve meydana gelen deformasyonun teşhisi için ön ayak olabilecek analizler yapılmıştır.

Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen, çalışmalarına yön veren, bana güvenen ve yüreklendiren danışmanım Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda gösterdiği anlayış ve destekleri için sayın Doç. Dr. Yunus AKALTUN'a sayın Prof. Dr. Semra İDE'ye ve Öğretim Görevlisi Dr. Serap GÜMÜŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Arş. Gör. Sümeyya İLKİN'e ve Arş. Gör. Barış Doruk GÜNGÖR'e teşekkür ediyorum.

Akademik çalışmalarım sırasında, birçok aşamada beni destekleyen Biyomedikal Mühendisliği Bölümü araştırma görevlilerine teşekkür ediyorum. Her zaman yanımda olan manevi desteklerini hiç eksik etmeyen arkadaşlarım Zeliha MERCAN, Ayseren KAYA ve Başak CAN YILDIRIM'a çok teşekkür ediyorum.

Fen Bilimleri Enstitüsü'ndeki çalışma hayatım boyunca, üzerimdeki emekleri için minnettar olduğum Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

2017/088 nolu projemiz kapsamında sağlanan desteklerden dolayı, Kocaeli Üniversitesi BAP proje koordinatörlüğüne,

Hayatım boyunca bana güç veren en büyük destekçilerim, her aşamada sıkıntılarımı ve mutluluklarımı paylaşan sevgili babam Harun ÇAYIR, annem İsmet ÇAYIR ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Haziran - 2018

Tuba ÇAYIR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER.....	16
1.1. Kıkırdak Doku	16
1.2. Kıkırdak Türleri.....	18
1.2.1. Hiyalin kıkırdak	18
1.2.2. Elastik kıkırdak	19
1.2.3. Fibröz kıkırdak.....	19
1.3. Eklemler ve Eklem Kıkırdağı.....	20
1.4. Kemik Doku	23
1.5. Kemik Türleri	26
1.5.1. İntramembranöz kemikleşme.....	27
1.5.2. Endokondral kemikleşme.....	28
1.6. Vücudumuzda Bulunan Elementler.....	31
1.7. Kemikte Bulunan Elementler	33
1.7.1. Kalsiyum	33
1.7.2. Fosfat.....	34
1.7.3. Silikon	35
1.7.4. Potasyum.....	35
1.7.5. Demir	35
1.8. Kıkırdakta Bulunan Elementler	36
1.8.1. Kükürt	36
1.8.2. Manganez	37
2. MATERYAL VE YÖNTEM	38
2.1. Küçük ve Büyük Açılı X-Ray Spektroskopisi	38
2.1.1. SWAXS yöntemi ve deney düzeneği ile ilgili temel bilgiler	48
2.1.2. Kullanılan yazılım ve paket programlar.....	53
2.2. X-Ray Floresans Spektroskopisi	58
2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu	61
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
3.1. DeneY Sistemleri ve Ölçülerin Alınması	63
3.2. Kemik-Kıkırdak Örneklerinin SAXS/WAXS Ölçümleri.....	64
3.2.1. Kadın ve erkek grubu kıkırdak örnekleri	65
3.2.2. Küçük açıda X-Işını saçılması ile elde edilen verilerin analizi	70
3.2.3. Geniş açıda X-Işını saçılması ile elde edilen verilerin analizi	88
3.3. X-Ray Floresans (XRF) Analizi.....	92

3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (Sem) Analizi.....	107
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	115
KAYNAKLAR	119
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	126
ÖZGEÇMİŞ	127



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kıkırdağın genel yapısı	17
Şekil 1.2.	Kıkırdak Türleri.....	18
Şekil 1.3.	Hiyalin kıkırdağın yapısı.....	18
Şekil 1.4.	Elastik kıkırdağın yapısı.....	19
Şekil 1.5.	Fibröz kıkırdağın yapısı	20
Şekil 1.6.	Eklem kıkırdağının oluşumu.	21
Şekil 1.7.	Eklem kıkırdağının yapısı.	22
Şekil 1.8.	Kemik dokunun anatomik yapısı.....	25
Şekil 1.9.	Kemik dokunun fizyolojik yapısı	25
Şekil 1.10.	İntramembranöz kemikleşme sırasında meydana gelen olaylar.....	27
Şekil 1.11.	Tipik bir uzun kemik yapısı	28
Şekil 1.12.	Tip I kolajenin moleküler yapısı	30
Şekil 1.13.	Kollajen molekülünün üçlü sarmal yapısını oluşturan alfa zincirlerinin farklılığına göre değişiklik gösteren kollajen tipleri.....	31
Şekil 1.14.	İnsan vücudundaki elementlerin yüzdelik gösterimi.....	32
Şekil 1.15.	60 kg'lık bir insan bedeninde bulunan mineral miktarı kıkırdağın yapısı	33
Şekil 2.1.	SAXS cihazının hassaslık aralığı	38
Şekil 2.2.	Makromoleküler yapıların aydınlatılmasında ağırlıklı olarak kullanılan, birbirini tamamlayıcı yöntemler.....	40
Şekil 2.3.	SAXS ve WAXS tekniklerinin bazı özellikleri ve ölçüm aralıkları	42
Şekil 2.4.	Şematik olarak Küçük ve Geniş Açılı X-Işını Saçılımı sisteminin temel elemanları: (X-Işını kaynağı; Slit ve Yönlendiriciler; Örnek [Sıvı, katı, jel, gaz, ince film ve ...]; Örnek Tutucu; Saçılma açısı ve Detektör)	44
Şekil 2.5.	Bir nano oluşumun C ve D noktalarından saçılan ışınlarla ilgili geometrik gösterim (r^2 iki saçıcı noktanın göreceli konum vektörü, S0 ve S sırasıyla gelen ve saçılan ışınların dalga vektörleri)	44
Şekil 2.6.	SAXS eğrisinden farklı bölgelere göre elde edilen bilgiler	45
Şekil 2.7.	Küre, çubuk ve disk modellerinin yapı karakteristikleri	47
Şekil 2.8.	İki farklı firmaya ait, kratky (çizgi kolimasyon) ve pinhol (nokta demet) geometrisine sahip laboratuvar tipi SWAXS sistemleri ve özellikleri	49
Şekil 2.9.	Farklı örnek tutucular ve örnek bloğu (A: SAXS pace cihazına ait örnek tutucu ve örnek bloğu, B: System3 cihazının ana örnek bloğu ve örnek döndürücü sistemi, C: Akış hücresi sistemine ait örnek tutucu, D: Toz örnekler için kullanılan örnek tutucu ve akış hücresi sisteminin bazı parçaları, E: Sıvı örnekler için tasarlanmış paslanmaz çelik ve kuartz tüplü örnek tutucu	50

Şekil 2.10. Anton Paar ve Hecus firmasının kullandıkları detektör tipleri (A: CMOS detektör, SAXSpacs cihazı, Anton Paar firması, B: Çizgi detektör, System3 cihazı, Hecus firması)	52
Şekil 2.11. Eş zamanlı ölçülen SAXS ve WAXS desenleri (Sağ: Hecus System3 cihazının yazılımı ve Sol: Anton Paar SAXSpace cihazının yazılımı)	53
Şekil 2.12. EasySWAXS programının arayüzü.....	53
Şekil 2.13. 3D View programının arayüzü.....	54
Şekil 2.14. Igor Pro 6.37 ve Irena macros paket programlarının lisans ve arayüzleri	55
Şekil 2.15. A: GINOM ve B: DAMMIN programlarının arayüzü	56
Şekil 2.16. GIFT programının arayüzü.....	56
Şekil 2.17. DECON programının arayüzü.....	57
Şekil 2.18. PDDF calculator programının arayüzü	58
Şekil 2.19. Deneysel ölçümler için kullanılan XRF Spektrometresi.....	59
Şekil 2.20. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	61
Şekil 3.1. HECUS SWAXS deney sistemi Kratky Optiğine sahip bir sistem.....	65
Şekil 3.2. Kadın hastalardan alınan kemik kıkırdak örneklerinin görünümü.....	66
Şekil 3.3. Erkek hastalardan alınan kemik kıkırdak örneklerinin görünümü	67
Şekil 3.4. SAXS ve WAXS kalibrasyonları yapılırken alınan ekran görüntüleri	68
Şekil 3.5. (A): EasySWAXS ve (B): 3D View programlarının ara yüzleri [a: Dedektör-örnek arası mesafe (27,9 cm); Lambda: Kullanılan X-Işınının dalga boyu (1,542 Å); d: Detektörlerde kanallar arası mesafe (0,54 µm); COG: Birinci pike ait en büyük şiddete karşılık gelen kanal numarası (#235)].....	69
Şekil 3.6. Data uzantılarını değiştirmek ve dönüştürmek için geliştirilmiş programın arayüzü.....	70
Şekil 3.7. a ₁ kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	72
Şekil 3.8. a ₂ kıkırdak örneklerinin dokuları için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği	73
Şekil 3.9. a ₃ kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği	74
Şekil 3.10. a ₄ kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	75
Şekil 3.11. a ₅ kıkırdak dokusu için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	76
Şekil 3.12. a ₆ kıkırdak dokusu için I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	77
Şekil 3.13. Kadın grubu kıkırdak örnekleri için az bütün dokuların I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	78
Şekil 3.14. b ₁ kıkırdak örneği dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği	79
Şekil 3.15. b ₃ kıkırdak örneği dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği	80
Şekil 3.16. b ₂ kıkırdak örneği dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği	81
Şekil 3.17. b ₅ kıkırdak örneği için az yoğun ve çok yoğun dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	82
Şekil 3.18. b ₄ kıkırdak örneği dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	83
Şekil 3.19. b ₆ kıkırdak örneği için az yoğun ve çok yoğun dokularının I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹)	84

Şekil 3.20. Erkek grubu kıkırdak örnekleri için az bütün dokuların I(q)(a.u.)-q(Å ⁻¹) grafiği.....	85
Şekil 3.21. a ₁ az yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği.....	88
Şekil 3.22. a ₁ çok yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği	89
Şekil 3.23. b ₂ kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği.....	89
Şekil 3.24. b ₅ az yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği	90
Şekil 3.25. b ₃ az yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği	90
Şekil 3.26. b ₃ çok yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği	91
Şekil 3.27. a ₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri.....	93
Şekil 3.28. a ₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	93
Şekil 3.29. a ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	94
Şekil 3.30. a ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	95
Şekil 3.31. a ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	95
Şekil 3.32. a ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	96
Şekil 3.33. a ₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	97
Şekil 3.34. a ₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	97
Şekil 3.35. a ₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	98
Şekil 3.36. a ₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	98
Şekil 3.37. a ₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	99
Şekil 3.38. a ₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	99
Şekil 3.39. b ₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	100
Şekil 3.40. b ₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	100
Şekil 3.41. b ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	101
Şekil 3.42. b ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	101
Şekil 3.43. b ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	102
Şekil 3.44. b ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	102
Şekil 3.45. b ₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	103
Şekil 3.46. b ₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	103
Şekil 3.47. b ₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	104
Şekil 3.48. b ₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	104
Şekil 3.49. b ₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri	105
Şekil 3.50. b ₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.....	105
Şekil 3.51. (a) Çok fazlı osteokondral doku iskelesinin şematik görüntüsü, (b) kıkırdak bölgesini oluşturan malzemenin ve (c) malzemenin kıkırdak, kemik ve ara yüzeyini gösteren SEM görüntüleri.....	107

Şekil 3.52. a ₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	108
Şekil 3.53. a ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	109
Şekil 3.54. a ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	110
Şekil 3.55. b ₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	111
Şekil 3.56. b ₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	112
Şekil 3.57. b ₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü.....	113

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Kadın ve Erkek hasta bilgileri	63
Tablo 3.2. Kadınlar grubu için jirasyon yarıçapları ve I_0 sabitlerinin tablo görünümü (Çubuksu) morfoloji de olup olmadıkları ve sırası ile etkin büyüklükler olan R_G , R_T , R_C 'nin hesaplanması.....	86
Tablo 3.3. Erkekler grubu için jirasyon yarıçapları ve I_0 değerleri (Çubuksu) morfoloji de olup olmadıkları ve sırası ile etkin büyüklükler olan R_G , R_T , R_C 'nin hesaplanması	87
Tablo 3.4. Kadın ve erkek hastalardan alınan örneklerin θ değerleri	91
Tablo 3.5. WAXS açıları ile hesaplanan düzlemler arası mesafeler	92
Tablo 3.6. Kadın ve erkek hastaların Ca/P Oranı	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

\vec{r}	: Yerdeğiştirme (Görelî Konum) Vektörü
2θ	: Saçılma Açısı
A	: İnce Çubuğun Kesit Alanı
Å	: Angström Birimi
A(Q)	: Saçılma Genliği
I	: Işın (Saçılma) Şiddeti
IR	: İnfrared Işınım
K	: Bağ Sayısı
L	: İnce Çubuğun Uzunluğu
Lc	: Korelasyon Mesafesi
M	: Segment (Monomer) Sayısı
M	: Tekrarlanan Birimler
N	: Tanecik Sayısı
Nm	: Nanometre
P(Q)	: Form Faktörü
P(R)	: Uzaklık Dağınım Fonksiyonu
Q	: Saçılma Vektörü
Q	: Saçılma Vektörü Büyüklüğu
Q	: Yapı Değişmezi (Invariant)
Rg	: Jirasyon Yarıçapı
S	: Saçılan Işınların Dalga Vektörleri
S	: Yüzey Alanı
S(q)	: Yapı Faktörü
S0	: Gelen Işınların Dalga Vektörleri
Si	: İç Ara Yüzey Alanı
t	: Tabakalı Yapının Kabuk Kalınlığı
V	: Hacim
$\gamma(r)$ “r”	: Komşuluğuunda Bulunan Elektronlar
η	: Elektron Yoğunluğuundaki Dalgalanma
λ	: Dalga Boyu
μ	: Çizgisel Soğurma Katsayısı
μm	: Mikrometre
ρ	: Elektron Yoğunluğu
ε	: Soğurma Katsayısı
μgg	: Mikro Gigagram
μm	: Mikro Metre
mm	: Mili Metre
keV	: Kilo Elektrovolt

Kısaltmalar

μ -PIXE	: Mikro Proton- Induced X-Ray Emission (Mikro Proton Uyarılan X-Ray Emisyonu)
μ -XRD	: Mikro X-Ray Diffraction (Mikro X-Işını Kırınımı)
3D	: 3 Boyut
ASA3	: Amplitude Spectrum Analyzer 3 (Hecus Cihazının Yazılım Adı)
BL	: Beamline (Demet Hattı)
BSU	: Bone Structural Units (Kemik Yapısal Birimi)
Ca	: Kalsiyum
CCD	: Charge Coupled Device (Elektriksel Yük Çiftlenimli Aygıt)
CMOS	: Complementary Metal Oxide Semiconductor (Tamamlayıcı Metal Oksit Yarı İletken)
COG	: Center of Gravity (Kütle Çekim Merkezi)
DTT	: Di-tiyotreitol
EXAFS	: Extended X-Ray Absorption Fine Structure (Genişletilmiş X-Işınları Emici İnce Yapı)
F	: Flor
Fe	: Demir
FEL	: Free Electron Laser (Serbest Elektron Lazer)
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spectrometry (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopi)
FT-IRM	: Fourier Transform Infrared MicroSpectrometry (Fourier-dönüşümü kızılötesi mikrospektroskopi)
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-Piperazin Etan Sulfonik asit
IFT	: Indirect Fourier Transformation Method (Dolaylı Fourier Dönüşüm Yöntemi)
K	: Potasyum
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
LPSD	: Linear Position Sensitive Detector (Çizgi Pozisyon Hassas Detektör)
Mn	: Magnezyum
Na	: Sodyum
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopi)
NSRRC	: National Synchrotron Radiation Research Center (Tayvan- Ulusal Sinkrotron Işın Araştırma Merkezi)
NTHU	: National Tsing-Hua University (Tayvan- Ulusal Tsing-Hua Üniversitesi)
OA	: Osteoartrit
OD	: Degree of Orientation (Yönlendirme Derecesi)
P	: Fosfor
Pb	: Kurşun
PDDF	: Pair Distance Distribution Function (Uzaklık Dağılım Fonksiyonu)
PE	: Polietilen
PSD	: Position Sensitive Detector (Konum Duyarlı Çizgisel Detektör)
qBEI	: Quantitative Backscattered Electron Imaging (Kantitatif Geri Saçılan Elektron Görüntüleme)
RBS	: Rutherford Backscattering Spectrometry (Rutherford Geri Saçılma Spektroskopisi)

RF	: Radyo frekans
ROS	: Rod Outer Segment (Çubuk Dış Bölümü)
RPE	: Retina Pigment Epiteli
S	: Kükürt
SANS	: Small Angle Neutron Scattering (Küçük Açılı Nötron Saçılması)
SAXS	: Küçük Açılı X-Işını Saçılması (Small Angle X-Ray Scattering)
SD	: Size Distribution (Boyut Dağılımı)
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
Sr	: Stronsiyum
SR	: Synchrotron Radiation (Sinkrotron Işın)
SR-XRF	: Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence (Sinkrotron Tabanlı X-Işını Floresans)
STZ	: Streptozotosin (Streptomyces türü bakterilerden elde edilen ve pankreasdaki beta hücrelerini seçici bir biçimde ve dönüşümsüz olarak tahrip ederek insülinomanın tedavisinde ve deneysel olarak diyabet oluşturmakta kullanılan madde.)
SWAXS	: Small and Wide Angle X-Ray Scattering (Küçük ve Geniş Açılı X-Işını Saçılması)
Ta	: Tantalum
TPF	: Transparent Primary Beam Stop and Filter (Işın Durdurucu ve Filtre Sistemi)
WAXS	: Wide Angle X-Ray Diffraction Scattering (Geniş Açılı X-Ray Saçılması)
XANES	: Introduction to X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy (X-Ray Kenar Yapısı Yakınındaki X-Işını Emilimini)
XAS	: X-Ray Absorption Spectroscopy (X-Ray Absorpsiyon Spektroskopisi)
XRF	: X-Ray Fluorescence (X-Ray Floresans)
Zn	: Çinko

HAREKETLİ EKLEM KIKIRDAĞININ YAPISAL VE ELEMENTEL KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

ÖZET

Günümüzde en çok karşılaşılan bir durum haline gelen osteoartrit bireylerin hareket kabiliyetine engel teşkil etmektedir. Eklemlerde iki taraftaki kemik grupları hareket ederken, birbirine sürtünmemeleri ve rahat hareket edebilmeleri eklem aralığındaki kaygan kıkırdak doku sayesinde olmaktadır. Kıkırdağın ezilmesi durumunda hareket kısıtlanmakta, ağrılı olup hatta eklem tamamen hareketsiz kalmasına sebep olmaktadır. Bu tez çalışmasında da sağlıklı ve hastalıklı hareketli eklem kıkırdağına sahip olan altı erkek ve altı kadın hastadan alınan kemik-kıkırdak örneklerinin yapısal ve elementel karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

Osteoartrit en sık görülen eklem hastalığı olup başta kıkırdak ve kemik doku olmak üzere tüm eklem yapılarını etkileyen dinamik bir süreçtir. Yaş, cinsiyet, heredite, akut travma, kronik yüklenme, önceden geçirilmiş eklem hastalıkları, obezite gibi faktörler osteoartritin oluşmasına sebep olmaktadır. Toplumdaki sıklığı, ortalama yaşam süresinin uzaması, obezitenin artması gibi nedenlerle giderek artmaktadır.

Bu tez çalışmasında bireylerin yaşına, cinsiyetine bağlı incelemeler yapılmıştır. Hastalardan alınan kemik-kıkırdak örneği küçük ve geniş açılı X-Ray Saçılma (SAXS/WAXS) cihazı ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elementsel analiz için X-Ray Floresans (XRF) cihazı kullanılmıştır. On iki örnekten alınan sonuçlar önce erkek ve bayanların kendi arasında daha sonra birlikte karşılaştırılarak sonuçlar elde edilmiştir. Kemik-kıkırdak örneklerinin yapısal ve elementel analizi kıkırdak, kıkırdak- kemik arayüzü ve kemik bölümü ayrı ayrı ele alınıp analizler gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik-Kıkırdak, Osteoartrit, SAXS, SEM, XRF.

STRUCTURAL AND ELEMENTAL CHARACTERIZATION OF ARTICULAR CARTILAGE

ABSTRACT

Osteoarthritis, which is nowadays the most encountered condition, is an obstacle to the ability of individuals to move. As the groups of bones on both sides of the joints move, their friction and their ability to move freely are due to the slippery cartilage tissue in the joint space. In the case of cartilage crushing, movement is restricted, painful and even causes the joint to remain completely immobile. In this thesis, the structural and elemental characterization of bone and cartilage specimens taken from six male and six female patients with healthy and diseased mobile joint cartilage was aimed.

Osteoarthritis is the most common joint disease and is a dynamic process affecting all joints, especially cartilage and bone tissue. Factors such as age, gender, heredity, acute trauma, chronic overload, previous joint diseases, obesity cause the formation of osteoarthritis. The frequency in society is increasing due to the average life span, the increase of obesity.

In this thesis study, studies related to the age and sex of the individuals were made. The bone-cartilage sample from the patients was determined using a small and wide angle X-ray Scattering (SAXS / WAXS) instrument and a Scanning Electron Microscope (SEM) instrument. X-Ray Fluorescence (XRF) instrument was used for elemental analysis. The results from twelve samples were first compared between men and women, and then the results were obtained. Structural and elemental analysis of bone-cartilage specimens were carried out separately by analyzing cartilage, cartilage-bone interface and bone section.

Keywords: Bone-cartilage, Osteoarthritis, SAXS, SEM, XRF.

GİRİŞ

İskelette kıkırdağın önemi kemikle birlikte iskeleti yapan özel bir destek doku olmasıdır. Kemik yapıdan daha yumuşak olan kıkırdakta damar bulunmamaktadır. Anne karnındaki bebeğin iskelet yapısı kıkırdaktadır; bu bebek büyürken kıkırdakta zamanla kemikleşme olmaktadır. Kıkırdak, kemikleşme meydana geldikten sonra kemik uçlarında epifiz plağında ve eklem yüzeylerinde bulunabilmektedir. Eklem yüzeyinde bulunan eklem kıkırdaklarının yüzeyleri oldukça kaygan yapıya sahiptir. Yetişkin insanlarda iskeletin kıkırdak bölümleri yalnızca kaburga kemiklerinin uçlarında, kemiklerin göğüs kafesiyle birleştiği noktada yer almaktadır. Ayrıca kıkırdak; nefes borusu, soluk borusu, kulak ve burunda da bulunmaktadır. Eklem kemik uçlarını sert ve elastik bir örtü biçimindeki eklem kıkırdağı kaplamaktadır. Hareketli iki kemiğin birbiri üzerinde yumuşaklık ve sürtünme hareketini sağlar. Kıkırdakta herhangi bir travma veya deformasyon meydana gelirse, diğer doku tahribatları gibi hızlı ve tam bir iyileşme meydana gelememektedir. Sonuçta yaralanmış kıkırdak iki kemik arasında ağrı ve hareket kısıtlılığına sebep olacaktır. Eklem kıkırdağı yük taşımaya son derece uygun yapısal, mekanik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu durum gözönüne alınırsa eklem kıkırdağının gelişebilmesi ve korunabilmesi kıkırdak doku üzerine sınırlı yük binmesi ile sağlanacaktır. Eklem kıkırdağına olması gerektiğinden daha fazla yük binmesi sonucunda osteoartrit denen hastalığın ortaya çıkmasına sebep olacaktır. Osteoartrit; hareketli eklem kıkırdağının bozuması ile, eklem kıkırdağında hasar, hareketli eklem yüzeyinde ve kenarlarında yeni kemiklerin oluşması ile meydana gelmektedir. Osteoartrit ile yaş arasında doğru orantı vardır. Genç yaşlarda nadir görülürken 60-65 yaş üzeri bu hastalıkların görülmesi daha olasıdır. Avrupa'da 65 yaş üzerindeki bir çok kişi radyolojik açıdan incelendiğinde %90 oranında osteoartrit bulgularının olduğu

tespit edilmiştir [1]. 50 yaşın altındaki kadınlarla erkeklerin bu hastalığa yakalanma oranları hemen hemen aynı iken bu yaşın üzerindeki özellikle kadınlarda bu hastalığa maruz kalma oranı daha yüksektir. Bu hastalığa, yaş, genetik, cinsiyet, obezite gibi birçok faktör sebebiyet verebilmektedir. Kıkırdağın yapısını koruyabilmek için kilo kontrolünü sağlamak, düz taban ayakkabılar giymemek, stresi kontrol altına almayı sağlamak, alkol kullanmamak, düzenli egzersiz yapmaya çalışmak ancak 40 yaşından sonra bedeni zorlayan sporlardan kaçınmak gerekmektedir. Bu etkenlerden birine örnek verecek olursak; kıkırdağı korumamız öncelikle kiloya çok dikkat etmekle sağlanabilir. Çünkü yürüme sırasında vücut ağırlığının bir katı, merdiven çıkma sırasında 3 katı, merdiven inme sırasında 5 katı, yerde dizlerini kırarak oturma ya da çömelme gibi pozisyonlarda 8 katı yük, dizlerimizin üzerine binmektedir. 60 kiloluk bir beden eğitimi öğretmenin, çocuklarla dizlerini kırarak bir pozisyonda ilgilenmesi sonucunda, dizlerine binen yük 480 kilodur. Eğer dizinde daha önceden meydana gelmiş bir problem varsa, oradaki sorunun çok kısa sürede geri dönüşümsüz bir hal almasına sebep olabilir [2]. Günümüzde en çok karşılaşılan bir durum haline gelen kemik-kıkırdak yapı da meydana gelen hastalıklar (osteoartrit gibi) ve tahribatlar (kaza sonucu kırıklar) bireylerin hareket kabiliyetine engel teşkil etmektedir. Eklemelerin herhangi bir zarar görmeden hareket edebilmeleri eklemler arasındaki kıkırdak dokunun kaygan bir yapıya sahip olmasıyla sağlanmaktadır. Kıkırdağın ezilmesi durumunda hareket kısıtlanmakta, ağrılı olup hatta eklem tamamen hareketsiz kalmasına sebep olmaktadır. Bu tez çalışmasında hareketli eklem kıkırdağında yaşa, cinsiyete ve hastalığa bağlı olarak ortaya çıkan deformasyonun yapısal ve elemental açıdan incelenmesi planlanmıştır. Tez de on iki insandan ameliyat esnasında alınan kemik-kıkırdak örnekleri kullanılmıştır. On iki örneğin altısı kadın, altı örnek ise erkek hastaya aittir. Hastalardan alınan kemik-kıkırdak örneklerinden 200µm kalınlığında kesitler alınmıştır. On iki hastanın ameliyat öncesi Röntgen çekimleri yapılmış, meydana gelen hasarlar tespit edilmiştir. Yapısal analiz için Small-Wide Angle X-Ray Diffraction Scattering (SAXS-WAXS) cihazı ve Scanning Electron Microscopy (SEM), elemental analiz için X-Ray Fluorescence (XRF) cihazı kullanılmıştır.

Kaabar ve diğ. osteoartritten etkilenen hastalıklı insan eklem kıkırdağından ince kesitler alarak temel anyon ve katyon sayılarının varlığını incelemek için mikro

proton uyarılan X-ray emisyonu (μ -PIXE) analizini yapmışlardır. Hastalıklı bölümde elde edilen Ca, P, K ve S dağılım haritaları, normal doku ile karşılaştırıldığında kemik-kıkırdak ara yüzeyindeki bu konsantrasyonlar da değişiklikler olduğunu görmüşlerdir. İnsan eklem kıkırdağının dekalsifiye bölümü için, kollajen ağındaki değişiklikleri küçük açılı X-ray saçılması(SAXS) tekniğini kullanarak incelemişlerdir. Kemik-kıkırdak arayüzünde dikey kolajen liflerinin kurulan kademeli yapı sayesinde normal eklem yüzeyinden daha yoğun osteoartrit olduğunu görmüşlerdir. Kemiğin yeniden modellenip ve büyümesi için gerekli elementlerin birikimi (kemik-kıkırdak arayüzünde, hastalıklı bölümlerde) enzim olarak Zn, Ca, K ve P varlığına dayanan kıkırdak parçalayan enzimlerin aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar önceden yapılan birçok çalışma ile örtüştüğü görülmektedir. Yapısal analiz sonucu elde edilen bulguların normal kıkırdak yapısından farklı olduğu görülmektedir. Eklem kıkırdağının yapısında yüzeysel, orta, derin kalsifiye ve subkondral bölgeler görülmektedir. Kollajen liflerin yönelimi yüzeysel bölgede yüzeye paralel, geçiş bölgesinde daha kalın ve rastgele yönelimli ve kalsifiye bölgesinde ise daha derin ve dikey olarak yönelmiştir. μ -PIXE ve SAXS teknikleri osteoartrit meydana gelen enzimatik değişikliklerin hem elementel hem de yönelim özelliklerini açıklamasını sağlamaktadır [3].

Moger ve diğ. sağlıklı ve hastalıklı eklem kıkırdağı ve subkondral kemikte kollajen yönelimlerinin bölgesel değişimini belirlemek için küçük açılı X-ray saçılma (SAXS) tekniğini kullanmışlardır. SAXS kırınım desenleri Avrupa Sinkrotron Radyasyon Fakültesinde kemik kesitleri ve kıkırdağın derinlikleri arttırılarak alınmıştır. Düşük yüklere maruz kalan bölgelerde kollajen liflerin daha düşük bir derecede yönelim göstermektedir. Oldukça yüksek yüke maruz kalan bölgelerde kollajen lifler özellikle radyal katmanda yönelime sahip olduğunu göstermektedir. Lezyonların saptandığında erken aşamada dahi olsa kollajen liflerin yönelimleri bozulma görülmüştür. Subkondral kemik lifleri eklem kesme kuvvetlerinin olduğu bölgelerde bükülmektedir. Liflerin yönelimdeki değişiklikler kıkırdağın bozulmamış olduğu bölgelerde bile kıkırdakta kalsifikasyon olduğu görülmektedir. Kalsifiye tabakasında kıkırdak kaybına neden olan çok ilerlemiş lezyonlar yüzeye teğet olan tabakada görülmektedir. Kollajen düzenindeki bölgesel farklılıkların eklem kıkırdağındaki çok düzenli katmanların üzerine binen yükü destekleyen en önemli unsur olduğunu

göstermektedir. Üstteki kıkırdığın derin dokusunda meydana gelen lezyonlardaki değişiklikler normal görülmektedir. Bu yüzden arayüz bölgesinin hastalıkların erken teşhis aşamasını anlayıp ona göre tedavi uygulanması için anahtar bir unsur olduğu söylenmektedir [4].

Zhang ve diğ. kemikte kaybolan inorganik maddelerin olası dejenratif sürecini ve dağılımını ve osteoporoz tedavisi ve önlenmesi için bilimsel bir temel temin etmek amacıyla, PIXE tekniğini kullanmışlardır. Çalışmalarını yapmak için femur kırığı olan yedi hastadan ve otopsideki beş ölüden femur başı alınıp elementel konsantrasyonlarını belirlemek için PIXE tekniğini kullanmışlardır. Sinkrotron radyasyon X-ışını flouresans (SRXRF) mikroprob analizi tekniği femurun başından alınan ince kesitler incelenerek kıkırdak yapı, kompakt ve süngerimsi bölgeler taramak için kullanılmıştır. Örnek hazırlama ve deney prosedürü detaylı olarak tarif edilmektedir. Sonuçlarda kontrol grubunda Sr, P, Ca, Fe ve Cu konsantrasyonlarının hasta grubundan daha yüksek olduğu, fakat S, K, Zn, Mn konsantrasyonlarında önemli ölçüde farklılık göstermediği görülmektedir. Kıkırdak, kompakt ve süngerimsi yapı içeren ince kesit kemik dokusunda, Ca, P, K, Fe, Zn, Sr, Pb gibi elementlerin kantitatif dağılım sonuçları incelenmiştir. Elde edilen veriler hasta grubunda hem kemik hem de kıkırdak bölümünde Ca, P ve K (kemik bileşimindeki büyük elementler) konsantrasyonunun oldukça az olduğunu, fakat kompakt bölgede kayda değer bir farklılığın olmadığını göstermektedir. P, K, Zn, Sr ve Ca arasındaki korelasyon ile birlikte kemikteki bazı metal elementlerin mineral ve fizyolojik fonksiyon kaybı mekanizması da tartışılmalıdır [5].

Kaabar ve diğ. μ -PIXE ve PIGE tekniklerini osteoartritten(OA) etkilenen hastalıklı ve sağlıklı insan femurbaşında bulunan iz ve eser elementlerin araştırılmasında kullanılmıştır. PIGE, Na ve F gibi atom numarası $z < 15$ küçük olan elementleri belirlemek için kullanılırken, PIXE Ca, Z, P ve S gibi atom numarası $z > 15$ büyük olan elementleri belirlemek için kullanılır. Kemik ve kıkırdak bölümlerinde S ve Na konsantrasyonları özellikle normal dokulardaki kıkırdak yapısında bulunan anahtar elementlerin biriktiği görülmektedir. Zn elementinin kemik-kıkırdak arayüzünde konsantrasyonunun arttığı görülmektedir. SAXS, OA etkilenen dekalsifiye olmuş insan femurbaşında, kollajen liflerin yer değişimini ölçmek için kullanılmıştır. SAXS sonuçları başkalarının bulgularının aksine; normal kollajen tip I ve çeşitli

bölgelerdeki hastalıklı doku arasındaki periyodik aksenal hafif bir düşüş göstermektedir. PIGE ve PIXE teknikleri OA etkilenen normal ve hastalıklı kişilerin elementel analizi için kullanılırken, SAXS tekniği ile kemik ve kıkırdak kollajen oluşumunu ve kemiğin lokal yapısını incelemek için kullanılmaktadır [6].

Ismail ve diğ. bu çalışmada X-ışını faz yayılımı kullanarak kemik- kıkırdak arayüzü ile ilgili incelemeler yapmışlardır. Faz yayılım yöntemlerinin kullanılması çok zayıflamış olan subkondral kemikteki bitişik kıkırdak gibi, düşük atom numaralarını incelemek için düşünülebilir görülmektedir.

Kemik üzerine gelen eklem kıkırdak kollajen liflerden oluşan bir ağ içerir. Bu ağ, osteoartrit gibi dejeneratif eklem hastalığı, zarar gören, bütünlüğü kıkırdak için gereklidir. Surrey ve aynı zamanda Paul Scherrer Enstitüsü (PSI) de bu grup tarafından hastalık ile meydana gelen değişiklikler ve kemik-kıkırdak arayüzünde varolan durumlarla ilgili bir dizi çalışma teknikleri uygulanarak çalışmalar yapılmıştır. Özellikle ilgi çeken tekniklerinden biri X-ışını görüntüleme kontrastı, büyük ölçekli kollajen organizasyonunun anatomik özellikleri ve derin kıkırdak bölgesinde kollajen lifler içinde bulunan mineralli faz hakkında bilgi vermektedir. Kemik bölümünde elde edilen sonuçlarda osteoartritli lezyona rastlanmadığına ve hastalıkla kemiğe karşı baseline olarak kullanılıp karşılaştırıldığını göstermektedir [7].

Kaabar ve diğ. kemik-kıkırdak arayüzünde element dağılımında meydana gelen değişikliklere her geçen gün ilginin arttığını belirtmektedirler. Kemik-kıkırdak arayüzünde ister mekanik hasardan kaynaklansın bu durum isterse hastalıktan. Özellikle, bu tür araştırmalar romatizmal artrit gibi hastalık süreçleri ile ilişkili olan ya da kıkırdak ve subkondral kemiklerin sinoviyal eklemlerinde meydana gelen osteoartritik aşınma ve yıpranma gibi hasarlarla ilişkili elementel değişikliklerin incelenmesi için yararlı olmaktadır. Yapılan çalışmada total kalça protezi ameliyatı ile elde edilen femur başının bölümlerini (μ -PIXE) ve (RBS) teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Kemik-kıkırdak arayüzünde Zn, Ca ve P artışı gözlenmiştir. Ayrıca, femur başının bir bölümünün subkondral yüzeyini altta yatan süngersi kemikte Zn konsantrasyonu ölçülmüştür, $136\mu\text{gg}^{-1}$ değer elde edilmiştir. Bunun yanısıra Ca ve P aynı pozisyondaki kemikte varolan değerleri ölçülmüş ve bu değerler sırasıyla 0,235

ve 0,0451 gg⁻¹ elde edilmiştir. Bu değerler aynı teknikleri kullanan başka yazarların yayınlamış olduğu makalelerdeki değerlerle çok az farklılık göstermektedir [8].

Bradley ve diğ. iki değerlikli kalsiyum, fosfor ve çinko katyonların eklem kıkırdağı ve kondral kemiğin normal büyüme, yeniden yapılanma, dejeneratif ve osteoartrit (OA) ile bağlantılı inflamatuvar süreçlerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Özellikle, metaloproteinaz olarak bilinen enzimler sınıfı hastalıkla ilişkili başlaması, ilerlemesi ve yeniden modelleme işlemi sırasında etkin olduğuna inanılan bir kofaktör olarak hareket etmektedir. Katyon ve anyonların göreceli varlığı, özellikle Na⁺² ve Cl⁻¹ iyonları kıkırdaktaki sabit yük yoğunluğu (FKH) ile ilişkilidir. Örneğin kondroitin sülfat ile bağlantılı yüksek gerilimli bir yapı nötralize eder. Sonuç olarak, kemiğin yapısal bileşenlerinde, kemikteki kalsiyum hidroksiapatit formunda stronsiyum apatit ve florapatit içermektedir. OA etkilenen eklem kıkırdak bölümlerini birçok fiziksel teknik kullanılarak inceleme yapılmıştır. Varolan katyon ve anyon iyonlarının dağılımını araştırmak için μ -SXRF, μ -PIXE ve μ -PIGE teknikleri kullanılmıştır. Bu fiziksel tekniklerin kombinasyonu bu dokuların element içeriği kapsamlı bir değerlendirme yapma yeteneğine sahiptir, nispeten düşük atom numarası olan iyonlarının oldukça geniş alanlar üzerinde bir dizi eşzamanlı dönüşümler elde edilebilmektedir [9].

Kaabar ve diğ. (μ -PIXE) analizinde osteoartrit (OA) etkilenen hastalıklı insan eklem kıkırdağı bölümlerinde temel elementlerin bir dizi dağılım miktarını incelemişlerdir. Ca, P, ve Zn gibi çeşitli katyonların eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin normal büyüme ve yeniden şekillenmesi için önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Özellikle, metaloproteinaz olarak bilinen enzimler sınıfı hastalıkla ilişkili başlaması, ilerlemesi ve yeniden modelleme işlemi sırasında etkin olduğuna inanılan bir kofaktör olduğu söylenmektedir. Alkalın fosfataz gibi diğer önemli enzimlerin kıkırdak mineralizasyonu ile ilişkisi olduğu açıklanmaktadır. Kemik ve kıkırdak element dağılımlarının haritalama için Sinkrotron Radyasyon X-ışını floresans (SR-XRF) tekniği kullanılarak araştırmalar yapılmıştır. CSAXS beamline de kullanarak mevcut araştırmalarda, Küçük-Açı X-ışını saçılması (SAXS) hastalıklı eklem kıkırdağının kollajen ağları yapısal ve organizasyonel değişiklikleri keşfetmek için dekalsifiye insan eklem kıkırdağı üzerinde yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda

hem elemental hemde yönelim özellikleri ile osteoartrit eklemlerde meydana gelen enzimatik değişimlerin tamamen resmetmemizi sağlamaktadır [10].

Camacho ve diğ. taramalı küçük açılı X-ışını saçılması (SAXS tarayarak) ve Fourier-dönüşümü kızılötesi mikrospektroskopi (FT-IRM) anatomik pozisyonda kemik yapısal özellikleri karakterize etmek için daha önce bağımsız bir şekilde kullanılmıştır. SAXS apatitik kristallerin fiziksel özelliklerinin doğrudan ölçümünü sağlarken, FT-IRM de moleküler düzeyde hem mineral hem de organik matrisinin yapısını değerlendirmektedir. Bu çalışmadaki her iki yöntem 14 aylık (kaza sonucu ölüm) L-4 vertebra gelişen kemik dokusu incelemek için uygulanmıştır. Bir 200µm kalınlığında kesit taramalı elektron mikroskobu ve SAXS cihazı kullanılarak incelenmiştir. Spektrumlar kortikal ve kanserli kemik belirli bölgelerinde uzaysal çözünürlük 200µm'de toplanmaktadır. Toplam SAXS yoğunluğu, kristal kalınlığı (T), baskın kristal yönelim ve derecesi belirlenen parametrelerdir. FT-IRM analizi için, 4 mm kalınlığında üst uzunlamasına örnekler kesilmiştir. Spektrum bölgelerinin 100 × 100 µm² SAXS spektrumları aynı yerden elde edilmiştir. Polarize FT-IRM verileri apatit ve kollajen bileşenlerin molekül oryantasyonunu belirlemek için toplanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları elde edilen bilgiler kullanılan iki tekniğin birbirini tamamladığını göstermektedir. Hem SAXS ve FT-IRM verileri kanserli bölge ile kortikal bölge karşılaştırıldığında kristallerin yapısında önemli ölçüde değişiklikler olduğu görülmüştür. Kortekste mineralizasyonun gittikçe arttığı, kristallerin kortikal kemik ve kanserli bölgeyle karşılaştırıldığında daha büyük derecelerde yöneldiği elde edilmiştir. Kullanılan iki teknikte bireysel olarak kullanılsa da her ikisinin kombinasyonu ile kemik kristal olgunlaşma mekanizmasını açıklamak için olanak sağlamaktadır [11].

D.A. Bradley ve diğ. eklem kıkırdak metalloproteinazlarında, artritinin dejeneratif ve enflamatuar süreçlerinde ve normal büyüme ve yeniden şekillendirme süreçlerinde Zn ve Ca gibi iki değerli katyonların varlığına dayanan bir enzim ailesi merkezi bir rol oynamaktadır. Kıkırdak mineralizasyonu ile ilgili olan bir başka önemli enzim olan alkalın fosfataz metalik kofaktörlere de bağımlıdır. Divalan katyonların lokal konsantrasyonu bu nedenle kıkırdak patofizyolojisi için önemli derecede ilgidir ve birçok yazar, kemik ve kıkırdağın metal iyon dağılımlarını haritalamak için sinkrotron X-ışını flüoresansını (XRF) kullanmıştır. 10 µm'lik mekansal çözünürlüğü

sağlayan ve histolojik kesitlere uygulanabilen bir tezgah üstü XRF analitik mikroskop kullanmışlardır ve bu da dağılımın yapısal özelliklerle korelasyonunu kolaylaştırmıştır. Bu çalışma, normal dokuda, hastalığıdaki değişikliklerin araştırılmasının öncüsü olarak elemental dağılımı sağlamayı amaçlamıştır. At eklem metakarpofalangeal eklemden hazırlanan altı örnek için normal ve mineralize kıkırdak arasındaki tidemark çevresinde artmış Zn ve Sr iyon konsantrasyonu gözlemlenmiştir. Bunun aktif bir yeniden yapılanma alanı olduğuna inanılmıştır, ancak bugüne kadar yapılan ayrıntılı karakterizasyonu yoktur. Proton ile İndüklenmiş X-ışını Emisyonu (PIXE) kullanan iki numunede de ön sonuçları bildirilmiştir. Bu, subkondral kemiğin yüzeyinde ve eklem kıkırdağında Sr ve Zn'nun artmış birikimi olan sinkrotron esaslı XRF'yi kullanan önceki gözlemlerini de teyit etmiştir [12].

Yurong Fei ve diğ. şeker hastalığı kemik metabolizmasını etkilemekte ve osteopeni ve osteoporozu neden olmaktadır, ancak patojenik mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu problemi çözmek için deneysel diyabetik osteoporoz modelinde kemik mineral elementi analiz edilmiştir. Erkek Wistar sıçanları rasgele streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik (n = 5) ve kontrol grubuna (n = 5) bölünmüştür. Deneysel 68 gün sürmüş ve deney sonunda femur kemik mineral yoğunluğu (KMY) çift enerjili X-ışını absorpsiyometri ile ölçülmüştür ve hayvanlarda femur içerisindeki element içeriği sinkrotron radyasyon X-ışını flüoresans (SRXRF) mikrotambası analiz tekniği ile belirlenmiştir. Sonuçlar diyabetik gruptaki femur KMY'nin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu göstermiştir (P <0.01). Diyabetik femurlarda kalsiyum (Ca), fosfor (P) ve çinko (Zn)'nin bağıl mineral içeriği kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Ve diyabetiklerde stronsiyum (Sr) % 11 düşmüştür (P = 0,09). Kükürtün (S) relatif içeriği, diyabetiklerde kontrollerinkinden istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır (P <0,01). Ancak, iki grup arasında krom (Cr), demir (Fe), bakır (Cu) ve kurşun (Pb) bağıl içeriğinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. İstatistiksel analiz, Ca'nın Sr (R = 0,38 ve P <0,05) ve Zn (R = 0,37 ve P <0,05) ile P (R = 0,85 ve P <0,001) ile pozitif korelasyon verdiğini ortaya koymuştur. Oysa Zn, S ile negatif korelasyon göstermiştir (R = -0,40 ve P <0,05). Bulgular, mineral kaybının diyabetikler de KMY azalmasına neden olduğunu ortaya koymaktadır [13].

I.Lima ve diğ. iz elementlerin anormal birikimi veya eksikliği teorik olarak kemik oluşumunu bozabilmekte ve osteoporoza katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda, osteoporoz gibi kemik hastalıklarıyla ilgili birçok sorunu çözüme kavuşturmadan açıklığa kavuşturmak için büyük ve eser elementlerin bilgisi çok önemlidir. Osteoporotik kemiklerdeki morfolojilere ve minerallere erişmek için çeşitli görüntüleme teknikleri yararlı olabilir. Bu çalışmada, X-ışını görüntüleme tekniği olarak sinkrotron radyasyonlu X-ışınılı mikrofloresan kullanılmış ve kemik yapıları araştırılmıştır. Bu nedenle, bu araştırma kemik kalitesinin bazı yönleri hakkındaki bilgiyi geliştirmeyi amaçlamaktadır. Ölçümler Brezilya'daki Brezilyalı Sinkrotron Laboratuvar Işık Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. 4-23 keV'lik bir enerji aralığına, 45 °/45 ° geometrisine ve kılcal optik bir beyaz giriş kullanılmıştır. Kemik kalitesinin sadece kemiklerin mimarisi ile değil aynı zamanda minerallerin konsantrasyonu ve dağılımı dikkate alınarak değerlendirilebileceği ve değerlendirilmesi gerektiği kanıtlanmıştır. Sonuçlarımız, mikron ölçeğindeki kemik bölgelerindeki elemental dağılımların bu yapılardaki fonksiyonları anlamada çok yardımcı olduğunu göstermiştir [14].

I. Lima ve diğ. bu çalışmada, kemik örneklerinin iç yapısını araştırmak için iki X-ray tekniği 3D mikrobik tomografi (mikro-CT) ve X-ışın mikrofloresansı (mikro-XRF) kullanılmıştır. Bu iki teknik birlikte çalışılır, çünkü kemik yapı ve kompozisyonunu karakterize etmek için birbirlerinin tamamlayıcısı olarak görülmektedir. Başlangıçta, numuneler mikrobilgisayar tomografi sisteminde tarama prosedürünü yapmak için kullanılmıştır ve ikinci adım da, X-ışını mikro-flüoresan analizinin yapılması planlanmıştır. Sonuçlar, her iki tekniğin de kemik örneklerini analiz etmek, incelemek ve karakterize etmek için güçlü yöntem olduğunu göstermektedir: Her iki teknik, kemik yapılarını ve kompozisyonlarını incelemek için alternatif prosedürlerdir ve tamamlayıcıdır [15].

Marios georgiadis ve diğ. ultrayapı düzenlenmesi ve yönlendirilmesi, polimerler, ahşap veya kemik gibi homojen olmayan ve anizotropik malzemelerin mekanik özellikleri için önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, makroskopik bağlamda malzemenin ultrayapı yönelimini mekansal olarak çözmek ve nicelleştirmek için teknikler eksiktir. Bu çalışmada, ultrayapı 3D oryantasyonun nicel ve mekansal olarak çözümlenmesine izin veren yeni bir yöntem sunulmuştur. Önerilen 3D tarama

küçük açılı X-ışını saçılımı (3D sSAXS) yöntemi, bir insan vertebranın ince trabeküler kemik örneğinde gösterilmiştir. Sinkrotron radyasyon kaynağından gelen bir mikro odaklı X ışınları ışını, numuneyi farklı dönme açısı için rastgele tarama yapmak için kullanılmıştır. Ayrıca, farklı dönme açılarındaki SAXS verileri ile kemik ultrayapısının yerel 3D yönlendirme ve yönlendirme derecesi (DO) arasındaki ilişkiyi tanımlamak için bir matematiksel çerçeve geliştirilmiş, onaylanmış ve kullanılmıştır. Ortaya çıkan yerel 3D yönlendirme vektör alanlarını kullanarak bir 3D yönlendirme haritası ile görselleştirilmiştir. Son olarak, ardışık kemik bölümlerine önerilen 3D tarama SAXS yöntemini uygulayarak, komple bir trabeküler elemanın yerel yöneliminin 3D haritası ilk kez yeniden oluşturulabilmiştir. Elde edilen 3D oryantasyon haritası, kemik altyapısı organizasyonu hakkında bilgi vermiş ve trabeküler kemik mikromimarisi ile yerel kemik altyapısı arasındaki bağlantıları ortaya koymuştur. Daha spesifik olarak, trabeküler kemik altyapısının, onlarca mikrometre oryantasyon alanlarında organize edildiğini gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak, yüksek DO'lu alanların trabeküler yapının yüzeyinin yakınında bulunması daha olası olduğu ve daha düşük DO (veya geçiş bölgesi) alanlar, yüksek DO'lu alanlar arasında yer aldığı görülmüştür. Yöntem tekrarlanabilirliği, numuneyi farklı numune eğim açılarındaki tararken elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla doğrulanmıştır. 3D tarama SAXS kullanılarak oluşturulan 3D oryantasyon haritaları, kemik altyapısı ve kemik mekaniği arasındaki yapı-fonksiyon ilişkilerini ölçmek ve anlamak için yardımcı olacaktır. Bunun ötesinde, önerilen yöntem malzeme bileşenlerinin 3B yönünü yerel olarak belirlemek amacıyla malzeme bilimleri gibi diğer araştırma alanlarında da kullanılabilir [16].

T.A. Grünwald ve diğ. biyouyumluluk, yeni implant malzemelerinin geliştirilmesinde önemli bir konudur. Bu bağlamda, yeni bir sınıf biyolojik olarak parçalanabilir Mg implantları, iltihaplanma yanıtı ve mekanik özellikler açısından umut verici özellikler sergilemektedir. Bununla birlikte, Mg bozunum ürünleri ile nano ölçekli yapı ve kemik mineralizasyonu arasındaki etkileşim henüz tam olarak anlaşılabilir değildir. Sinkrotron mikro ışınları x ışını flüoresansı (μ XRF), küçük açılı x ışını saçılımı (μ SAXS) ve x ışını kırınımı (μ XRD) ile yapılan araştırmalar, parçalanma hızının kemikteki kanın etrafındaki Mg birikimi yerleri damarlar, laküna ve kemik iliği üzerindeki etkisini göstermiştir. İmplant-kemik arayüzünde sadece en

yüksek bozulma hızında Mg bulunmuştur. Kemik matrisine Mg eklenmesi tamamlanmış implant bozunmasından sonra Mg seviyesinin düştüğü için kalıcı olmadığı görülmüştür. μ SAXS ve μ XRD, Mg'nin hidroksil apatit (HAP) kristalit yapısını etkilediğini göstermiştir, zira yüksek Mg konsantrasyonlu bölgelerde belirgin şekilde daha kısa ve daha ince HAP kristalitleri bulunmuştur. Bu bölgeler aynı zamanda HAP kafesin ve düşük kristalin düzeninin de bir daralma sergilemiştir [17].

B. Pemmer ve diğ. iz elementler, kemikte biriken bilinen küçük miktarlardaki kimyasal elementlerdir. Kortikal ve trabeküler kemikler, osteonlar ve farklı mineral içeriğine sahip kemik paketleri gibi kemik yapısal birimlerinden (BSU'lar) oluşur ve çimento hatları ile ayrılırlar. Kemikteki eser elementleri araştıran daha önceki çalışmalar çözünürlükten yoksundu ve bu nedenle insan kemiğinin BSU'larındaki çinko (Zn), stronsiyum (Sr) ve kurşun (Pb) konsantrasyonu hakkında çok az bilgi mevcuttu. İnsan kemik dokusunda Zn, Sr ve Pb'nin dağılımını ve birikimini belirlemek için kantitatif geri saçılan elektron görüntüleme (qBEI) ile birlikte sinkrotron radyasyon indüklenen mikro X-ışını floresans analizi (SR μ -XRF) kullanılmıştır. Osteoporotik femur boynu kırıkları ve sağlıklı kişilerden gelen on altı insan kemik örneği (10 femoral boyun ve 4 femur başı) analiz edilmiş. Flüoresans yoğunluk haritaları BE görüntüleri ile eşleştirilip ve kalsiyum (Ca) içeriği ile korelasyon göstermiştir. Çinko ve Pb'nin çevresindeki mineralize kemik matrisine kıyasla tüm numunelerin çimento hatlarında belirgin olarak artmış seviyelerde olduğunu elde etmişlerdir. Pb ve Sr düzeyleri ile mineralizasyon derecesi arasında korelasyon olduğu bulunmuştur. İlginç olarak, Zn yoğunluklarının Ca seviyeleri ile hiçbir korelasyon olmamasıdır. İnsan kemiklerinin BSU'larında farklı birikim mekanizmalarına işaret eden Zn, Pb ve Sr eser elementlerinin diferansiyel bir birikimi olduğunu ilk kez göstermişlerdir [18].

B. Sindhapakorn ve diğ. osteoartrit (OA), eklem kıkırdağının dejenerasyonu ve subkondral kemiğin kalınlaşması ile ilgili karakterizasyon yapmışlardır. Bu çalışma da, sağlıklı ve OA kemik ve kıkırdak karşılaştırılıp, biyokimyasal bileşenlerin değişimi incelenmiştir. Diz osteoartritindeki kemik değişiklikleri için Sinkrotron tabanlı X-ışını floresans (SR-XRF) ve Xray kenar yapısı yakınındaki X-ışını emilimini (XANES) içeren absorpsiyon spektroskopisi (XAS) ve genişletilmiş X-

ışınları emici ince yapı (EXAFS) teknikleri kullanılmıştır. Kemik örnekleri çeşitli osteoartritli hastalardan toplanmış ve hem erkek hem de kadın hastalardan alınmış olup, yaşları 20 ile 74 arasında değişmektedir. SR-XRF sonuçları, XRF yoğunluklarına dayalı olarak; 20-36, 40-60, 70 yaşa göre üç ana grupta çoğunlukla Ca elementi için 4240 eV'da uyarılmıştır. XAS tekniklerini kullanarak, XANES özellikleri, osteoartrit semptomlarından etkilenen kemik örneklerinde meydana gelen elektronik geçiş terimlerini açıklamak için kullanılabilir. Dahası, kemik örneklerinde Ca iyonları etrafında yapısal bir değişiklik, yaşlar arttıkça Ca-amorf fazın artışı gösteren EXAFS sonuçlarıyla açıkça elde edilmektedir [19].

J. Mora-Macías ve diğ. kemik mekanik özelliklerinin belirlenmesinde nanoindentasyon başarıyla kullanılmıştır. Kırık iyileşmesindeki uygulaması, rejenerasyon işlemi sırasında dokunmuş kemiğin malzeme özelliklerinin gelişimi hakkında bilgi sağlar. Bununla birlikte, bu teknik distraksiyon osteogenezi sırasında dokuma kemik mekanik özellikleri değerlendirmede uygulanmamıştır.

Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, kemik nakil işlemi sırasında üretilen dokuma kemiğin elastik modülünün uzamsal ve zamansal değişkenliklerini değerlendirmektir. Kallus numuneleri, müdahale edilen hayvanlardan kemik nakli sırasında farklı zaman noktalarında (cerrahi sonrası 35, 50, 79, 98, 161 ve 525 günler) nanoindentasyon ölçümleri için kullanılmıştır. Sonuçlar, dokuma kemiğinin ortalama elastik modülünün kemik nakil işlemi sırasında arttığını ve 525 günden sonra (cerrahiden sonra 7GPa'dan 35 gün sonra ameliyattan yaklaşık 525 gün sonra 14GPa'ya kadar) kortikal kemiğin değerinin% 77'sine ulaştığını gösterdi. Kemik taşıma sırasında üretilen dokuma kemik, kırılma iyileşmesi için bildirilen değerler olarak zamana bağlı olarak elastik modülün evrimini benzer şekilde ortaya koymaktadır. Ayrıca, kallus içinde elastik modülün farklı mekansal varyasyonları sürecin farklı aşamalarında bulunmuştur [20].

D. Gibelli ve diğ. X-ışını enerji dağılım spektrometresi (SEM-EDS) ile birleştirilmiş taramalı elektron mikroskobu, keskin lezyonların makroskopik analizinin geliştirilmesi için literatürde yaygın olarak görülmekle birlikte, adli antropoloji başta olmak üzere adli bağlamda gerçek potansiyeline ilişkin çok az endikasyon , şu an mevcuttur. Bu makale, keskin kuvvet yaralanmasından sonra kemik üzerinde bulunan

metalik kalıntıların davranışının analizi için bir pilot çalışmayı temsil etmektedir. On dört lezyon insan kemiğinde (yarıçapı) tüm yumuşak dokuların üzerinde yedi değişik keskin alet (üç metal alet, üç metal testere ve fırında kil bıçağı) ile temizlenmiş. Aletlere ve lezyonlara SEM-EDS uygulanmıştır. Çapları 0,5 ila 150 mm arasında olan her lezyonda 3 ila 18 parçacık tespit edildi. Olguların% 58'inde parçacık bileşimi kullanılan araç ile uyumlu olduğu görülmüştür. Sonuçlar, keskin kuvvet yaralanmasının sıklıkla yaygın metal türleri durumunda kemik üzerinde nispeten az tortu bıraktığını düşündürmektedir. Testereleler, diğer kalıntılarla bıçaklardan biraz daha fazla kirlilik gösterdi; testere dişlerinin önceden karşılaşılan malzemenin kalıntılarını tutma kabiliyeti ile açıklanabilir. Buna ek olarak, kemiğin kesilmesi için kullanılan aletle ilgili metal kalıntıları lezyonların kenarlarında / duvarlarında testere izlerinde bulunurken, bıçak / makas durumunda çalılık tabanında daha sık görülen metal kalıntıları, Kalıntıları terk ettiği zaman pişmiş kil bıçağı hariç, onları zeminden kenarlara ve çevresindeki kemik arasında eşit olarak bölünmüş gibi görünüyordu [21].

Policarp Hortolà suç muayenesinde adli öneme sahip olduklarından, insan kan lekelerinin bazı geleneksel silah ve ritüel cisimlerin oluşumundan dolayı antropolojik etkileri vardır. Daha önce, evcil koyun (*Ovis aries*) tibia da dahil olmak üzere deney numunelerinde eritrositlerin rehberliğinde tarama elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. Burada, kan örneği yüzey morfolojisinde, örnek içi (smear bölgesi) ve numuneler arası (bireysel bulaşma, bulaşma mekanizması, kemik orijinli) parametrelerin bir fonksiyonu olarak ortaya çıkabilecek potansiyel farklılıklar ortaya konan karşılaştırmalı bir SEM çalışması rapor edilmiştir. Emu (*Dromaius novaehollandiae*) tibiotarsus'un bir parçası, yetişkin bir erkeğin periferik kanıyla bulaştırıldı. Hava ile kurutma ve iç mekanlarda depolandıktan sonra, üç kan stainının sınır ve komşu iç alanları, düşük vakum modunda çalışan değişken basınçlı SEM'de ikincil elektronlar aracılığıyla incelendi. Bir bütün olarak kuruma mikro çatlakları mevcuttu, leke ile substrat arasındaki sınırlar zayıf olarak belirlenmiş ve incelenen bölgelerde hiç eritrosit negatif kopyası gözlemlenmemiştir. İlâveten, kurutulan plazma matrisinde az çok gömülü bulunan bir varsayılan fibrin ağı, smear sınırında gözlenmiştir. Kayma bulaşmalarındaki lekelenme bölgesi ile ilgili olarak, baş ve kuyruk benzerken, çevre ve sınır farklı olarak görülmüştür. Kaygan tek tek göz

önüne alındığında, benzer özelliklere sahiplerdi. Sürtünme mekanizmasının bir fonksiyonu olarak smear bölgesine bağlı olarak, periferik sürgülü veya dokunduğundan farklıydı, oysa sınırlar kayma ve dokunma bulaşmalarına benzerdi. Kemik kökeninin bir fonksiyonu olan smear bölgesi ile ilgili olarak, çevre, ratit ve memeli kemiklerinde benzer olduğunu ortaya koyarken, sınır, ratit ve memeli kemiklerinde farklıydı. Bu çalışmanın sonuçları, SEM incelemesinin verimli bir şekilde ratit kemiğinde kan lekelerini algılamak için kullanılabileceğini göstermektedir. Yerli koyun kemiklerindeki daha önceki SEM sonuçlarıyla birlikte, bu ham materyalin memeli veya ratit orijinine bakılmaksızın kemikten yapılmış cisimler üzerinde kan kalıntılarının tespit edilebileceğini ileri sürmüşler [22].

Ines Jimenez-Palomar ve diğ. sıçan kemiğinin mikron uzunluk skalasındaki mekanik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gözlemlenirken bir yerinde atomik kuvvet mikroskopu (AFM) kurulumu kullanılarak çevresel koşulların bir fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Odaklanmış iyon demeti ile imal edilen sıçan kemik konsolu örnekleri, hem düşük hem de yüksek vakum koşullarında SEM'de ve ayrıca elastik modüllerini ölçmek için AFM'yi kullanarak havada ıslak olarak test edilmiş. Sıçan kemiğinin mikron uzunluk skalasındaki elastik modülü, çevresel test koşullarından bağımsız olduğu gösterilmiştir ve nispeten yüksek vakum koşullarında bile suyun kemiğe bağlandığını gösterir. Bu nedenle çalışmalarımız, yüksek çözünürlüklü SEM kullanılarak gözlemlenmekte olan kemiğin in situ mekanik testlerinin, havadaki ıslak teste benzer sonuçlar sağlayabileceğini göstermektedir [23].

Michelle Gerritsen ve diğ. kollajen canlı organizmaların dokularında hayati bir maddedir. İnsan vücudunun neredeyse her yerinde bulunur, kollajen bağ dokusunda, kemik büyümesinde ve kıkırdakta önemlidir. Kollajen XI, kıkırdak dokusunun çok küçük bir bölümünü oluşturur; Ancak, kartilaginöz dokuda önemli bir rol oynar. Kollajen XI ve iki kollajen XI izoformu, V1b ve V2, ossifikasyon sürecinde kritik öneme sahiptir. Kollajen XI, V1b, V2'nin ve bunların gelişmekte olan sığır kıkırdağı içindeki ossifikasyon sürecindeki spesifik fonksiyonlarının yeri iyi tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, sığır kıkırdağındaki kollajen I, II, XI ve iki kollajen XI izoformu V1b ve V2 immüno-SEM tekniği kullanılarak araştırılmıştır. I ve II kollajenlerinin yerleri için yapılan sonuçlar, önceki çalışma ile tutarlılık düzeyinin

yüksek olduğunu göstermektedir; bu nedenle, immüno-SEM tekniğinin, kırıkta ve mineralize dokudaki çeşitli kollajen tiplerinin yerini belirlemek için güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışma, XI kolajeni alt hipertrofik bölgede ve ayrıca kırıkta doku boyunca yaklaşık iki mikron hücre duvarlarında perisellüler bir düzen içinde mevcut olduğunu göstermiştir. V1b eklem yüzeyinde, mineralize bölgede, istirahat bölgesinde ve diyafizin distal kenarında V₂ izoformu, yeni oluşan kırıkta bölgelerinde en güçlü şekilde ifade edilir ve kondrosit olgunlaşmasıyla kaybolmuştur. V₂, epifizin distal kenarında olduğu kadar mineralize dokuda da bulunur. XI Kollajen ve iki izoformu V1b ve V₂'nin ossifikasyon sürecinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu rol iyi anlaşılmamıştır ve hala karakterize edilmektedir. Osteo-kondral kavşakta ve ortak yüzeyde iki izoformunun tespiti, XI, V1b ve V₂ kolajenlerinin ossifikasyon sürecinde hayati bir rol oynadığına işaret eder ve spesifik oldukları için daha fazla araştırmayı garanti eder ossifikasyon süreci içinde işlev görmüştür [24].

1. GENEL BİLGİLER

Yaşamın temel taşı olan hücrelerin çoğu dokulara yerleşmiş olup bağ dokusu adı verilen karmaşık bir hücre dışı yatak ile çevrelenmiştir. Hücre dışı yatak veya extrasellüler matrix (EM) bağ dokusunun bağlayıcı ve destekleyici fonksiyonunu gerçekleştirir. Organizmada bulunan en yaygın doku türü olan bağ dokusu; kıkırdak, tendonlar, ligamanlar, kemik matrixi, böbrek pelvisi, üreterler ve üretrada dağılım göstermektedir.

Deri altına da yayılmış olan bağ dokusu karaciğer ve kas gibi parankim organlarda ise hücrelerarası boşluğu doldurarak dokuların şekillenmelerini sağlar ve organları birbirine bağlayarak sistemlerin organizasyonunu sağlamaktadır. Doku kayıplarını önler, yara iyileşmesinde fonksiyon görür. Extrasellüler matrix temelde substantia fundamentalis denen temel madde içinde yüzen çözünmez protein liflerinden oluşmuştur.

1.Hücreler

2.Hücrelerarası madde (Extrasellüler Matrix)

Temel madde (Substantia fundamentalis)

1.Yapıştırıcı (Adhesif) glikoproteinler

2.Proteoglikanlar

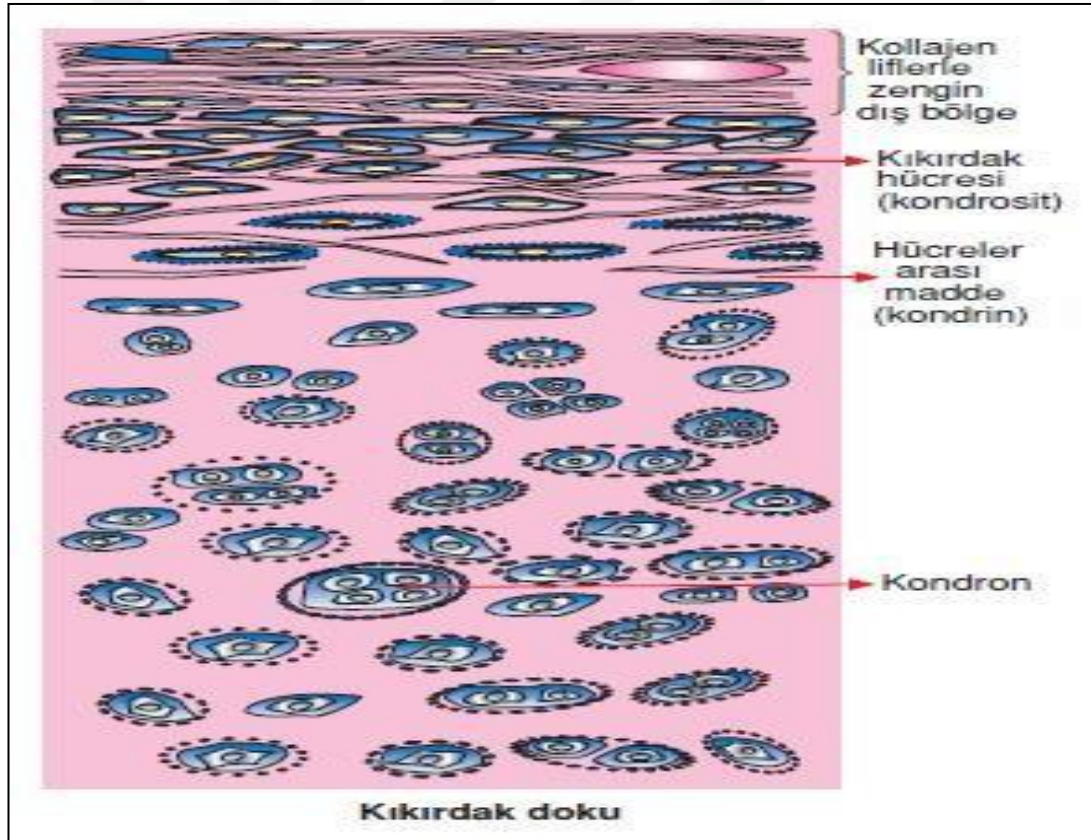
3.Serumda bulunan maddeler (glukoz, albumin, üre...)

Temel madde içinde yüzen protein lifler: Kollajen ve Elastindir.

1.1. Kıkırdak Doku

Kıkırdak doku embriyonun mezoderm tabakasından gelişmiş özel bir bağ dokusu tipidir Kemik dışındaki diğer bağ dokularından daha sert bir doku sahiptir ama belirli bir bükülebilirliğe ve esnekliğe vardır. Kıkırdak dokunun içerisindeki hücre ve lifler

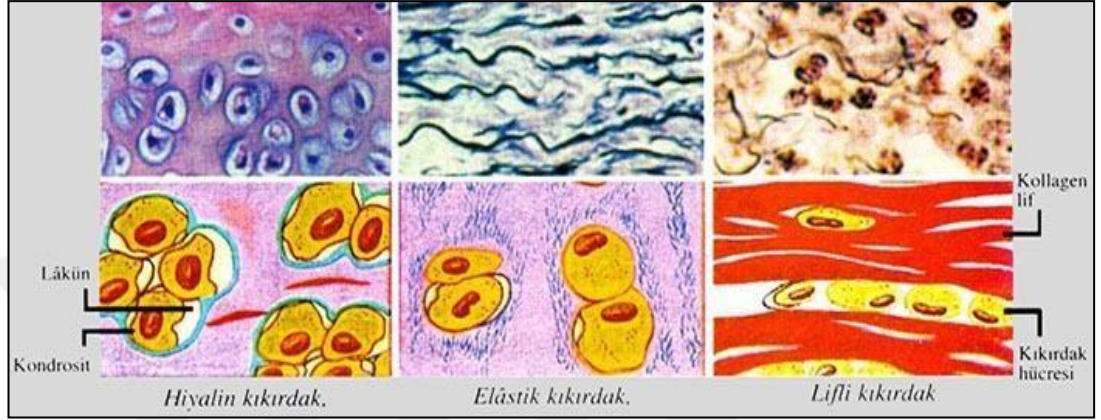
vardır. Bu hücre ve lifler jel kıvamında temel madde içine gömülü olarak yerleşik halde bulunmaktadırlar. Kıkırdak doku içerisinde yer alan liflerin türlerine ve yapılarına göre kıkırdaklar farklı türlere ayrılır. Organizmanın farklı gereksinimlerinden dolayı bu çeşitliliğin olması gereklidir. Şekil 1.1’de kıkırdak dokunun genel yapısı gösterilmiştir. Kıkırdak dokuda damar ve sinir yoktur. Kıkırdak doku temel olarak hücre, lif ve temel maddeden (hücrelerarası amorf madde) meydana gelmektedir. Lif ve hücrelerarası maddenin oluşturduğu yapıya matriks (intersellüler substans veya ekstrasellüler matriks) denilmektedir. Kıkırdak hücrelerinin genç olanlarına kondroblast, ergin olanlarına kondrosit adı verilmektedir. Bu hücrelerin yerleştikleri boşluklara da laküna adı verilir. Kıkırdak dokusunun etrafını perikondrium adı verilen sağlam fibröz bir bağ doku kılıfı sarmaktadır. Bu kılıf kıkırdak metabolizması için gerekli olan bir yapıdır [25-29].



Şekil 1.1. Kıkırdağın genel yapısı [30]

1.2. Kıkırdak Türleri

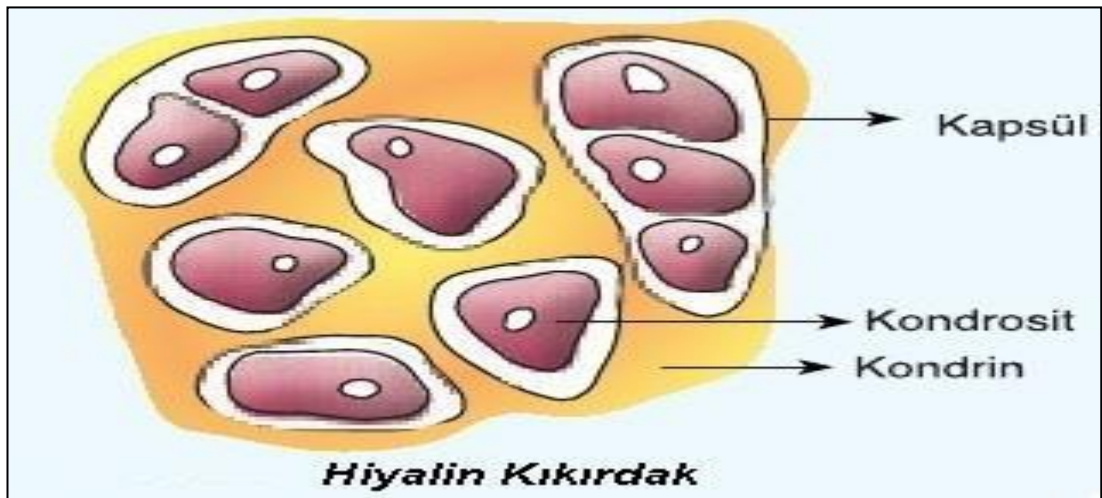
Şekil 1.2.'de kıkırdak türleri gösterilmiştir. Organizma da içerdiği lif yapısına göre 3 çeşit kıkırdak bulunmaktadır. Bunlar; hiyalin, elastik ve fibröz kıkırdaktır.



Şekil 1.2. Kıkırdak Türleri [31]

1.2.1. Hiyalin kıkırdak

Şekil 1.3.'de hiyalin kıkırdağın yapısı gösterilmiştir. İnsan vücudunda en fazla bulunan kıkırdak türüdür. Erişkinler de kostaların ventral uçlarında, solunum sisteminde burun, trakea, bronş gibi bölgelerde, dış kulak yolunda ve eklem yüzeylerinde yerleşik olarak bulunan bir dokudur. Yapısı incelendiğinde mavi-beyaz renkte olup yarı saydamdır.

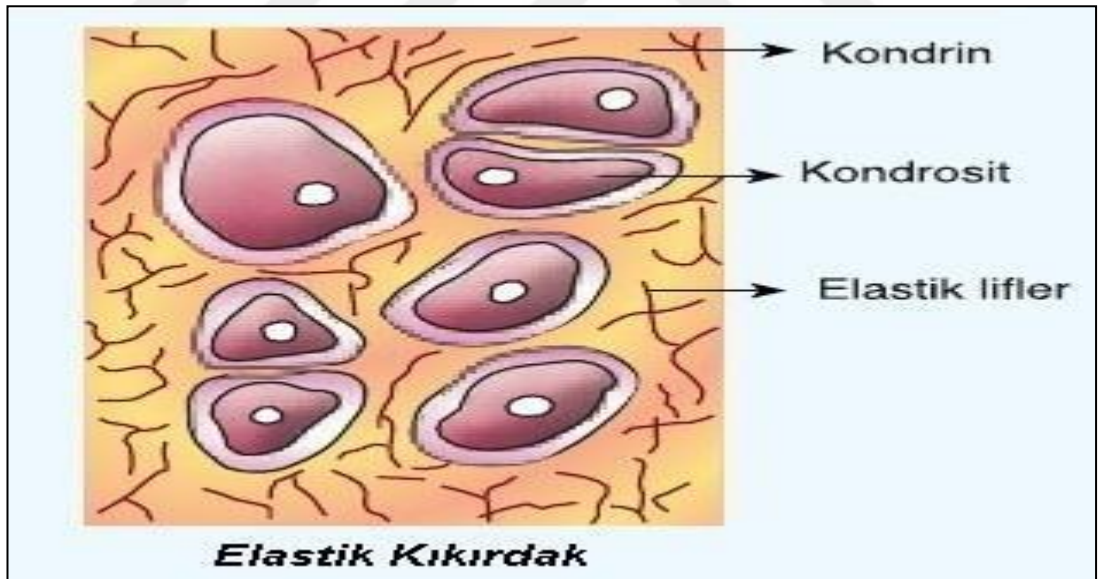


Şekil 1.3. Hiyalin kıkırdağın yapısı [32]

Embriyonun iskelet yapısı tamamen hiyalin kıkırdaktan meydana gelmektedir. Embriyonun gelişmesi ile iskelet sistemindeki kıkırdak yerini yavaş yavaş kemik dokuya bırakmaktadır. Hiyalin kıkırdağın histogenezi, interstisiyel ve apozisyonel şekilde olmaktadır. En çok bulunan tiptir. Embriyoda tüm iskelet hiyalin tiptedir.

1.2.2. Elastik kıkırdak

Şekil 1.4.'de gösterilen bu tür kıkırdağın yapısında elastik lifler bulunmaktadır. Organizma içerisinde dış kulakta, epiglottiste ve lariks gibi bölgelerde yerleşik olan dokudur. Yapısına bakıldığında sarımsı bir renktedir. Renk farklılığından dolayı hiyalin kıkırdaktan ayırt edilebilmektedir. Yapısal özelliğine bakacak olursak; lif farklılıkları haricinde hiyalin kıkırdağa benzemektedir. İçerisinde bulunan elastin, Orcein gibi özel boyalar yardımıyla gösterilebilir. Hücreleri yuvarlak ve kapsüllü yapıya sahiptir. Hiyalin kıkırdakla kıyaslırsak, elastik kıkırdak hücrelerinin sitoplazmalarında daha az yağ ve glikojen varlığından söz edebiliriz. Bu tür kıkırdakta da perikondriyum bulunmaktadır.

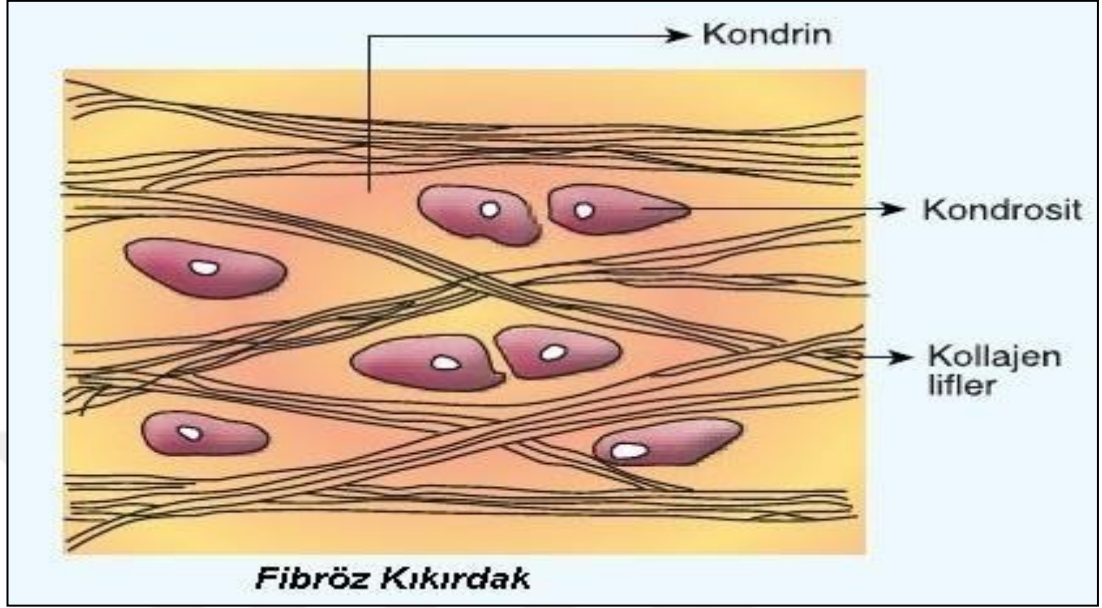


Şekil 1.4. Elastik kıkırdağın yapısı [32]

1.2.3. Fibröz kıkırdak

Şekil 1.5.'de bu tür kıkırdak dokusunun yapısında çok yoğun kollejen lifleri yer almaktadır. Bununla birlikte sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdak dokusu arasında

geçiş kıkırdak türü olarak da adlandırılır. Dokunun içerisinde amorf madde çok bulunmamaktadır, ayrıca tam anlamıyla bir perikondrium da görülmemektedir.



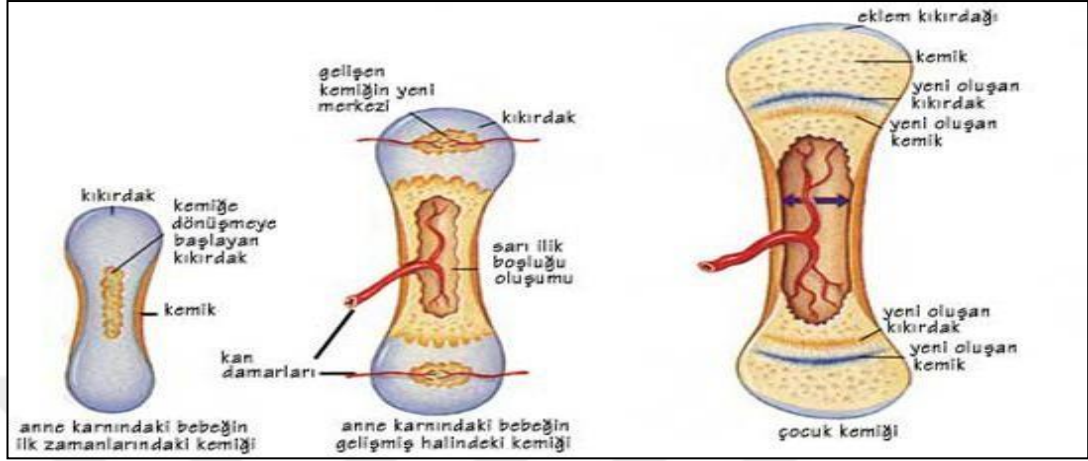
Şekil 1.5. Fibröz kıkırdağın yapısı [32]

Organizma içerisinde; intervertebral diskler, simfizis pubis gibi yerlerde bulunurlar. Fibröz kıkırdak hücreleri tek ve ikili gruplar halinde kıkırdak içerisinde bulunurlar. Doku H.E ile asidofilik boyanmaktadır.Çünkü yapısında çok miktarda ve kalın tertiplenmiş kollajenler (tip I) bulunmaktadır. Bu kollajenler gerilmeye karşı çok dirençli yapıya sahiptirler.

1.3. Eklemler ve Eklem Kıkırdağı

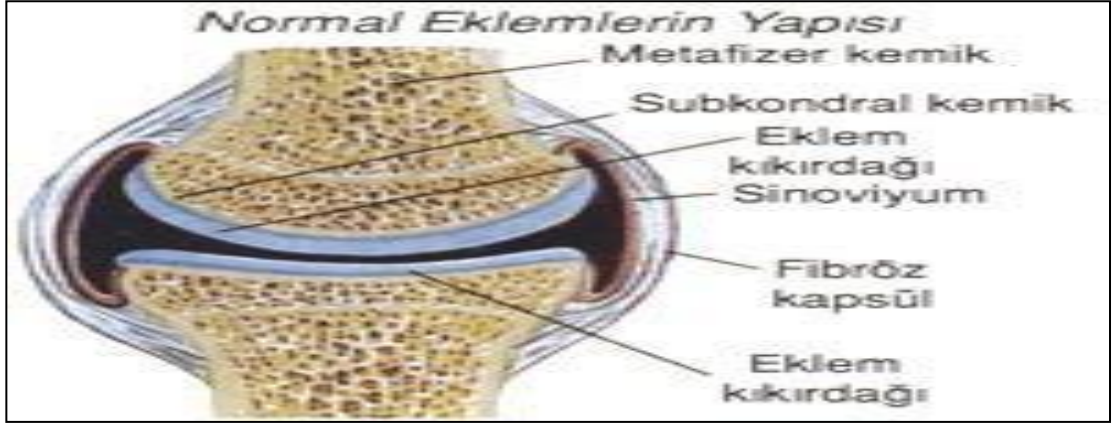
Şekil.1.6. ve Şekil 1.7.'de gösterildiği gibi eklemler çalışma şekillerine göre üç grupta sınıflandırılırlar: bunlar fibröz, kartilaginöz ve sinoviyal eklemlerdir. Fibröz eklemler (Sinartroz) kafatasını oluşturan kemikleri birleştiren, hareket kabiliyeti olmayan eklemler olarak adlandırılır. Kartilaginöz (Amfiartroz) eklem yapısında, eklem yüzeylerinin arası kıkırdakla örtülüdür, böylelikle yapı eklemlerin sınırlı hareketine izin vermektedir. Sinoviyal eklemler vücut içerisindeki en hareketli eklemlerdir. Bu eklemler kapsülle çevrilidir ve eklem boşluğuna sahiptir. Eklem yüzeyleri kıkırdak doku ile kaplıdır ve eklem boşluğunu dolduran sinoviyal bir sıvı vardır. Bu eklemler eksen ve anatomik yapılarına göre iki gruba ayrılırlar. Eksenine göre ise eklemler, tek eksenli, iki eksenli, ikiden fazla eksenli ve belirli bir eksenli

olmayan eklemler olarak dörde ayrılmaktadırlar. Anatomik olarak yapılar sınıflandırıldığında da pivot, menteşe, kayar, top-yuva ve eyer eklem olarak kendi aralarında beş gruba ayrılmaktadır.



Şekil 1.6. Eklem kıkırdağının oluşumu [33]

Sinoviyal eklemler eklem kapsülü, bursalar, kıkırdağ, eklem bağları, sinoviyal sıvı ve subkondral kemik gibi yapılardan oluşmaktadırlar. Buradaki bursaların içi sinoviyal sıvıyla doludur ve yastıkçıklara benzerler. Bu yastıkçıklar eklem yüzeyini sarar; kemik, kas ve lif yapısı arasında tampon görevi görmektedirler. Eklem bağları, hareketli eklemlerde bulunan kemikleri birbirine bağlayıp, stabiliteyi sağlamaktadır. Eklem kapsülü de benzer şekilde stabiliteye yardımcı elemandır. Eklem kapsülünün yüzeyinde bulunan sinoviyal zar sinoviyal sıvıyı salgılamakla görevlidir. Bu sinoviyal sıvı eklem yüzeyini kayganlaştırarak aşınmayı engellerken, aynı zamanda kıkırdağı da beslemektedir. Eklem kıkırdağı hareketli eklem esneklik kazandırıp, kemik yüzeyindeki yükü dağıtarak kemiğin yüzey yapısının deforme olmasını önleyip, eklemi oluşturan yüzeylerin birbirine olan uyumunu sağlamaktadır. Kıkırdağ dokusunun daha öncede kıkırdağ hücreleri ve matriksten oluştuğunu söylemiştik. Ekstraselüler matriksin en temel yapı bileşenleri proteoglikanlar ve kollajenlerdir. Subkondral kemik yapısındaki özellikler sayesinde kemiklere gelen basıncın uniform dağılmasında önemli rol oynamaktadır [34].



Şekil 1.7. Eklem kıkırdağının yapısı [35]

Eklem kıkırdağı, eklemün yük taşıyan yapısını oluşturan bağ dokusudur diyebiliriz. Ayrıca sinovyal eklemleri oluşturan kemiklerin eklem bakan yüzeylerini kaplamaktadır. Eklem kıkırdağı, eklemlerin hareketi esnasında biyomekanik hareketlere ve yüklenmelere sürekli karşılaşılabilen bir dokudur [36]. Spor haricinde günlük hayatta yaptığımız merdiven çıkmak gibi durumlarda dahi kıkırdağın maruz kaldığı yüklenme oldukça fazladır [37]. Eklem kıkırdağında meydana gelen mekanik yüklenme ile ilgili birkaç temel durum vardır:

- (a) kıkırdağ dokunun zorlanmamasını sağlamak,
- (b) kıkırdağın içerisinde bulunan matriksi ve hücrelerin zarar görememesini sağlamak,
- (c) sürtünmeye maruz kalabilecek herhangi bir hareket için eklemi zorlamamak [38].

Kıkırdağın özel yapısı sayesinde bu durumları yerine getirebilmektedir. Kıkırdağdaki yük, içerisinde bulunan katı bileşenlerin oluşturduğu gerilim ve sıvı bileşenlerin oluşturduğu basınç ile meydana gelmektedir. Eklem kıkırdağı yapısı, kondrosit hücreleri, ekstrasellüler matriks ve sudan meydana gelmektedir. Ekstrasellüler matriksin oluşum ve yıkımından kondrosit hücreleri sorumludurlar. Kondrositlerin, yüke bağlı fiziksel yapıları, basınçları ve buldukları kimyasal ortamları değişmektedir. Bununla beraber, bu hücrelerin yüke karşı herhangi bir direnç oluşturmamaktadır [39,40]. Kondrositler, mekanik yüklere karşı biyokimyasal işlemlerle cevap verirler [41]. Ekstrasellüler matriks, kıkırdağın kuvvet altında geometrisinin, elastikliğinin ve direncininin değişmemesini sağlamaktadır [42]. Eklemde bulunan kıkırdağın, katı ve sıvılardan oluşan katmanlı yapısı, eklem

yüzeyinin maruz kaldığı yüke karşı korunmasını sağlar. Kıkırdak dört bölgeden oluşmaktadır. Bunlar, yüzeysel bölge, orta bölge, derin bölge ve kalsifiye kıkırdak bölgedir. Her bölgedeki kemik hücrelerinin yapısı ve yüzeye dağılımı ile ekstraselüler matriksin yapısı, içeriği ve işlevi farklılık göstermektedir [36,39]. Eklem üzerine yük binince yüzey katmanı sıvı kaybeder, sertleşir ve dirençli bir yük taşıma bölgesi oluşturur. Eklem kıkırdağında bulunan kolojen ağlar ile kıkırdağa binen yük sıvı basıncı yardımı ile meydana gelen gerilimleri dengelemektedir. Fiziksel yüklere karşı kıkırdağın dayanımını ESM'nin bileşimi ve bütünlüğü belirlemektedir. Fiziksel düzeyde meydana gelen yüklenmeler, kıkırdak dokuda bulunan matriks metabolizmasının düzenli bir şekilde devam etmesini sağlar [38,39]. Eklem kıkırdağının yük taşımaya uygun yapısal, biyokimyasal ve mekanik özelliklerinin gelişebilmesi ve korunabilmesi, dokunun işlevsel olarak yük altında bırakılmasını gerektirmektedir. Matriks bileşiminin düzenlenmesinde mekanik uyarıların etkisini ortaya koymak adına kıkırdak üzerine yük gelen ve gelmeyen bölgeler arasında inceleme yapıldığında yapısal farklar gözlemlenebilmektedir. Eklem üzerine yük binmesi ile hücre ve matriks deformasyonu meydana gelmektedir. Sonuç olarak kıkırdak dokusu içindeki sıvı hareketleri, elektriksel akımlar, basınç farklılıkları çeşitli yönlerde oluşan kuvvetleri ve hareketleri ortaya çıkarmaktadır [41]. Kuvvetlerin ve hareketlerin sonucunda ortaya çıkan fizyolojik uyarılar, kondrosit hücresindeki fiziksel olayların biyokimyasal olaylara geçişini sağlamaktadır. Biyokimyasal olaylar meydana gelerek proteoglikanlar, kollajenler, nonkollajenöz proteinler ve diğer matriks proteinlerinin oluşmasını tetiklemektedir. Bu yol izlenerek, mekanik uyarılar anabolik ve katabolik süreçler üzerinde etki etmektedir. Her eklem mekanik yüklere dayanım gücü, o eklem yapısına ve şekline bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kas-iskelet sisteminde yer alan her eklem, farklı yönlerde, farklı sürelerde ve şiddetlerde yüklerle karşılaşabilir [39].

1.4. Kemik Doku

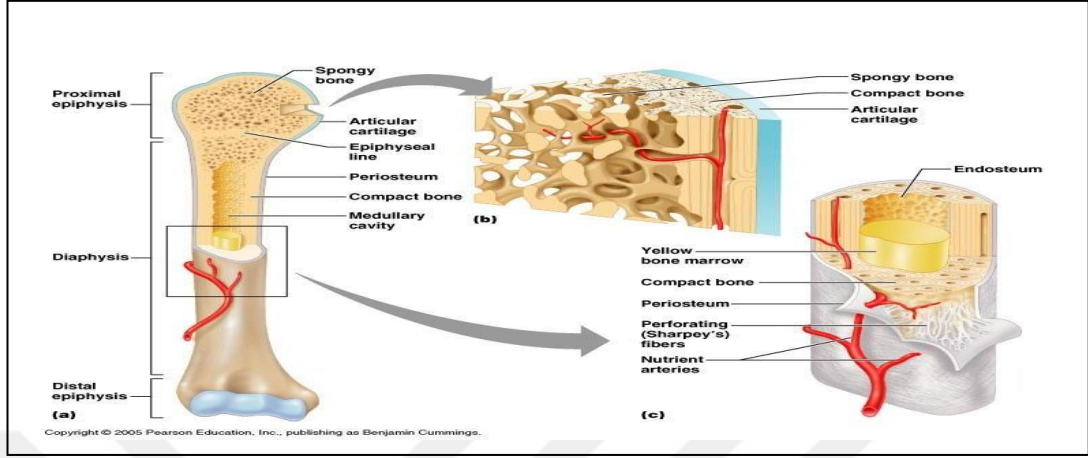
Kemik, iskelet sistemini oluşturan organik ve inorganik bölümlerden meydana gelen bir dokudur. Kemiğin, %30'luk kısmı organik, %70'lik kısmı da inorganik materyallerden oluşmaktadır. Kemik dokunun organik yapısı %98'i matriks, %2'si de hücrelerden meydana gelmektedir. Matriks kısmının %95'ini kaslar ve kollajen yapılardan tip 1 kollajen yapısı oluşturmaktadır. Kemik dokunun %20'den

fazlasında kollajen bulunmaktadır. Bu durum organik matrikte ise %90'a çıkmaktadır.

Vücut içerisinde dokular karşılaştırıldığında en sert doku kemik dokudur. Kemik, çeşitli türlerde kemik hücreleri ve fibriller, kalsiyum açısından zengin matriks içine gömülü bir şekilde iskelet sisteminde yer almaktadır. Bu durum gözüne alındığında kemik hücrelerinin kemik dokuda daha az yere sahip olduğunu, matriks kısmının yapıya hakim olduğunu söyleyebiliriz. Kemik matriksinin içerisinde oldukça kalsiyum tuzu bulunduğu için kemik dokunun yapısı daha serttir. Kemik doku sert bir yapıya sahip olmasına rağmen, kırıldık dokudan ayırtedici bir özelliğide yapısında damar bulunmasıdır. Kemik matriksi, lamel adı verilen 3-7 mikron(μ) kalınlığında olan tabakalar halinde kemik dokusunda bulunmaktadır. Bu lamellerin içinde, tek sıra halinde dizili laküna denilen, boşluklar bulunmaktadır. Kemikte dört tip kemik hücresi bulunmaktadır. Bunlar Osteoprogenitor hücre, osteoblast hücre, osteosit hücre, osteoklast hücrelerdir. Ergin kemik hücrelerine osteosit hücresi denilmektedir. Osteositler, genç kemik hücreleri olarak bilinen osteoblastlardan gelişmektedirler ve osteoblastlar daha küçük yapıya sahip olup, laküna adı verilen boşlukların içinde bulunmaktadırlar. Osteositlerin kanalcıklar içinde uzanan çok sayıdaki ince uzantıları vardır, bu uzantılar kemik içinde bulunan diğer hücrelerin uzantıları ile ucuca gelmektedirler. Bu olay sonucunda kemik doku içindeki madde transferi sağlanmış olmaktadır. Osteosit hücreleri, oval şekilli çok yönlü çekirdeği bulunan, bu çekirdeği açık bazofil boyanabilmektedir. Ayrıca osteositler aktif protein sentezi yapamazlar. Osteoblast hücreleri, kemik matriksi içinde bulunan organik bölümün çalışmasından sorumlu olan hücrelerdir. Ayrıca, osteoblast hücreler inorganik yapıların kemiğe yerleşmesine yardımcı olmaktadır.

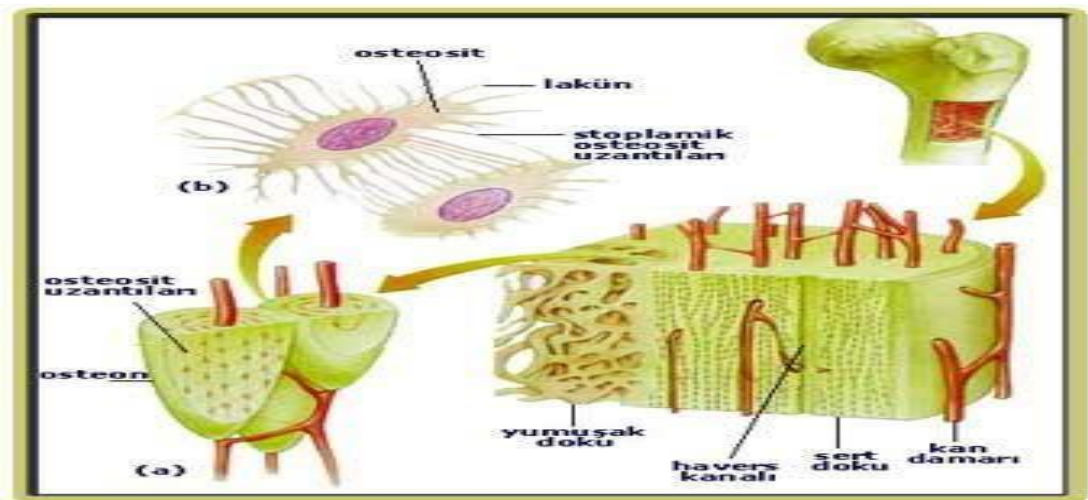
Kemik dokuda bulunan boşluklarda heryere uzanabilen küçük silindirik kanalcıklar bulunmaktadır. Bu küçük silindirik kanalcıklar daha sonra kendi aralarında birleşip matriks içinde bulunan ağ şeklindeki yapının boşluklarını doldurular. Kemiğin yapısal incelemesi yapıldığında, iki farklı bölüm görülmektedir. Bu yapılara kompakt ve spongioz kemik adı verilmektedir. İki tür kemiğin yapısında da kanaliküler mevcuttur ve fakat işleyiş açısından farklıdırlar. Kemik hücreleri yeterli gelişimlerini sağladıktan sonra tekrar bölünmezler. Farklı olarak sadece osteoprogenitör hücreler sürekli olarak çoğalabilmektedirler. Kemik dokusu içerisinde bulunan hücreler daha

önceden meydana geldikleri osteoprogenitör hücreye dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Şekil 1.8.'de kemiğin anatomik yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Kemik dokunun anatomik yapısı [43]

Metabolizma açısından baktığımızda organizmanın en aktif dokusu kemiktir. Yapısında bulunan minerallerle, sürekli olarak gerçekleşen yıkım ve yapım olayı mevcuttur. Bu durum, yaşam boyunca kemik dokusunu sürekli olarak dönüşüme uğratabilmektedir. Meydana gelen dönüşüm sayesinde yeni doğan bebeklerin %100'ü erişkinlerin %18' i kemiklerdeki kalsiyum miktarı bir yılda dönüşüme girebilmektedir. Kemik dokuda sürekli meydana gelen yıkım ve yapım olayları vardır. Bu olayların gerçekleşmesini osteoblast, osteoklast ve osteositler gibi kemik hücreleri sağlamaktadır. [44, 45, 46]. Şekil 1.9'da kemiğin fizyolojik yapısı verilmiştir.



Şekil 1.9. Kemik dokunun fizyolojik yapısı [47]

1.5. Kemik Türleri

Kemik yapısal olarak iki farklı türe sahiptir. Bunlardan birincisi kaba lifli (woven bone) veya olgunlaşmamış kemik primer kemiktir. İkincisi ise olgunlaşmış veya lameller yapıya sahip olan kemik sekonder kemiktir. Yeni doğan bebeklerin gelişimi sırasında ve kemikte meydana gelen tahribatın onarımında ilk olarak ortaya çıkan kemik türü primer kemiktir. Primer kemik, rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen liflere sahipken sekonder kemik ise lameller halinde organize olmuş kollajen liflere sahiptir. Olgunlaşmamış kemik geçici olan kemik yapısıdır. Zamanla yerini sekonder kemiğe bırakmaktadır. İki tane olgu kemik tipi vardır. Bunlar kompakt kemik ve sponginez kemik türleridir.

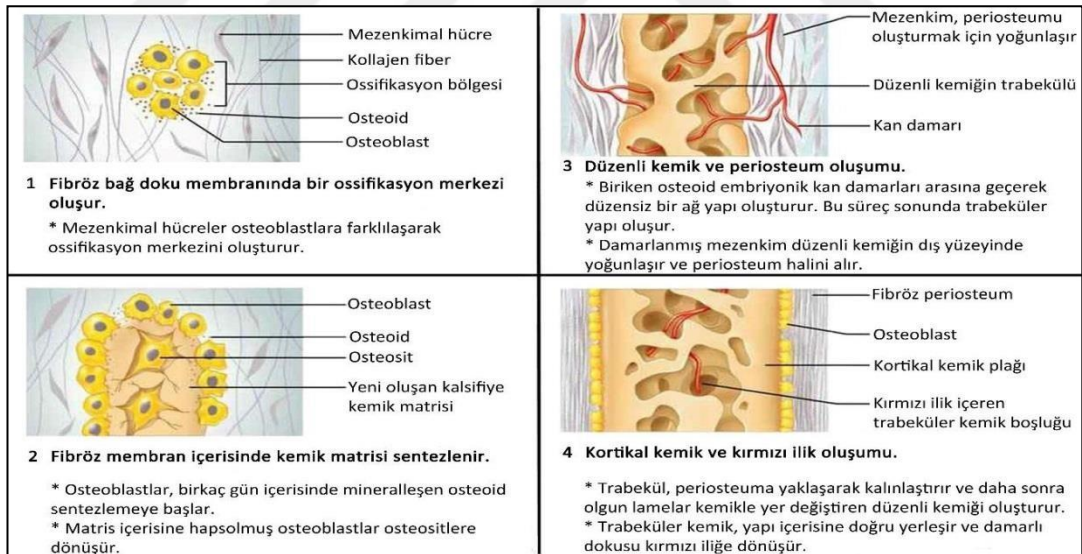
Kompakt kemikte lamellar yapılar bulunmaktadır. Üç farklı dizilim gösteren bu lameller spesiyal, ara, iç ve dış sirkumferensiyel lamellar olarak adlandırılmıştır. Spesiyal lamelleryapının ortasında Havers kanalları bulunmaktadır. bu kanallar içerisinde düzensiz şekilde silindirik biçimli birimler yer almaktadır. Lameller ve havers kanalının bir araya gelmesi ile oluşan yapıya osteon denilmektedir. Osteonlar kompakt kemik dokusunun çoğunluğunu oluşturmasına rağmen osteonlar arasında kalan bölgelerde ara lamellar yer almaktadır. Sirkumferensiyel lamellar ise kompakt kemiğin iç ve dış yüzeylerinde bulunmaktadır, oldukça kalın bir yapıya sahiptirler. Kemiğin iç ve dış yüzeyleri periost ve endost denilen zarlarla kaplıdır. Dış yüzeyde bulunan zar periost, iç yüzde bulunan zara ise endost yapısıdır. Periost yapı, gelişmekte olan kemiklerde iki katmandan oluşmaktadır. Dış katmanı kompakt bağ dokusundan oluşmuşken, iç katmanı ise hücreli yapıya sahiptir. Endost ve periost zara kıyaslanacak olursa endost zar çok daha ince ve tamamen hücreli bir zar yapıya sahipken, periost zarda daha çok damar görülmektedir.

Sponginez kemikte aralarında sement çizgileri bulunmaktadır ve bu çizgiler de birçok lamelin üst üste gelmesiyle oluşan kemik trabeküllerinden meydana gelmektedir. Kalsifiye olmuş kıkırdak adacıkları sponginez kemikte görülmektedir. Ortalarında kan damarları bulunmayan büyük trabeküllerin içinde havers sistemi mevcutken küçük ve ince trabeküllerde ise mozaik gibi birleşmiş üçgen şekilli lamellar yapının olduğunu söyleyebiliriz. Trabeküller yapılarının aralarında boşluklar vardır. Bu boşluklar üç boyutlu kemik ağı oluşmasına sebep olmaktadır. Trabeküller araları

endosteum zarıyla örtülüdür ve boşlukları kemik iliği ile dolmuş vaziyettedir. Bu kemik yapısının içerisinde iki çeşit kemik vardır. bu kemiklerin yapılarına göre kemik gelişimi meydana gelmektedir. Membranöz kemik ve kartilajenöz kemik varolan kemik türleridir. Membranöz kemik kemik gelişimini intramembranöz ossifikasyon kartilajenöz kemik ise kemik gelişimini endokondral ossifikasyon yaparak tamamlamaktadır.

1.5.1 İnamembranöz kemikleşme

İnamembranöz Kemikleşme yassı kemiklerin oluş mekanizmasında yer almaktadır. Bu tür kemikleşme kemik gelişiminde ve gelişen kemiklerin kalınlaşmasında rol oynamaktadır. Mezankimal doku yoğunlaşmaları içinde kemikleşmenin başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denilmektedir. Bu tür kemikleşmede meydana gelen olaylar bir grup mezankimal hücrenin kemik hücresine dönüşmesi ile başlamaktadır, sonrasında yeni kemik matriksinin oluşup kemikte kalsifikasyon süreci ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1.10. İnamembranöz kemikleşme sırasında meydana gelen olaylar [48]

Genç kemik hücrelerinin etrafı sarılarak ergin kemik hücresi olan osteosit hücrelerine yerini bırakmaktadır. Gelişme içerisinde olan bu kemik gözelerine iğnecik denilmektedir. Histolojik olarak incelendiğinde kesitlerdeki görüntülerden dolayı böyle adlandırılmışlardır. Bunun gibi bazı mezankimal oluşumlar, kemikleşmenin başladığı noktada birleşip daha sonra süngerimsi yapıya dönüşürler. Yeni doğan

bebeklerde bulunan bağ dokusunda kemikleşme meydana gelmediğinden bingıldak gibi kafa tasında kemikleşmemiş yumuşak bölgeler bu duruma örnek verilebilir. Bağ dokusu içerisinde kemikleşmeye katılmayan bölümler de bulunmaktadır. Bunlar kemiğin periosteum ve endeosteumunu meydana getirmektedir. Şekil 1.10.'da intramembranöz kemikleşme sırasında meydana gelen olaylar verilmiştir.

1.5.2. Endokondral kemikleşme

Endokondral kemikleşme, hiyalin kıkırdığın kemik yapısına dönüşmesi haline diyebiliriz. Endokondral kemikleşme türü kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesini sağlamaktadır. Endokondral kemikleşme iki adımdan oluşmaktadır. İlk aşamada kemik yapısındaki kondrositlerde deformasyon ortaya çıkmaktadır. Daha sonra kalsifiye olmuş kıkırdak matrisinde birbirinden ayrılmış ve genişlemiş alanlar içerisinde laküna denen boşluklar ortaya çıkmaktadır. İkinci aşamada, kemik hücreleri ve kan kapillerlerinin oluşturduğu kemiksi çekirdek yapı, deforme olmuş kıkırdak hücrelerindeki laküna diye adlandırılan alanlara yerleşmektedirler. Kemik hücreleri, kıkırdığımsı yapının üzerini kemik matrisi ile örten genç kemik hücresi olan osteoblast hücrelerine dönüştürmektedir. Böylelikle kalsifiye olmuş kıkırdak dokusu, bu kemikleşme türünde destek doku görevi görmektedir. Şekil 1.11.'de tipik bir uzun kemik yapısı verilmiştir.

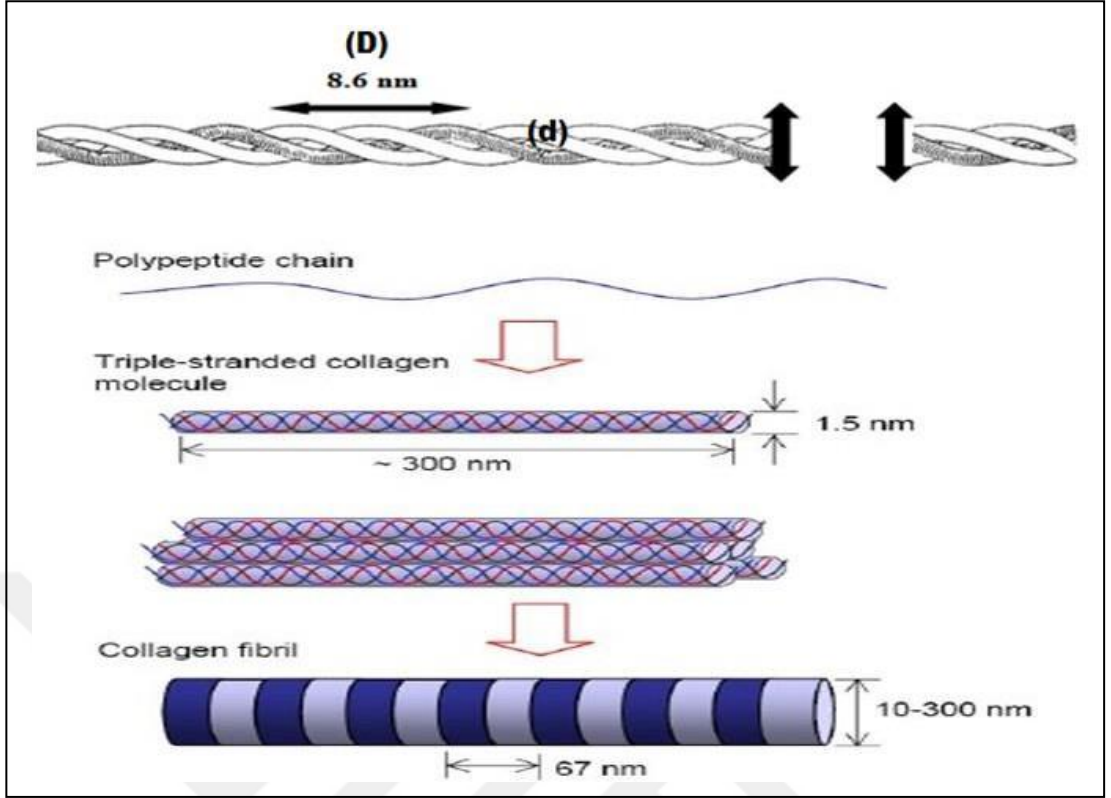


Şekil 1.11. Tipik bir uzun kemik yapısı [49]

Uzun kemikler, epifiz ve diafiz adı verilen silindirik içi boş ve uçları genişlemiş hiyalin kıkırdak dokusundan oluşmaktadır. İntramembranöz kemikleşme kemik dokusunda yer alan diafiz noktalarını sararak perikondriumun içinde meydana gelmektedir.

Kollajen

Toplam vücut proteinlerinin %30'unu, toplam vücut ağırlığının ise %6'sını oluşturan kollajen insan vücudunda en yaygın olarak bulunan proteindir. Kıkırdağın %50'si, korneanın %68'i, derinin %72'si kollajendir. Tüm vücut kollajenleri arasında nicel olarak toplam kollajen miktarının %70'ini tip I, II ve III kollajenler oluşturur. Kollajenlerin EM'deki yapı, organizasyon ve işlevleri önem taşımaktadır. Kollajen, doku ve organları şekillendirir, yapısal güç sağlar. Genetik olarak tanımlanmış toplam 19 adet kollajen tipinin farklı özellikleri bulunmaktadır ve sürekli olarak yeni tipleri eklenmektedir. Şekil 1.12.'de gösterildiği gibi bütün kollajen tiplerinde üçlü bir sarmal yapı vardır. Bazı kollajenlerde molekülün tümü üçlü sarmal iken diğerlerinde üçlü sarmal çatının sadece bir bölümünü yapabilir. Her bir kollajen molekülü üç alfa polipeptit zincirinin sarmal şekilde birbiri üzerine dolanmasıyla gelişmiş, 300 nm uzunluğunda, 1,4 nm genişliğinde sert bir çubuk şeklindedir. Üçlü sarmal yapısı 8,6 nm de bir tamamlanmaktadır. Her bir alfa zinciri yaklaşık bir aminoasit içermektedir. Aminoasitler arasındaki mesafe hemen hemen sabit olup, 0,29 nm'dir. Amino asit dizisi her üç amino asitte bir glisin molekülünün tekrarlanması ile karakterizedir. Bu dizi Gly-X-Y formülüyle ifade edilir. Buradaki X ve Y'ler prolin, hidroksiprolin veya diğer amino asitler olabilirler. Hidroksiprolinler hiçbir zaman X pozisyonunda bulunmazlar. Her kollajen molekülünün bir karboksil (COOH), bir de amino ucu (NH₂) bulunmaktadır. Kollajen molekülündeki her alfa zincirinin sonunda 15-20 aminoasit bulundurabilecek uzunlukta sarmal olmayan (telopeptit) alanlar vardır. bu bölgeler çok fazla değişebilen uzunlukta olup molekül içi ve molekül dışı kovalent çapraz bağlantı bölgeleridir. Belli aralıklarla uç uca gelen kollajen moleküllerinin kendi aralarında düzenlenmesi sonucu oluşan fibrillerde birbiri ardına gelen bantlaşmalar ortaya çıkmaktadır. Kollajen fibrillerde biribirine bitişik birer açık ve koyu bölgeye D periyodu adı verilmektedir. Bir d periyodu 0,6 D aksenal uzunluğunda bir açık, 0,4 d aksenal uzunluğunda bir koyu bölgeden oluşur. Herbir D periyodu 67 nm uzunluğunda ve yaklaşık 234 amino asit içermektedir. Kollajen fibrillerin yapıları değişken değildir. Fakat farklı bölge ve gelişim aşamalarında çap farkı gösterebilirler. Yaklaşık 1000 aminoasit içeren erişkin tip I kollajen ilk tipe aittir.



Şekil 1.12. Tip I kollajenin moleküler yapısı [50]

Üç adet alfa zinciri ve bir miktar karbonhidrat içerir. Üç polipeptid zinciri birbiri içine bükülerek süperhelix yapı oluştururlar. Kollajenin çarpıcı bir özelliği alfa zincirinin üçlü sarmal kısmının her üçüncü konuşunda bir glisinaminoasiti bulunmasıdır. Bu olay, glisinin üçlü sarmalının merkez özünde bulunan dar alana sığabilecek kadar küçük tek aminoasit olmasından ötürüdür. Kıkırdak yapı da kollajen büyüklüğü ortalama 46-63 nm boyutundadır.

Kollajen molekülünün üçlü sarmalını oluşturan α zincirlerinin farklılığına göre değişik kollajen tipleri saptanmıştır

Types	Chains	Structural Details	Localization
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 1(I)]$	300nm, 67nm banded fibrils	skin, tendon, bone, etc.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	300nm, small 67nm fibrils	cartilage, vitreous humor
III	$[\alpha 1(III)]_3$	300nm, small 67nm fibrils	skin, muscle, frequently with type I
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	390nm C-term globular domain, nonfibrillar	all basal lamina
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	390nm N-term globular domain, small fibers	most interstitial tissue, assoc. with type I
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	150nm, N+C term. globular domains, microfibrils, 100nm banded fibrils	most interstitial tissue, assoc. with type I
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	450nm, dimer	epithelia
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$?, ?	some endothelial cells
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	200nm, N-term. globular domain, proteoglycan bound	cartilage, assoc. with type II
X	$[\alpha 1(X)]_3$	150nm, C-term. globular domain	hypertrophic and mineralizing cartilage
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	300nm, small fibers	cartilage
XII	$\alpha 1(XII)$?, ?	interacts with types I and III

Şekil 1.13. Kollajen molekülünün üçlü sarmal yapısını oluşturan alfa zincirlerinin farklılığına göre değişiklik gösteren kollajen tipleri [52]

Şekil 1.13.'de kollajen molekülünde 12 kollajen tipi bulunmaktadır. Kollajen fibriller 0,05-0,20 μ m çapındadırlar ve 640 Å aralıklarla tekrarlanan periyodik enine çizgilenmeler gösterir. Tip II, tip IX, tip X, tip XI kıkırdığın yapısında bulunan kollajen tipleridir. İncelemiş olduğumuz kemik-kıkırdak örneklerinde tip II kollajenin bulunduğu kıkırdak yapı 300 nm uzunluğunda ve 67 nm genişliğinde fibrillere sahip özellik göstermektedir. Tip IX, 200 nm de tip X, 150 nm ve tip XI, 300 nm uzunluğunda kristal yapısı bulunmaktadır.

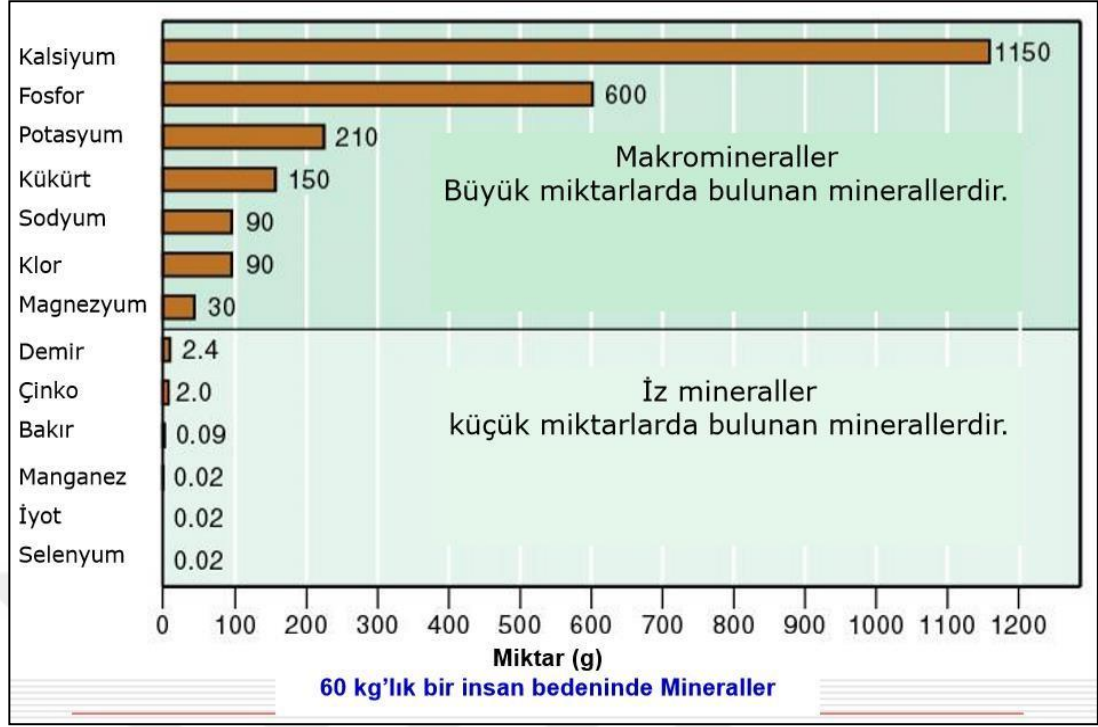
1.6. Vücudumuzda Bulunan Elementler

Dünya üzerinde insan ve hayvan organizması gözönüne alınarak tabiatta olduğu bilinen çok miktarda kimyasal element vardır. Bunların 26 kadarı canlılık için çok önemli olduğu kabul edilmektedir. Bir çoğunun henüz fizyolojik görevleri kesin olarak bilinmese de gün geçtikçe bu kimyasal elementlere yenileri eklenmektedir. Canlı organizmaların kurulumunda karbon, hidrojen, oksijen ve azot gibi temel elementler yer almaktadır ve bu elementler mineral madde olarak dikkate

alınmamaktadırlar. Şekil 1.14.'de gösterildiği gibi bu elementlerin dışında makro ve mik roelement olarak sınıflandırmalar yapılmaktadır. Potasyum, kalsiyum, Klor, fosfor, magnezyum, sodyum, ve kükürt makroelement iken bakır, demir, çinko, kobalt, iyot, mangan, molibden, selenyum gibi elementler mikro elementler olarak adlandırılır ve C, H, O ve N ile birlikte canlı organizmaların % 99 undan fazlasını oluşturmaktadırlar.

Table 2.1 Naturally Occurring Elements in the Human Body			
Symbol	Element	Atomic Number (see p. 33)	Percentage of Human Body Weight
Elements making up about 96% of human body weight			
O	Oxygen	8	65.0
C	Carbon	6	18.5
H	Hydrogen	1	9.5
N	Nitrogen	7	3.3
Elements making up about 4% of human body weight			
Ca	Calcium	20	1.5
P	Phosphorus	15	1.0
K	Potassium	19	0.4
S	Sulfur	16	0.3
Na	Sodium	11	0.2
Cl	Chlorine	17	0.2
Mg	Magnesium	12	0.1
Elements making up less than 0.01% of human body weight (trace elements)			
Boron (B), chromium (Cr), cobalt (Co), copper (Cu), fluorine (F), iodine (I), iron (Fe), manganese (Mn), molybdenum (Mo), selenium (Se), silicon (Si), tin (Sn), vanadium (V), zinc (Zn)			

Şekil 1.14. İnsan vücudundaki elementlerin yüzdelik gösterimi [53]



Şekil 1.15. 60 kg'lık bir insan bedeninde bulunan minarel miktarı [54]

1.7. Kemikte Bulunan Elementler

1.7.1. Kalsiyum

Kemik elementel açıdan incelendiğinde yapısında kalsiyum ve fosfat elementlerinden oluşmaktadır. İskelet sistemi kalsiyumu depolayarak kan ve dokulardaki kalsiyum dengesini sağlamaktadır. Kalsiyum kas ve sinir işlevlerinde, kalp otonomisinde vs. gibi durumlarda önemli rol oynamaktadır. Vücutta bulunan kan ile kemik arasında sürekli olarak Ca^{+2} alışverişi yapılmaktadır. Besinlerden elde edilen Ca^{+2} , hızlı bir şekilde kemiklerde depo edilmektedir. Fazla kalsiyum miktarı boşaltımla vücuttan atılmaktadır. Kandaki Ca^{+2} oranı düştüğünde ise kemikteki Ca^{+2} serbest hale geçmektedir. Kemikğin içerisinde bulunan kalsiyum, iki şekilde serbest hale gelebilmektedir. Hızlı ve yavaş olan bu iki mekanizma kalsiyumu serbest hale getirir. İlk olarak, iyonlar basit olarak hidroksiapatit kristallerinden interstisyel sıvıya, zaman içerisinde de kana geçmesi sağlanarak yapılmaktadır. Genel olarak süngerimsi kemikte meydana gelen durum, hidroksiapatit kristallerinin geniş yüzey alanları sayesinde olmaktadır. Olgunlaşmış kemikte bile, çok az kalsifiye olmuş yeni lameller yapılar kalsiyumu kolayca alıp ve vermektedir. İkinci yol ise, kemiği etkileyen hormonlara bağlı olmaktadır. Bu hormonlar kemik matriksinde hücreleri

(osteoklastları) aktif edip sayılarını arttırarak kalsiyum serbest hale getirilebilir. Kalsiyum eksikliğinin en başta görülen belirtileri kemik ve dişlerdeki zayıflık, dişlerdeki rmedir. Kişideki kalsiyum eksikliği önemsenmez ise uzun süren kalsiyum eksikliği sonucunda sinirlerde oluşan zayıflık el ve ayaklarda uyuşmaya sebep olur. Bazı durumlarda ise geçici felce, bazı durumlarda da istem dışı hareketlere neden olur. Kalsiyum eksikliğinin sebep olduğu diğer sağlık sorunları da D vitamini eksikliği ve tiroit hastalıkları belirtileridir. Kalsiyum kemikler için oldukça önemli olduğundan belirtilerin bir kısmı da kemiklerde: Özellikle kalça kemiklerinde ağrılar, sırttaki kamburumsu duruş bozuklukları, bileklerdeki hassaslaşan kemikler olarak da kendini gösterir. Kanınızdaki kalsiyum değerlerinin normalden fazla olması durumuna kalsiyum yüksekliği ya da hiperkalsemi denir. Kanda fazla kalsiyum bulunması kemikleri zayıflatabilir, böbrek taşına sebep olabilir ve beyin ile kalp fonksiyonlarına zarar verebilir.

Kalsiyum yüksekliğinin sorumlusu genellikle fazla çalışan paratiroid bezleridir. Bu dört küçük bez, tiroit bezinin arkasında yer alır. Ayrıca kanser, bazı hastalıklar, bazı ilaçlar, çok fazla kalsiyum ve D vitamini takviyesi tüketmek de hiperkalsemiye yol açabilir.

1.7.2. Fosfat

Fosfor, kemik mineralinin kalsiyumdan sonra gelen anahtar bir bileşenidir. Buna ilaveten, enzim sistemlerinde ve moleküler etkileşimlerde de çok önemli rol oynamaktadır. Kemikte vücut içerisinde bulunan fosfatının %85 kadarı depolanmaktadır. Plazmada bu durum tersinedir, fosfat elementinin büyük bir kısmı bağlanmamıştır ve böbreklerdeki proksimal tübüllerden geriye emilmektedir. PO_4 idrarla atılmaktadır. Fosfat eksikliğinde kemikler kırılgan hale gelir. Kemiklerde ve dişlerde gelişim bozukluğu yaşanır. Buna bağlı olarak dişler erken rr ve yapısal olarak daha hassas ve düzensiz olur. Kaslarda ve eklemlerde büyük sorunlara yol açarak eklemlerde bulunan sıvıda enfeksiyonel ve iltihap sıkıntısı yaşanmasına yol açar. Fosfor eksikliği aynı zamanda cilt sorunlarına ve cildinizde mat bir görünüme neden olmaktadır.

1.7.3. Silikon

Silikon vücutta aort, trakea, tendon, kemik, deri ve bağ dokusunda bulunmaktadır. Bağ dokusu içerisinde, glikozaminoglikanların yapısal bütünlüğünün korunması için yüksek miktarda silikona ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda silicon, bağ dokusuna biyolojik destek görevi sağlamaktadır. Bunun yanısıra kemik ve kırıkta kollajen sentezi sağlamakta ve kemik kalsifikasyonunda rol almaktadır. Kesin olmamakla birlikte eksikliği durumunda insan kemiği ve bağ dokusunda olumsuz etkiler gözlemlenmektedir. Silikonun insan vücudundaki ihtiyacı hakkında net bilgi henüz bilinmemektedir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında ihtiyaç duyulan silikon miktarının günde 5-20 mg olduğu tahmin edilmektedir [55-57].

1.7.4. Potasyum

Potasyum, hücre içerisinde katyon yapıya sahiptir. Plazma düzeyinin yaklaşık 4-5 mM'de 23 katı kadarı eritrositlerde bulunmaktadır (105 mM). Hücre içi yüksek potasyum düzeyi Na/K-ATP'az sistemi ile sürdürülmektedir. Günlük gereksinimi 50-150 mmol'dur. Kan basıncını düşürebilmekte, sıvı dengesinin oluşturulmasında, protein sentezinde, sinir iletiminde, kas kasılmasında ve kalp atışının sürdürülmesinde hayati önem taşımaktadır.

Sağlıksız beslenme sonucunda potasyum eksikliği ortaya çıkabilir. Aşırı efor sarfeden, terleyen veya diyabet ve böbrek problem olan insanlarda potasyum eksikliği görülebilmektedir. Potasyum eksikliği sonucunda güçsüzlük, konsantrasyon zaafiyeti ve yorgunluk belirtileri gözlemlenebilir. Ayrıca ileri boyutta hipertansiyon, felç, aritmi gibi sağlık sorunlarına da sebep olabilmektedir.

1.7.5. Demir

Demir bütün doku ve organlar için temel element olarak bilinmektedir. Demir emilimi vücutta en fazla % 10 oranında gerçekleşmektedir. Mukozal blok adı verilen doğal bir direnç sonucunda vücutta bulunan demir bu oranı geçememektedir. Kalsiyum iyonları demir emilimini inhibe etmektedir. Toplam demirin % 77'si porfirin sentezinde, %55 Hem, %15 doku enzimleri ve %7 miyoglobin olarak

bulunmaktadır. Ferritin olarak çeşitli dokularda %20, plazma transferinde %3'lük kısmı kullanılmaktadır. Vücutta bulunan demir miktarının bir kısmı Hem yıkımı ile sağlanmakta diğer kısmı depolardan, çok azı bir miktarı da emilimden gelmektedir. Demir eksikliği genelde çocuk, genç kadın ve yaşlılarda anemi nedeni olarak bilinmektedir.

1.8. Kıkırdakta Bulunan Elementler

1.8.1. Kükürt

Kükürt organizmada aminoasitlerin yapısında mukopolisakkaritlerin içerisinde SO_4 olarak yer almaktadır. Proteinlerin üçüncül yapısında (insülin) bulunmaktadır. Kükürt eksikliği kıkırdak erimesine sebep olmaktadır. Hareketli eklemler arasında kıkırdakta sıvı kaybına sebep olmaktadır. Kas kemik ve deri yapısı vücudun kükürt depolarının yarısını oluşturmaktadır. Kalan yarısını ise protein metabolizması başta olmak üzere pek çok yerde kullanılmaktadır. Proteinler vücut içerisinde işlevlerini gerçekleştirebilmek için belirli formlarda bulunmaları gerekmektedir. Kükürt elementi de proteinin kimyasal bağlar yardımı ile vücut içerisinde kullanılmasını sağlar. Ayrıca kükürt elementi saçlarda ve tırnaklarda bulunan "keratin" içerisinde yüksek oranda bulunurken kemik dokularındaki kıkırdak yapılara elastiklik kazandırmaktadır. Yaş ilerledikçe kükürt eksikliğine bağlı olarak bu esnek dokuların elastisitelerinin kaybolacaktır. Ciltte kırışıklık ve sarkma gibi dejenerasyonlar meydana gelirken; kemik ve eklem dokularında da kireçlenmeler başlayacaktır. Kükürt mineralinin vücuttaki eksikliği sonucunda yaşlanmayı arttıracak kanısına varmak mümkündür.

Kükürt, hücrede enerji üretiminde, insülin hormonunun aktive edilmesinde, vücutta biriken toksik materyallerin bertarafında oldukça önemlidir. Kıkırdak dokusunda en çok bulunan temel yapı taşı Glukozamin molekülüdür. Bu molekül deri, kas, tırnak ve bağ dokularda önemli bir yapı taşıdır. Ayrıca eklemlerdeki en önemli görevi kıkırdak oluşumlarını sağlamak bunun yanında kıkırdağa kükürt emilimine yardımcı olmaktır.

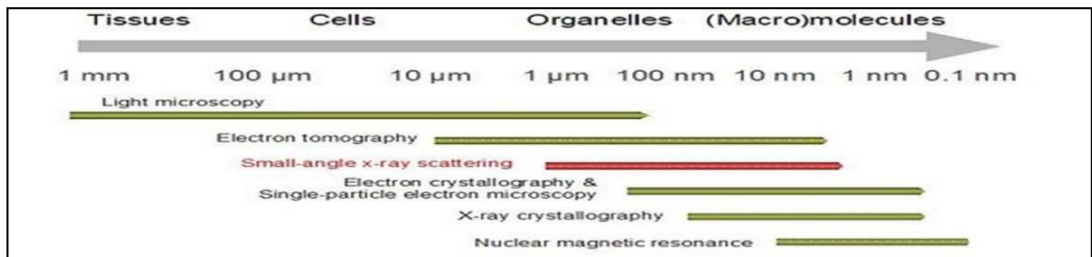
1.8.2. Manganez

Kemik metabolizması (organik matriks oluşumu) için gereklidir. Ama özellikle fetal gelişiminde, laktasyon da, iskelet gelişiminde, hidrolazlar da, kinazlar da, dekarboksilazlar ve transferazların aktivitelerinde çok önemli bir yere sahiptir. Protein ve polisakkarit oluşumunda “glikozil transferaz” üretiminin harekete geçirilmesinde kolesterol sentezi, Mn^{2+,3+} değerlikte olduğunda piruvat karboksilaz, SOD ve konkavalin gibi metallo enzimlere katılabilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda rol oynamaktadır. Doku solunumuna katılabilmektedir. Aminoasit ve yağ aside sentezinde oksidatif fosforilasyon çok önemlidir. İnce bağırsaktan emilip karaciğer, kemik dokusu, böbrek ve pankreas başta olmak üzere tüm vücutta depo edilebilen bir elementtir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Eklem kıkırdağını yüksek düzeyde mekanik zorlanmaya maruz bırakırsak inflamasyona ve doku yıkımına sebebiyet vermiş oluruz. Kıkırdak hücreleri olan kondrositler, üzerlerine binen mekanik etkileri algılayarak proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını sağlayan bir süreç başlatırlar. Kıkırdakta meydana gelen kondrosit hasarı, proteoglikan kaybı, ekstrasellüler matriks yapısının bozulması, aynı zamanda kemiğin eklem dokularındada hasar meydana getirecek ve osteoartrit gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olacaktır. Kıkırdak ve diğer eklem dokularında meydana gelen bu hasarların daha net belirlenmesi, hem osteoartrit patogenezi aydınlatması hem de daha etkin farmakolojik ve fiziksel tedaviler geliştirilmesine bir çok katkı sağlaması beklenmektedir. Maruz kalınan mekanik etkenlerin insan bedeni üzerindeki etkisi ve oluşan etkilerin sonuçlarının daha belirgin bir şekilde anlaşılması sağlanmalıdır. Bunların daha iyi anlaşılabilmesi için eklem kıkırdağının yapısal ve elemental boyutta incelenmesine ihtiyaç vardır. Yapısal analiz için küçük ve geniş açılı X-Ray (SAXS/SWAXS) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Elementel analiz için X-Ray floresans spektroskopisi (XRF) kullanılmıştır. Son yirmi yıldır, modern X-ışını kaynaklarının kullanılmaya başlanması ve detektör teknolojisindeki gelişmeler moleküler boyut ile mikro boyut arasında kalan yapısal farklılıkları ayrıntısı ile inceleme olanağı sağlamıştır. Bu bölgedeki yapısal incelemeler, nanoteknolojideki gelişmelere paralel olarak günümüzde büyük önem taşımaktadır.

2.1. Küçük ve Geniş Açılı X-Ray Saçılması (SAXS/SWAXS)



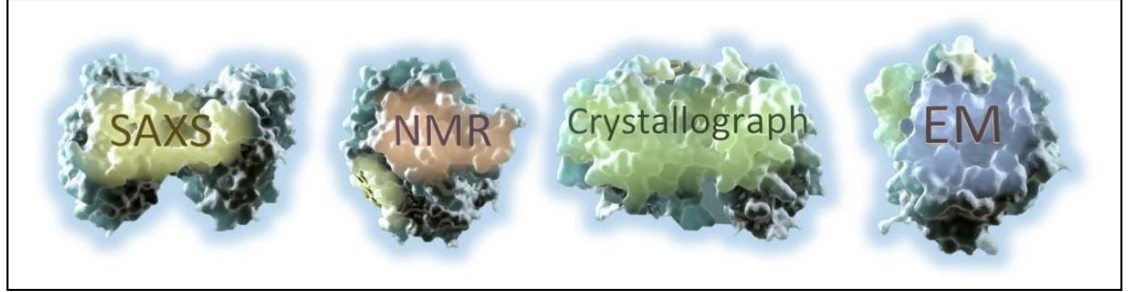
Şekil 2.1. SAXS cihazının hassaslık aralığı [58]

Özellikle, son 20 yılda Biyolojik malzemelerin yapısı buldukları doğal ortamlarında, X-Işını saçılma teknikleri (SAXS, WAXS) kullanılarak incelenmekte ve bu tür malzemelerin özelliklerini araştırmak üzere çalışmalar aktif olarak sürdürülmektedir. Bilindiği üzere, X-Işınları, keşfedildikleri 1895 yılından itibaren, yapı analizlerinde etkin olarak kullanılmaktadır. Bu yapı analizleri, gelişen X-ışını kaynağı ve detektör teknolojisi ile birlikte nano boyutta yapı analizlerinin de yapılabilmesi ile daha geniş skalaya yayılmıştır. En önemli gelişme, sıvı fazdaki malzemelerin elektron yoğunlukları mertebesinde bilgilere ulaşabileceğimiz, dinamik yapı değişimlerini hem moleküler, hem de nano skala da eş zamanlı olarak inceleyebileceğimiz, X-ışını saçılma yöntemlerini kullanabilecek deneysel olanaklara kavuşulmasıdır. Güncel X-Işını saçılma çalışmalarında genellikle, alışla gelmiş kapalı (Conventional) X-Işını tüpleri ya da sinkrotron kaynaklarından yararlanılmaktadır. Kapalı X-Işını tüplerinde en büyük avantaj, büyük laboratuvarlara gerek olmadan küçük ortamlarda kullanılabilme özellikleridir. Bunun yanında alışla gelmiş kapalı X-Işını kaynağından çıkan X-Işınının şiddetinin, sinkrotron ışınlarından (SR) çok daha küçük olması ise çalışmalar için bir dezavantaj olarak bilinmektedir. Ayrıca çalışılan dalga boyu aralığının sınırlı olmasından dolayı, X-Işını tüpüne kıyasla, sinkrotron kaynakları genellikle tercih edilmektedir. Genellikle ilk ve başlangıç analizler laboratuvar tipi SAXS/WAXS cihazları ile yapılır ardından seçilen örnekler sinkrotron merkezlerine taşınıp daha detaylı analizler yapılır.

X-Işını yöntemlerinden biri olan X-Işını Küçük ve Geniş Açılı Saçılması (SAXS/WAXS) yöntemi ile incelenen örnekten Küçük ve Geniş açıda saçılan X-Işını şiddetleri, saçılma açısının bir fonksiyonu olan Q (saçılma vektörü) büyüklüğüne göre elde edilerek bu verilerden yapı ile ilgili bilgiye ulaşılmaktadır. Küçük ve Geniş Açılı Saçılmalarında, tıpkı X-Işınları kırınımında olduğu gibi, saçılma olayı yapıdaki elektronlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Ayrıca SAXS yöntemi çözelti içindeki biyolojik makromoleküllerin düşük-çözünürlüklü (nano metre mertebesindeki boyutunda) yapısal karakterizasyonları için geliştirilmiş bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu teknik ve yöntem, farklı matematik ve sayısal yöntemlerle birlikte kullanılarak protein ve protein komplekslerinin düşük-çözünürlüklü üç boyutlu yapıları ile proteinlerin dördüncül yapıları ve oligomerik

kompozisyonları hakkında bilgi sağlamaktadır. Şekil 2.2.'de zarf yapıları görselleştirilmiş makromoleküler yapıların hangi yöntemlerle analiz edilebileceği ifade edilmektedir [59].



Şekil 2.2. Makromoleküler yapıların aydınlatılmasında ağırlıklı olarak kullanılan, bir birini tamamlayıcı yöntemler

NMR analizleri ile moleküler düzeyde, binlerce atom içeren yapılar yine sıvı ortamda incelenebilmekte, ancak makromoleküler katlanım ile ilgili en genel bilgiye, SAXS analizleri ile ulaşılabilmektedir. Bununla birlikte SAXS analizleri düşük çözünürlü yapıyı açıklarken, kristalografik bilgi bir kaç angstrom boyuta inebilen atomik düzenlenimleri, yüksek çözünürlükte verebilmektedir. Bununla birlikte, makromoleküler kristalografinin en büyük dezavantajı ise, incelenecek malzemenin kristal yapıya sahip olması gerekliliğidir. Oysa, biyolojik doğal yapılar genelde sıvı ortamı gerekli kılar. Elektron mikroskopi yöntemi ise, gerçek görüntüyü içermekle birlikte, sıvı faz içeren biyolojik örnek hazırlama evresi çok zor olup malzemenin genelini içeren bilgiler elde edilmesi sıkıntılıdır.

Proteinler gibi makromoleküler yapılarının aydınlatılması için neden SWAXS yapı analiz yöntemi kullanılıyor? Bu sorunun cevabını oluşturabilmek için başlıca nedenler aşağıda sıralanmıştır.

1. X-Işınlarının dalga boyları yeterince kısadır (0.1-1 Å). Yani, atomik, moleküler ve nano boyuta duyarlıdır.
2. Yüksek enerjiye sahiptirler. Böylece incelenecek yapının derinliklerine kolayca ulaşabilirler.

3. Yüksek akıllı X-ışınları kullanılarak saçılma olaylarının olma olasılığı artırılabilir. Yani farklı veri kalitesi artırılarak elektron yoğunluğu mertebelerinde ayrıntılı yapısal bilgilere ulaşılabilir [60].

4. Sıvı fazda makromoleküler şekillenimler (katlanımlar) çok farklı olabilmektedir. Bu farklılıklar dinamik olarak yine bu yöntemle moleküler ve nano skalada eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir.

Bunun için uygun optik elemanlara ve detektör sistemine sahip deney sistemleri kullanılmalıdır.

Özet olarak, SWAXS yöntemi ile oluşturulan veriler kullanarak proteinler gibi makromoleküler yapıların ve nano oluşumların şekil, boyut, jirasyon/etkin yarıçapları (R_g), maksimum 3D büyüklükleri (D_{max}) ve oluşumlar arası mesafeler gibi yapısal bilgilere ulaşılabilir [61].

Yapı içinde ve çözelti ortamında bulunan nano oluşum veya proteinlerin yapıları hakkında bilgi edinmek için SWAXS yöntemi en güçlü tamamlayıcı yöntemlerden biridir [61]–[64].

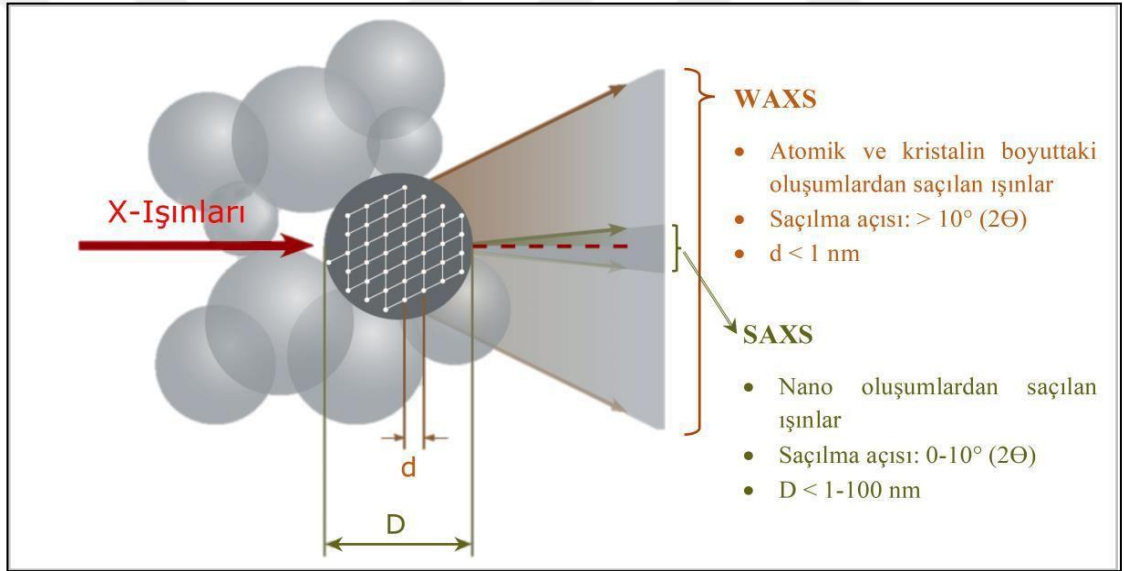
Bu yöntemle, küçük açı ($\sim 0,3 - 40$) bölgesinde çalışılarak proteinlerin düşük çözünürlü ama gerçek yapıları hakkında bilgi edinilebilmektedir [61]. İlgili açı sınırında analizler için protein ve nano oluşumların boyutu yaklaşık $\sim 20 - 250 \text{ \AA}$ civarındadır [61].

SAXS verilerinin değerlendirilmesinde farklı programlar kullanılarak oluşumların 3 boyutlu (3D) yapıları modellenebilir [55]–[67]. Bu modelleme işlemlerinde, incelenecek her bir malzeme içeriğindeki nano yapılar, farklı matematiksel bağıntılarla biçimlendirilir.

WAXS bölgesindeki ($\sim 3 - 200$) saçılma verilerinden yararlanılarak, proteinlerin moleküller arası yapı düzenlenimleri, kristalin katman oluşumları ve mesafeleri hakkında da bilgi elde edilebilir [68].

Küçük ve Geniş Açılı X-Işını yöntemini diğer yöntemlerden farklı yapan en önemli özellik, angströmdan (\AA) mikrometre (μm) kadar uzanan büyüklüklerde, homojen olmayan elektron yoğunluklarına duyarlı olmasıdır.

SWAXS yöntemi ile sıvı, katı, gaz, toz ve jel gibi formda olan örneklerin yapıları hakkında bilgi alınabilmesi de mümkündür. Kısaca, SAXS aralığı 0,02 nm ile 0,40 nm dalga boyuna sahip iyi yönlendirilmiş X-ışınları ile, büyüklüğü 0,1 nm ile 100 nm arasında nanoparçacıklar ve yoğunluk değişimleri (farklı oluşumlar) içeren maddelerin yapılarını incelemeye yarayan bir teknik olarak biliniyor. WAXS bölgesine baktığımızda ise, atomik (angstrom) boyutta olan oluşumların yapıları hakkında bilgi alınmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. SAXS ve WAXS tekniklerinin bazı özellikleri ve ölçüm aralıkları [71]

SAXS, örnek içerisindeki homojen olmayan nanometre boyutundaki elektron yoğunluklarına duyarlıdır ve çok küçük açılarda ($2\theta < 10^\circ$) X-Işınlarının elastik saçılması olarak tanımlanır. Boyut ve saçılma açısı arasındaki ters orantılılık sebebiyle, büyük açılarda küçük boyutlu yapıların bilgisi, küçük açılarda ise daha büyük boyutlara sahip yapıların bilgisi algılanabilir.

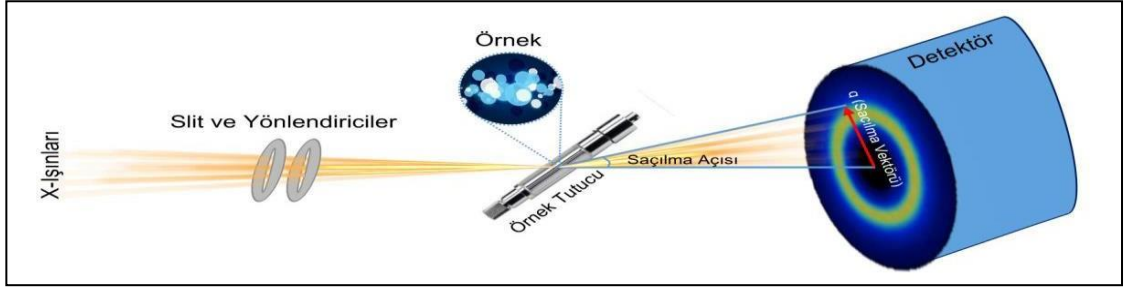
Geniş Açıda X-Işını Saçılması (WAXS) da, SAXS ile aynı fiziksel prensiplere dayanır. Her iki teknikte de örnek içindeki elektron yoğunluklarının bir fonksiyonu olarak örnekten elastik saçılma dikkate alınmaktadır. WAXS yöntemi ($2\theta > 10^\circ$) küçük ölçekli yapıların incelenmesinde kullanılır. Saçılma verileri aynı zamanda

kırınım (XRD) bilgileri de içerir. SAXS verileri büyük oluşumların düzeninden, WAXS deseni ise atomik ve moleküler düzenlenimlerden oluşan kırınım verisine ulaşmayı sağlar. Bu nedenle örneğin kristalinitesi hakkında da bilgi edinmek mümkün olur.

WAXS çalışmalarında, atomik ve moleküler boyutta ayrıntılı ve daha hassas yapıları görülebilirken, Şekil 2.3.'de görüldüğü gibi SAXS ile yapıya daha uzaktan bakıp, daha büyük yapısal oluşumları ve onların gruplaşmalarını incelemek mümkün olur.

SWAXS yöntemleri ile biyolojik oluşumların içyapısını, şeklini, büyüklüklerini ve dağılımlarını belirlemek mümkündür [72]. Böylece geliş güzel ve farklı yönelimlere sahip, çözelti içindeki lateksler, supramoleküller, bir araya toplanan miseller, proteinler de bu yöntem ile kolayca incelenebilmektedir [73]. Özetle nano boyutlu oluşumların yapısal analizlerinde SAXS yöntemiyle, parçacıkların uzaysal ve yönelime bağlı düzenlenimleri de incelenebilir [74]. Kısaca bu yöntemin uygulanabilmesi için gerekli koşul, incelenecek örnekler içinde farklı elektron yoğunluklarına sahip nano boyutlu oluşumların bulunmasıdır.

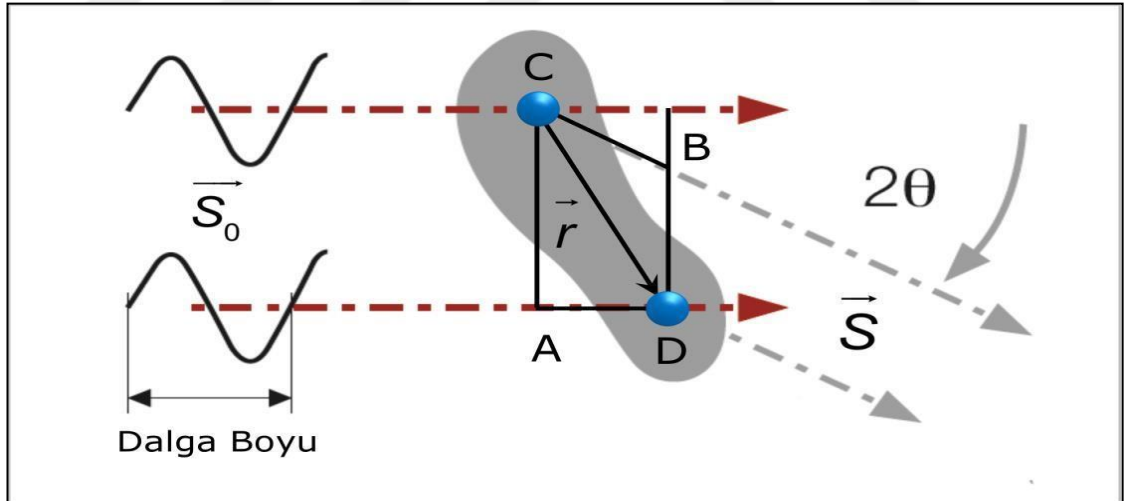
SWAXS yönteminin bu özellikleri farklı örneklerle çalışma imkânı verdiği için, bu yöntemi kullanarak nanoteknoloji ve nanobiyoteknoloji gibi bilimlerinin her alanında çalışma yapılabilir. Bir elektromanyetik dalganın elektrik alanı atomik yapıdaki elektronlarla etkileşerek onların salınım hareketi yapmasına, dolayısıyla ikincil bir dalganın üretimine yol açar. Böylece oluşan ikincil dalga gelen dalga ile aynı frekanslı ise saçılma koherent saçılma olarak adlandırılır [75]. Hızlandırılmış yükler, büyük mesafelerdeki bütün saçılma genliklerinin eklenmesiyle oluşan ikincil dalgaları üretir. Bütün ikincil dalgalar aynı frekanslıdır fakat farklı yol uzunluklarından dolayı farklı fazlara sahiptirler. Küçük ve Geniş Açılı X-Işını Saçılımı sisteminin temel elemanları Şekil 2. 4.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Şematik olarak Küçük ve Geniş Açılı X-ışını Saçılımı sisteminin temel elemanları: (X-ışını kaynağı; Slit ve Yönlendiriciler; Örnek [Sıvı, katı, jel, gaz, ince film v.b.]; Örnek Tutucu; Saçılma açısı ve Detektör) [76]

X-ışınları kaynaktan çıktıktan sonra slit ve yönlendiriciler tarafından ışın demeti olarak şekillendirilir (çizgi veya nokta) ve örneğe çarparlar. Bu demetin küçük bir kısmı gelme doğrultusundan farklı bir yöne saçılır. Bu durum gelen ışının açısı ile örnekten yansımaya benzer. Detektör, saçılma şiddetini saçılma açısına bağlı kaydeder.

Şekil 2.5.'te gösterildiği gibi, incelenen örneğin yapısı hakkında bilgi, saçılma açılarının fonksiyonu olan saçılma şiddetinin analizinden elde edilir.



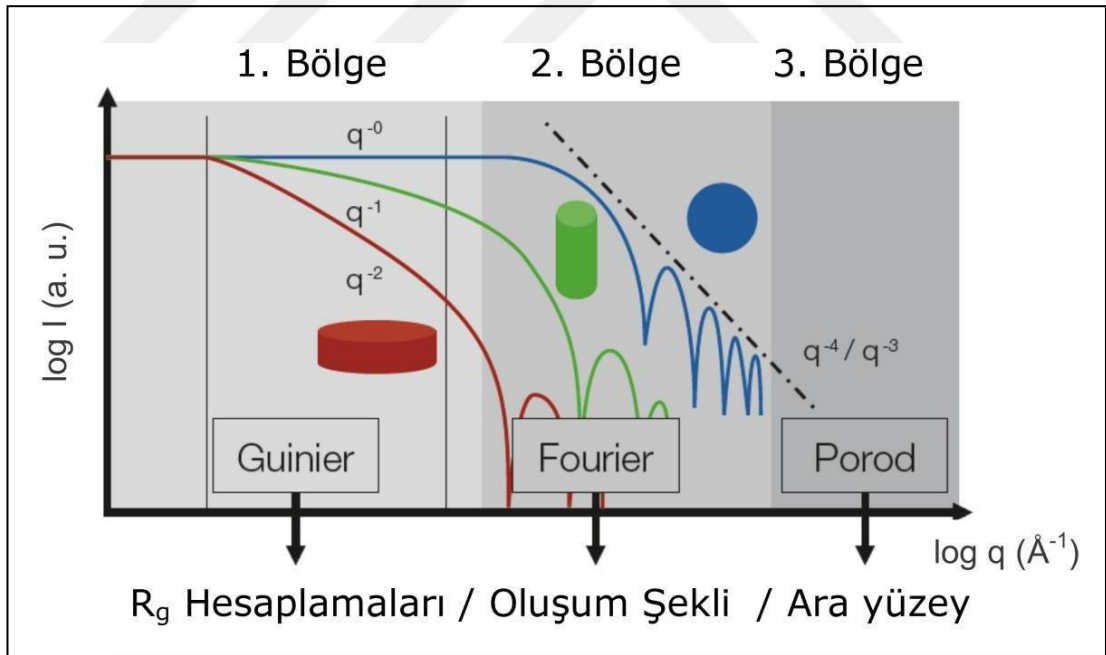
Şekil 2.5. Bir nano oluşumun C ve D noktalarından saçılan ışınlarla ilgili geometrik gösterim (r iki saçıcı noktanın görelî konum vektörü, S_0 ve S sırasıyla gelen ve saçılan ışınların dalga vektörleri) [76]

Genelde SAXS yönteminin uygulanmasında izlenen adımlar aşağıdaki gibi sıralanabilir. Bu adımlar bazı kabullere dayanmaktadır.

I. Parçacıklar istatistiksel olarak izotropiktir ve uzun erimli etkileşimler yoktur. Bu da, büyük uzaysal mesafelerde parçacıklar arasında etkileşim yoktur anlamına gelmektedir. Zaman içinde yönelimdeki değişimler ihmal edilir.

II. Parçacıklar bir hayali matris üzerine yerleştirilmiştir. Matris, elektron yoğunluğu ile homojen ortamlarda oluşturulmuştur. Bu durum katılardaki homojen olmayan dağılımlar için ya da çözeltideki parçacıklar için geçerlidir.

Deforme olmuş bazı parçacıkların saçılma deseninin analizinde, Q önemli bir rol oynar. Bu değer, saçıcı hacim kesrine, çözünürlüğe veya elektron yoğunluğu farkına bağlıdır [77]. Yani, toplam saçıcı hacim ile orantılıdır. Örnek içinde bulunan farklı elektron yoğunluğuna sahip saçıcı hacim ne kadar büyük ise, bu alan değeri de orantılı bir şekilde büyüyecektir. Bir SAXS eğrisi genel anlamda, nitel olarak incelendiğinde, üç ana bölgeden oluşur. Bu üç bölgeden yararlanarak malzeme ve örnekler hakkında öncü yapısal bilgiler elde edilebilir.



Şekil 2.6. SAXS eğrisinden farklı bölgelere göre elde edilen bilgiler [71]

Şekil 2.6.'da görülen küçük q bölgesinden büyük nano oluşumlar, büyük q bölgesinden farklı fazlar içeren örnekler için ara yüzeyler ve geri kalan bölümde ise oluşum şekilleri ve orta boyutlu yapı etkileşimleri hakkında bilgi edinilir.

Bilindiği ve görüldüğü üzere q , \AA^{-1} biriminde, gerçek uzayda tanımlı mesafelerin tersi ile orantılı bir niceliktir. Yani, yapıya $D=2\pi/q$ uzunluk ölçüsüne sahip hayali bir pencereden (ters uzaydan) baktığımız söylenebilir.

Bu pencere, incelenen örneğin içyapısını, Fourier analizi ile matematiksel olarak görmemize olanak sağlar. Bu analizler ile gerçek uzaydaki elektron yoğunluğu bilgisine ulaşılabilir. Saçılma vektörünün büyüklüğü (q), küçüldükçe pencerenin boyutu artar. Büyüdükçe tersi durum söz konusu olur.

1) q değeri küçüldükçe, örneği incelemeye olanak tanıyan pencere büyüyeceğinden örnek içindeki saçıcıların birbirleri ile etkileşimleri hakkında bilgi alınır.

2) q değeri büyüdükçe, pencere küçülür. Böylece saçıcıların kendi büyüklükleri ve şekilleri hakkında bilgiye ulaşılabilecektir. Daha da büyük q değerleri, saçıcılar ile içinde buldukları ortam arasındaki ara yüzey yapısı hakkında bilgi verir.

Üç bölgede incelenebilecek saçılma eğrisi ile ilgili daha ayrıntılı bilgi, bu bölgeler adlandırılarak sırası ile aşağıda verilmektedir.



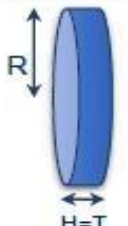
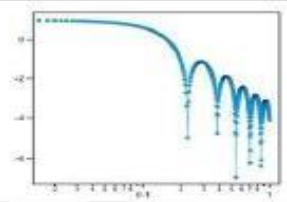
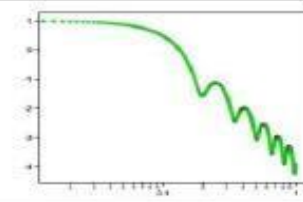
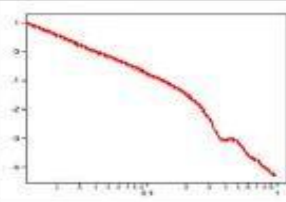
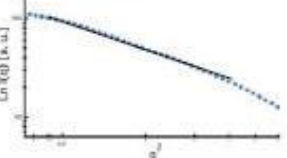
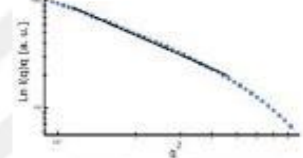
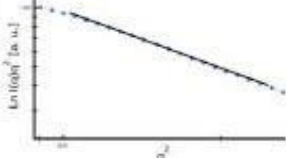
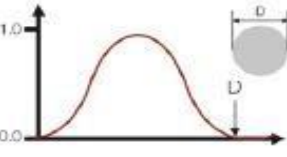
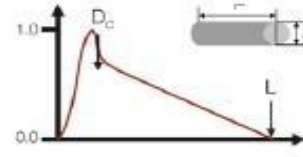
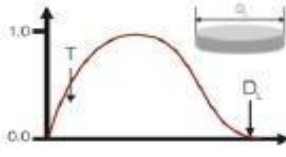
1. Bölge: Guinier aralığında, yani küçük q aralığında, parçacık etkileşiminin olduğu ara yüzey alanı birçok durumda deneysel olarak ölçülebilir. Sonuçta tek tip parçacıkların (monodispers) saçılma şiddetinden yararlanılarak parçacıkların jirasyon yarıçapını (R_g) belirlemek bu aralıkta mümkün olur.

2. Bölge: Orta q bölgesinde ise, uzaysal kararlılık gelişmeye başlar ve parçacıklar arası korelasyonlar gözlenir. Şekil 3.5.'de görüldüğü gibi düzlem veya disk yapılar için q^{-2} ve silindir şeklindeki oluşumlar için q^{-1} ile orantılı şiddet değişimi ayırt edilebilir şekil alır.

3. Bölge: Büyük q bölgesinde, ara yüzeyin yapısı gözlenmelidir ve iyi belirlenmiş iç yüzeyin varlığı dikkate alınmalıdır. Debye [78] ve Porod [79] bu bölgedeki eğim için, saçılma şiddetini, q 'nun 4.dereceden bir serisi olarak ifade etmişler.

Tüm bu analizler için en genel uygulama, incelenen örneğin yapısı ile bir model yapı oluşturmak ve bu model yapıdan elde edilen kuramsal saçılma şiddetlerini, deneysel şiddet verilerine fit yapmak şeklindedir. Böylece aynı anda pek çok yapısal parametre daha ayrıntılı ve hassas bir şekilde belirlenebilir.

Jirasyon yarıçapı, nano oluşumların elektron yoğunlukları tamamı ile özdeş olmadığı için tanımlanan ve parçacıkların etkin geometrisinin bir göstergesi olan yarıçap olarak bilinmektedir. Parçacık büyüklükleri ve dağılımları bilinen bir sistem için, eylemsizlik momenti yardımı ile bu yarıçap değeri hesaplanabilir. Jirasyon yarıçapının belirlenmesinde iki adımdan oluşan bir yöntem kullanılır. İlk önce, parçacığın tüm olası pozisyonlarının ortalaması alınır. Ardından parçacık içinde tanımlanan bir başlangıç noktasından r vektörel uzunluğu ile gidilebilecek tüm durumların olasılığı araştırılır.

Şekil			
SAXS			
R_g	 Eğim = $-\frac{1}{3} R_g^2$ $R_g^2 = \frac{3}{5} R^2$	 Eğim = $-\frac{1}{2} R_c^2$ $R_c = \frac{R}{\sqrt{2}}$	 Eğim = $-R_T^2$ $R_T = \frac{T}{\sqrt{12}}$
PDDF			
Form Faktör	R yarıçaplı homojen bir küre için form faktörü, $F(q) = [A(q)]^2 =$ $V^2 \rho^2 \left[\frac{3(\sin qR - qR \cos qR)}{q^3 R^3} \right]^2$	R yarıçaplı, L uzunluğunda ve düzgün bir silindir için form faktör, $F(q) = \left[\frac{\sin(qL/2)}{qL/2} \right]^2 \left[\frac{2J_1(q\sqrt{1-\mu^2}R)}{q\sqrt{1-\mu^2}R} \right]^2$	R yarıçaplı disk için L → 0 limit durumunda, disk için form faktör, $F(q) = \frac{2}{(qR)^3} \left[1 - \frac{J_1(2qR)}{qR} \right]$

Şekil 2.7. Küre, çubuk ve disk modellerinin yapı karakteristikleri [76]

Böylece elde edilen saçılma desenleri kullanılarak basit geometrik yapılar hakkında, doğrudan bilgi edinmenin mümkün olabildiği görülmektedir.

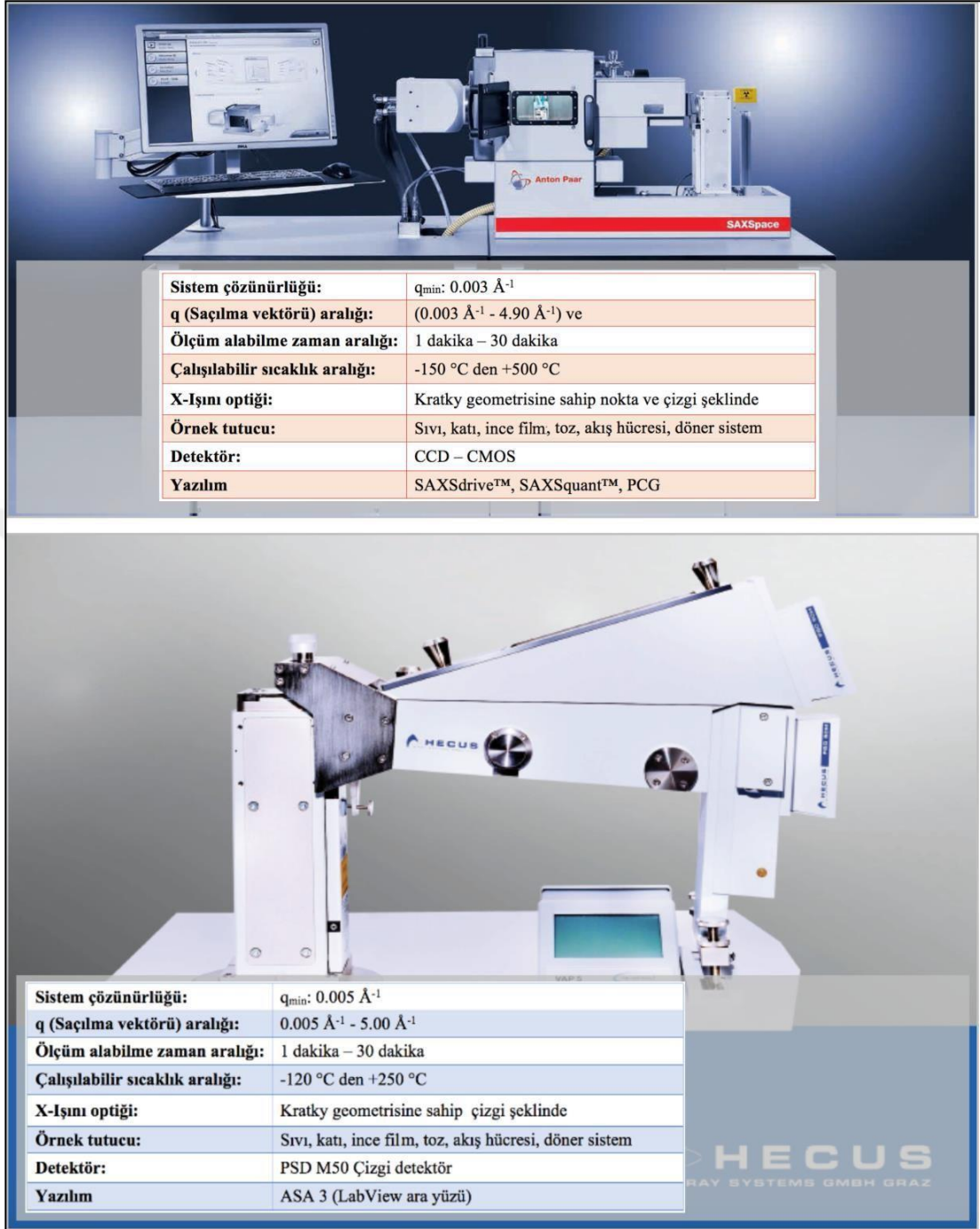
2.1.1. SWAXS yöntemi ve deney düzeneği ile ilgili temel bilgiler

Bu tez kapsamında incelenecek biyolojik örneklerin SWAXS yöntemi kullanarak yapılan ölçüm ve analizlerinde iki farklı laboratuvar tipi SWAXS cihazı (HECUS System3 ve Anton Paar SAXSpase) ile Sinkrotron Işın (NSRRC, BL23A) demet hattı kullanılmıştır.

Biyolojik örnekler ile çalışmada, kullanılan X-ışınlarının neden olacağı yıkıcı etkinin önüne geçebilme amacı ile kullanılacak X-ışınlarının enerjilerine (dalga boylarına) ve akılarına dikkat edilmesi gerekir. Bunun dışında kullandığımız X-ışını demetinin örnek üzerine düşen kesit şekli de oldukça önemlidir.

SWAXS deney donanımlarında çizgi ve nokta kolimasyon ile elde edilen X-ışınları doğrudan örnek üzerine düşürülerek saçılma olayları gerçekleştirilir. Çizgi kolimasyon ile örneğin büyük bir bölümü saçılma profiline katkı verirken, nokta kolimasyonda elde edilen saçılma verisinin hassasiyeti çok daha fazla olabilmektedir. Eğer analiz yapmak istediğiniz örneğin saçıcılığı az ise o zaman nokta kolimasyonlu, akısı yüksek X-ışını demetlerine ihtiyaç duyulur. Bu tür örnekler için en iyi deneysel olanaklar SR merkezlerinde bulunmaktadır.

Eğer incelenecek örnek saçıcılık açısından zayıf değil ise o zaman çizgi kolimasyon şekline sahip olan laboratuvar tipi SWAXS cihazları kullanarak çok iyi sonuçlar verecektir. Çizgi şeklinde olan X-ışınları kullanıldığında “yansıma etkisi” (smearing effect) ışın içine giriyor ve bu etkiyi yok etmek için farklı yöntemler kullanılması gerekir. Şekil 2.8.’de bu tez kapsamında kullanılan laboratuvar tipi SWAXS deney sistemleri görülmektedir.



Şekil 2.8. İki farklı firmaya ait, kratky (çizgi kolimasyon) ve pinhol (nokta demet) geometrisine sahip laboratuvar tipi SWAXS sistemleri ve özellikleri [76]

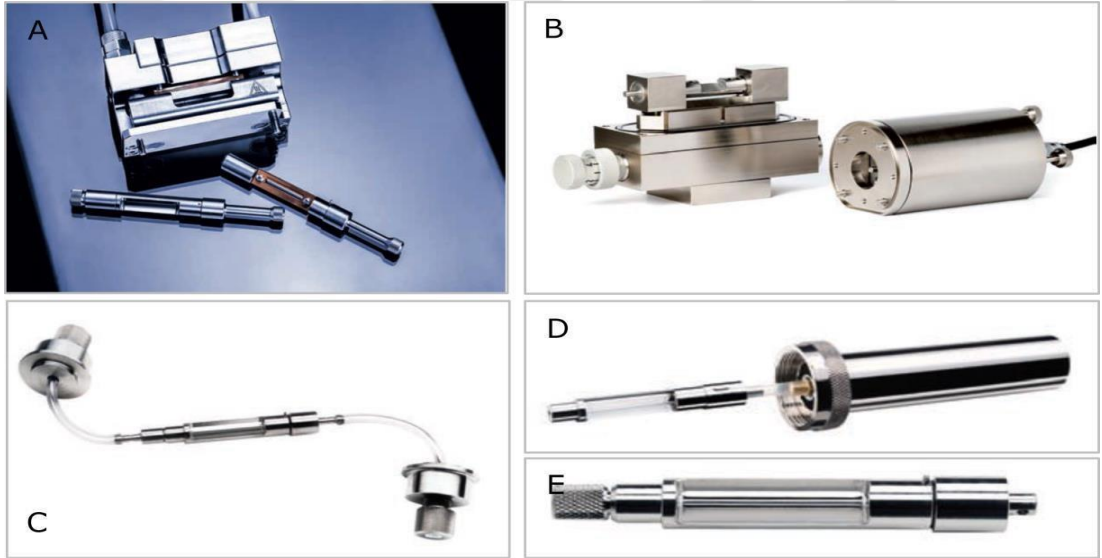
Bu sistemlerin en büyük avantajı, hem SAXS, hem de WAXS verilerini eş zamanlı toplayabilmeleridir. Böylece, SAXS verisinden nano boyutlu oluşumlar, WAXS bölgesinde kaydedilen verilerden ise moleküler yapılar incelenebilmektedir. Sistemlerde $\text{CuK}\alpha(=1,54 \text{ \AA})$ X-Işınları kullanılmaktadır. Laboratuvar tipi sistemlerinin tek dezavantajı diğer laboratuvar tipi X-Işını kaynağı kullanan deney

sistemlerinde olduğu gibi X-Işını akısının sınırlı olmasıdır yani sadece sabit dalga boyu ve enerji ile çalışma zorunluğu vardır. Daha yüksek akı gereken zayıf saçıcı örnekler için Sinkrotron Işın (SR) kaynağına, ihtiyaç duyulmaktadır.

Laboratuvar tipi SWAXS sistemlerinin önemli parçaları aşağıda sıralanmıştır:

- 1) X-Işını Tüpü
- 2) Kolimator (Kolimasyon sistemi)
- 3) Örnek haznesi ve örnek tutucular
- 4) Vakum sistemi
- 5) Demet durdurucu ve filtreler
- 6) Detektör sistemi
- 7) Yazılımlar

SWAXS analizlerinde çok çeşitli forma sahip örnekler ile çalışıldığı için, farklı örnek tutucular kullanılmaktadır (Şekil 2.9.). İncelenen farklı örnekler için Hacettepe Üniversitesi Fizik Müh. Böl., Mekanik Atölye imkanları kullanılarak, bu tez çalışması kapsamında, çeşitli örnek tutucular da ayrıca tasarlanıp kullanılmıştır.



Şekil 2.9. Farklı örnek tutucular ve örnek bloğu (A: SAXSpace cihazına ait örnek tutucu ve örnek bloğu, B: System3 cihazının ana örnek bloğu ve örnek döndürücü sistemi, C: Akış hücresi sistemine ait örnek tutucu, D: Toz örnekler için kullanılan örnek tutucu ve akış hücresi sisteminin bazı parçaları, E: Sıvı örnekler için tasarlanmış paslanmaz çelik ve kuartz tüplü örnek tutucu) [76]

Şekilde görülen örnek tutucular, maksimum saçılma sağlanması için gelen ışın demetine paralel olarak yerleştirilirler. Örnek tutucular paslanmaz çelikten yapılmış

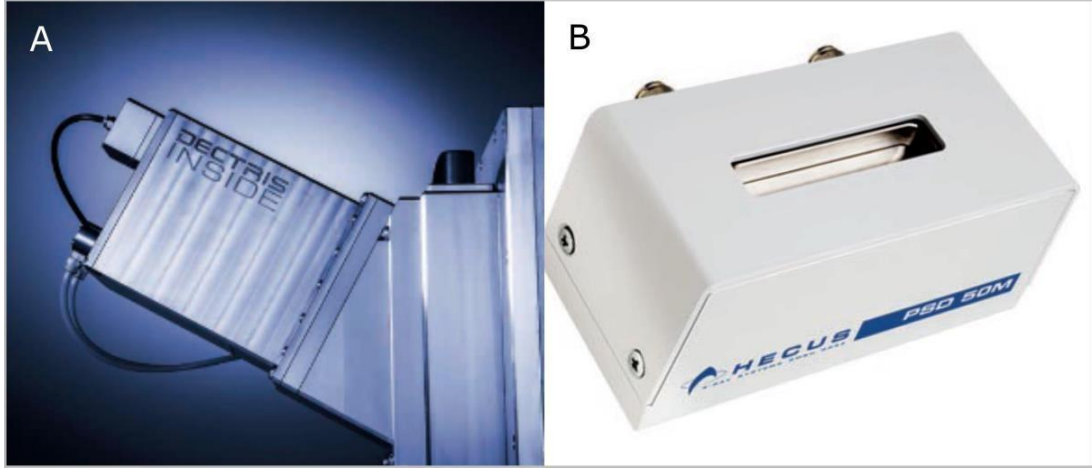
olup 10 mm çap ve 65 mm boyundadırlar. Farklı tipte örnekler için farklı örnek tutucular mevcuttur. Sıvı örnekler için tasarlanmış örnek tutucuda, içine yerleştirilmiş 50 µl'ye kadar sıvı alabilen (2 mm çaplı) ince kuartz kapiler tüp bulunur. Bir mikropipet veya özel uzun uçlu şırınga yardımıyla bu kapilere sıvı örnek doldurularak ölçüme hazırlanır. Toz örnekleri, sıvı örnek tutucuya enjekte edilemeyen yoğun (jel) malzemeleri ya da partikül içeren sıvıları ölçmek için, örnekler öncelikle farklı çaplarda kuartz kapilerlere doldurulur. Ardından ikincil bir örnek tutucuya bu kapiler tüp yerleştirilir.

Bu çalışmada 1,5 mm çapında kuartz kapiler tüp, paslanmaz çelik örnek tutucu içinde, ve sıvılara özel olarak üretilmiş örnek tutucular, Şekil 2.9.-B'de görüldüğü gibi laboratuvar tipi SWAXS sistemlerinde ana bloğuna yerleştirilmektedir.

Laboratuvar tipi SWAXS sistemlerinde alınan ölçümlerde, X-Işınlının hava molekülleri ile olan etkileşimlerinden gelecek istenmeyen saçılmaları önlemek için belli bir vakum altında (<1 mili bar) çalışılır. Laboratuvar tipi sistemlerde, sistemin hepsi (X-Işınları, kolimotor sistemi, örnek bloğu, örnek tutucu ve detektörler) vakum altındadır.

Detektörler, enerjik X-Işını fotonlarının detektör aktif maddesi ile çeşitli yollarla etkileşmesi sonucu, algılanmasına ve elektronik sayaç sistemi ile sayılmasına yarar. Detektörler nokta, çizgi ve alan olmak üzere üç tipe ayrılabilir. Bir X-Işını çizgi detektörü özdeş şekil, büyüklük ve özelliğe sahip algılama elemanlarından oluşur. Bu elemanlar piksel ve bazen de kanal olarak adlandırılırlar. Çizgi detektörler tek boyutlu (1D) detektörler olarak da bilinirler. Lineer konum duyarlı detektör (LPSD) veya konum duyarlı detektör (PSD) terimleri de sıkça kullanılmaktadır. Bir çizgi detektör eş zamanlı olarak X-Işınları kırımının tek boyutlu dağılımını ölçebilir. Belirli 2θ aralığında bir çizgi detektör, aynı aralıkta tarama yapan bir nokta detektörden daha hızlı bir şekilde kırınım desenini toplayabilir. Çizgi detektörün her kanalı nokta detektör gibi davranır [80].

Bu tez kapsamında çalışılan sistemde kullanılan SAXS ve WAXS detektörleri, Hecus sistemi için: 1024 kanallı çizgisel konum duyarlı ve Anton Paar sistemi için: CMOS ve CCD detektörlerdir (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Anton Paar ve Hecus firmasının kullandıkları detektör tipleri (A: CMOS detektör, SAXSpacs cihazı, Anton Paar firması, B: Çizgi detektör, System3 cihazı, Hecus firması) [76]

Ölçümü yapılacak farklı örnekler göre, sistem elektro-mekanik ve optik ayarlarının yapılması, verilerin toplanması, düzeltilmesi ve kalibre edilmesi için her deney sistemine özel farklı yazılımların kullanılması gerekir. System3 cihazının ASA3 (Amplitude Spectrum Analyzer) yazılımı ile konum ve enerji spektrumları eşzamanlı olarak ayarlanabilir. Tüm özellikler arabirim kartına yerleştirilmiştir. Detektörle beraber bu kart kolay çalışma, iyi çözünürlük ve yüksek oranda tekrarlanabilir sonuçlara ulaşmayı mümkün kılar. ASA3 ile SAXS ve WAXS ölçümlerini ve detektörün içinde bulunan süper iletken telin enerjilerini aynı ekran üzerinde eş zamanlı olarak görebiliriz (Şekil 2.11.). ASA3 programından veriler .p00 uzantılı dosyalar olarak daha sonra işlenmek üzere kaydedilir. Her örnek değişiminde deney sisteminin tekrar ayarlanması gerekebilir. Bu durumda tekrar ASA3 program arayüzü açılarak ayarlamalar baştan yapılır. Aynı zamanda sol tarafta SAXSpace cihazının arayüz programında görülmektedir. Bu program Anton Paar firmasının yazılım gurubu tarafından yazılmıştır. Bu program detektörden alınan dataları .tif uzantılı ve resim formatında kaydeder ve daha sonra elde edilen resimler birtakım işlemler sayesinde .txt ve .PDH uzantısına dönüştürülür.

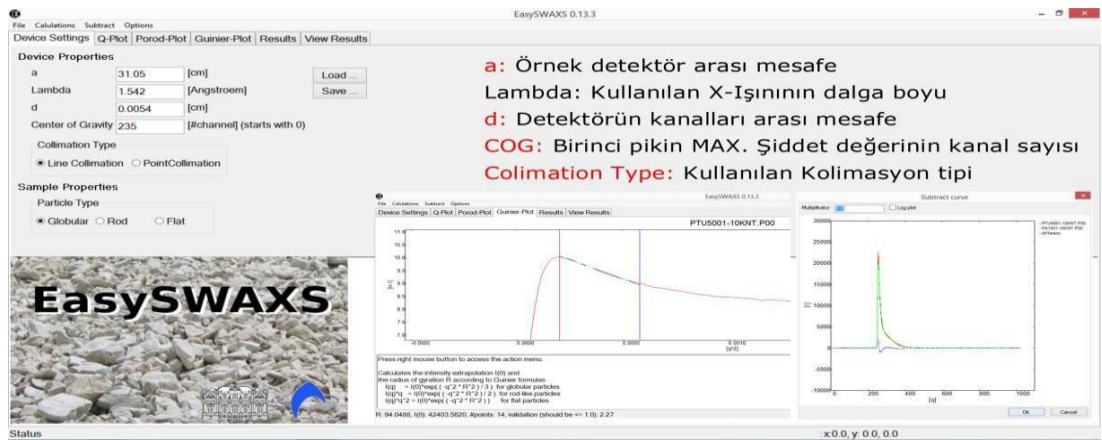


Şekil 2.11. Eş zamanlı ölçülen SAXS ve WAXS desenleri (Sağ: Hecus System3 cihazının yazılımı ve Sol: Anton Paar SAXSpace cihazının yazılımı) [76]

2.1.2 Kullanılan yazılım ve paket programlar

EasySWAXS Programı

Şekil 2.12.'de arayüzü görülen EasySWAXS programı, HECUS firması tarafından geliştirilmiş orginal bir programdır. Bu program sayesinde, sistem tarafından .P00 uzantılı dosyalara kaydedilen veriler, .dat uzantılı dosyalara dönüştürülerek başka programlarda girdi olarak kullanılabilmekte ve bu farklı programlar yardımı ile daha da ayrıntılı yapı analizleri yapılabilir. Özetle, HECUS System3 cihazından kaydedilen veriler bu program yardımı ile farklı analizler için hazırlanmaya başlanır. Ayrıca başlangıçtaki ham (jirasyon yarıçapı, oluşum formları vb.) yapı bilgileri yine bu program yardımı ile elde edilir.

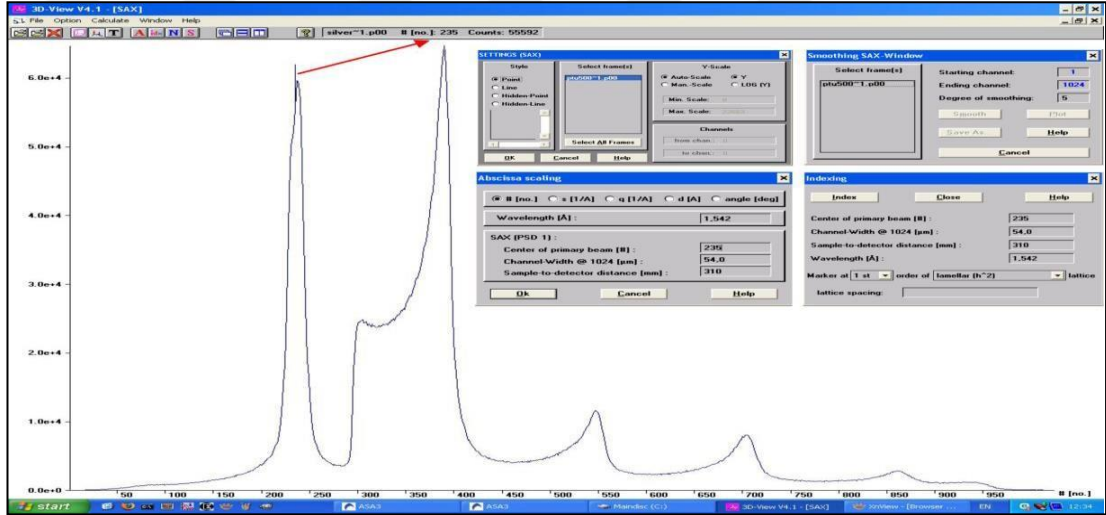


Şekil 2.12. EasySWAXS programının arayüzü [76]

3D View Programı

Şekil 2.13.'de arayüzü görülen 3D View Programı ile, .P00 uzantılı veri dosyaları doğrudan açılabilir. X eksenindeki veriler, kanal sayısı, q, d veya 2θ ya çevirilip anında işlenmek istenen veriye dönüştürülebilir.

Programın en önemli işlevlerinden biri veri kalibrasyonunda oldukça önemli olan, COG (Birinci pikin maksimum şiddet değerine karşılık gelen kanal numarası) değerini bulabilmektir. Böylece, eğer tabakalı, hegzagonal veya kübik yapıya sahip bir malzeme inceleniyorsa, bu program vasıtası ile saçıcı malzemeden gelen ışın piklerinin konumu ve nano oluşumların kristalin dizilimleri ile ilgili düzlemler arası mesafeler rahatlıkla ölçülebilir.



Şekil 2.13. 3D View programının arayüzü [76]

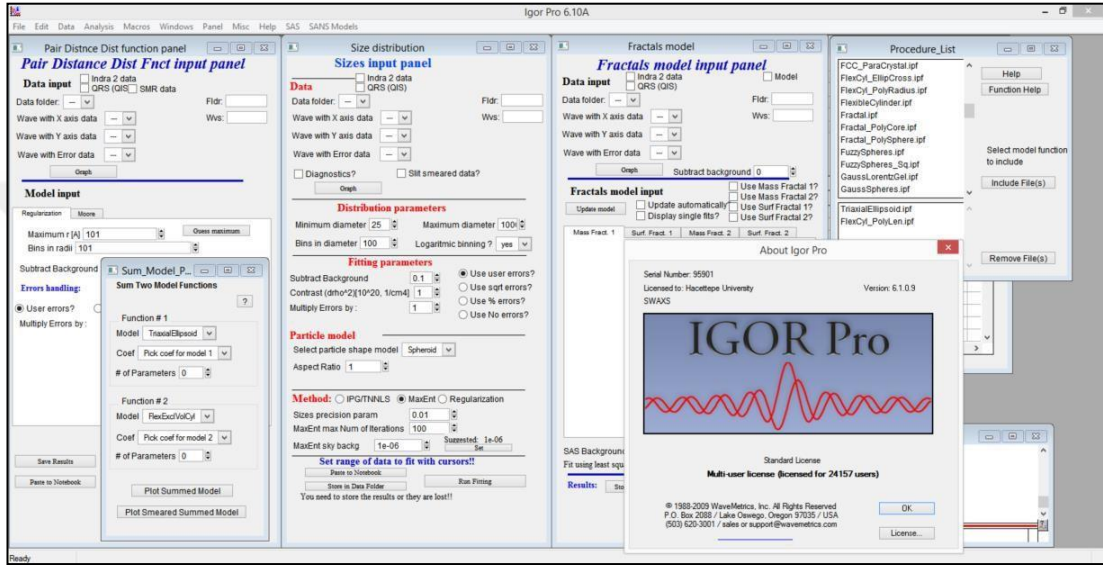
Igor Pro Paket Programı

Igor Pro 6.37, bilimsel verilerin çok yönlü işlenmesine olanak tanıyan, yayınlarda kullanılacak kalitede grafikler çizdirilebilen, çok miktarda deney sonucunun sistematik şekilde yönetilebildiği, etkin kullanımı olan önemli bir yazılımdır. Pek çok farklı ölçüm ve analiz cihazı tarafından üretilen veriler ve ilgili dosyalar, bu programa girdi (input) olarak kabul edilebilir.

Argonne Laboratuvarı X-Işınları Bölümü'nde üretilen küçük açı saçılması analiz işlemleri için tanımlı prosedürler, paket haline getirilerek, Igor Pro yazılımına

eklenip kullanılabilirler [81]. Bu paket halindeki eklentilerden biri, IrenaSAS ismi ile anılmaktadır [82].

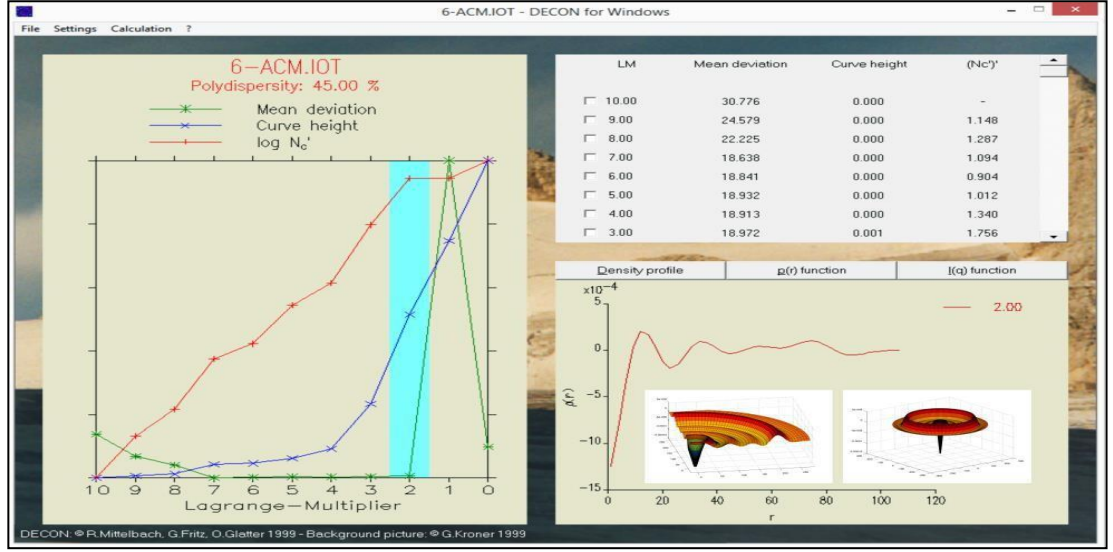
IrenaSAS paketiyle (Şekil 2.14.'de görülen ara yüzden de takip edilebildiği gibi) küçük açı saçılması deney sonuçlarına eğri fit etme işlemleri yapılabilen, Guiner ve Porod bölgeleri incelenebilmekte, uzaklık dağılım fonksiyonu (PDDF), boyut dağılımı ve fraktal boyut bilgileri elde edilebilmektedir.



Şekil 2.14. Igor Pro 6.37 ve Irena macros paket programlarının lisans ve arayüzleri [76]

ATSAS Paket programları

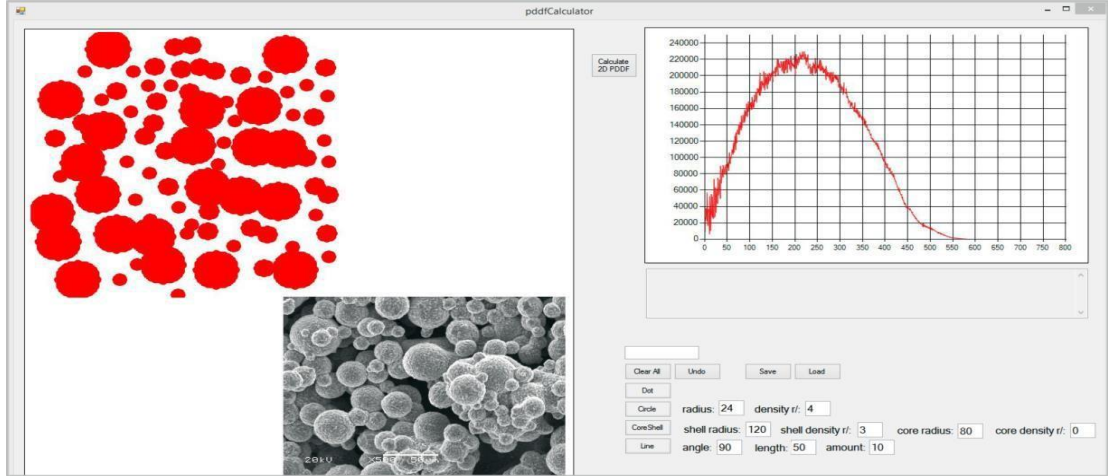
Şekil 2.15.'te ATSAS paket programının [83] içinde pek çok küçük ve kullanışlı alt programlar bulunmaktadır. Bu programlardan GNOM [84] ve DAMMIN [85] en yaygın kullanılanlardır. Öncelikle, Igor Pro programı kullanılarak elde edilen PDDF grafiklerinden DAMMIN programı için çıktı hazırlanması gerekmektedir. Bu çıktılar DAMMIN programı için girdi olarak kullanılıp analiz işlemleri başlatılır. DAMMIN Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (EMBL) küçük Açık Saçılması Bölümünde üretilmiş bir alt programdır. DAMMIN algoritmasında başlangıç olarak, küçük taneciklerden oluşan büyük bir yapı şekli model yapı olarak önerilir. Daha sonra şekil içerisindeki küçük taneciklerin konumu ve sayısı değiştirilerek ölçülen SAXS desenine en yakın desen veren yapı modeli tespit edilmeye çalışılır.



Şekil 2.17. DECON programının arayüzü [76]

PDDF Calculator

Analiz için kullanılan programlardan elde edilen uzaklık dağılım fonksiyonları ve bunlara karşılık gelen yapı modelinin doğruluğunu sınamak için modele karşılık gelen uzaklık dağılım fonksiyonunun da hesaplanması gerekir. Bu işlemi on binlerce noktadan oluşan şekiller için hesaplayabilecek PDDF Calculator isimli bir yazılım laboratuvarımızda tasarlanarak geliştirilmiştir. Bu program yardımı ile, nokta, çubuk, daire, çekirdek-kabuk gibi basit şekiller, beklenen yapı modeline uygun olacak şekilde, yazılım içerisindeki çizim alanına çizilebilmektedir. Kullanıcı tarafından çizilen şekiller yazılım tarafından homojen dağılmış noktalar halinde haritalandırılmaktadır. Kullanıcı yapı modeli ile ilgili şekli ifade edebilecek çizimin, kaç noktadan oluşacağına, yönelimine ve konumuna karar verebilmektedir (çizdirmek istenilen şeklin elektron yoğunluğu tanecik sayısı ile ayarlanabilmektedir. Yazılım daha sonra, çizim alanındaki tüm noktalar arasındaki uzunlukları hesaplayıp tasnifleyerek uzaklık dağılım fonksiyonunu elde etmeye çalışır. Şekil 2.18.'de, SEM görüntüsü kullanılarak (kırmızı topçuklarla) yapı modeli oluşturulan örneğe ait, hesaplanan uzaklık dağılım fonksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.18. PDDF calculator programının arayüzü [76]

2.2. X-Ray Floüresans Spektroskopisi (XRF)

XRF Spektrometre cihazı yüksek hassasiyet ile mikroanaliz için analizör x-ray cihazıdır. SEM / EDAX benzeri küçük parçalar ve inklüzyonlara göre, daha iyi bir duyarlılık analizi sağlar. Nokta analizinin yanında spot çapı ($<20 \mu$) eşleştirmeleri ve satır satır tarama yardımıyla haritalama yapılabilmektedir. Eagle III XRF Spektrometre cihazı vakum altında Uranyum (U-92)'dan Sodyum (Na-11)' kadar olan elementlerin hepsinin ölçümünü yapabilmektedir. XRF Spektrometre cihazı, Mikro X-ışını Floresans Spektrometresi olan EAGLE III (Kartal III) μ -Probe mikro X-ışını floresans spektrometresi üçüncü nesil bir aracını temsil eder. Numune analiz spot boyutu X-ray optik kullanımı ile minimize edilir, 20 mikron- 300 mikron arasında mümkün olan spotsizes aralığı sağlar. XRF Spektrometre cihazı, bir X-ışını kılcal tüp lensi radyasyonu büyük miktarda toplar ve X-ışınlarını analiz bölgesine odaklar ve böylece düşük güçlü bir X-ışını tüpünün kullanılmasına rağmen daha yüksek bir analiz hassaslığı sağlar. Şekil 2.19.'da XRF spektrometresi görülmektedir.



Şekil 2.19. Deneysel ölçümler için kullanılan XRF Spektrometresi [89]

XRF Spektrometre cihazı μ -Prob avantajları

- ✓ Numunenin hassasiyetlik ölçümü, 10-50 ppm'dir.
- ✓ Düzensiz şekilli örneklerin bile istenilen alanın küçük boyutu tahribatsız analizi.
- ✓ Büyük örnekler için büyük numune haznesi.
- ✓ Vakum altında analiz mümkündür, bu nedenle fosforlara kadar olan elementler için organik veya sıvı numuneler analiz edilebilir.
- ✓ "VeriSpot" ile heyecan verici alanın boyutunu esnek olarak ayarlama veya kılcal optiklerin kolay değiştirilmesi.

Ölçme Prensibi

Küçük, yoğun bir X ışını demeti üretmek için, küçük apertürler gibi geleneksel teknikler yeterli değildir. X-ışını tüpünün gücünü arttırmak bile gerekli yoğunluğu sağlayamaz.

Bununla birlikte, X-ışını optiklerinin kullanılması istenen etkiyi getirebilir. X-ışını optiği ile, daha yüksek katı bir açı ile tüp hedefine yakın X-ışını demetini toplamak ve bir ışık kılavuzuna benzer şekilde ışını numuneye doğru yönlendirmek mümkündür. Böyle bir X ışını optik sisteminin en basit örneği bir Monokapıladır.

Çoklu kapıllar, çıkmakta olan X-ışınlarının bir noktada yoğunlaştığı şekilde oluşturulan binlerce çok küçük monokapiliyer yığıdır. Bu, çok yüksek yoğunluklu,

20 μ çaptan küçük ışın demetlerine izin verir. Monokapılar ve poli kapılar birbiri ile karşılaştırıldığında poli kapılar sistem diğerine nazaran X-Ray yoğunluğunu 1000 kat daha fazla arttırmaktadır. Bu marka cihaz da X-Işını demetini oluşturmak için bu sistem geliştirilmiş ve hizmete sunulmuştur.

Küçük X-ışını noktasının bombardımanı altındaki örnek üzerine, örnekteki elementlere göre karakteristik X-ışını çizgilerini yaymaktadır. Yayılan X-ışınlarını analiz etmek için yüksek çözünürlüklü bir EDAX Si (Li) detektörü kullanılmıştır.

Küçük X-ışını noktasının bombardımanı altındaki numune, numunedeki elementlere göre karakteristik X-ışını çizgileri yaymaktadır. Yayılan X-ışınlarını analiz etmek için yüksek çözünürlüklü bir EDAX Si (Li) detektörü kullanılır. Bu, Sodyum (Na) ile Uranyum (U) arasındaki tüm elementlerin eşanlı analizini sağlar. Küçük nokta nedeniyle, EAGLE bir hattın (çizgi taraması) ve bir alanın (haritalama) dağılım analizi yapabilir. Bu, EAGLE'i X-ray Micro Analysis için yüksek duyarlılıkla evrensel bir araç haline getirir.

Çizgi Tarama; LineScan ile bir hat boyunca elemental dağılım göstermek mümkündür. Verilen herhangi bir elementin yoğunluğu, bir çizgideki eşit noktada ölçülebilir. Bu şekilde konsantrasyon profillerini göstermek mümkün olur.

Eagle Haritalama; Bu seçenek bir alanın yoğunluk dağılımının ölçülmesine izin verir. Spektral Haritalama ile her ölçüm noktası için tüm X-ışını verileri diske kaydedilebilir. Bu yolla ilave elementlerin dağılımının analizi, numunenin seçilen alanlarından toplanan spektrumların analizi veya çizgi taramasının analizi gibi ileri sonrası edinim analizleri yapmak mümkündür. Bu şekilde, veri değerlendirmesinde büyük esneklik sağlanır.

Eagle Görüntüleme; Elemental dağılım, görüntü işleme algoritmaları ile manipüle edilebilir. Bunların arasında doğrusal görüntü işlemleri (Toplama, Çıkarma, Çarpma, Bölüm), çeşitli görüntüleme seçeneklerinin kullanımı (gri, termal, sözde renk ve logaritmik ölçekler), video gradyanının manipülasyonu, kontrast geliştirme, seçim belirli yoğunluk bölgelerine sahip örnek alanların nokta ölçüm özellikleri vb.

Coatmaster; Kaplama kalınlığı ve bileşim analizi için yazılım mevcuttur. En fazla 5 monoelement katmanı ölçülebilir. Alaşımli kaplamalar için, çok elementli taban

malzemelerin kalınlığı ve bileşimi belirlenebilir. FunMaster, kalınlık uygulamalarının oluşturulmasını ve değerlendirilmesini sağlar. EAGLE'ın bir üst kat kaplama kalınlığı analiz cihazına olan kapasitesini genişletir.

2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Şekil 2.20.'de Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) verilmiştir. Serbest elektronlarla, yüklü partiküller elektromanyetik veya elektrostatik alanda diğer yüklü partiküller gibi yön değiştirilebilir. Bu elektronlar aynı zamanda çok kısa boylu dalgalar gibi davranır ve kırınıma uğrayabilir, absorplanabilir veya saçılabilir ve karşılaştığı noktaya bir miktar enerji taşırlar [90]. Bu prensiplerden yola çıkılarak Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) (SEM), 1950'li yıllarda geliştirilmesi ile birlikte birçok bilim dalında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Çünkü SEM büyük çeşitlilikte numunenin incelenbilmesine olanak sağlamıştır. Bir maddeye ait birçok özelliğinin cihazın yardımcı tekniklerle birlikte kullanılmasıyla elde edilebilmesinin yanında numune yüzeyinin görüntülenmesi ve bileşiminin belirlenmesi de sağlanmıştır [91].



Şekil 2.20. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) [92]

Taramalı elektron mikroskopta, katı numune yüzeyi raster düzeninde yüksek enerjili bir elektron demetiyle taranır. Raster, bir katot ışınları tüpü veya bir televizyondaki tarama düzeni ilkesine benzer bir tarama şekli olup, bu sistemde bir elektron demetiyle önce yüzey boyunca düz bir doğru üzerinde (x yönünde) tarama yapılır, sonra demet başlangıç pozisyonuna döner ve son olarak aşağı doğru (y yönünde)

belirlenmiş bir miktar kadar kaydırılır. Bu işlem söz konusu yüzey alanı tamamen taranana kadar tekrarlanır. Bu tarama işlemi sırasında yüzey üstünde (z yönü) bir sinyal alınır ve görüntüye dönüştürüleceği bir bilgisayar sisteminde toplanır [93]. Bütün mikroskoplarda ana unsur büyütme derecesi ve görüntü netliğidir. Bir optik mikroskopta ışık dalgalarının odaklanmasında lensler kullanılır. SEM’de ise ekrandaki görüntüyü oluşturan elektron demetinin odaklanmasında elektromıknatıslar kullanılır. Elektromıknatısların kullanımı operatöre daha yüksek büyütme derecelerinde çalışma olanağı sağlar. Aynı zamanda elektron demeti daha net bir görüntü oluşturur. SEM, katı madde yüzeylerinde direkt olarak çalışmak için tasarlanmış bir cihazdır. Cihaz tarafından sağlanan ve odaklanan elektron demeti ile yapılan tarama ile TV’dekine benzer bir görüntü oluşur. SEM optik mikroskoplara nazaran daha derin bir odaklama sağlar. Bu özellikleri nedeniyle, SEM ile bir numunenin üç boyutlu görüntüsü elde edilebilir. SEM, daha çok görüntüleme amacı ile üretilmiştir. Çözünürlük topografik 10 nm ve kompozisyonda 100 nm’den daha iyi düzeyde elde edilebilir [90]. İyi bir görüntü ve çalışması için numunelerin elektriksel olarak iletken olmaları tercih edilir. Ayrıca elektrikçe iyi iletken numuneler genellikle ısıyı iyi ilettilerinden ısısal bozunma olasılığı en az düzeydedir. İletken olmayan numunelerin SEM görüntülerini elde etmek için numune yüzeyine vakumlu bir ortamda ince bir metalik film tabakası kaplanır [93].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Deney Sistemleri ve Ölçülerin Alınması

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalarda, kullanılan farklı insanlara ait kemik-kıkırdak örnekleri, Kocaeli Üniveristesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü'nde çalışan Hekim, Doç. Dr. Kaya Memişoğlu tarafından sağlanmıştır. Son yıllarda, yüksek akıllı X-ışını kaynaklarının üretimi, hassas detektörlerin ve yazılımların kullanımı ile gelişen deneysel avantajlar, biyolojik örneklerin Küçük ve Geniş Açılı X-ışınları saçılması (SWAXS) yöntemleri kullanılarak yapılan ayrıntılı analizlerini yaygınlaştırmıştır. Bu analizler yardımı ile, doğal biyolojik yapıların buldukları ortamı bozmadan yapısal analiz yapabilme olanakları da böylece geliştirilmiştir. Kadın ve erkek hastalardan ameliyat esnasında alınan on iki adet kemik-kıkırdak örneklerinin yapısal analizi için SAXS/WAXS (Küçük açılı X-Ray Spektroskopisi/geniş Açılı X-Ray Spektroskopisi), elemental analiz için mikro-XRF (X Işını Floresans) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri yapılmış ve elde edilen veriler bu bölümde sunulmuştur. Analiz için kullanılan hasta bilgileri Tablo 3.1. de detaylı olarak gösterilmektedir.

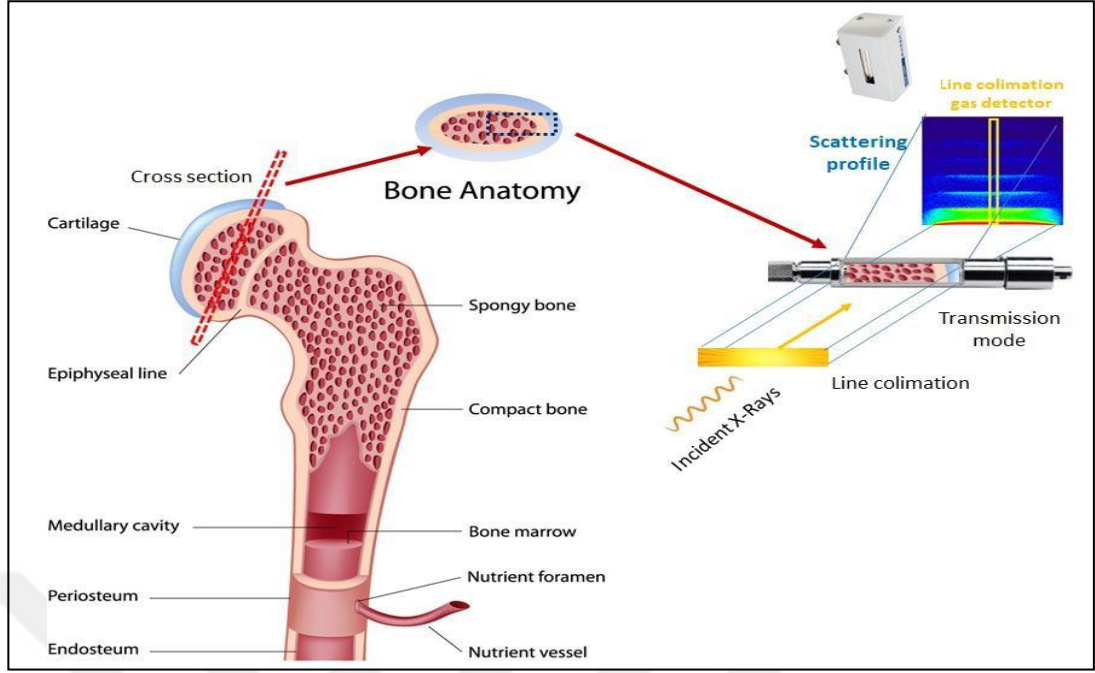
Tablo 3.1. Kadın ve Erkek hasta bilgileri

Kadın Hasta Grubu			Erkek Hasta Grubu		
Hasta ismi	Yaş	Kemik Bölgesi	Hasta ismi	Yaş	Kemik Bölgesi
a ₁	64	Kalça kemiği	b ₁	74	Kalça kemiği
a ₂	72	Kalça kemiği	b ₂	64	Ayak
a ₃	87	Kalça kemiği	b ₃	78	Kalça kemiği
a ₄	67	Ayak	b ₄	74	Omuz
a ₅	68	Diz	b ₅	88	Ayak
a ₆	74	Diz	b ₆	57	Omuz

3.2. Kemik-kıkırdak örneklerinin SAXS/WAXS ölçümleri

Günümüzde biyokimya/biyofizik araştırmalarına konu olan karmaşık yapıların içerdikleri nano oluşumların boyut, şekil ve dağılım analizlerinde X-Işını Saçılması yöntemlerinin kullanımı, gelişen elektromekanik cihaz teknolojisinin deney sistemlerine yansması sonucu, son yıllarda yaygınlaşmıştır. XRD ve NMR gibi tekniklerle beraber SAXS/WAXS ölçümleri de etkin kullanım alanına sahiptir [48]. Deney donanımlarının incelenecek biyolojik örnekler için optimize edilmesi ve en yüksek performans ile çalışması yapılan araştırmaların kalitesini ve hassasiyetini de artırmaktadır. Bu nedenle kemik, kıkırdak, saç, tendon, dentin, retina gibi zengin nano oluşum içeren biyolojik örneklerin ayrıntılı incelenebilmesi için tüm deneysel olanaklar geliştirilerek kullanılmalıdır. Özellikle örnek yönelimleri, malzemenin soğurucu ve saçıcı özellikleri optimize edilerek belirlenmelidir. Yüksek soğurma özelliği olan malzemeler için GISAXS modunda, az soğurucu olup iyi saçıcı örnekler için Transmisyon (geçirgen) modunda ölçümler yapılır. Eğer malzeme kararlı ise yüksek akılarda ölçüm yapılabilirken ölçüm süresi uzun olabilmektedir. Uzun süre ölçüm ve yüksek akı incelenecek biyolojik örneğe (retina gibi yumuşak dokulara) zarar verecek durumdaysa, kapiler tüp veya uygun örnek tutucular kullanılarak bu sorunlar ortadan kaldırılabilir. Ölçümlerde temel amaç tüm deneysel parametreleri optimize ederek en iyi kalitede veriyi toplamaktır. Bu nedenle her bir biyolojik örnek ölçüm öncesinde yoğun bir deneme sürecinden geçirilir. Sinkrotron ışın kullanımında kemik-kıkırdak geçişlerinde yüksek akılı, nokta kolimasyon X-Işını demeti kemik bölgeden başlayarak kıkırdak doku sonuna kadar mikrometrik ötelemeler ile biyolojik örneği tarama kolaylığı sağlar. HECUS SWAXS sisteminde çizgi kolimasyon X-Işını kullanıldığı için örnek aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Yani çizgi kolimasyon ışın malzemenin tüm farklı yapısal özellikleri ile etkileşmektedir. Bazı durumlarda gözenekli iç bölge doku matrisi açısından az yoğun, kıkırdak bölgeye doğru olan yapı ise daha yoğun yapı olarak tanımlanmıştır. Örneklerin en iyi saçılma profili veren transmisyon modu ölçümlerde kullanılmıştır.

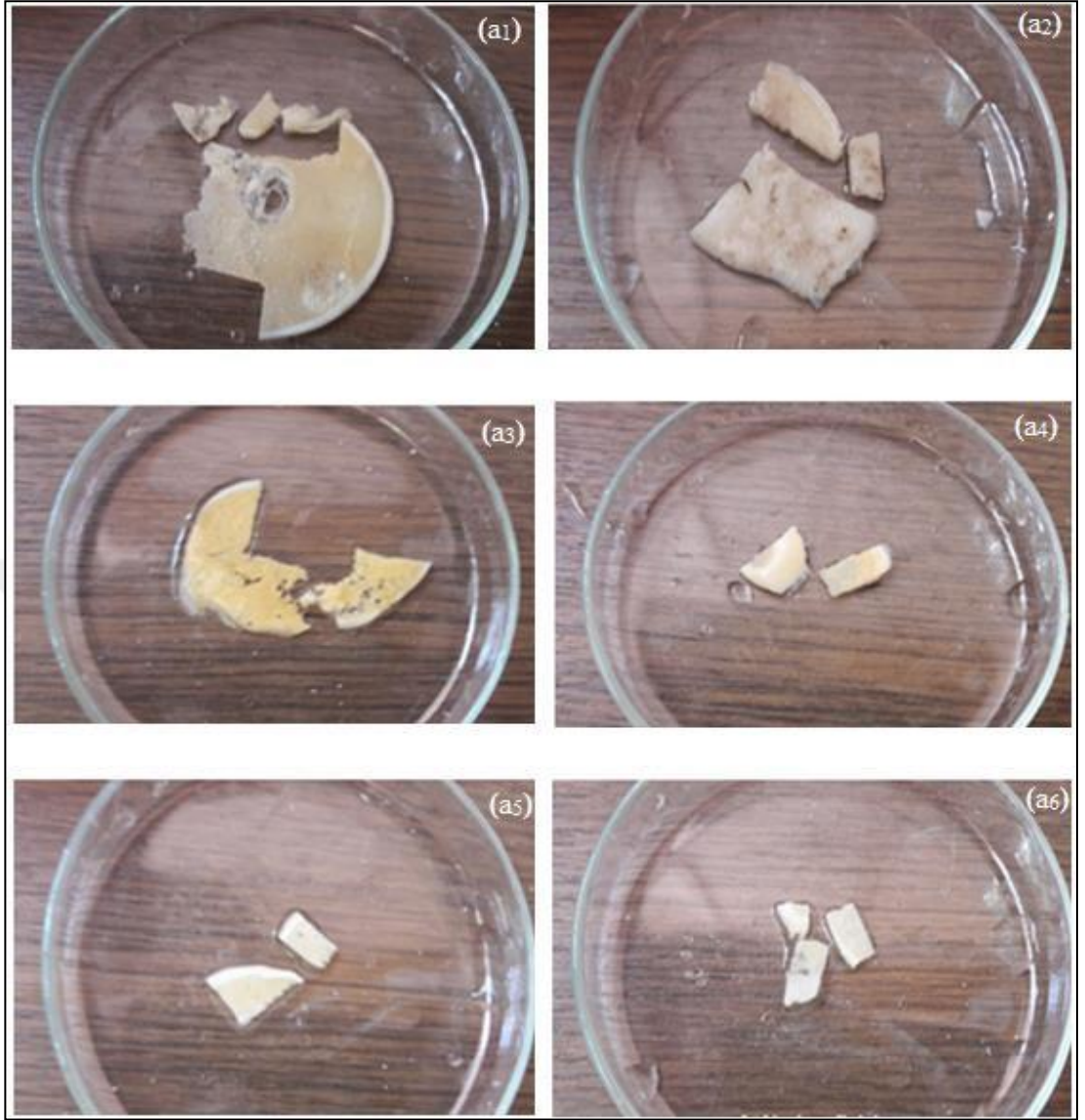


Şekil 3.1. HECUS SWAXS deney sistemi Kratky Optiğine sahip bir sistem [76]

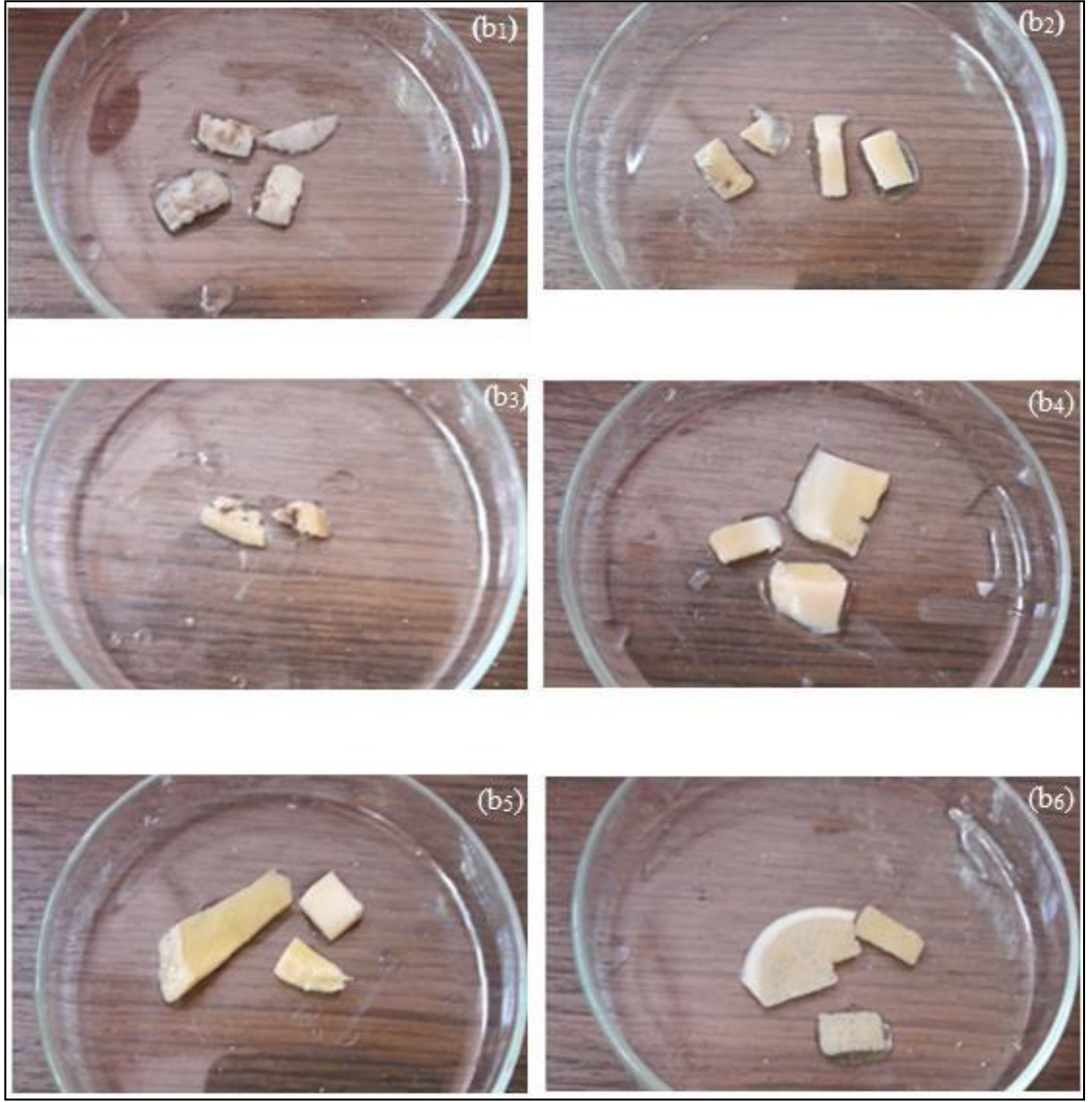
Şekil 3.1.'deki gibi kemik yapısından belli bir kesit alınıp analizleri incelenmesi sağlanmıştır. HECUS marka SAXS-WAXS sistemi ile $\text{CuK}\alpha = 1,54 \text{ \AA}$ ışını kullanılarak iki adet 1024'er kanallı çizgi detektör ile ölçümler alınmış ve kaydedilen saçılma verilerininin 3D WIEV programı kullanılarak $\ln[I(q)]-q^2$, $\ln[I(q).q]-q^2$ ve $\ln[I(q).q^2]-q^2$ grafikleri elde edilmiştir. X-Işını saçılması yöntemleri ile edinilen en önemli bilgiler, makromoleküler yapıların doğal ortamlarında çubuk diskleri içindeki 3D şekillenimleri, sayıları ve bir birlerine göre uzaklık dağılımları gibi yapısal bulgulardır.

3.2.1. Kadın ve erkek grubu kemik-kıkırdak örnekleri

Üzerinde çalışılan kemik-kıkırdakların hepsi, kadın ve erkek hastalardan ameliyat esnasında alındıktan hemen sonra %4'lük formaldehit içinde fiks edilmişlerdir. Yani yapıları sabitlenmiştir. Laboratuvarımıza ulaşan fiks edilmiş örnekler üzerine ilk cerrahi işlemler, Doç. Dr. Kaya Memişoğlu yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin sonrasında kemik-kıkırdak örneklerinden belli 200-300 μm kalınlığında kesilmiştir. Bu işlem, elimizde bulunan çok sayıda insan kemik-kıkırdak örneği için uygulanmıştır. Cinsiyete bağlı olarak gruplandırılmıştır. Kadın hastalar a, erkek hastalar b grubuna ayrılmıştık. Örnek hazırlama ile ilgili aşamalar, Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de görülmektedir.

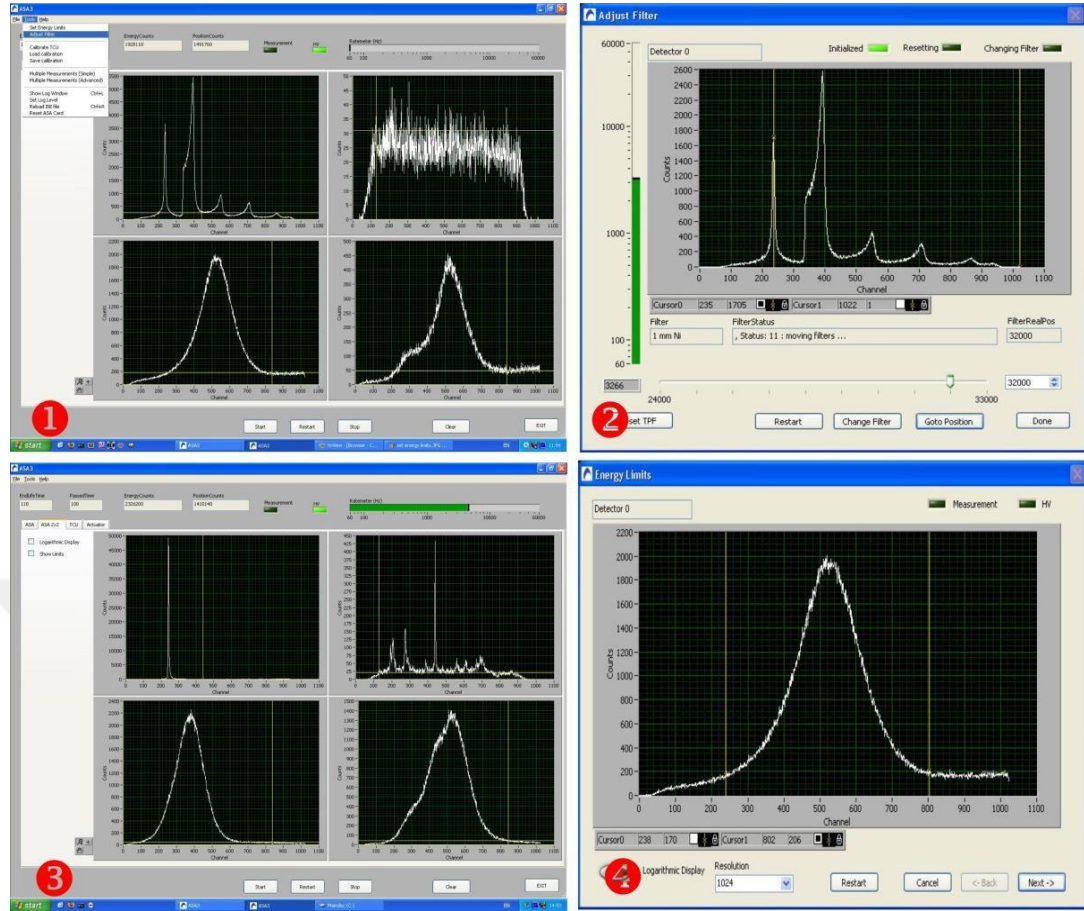


Şekil 3.2. Kadın hastalardan alınan kemik kıkırdak örneklerinin görünümü



Şekil 3.3. Erkek hastalardan alınan kemik kırık örneklerinin görünümü

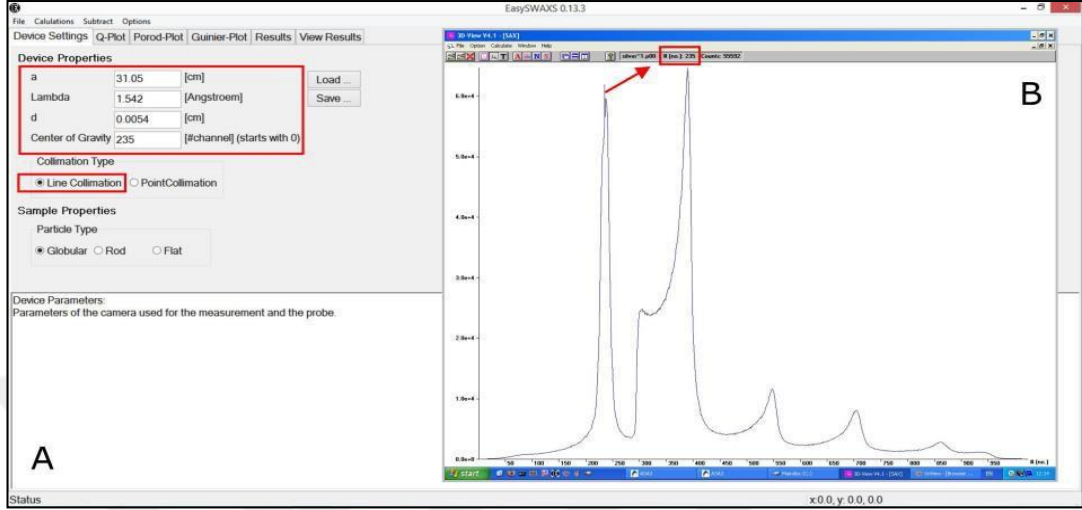
Cerrahi işlem sonrası elde edilen kemik-kırık örnekleri, X-ışını saçılma ölçümleri için 1,5 mm çaplı kuartz kapiler tüplere yerleştirilmiştir. Ölçümlere başlamadan önce sistemde deney sistem ayarlarının ve kalibrasyon işlemlerinin yapılması gerekmektedir. SAXS bölgesi kalibrasyonu için “Silver stearate” ve WAXS bölgesi için “Subilant” test örnekleri kullanılmıştır. Kullandığımız Hecus System 3 cihazının detektörleri çizgi detektörü olup, 1024 kanaldan oluşmaktadır. Detektörle ilgili veri ekranında, yatay eksenindeki kanallara düşen fotonların q “saçılma vektörü” büyüklükleri ve düşey ekseninde bulunan şiddet değerleri kalibre edilmelidir. Silver stearate ve subilant test örneklerinin pik değerleri karakteristik olup önceden bilinmektedir. Bu değerler temel alınarak, yatay eksenindeki kanallar kalibre edilir. Şekil 3.4.’de bu işlemler ile ilgili sistem-ekran görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.4. SAXS ve WAXS kalibrasyonları yapılırken alınan ekran görüntüleri [76]

Şekil 3.4.'de, 1. Ekran görüntüsü Silver stearate ve SAXS kalibrasyonuna aittir. Dört bölümlü ekranda, üst sol SAXS verisini, üst sağ WAXS verisini, alt sol ve sağ, sırası ile SAXS ve WAXS detektör gerilimlerini gösterir. 2. Ekran görüntüsü ise ana ışın demetinin, detektörü yüksek şiddet hasarından korumak için, Ni filtre konum ve ayarlamaları ile ilgilidir. 3. Ekran görüntüsü Subilant için elde edilen ölçüm değerlerini ve detektör ayar bilgilerini kapsar. 4. Ekran görüntüsü ise, detektörlerin içinde bulunan süperiletken tellerinin gerilim limitlerinin kalibrasyonunu daha açık bir biçimde göstermektedir. Tüm ölçümler, ASA3 (Amplitude Spectrum Analyzer) sistem yazılımı kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. ASA3 ile SAXS ve WAXS ölçümleri ve detektör gerilimleri aynı ekran üzerinde eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. ASA3 programında veriler .P00 uzantılı dosyalar olarak kaydedilirler. Daha sonra bu datalar işlenmek üzere farklı uzantılara (.txt, .PDH vb.) sahip dosyalara çevrilip istenilen analiz programında açılabilir hale getirilebilirler. Her örnek değişiminde deney sisteminin tekrar ayarlanması ölçülen verinin

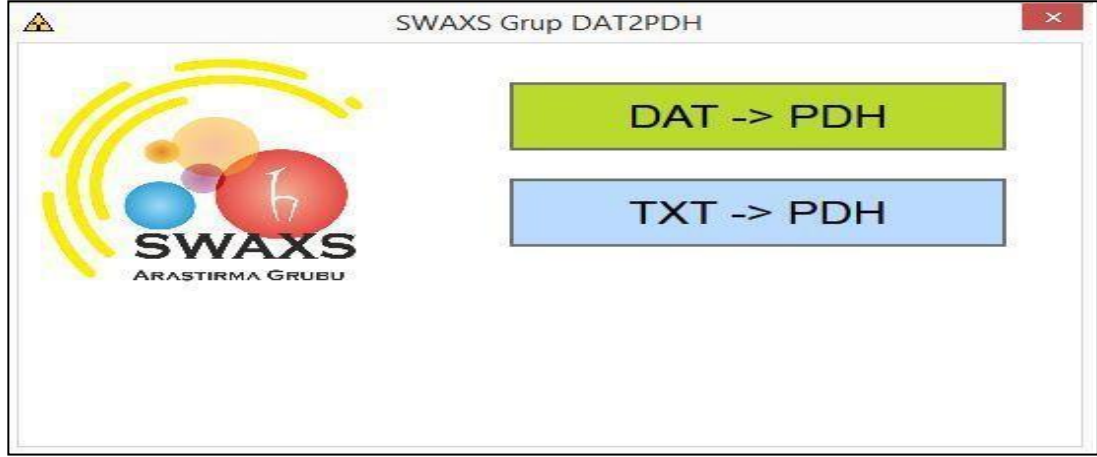
güvenilirliğini artırır. ASA3 programı yardımı ile kaydedilen .P00 uzantılı bir verinin işlenmesi için ihtiyaç duyulan yardımcı programlar ve sistem ile ilgili fiziksel bilgiler Şekil 3.5.' de verilmiştir.



Şekil 3.5. (A): EasySWAXS ve (B): 3D View programlarının ara yüzleri [a: Dedektör-örnek arası mesafe (27,9 cm); Lambda: Kullanılan X-Işınının dalga boyu (1,542 Å); d: Detektörlerde kanallar arası mesafe (0,54 µm); COG: Birinci pike ait en büyük şiddete karşılık gelen kanal numarası (#235)] [76]

İlk önce 3D View programını açıp elde ettiğimiz $I(q)$ - q desenini çizdirip 1. pikimizin detektördeki kanal sayısını öğreniyoruz (Ni filtre kullanarak) bu değer (COG, Center of Gravity) olarak biliniyor, ardından EasySWAXS programını açıp Şekil 3.6.-A'da görüldüğü gibi kutucuklardaki istenilen bilgileri giriyoruz daha sonra kullandığımız kolimasyon tipini seçip (Çizgi veya nokta) file/save/curve menülerini seçip SAXS verilerimizi .dat uzantılı olarak kaydediyoruz. Ardından detaylı analizler için bu dataları Igor Pro, PCG, Origin Pro ve ATASAS Paket programları gibi programlarda açıp analizlere başlıyoruz [94].

EasySWAXS programı, orjinal bir programdır ve HECUS system 3 cihazından alınan .P00 uzantılı dataları .dat uzantılı verilere çevirmek için kullanılan orjinal bir programdır. .dat uzantılı dataları PCG ve bunun gibi başka programlarında kullanmak için datalarımızın. PDH uzantılı olmaları gerekir. Bunun için SWAXS Araştırma Grubu tarafından bazı küçük ama son derece kullanışlı orjinal yazılım ve programlar geliştirilip ve bu tez kapsamında kullanılmıştır. Aşağıda Şekil 3.6.'da yazılan programın arayüzü verilmiştir.



Şekil 3.6. Data uzantılarını değiştirmek ve dönüştürmek için geliştirilmiş programın arayüzü [76]

Yukarıda anlatıldığı gibi kemik-kıkırdak örnekler 1,5 mm çapında olan kuartz kapillerlerin içine koyulup ardından sistemin örnek tutucu bloğuna yerleştirilir ve X-Işınlarına maruz bırakılır. Örnekler biyolojik oldukları için, X-Işınları önünde bozulmamaları için, ölçüm süresi 300s seçildi. Ölçümler oda sıcaklığında ve 24° C da yapıldı. Bu ölçümler yapıldıktan sonra kemik-kıkırdakların proteininin boyutları ve kristal yapıları hakkında bilgi edinildi.

3.2.2. Küçük açıda X-Işını saçılması ile elde edilen verilerin analizi

Jirasyon/Etkin Yarıçapların Belirlenmesi

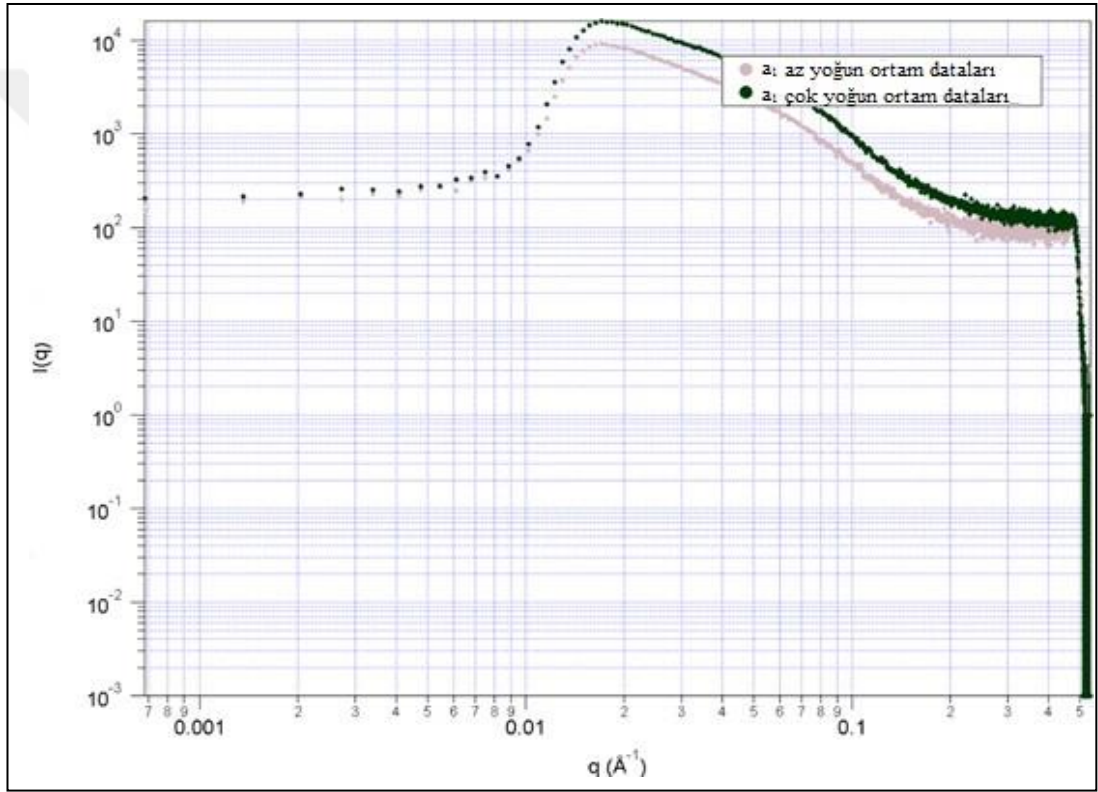
Protein yapısının kompaktlığının bir göstergesi olarak jirasyon yarıçapı belirlenir. Kemik-kıkırdak yapının içerisinde kollajen yapılar vardır. Bu kollajen yapılar proteinlerin birleşmesi ile meydana gelmektedir. Yapının daha iyi anlaşılabilmesi için jirasyon yarıçapları hesaplanmıştır. Jirasyon yarıçapı ile ilgili iyi olan şey, SAXS gibi tekniklerle deneysel olarak ölçülebilmesidir. Ancak, tüm şekil bilgilerini tek bir sayıya indiren bir kompaktlık ölçüsüdür. Düzenli ikincil yapıların, 3 boyutlu protein yapısıyla protein olarak nasıl birleştirilebileceğiyle ilgili endişe vericidir. Protein boyut aralığı göz önüne alındığında, protein boyutu aralığının en yüksek yarıçapı, β -ve ($\alpha + \beta$) ile karşılaştırıldığında daha az sıkı olduğunu düşündürmektedir. En düşük jirasyon yarıçapı ve buna bağlı olarak en sıkı paketlenme α / β -proteinlerinin karakteristiğidir.

Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Bölümü X-Işınları Laboratuvarında bulunan laboratuvar tipi Hecus marka SWAXS cihazıyla ölçümler alınmış ve kaydedilen verilerin 3D WIEV programında $\ln[I(q)]-q^2$, $\ln[I(q).q]-q^2$ ve $\ln[I(q).q^2]-q^2$ grafikleri çizilerek Guinier bölgelerinin incelenmesi sonucu, globüler (hacimsel,3D) nano yapı için R_G , rod (1D) yapı için R_C , flat (2D) yapı için R_T olarak tanımlanan jirasyon/etkin yarıçap değerleri ve bütün nano yapılar için moleküler ağırlık ve saçıcı nano oluşum sayısı hakkında bilgi veren I_0 değerleri belirlenmiştir.

Kadın ve erkek hastalardan alınan kemik-kıkırdak örneklerini kendi aralarında sınıflandırarak incelemeler yapılmıştır. Kalça kemiği, diz, omuz ve ayak kemik örnekleri önce cinsiyete göre ayrı ayrı incelenmiş ve birbirleriyle elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. Örneklerin tamamı için kemik yapısı az yoğun ortam, kıkırdak yapısı çok yoğun olarak incelenmiştir. Kemik yapısı gözenekli olduğu için az yoğun ortam olarak adlandırılmıştır. Kollajen, hareket sisteminin yapı taşlarını, özellikle kemik, kıkırdak, lif ve eklemleri oluşturan proteinlerdir. Bu protein birbiri üzerine sarılmış üç alfa zincirinden meydana gelir. Bu üç segment birbirine β -bağlantılarıyla bağlanmıştır. Üçlü sarmal yapı kolajen molekülünü oluşturur Alfa zincirler ve liflerin kolajen molekülleri birbirlerine çarpaz bağlarla bağlıdır. Yaşlandıkça çarpaz bağlanma artmakta ve kıkırdak dokuda kırılabilirlik ve deformasyon miktarı artmaktadır.

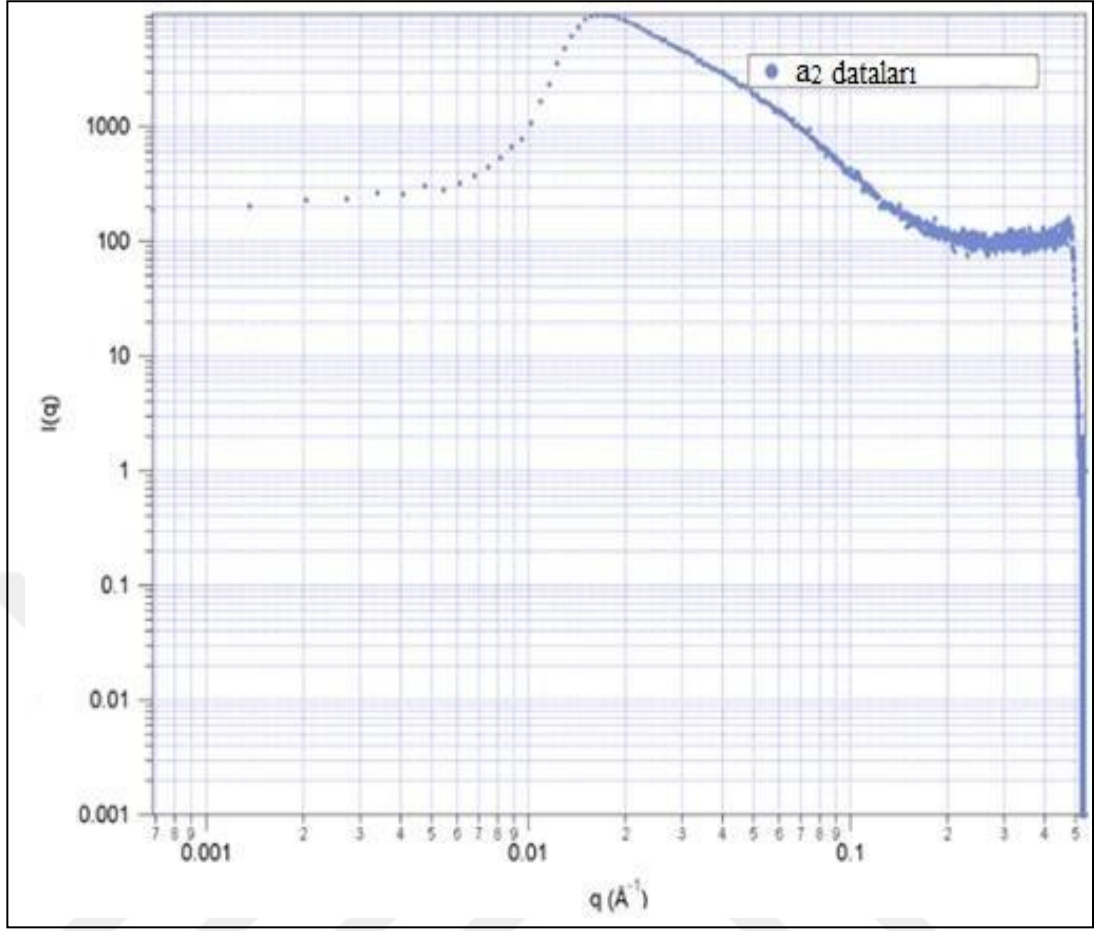
a. Kalça kemiği

$I(q)(\text{a.u.})-q(\text{\AA}^{-1})$ grafikleri her örnek için az yoğun ve çok yoğun dokular ve bütün örnekler beraber olacak şekilde IGOR Pro 6.10 ile çizilmiştir. Alınan sonuç grafiklerinde her grafiğin yapmış olduğu piklerin maksimum noktası jirasyon yarıçapını bize vermektedir. q değeri elektron yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Elektron yoğunluğu ne kadar artarsa uzaklık dağılım fonksiyonu buna bağlı olarak değişip darlaşır. Uzaklık dağılım fonksiyonunun darlaşması jirasyon yarıçapının artmasına sebep olur.



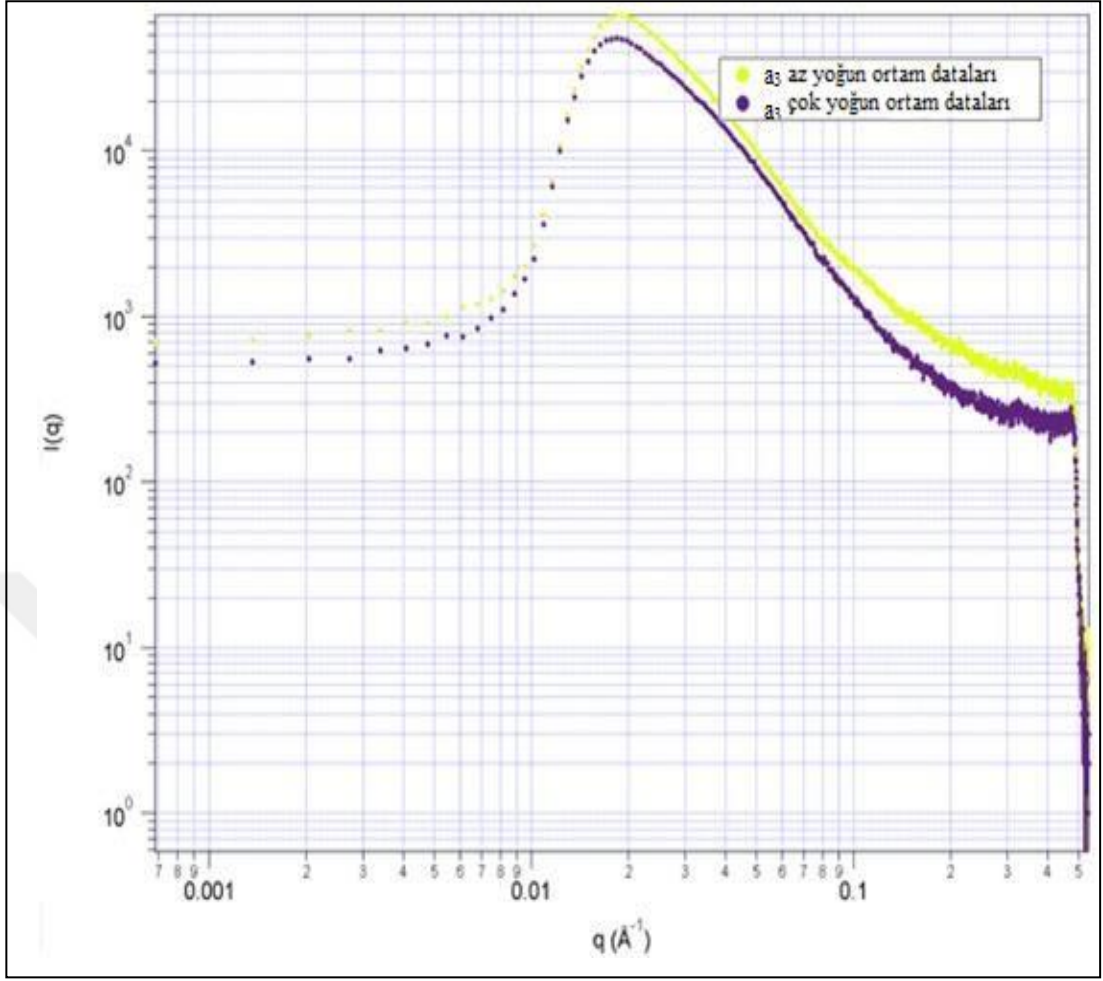
Şekil 3.7. a₁ kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için $I(q)(\text{a.u.})-q(\text{nm}^{-1})$ grafiği

Şekil.3.7' de a₁ kıkırdak örneğinin grafiklerinden elde sonuçlarla 3D boyutlu jirasyon yarıçapı azyoğun dokuda 5,33 nm iken çok yoğun dokuda bu değer 5,47 nm olmaktadır. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku da $0,21 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$ iken çok yoğun dokuda $0,12 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$ değerine sahiptir.



Şekil 3.8. a₂ kıkırdak örneklerinin dokuları için I(q)(a.u.)-q(nm⁻¹) grafiği

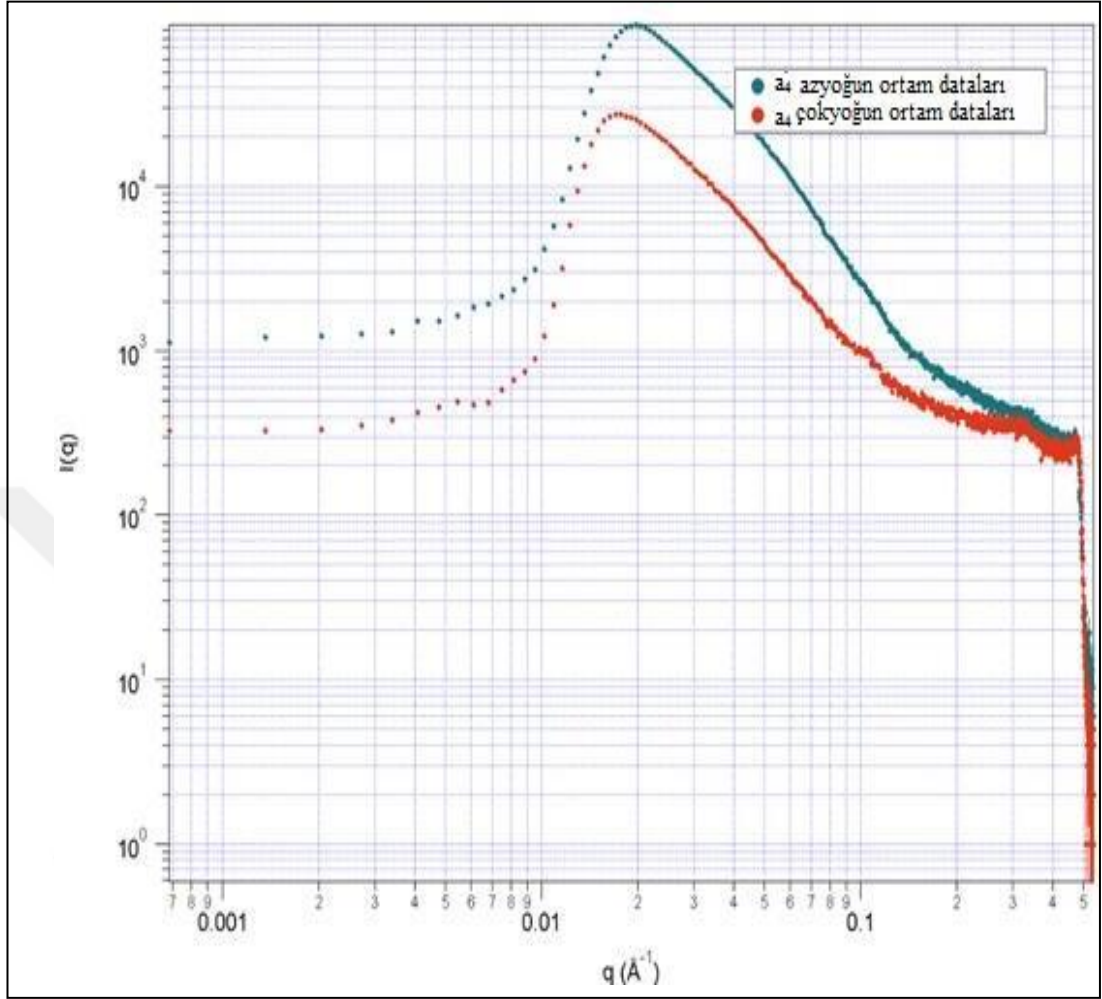
Şekil 3.8’de a₂ kıkırdak örneğinin 3D boyutlu jirasyon yarıçapı 6,57 nm’ dir. Kristal yapının pik şiddeti 0,15×10⁵g.mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. a_3 kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için $I(q)(a.u.)$ - $q(nm^{-1})$ grafiği

Şekil 3.9.'da a_3 kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı az yoğun doku için 6,29 nm, çok yoğun doku için 6,54 nm' dir. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku için $0,77 \times 10^5 g.mol^{-1}$ çok yoğun doku için $1,14 \times 10^5 g.mol^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

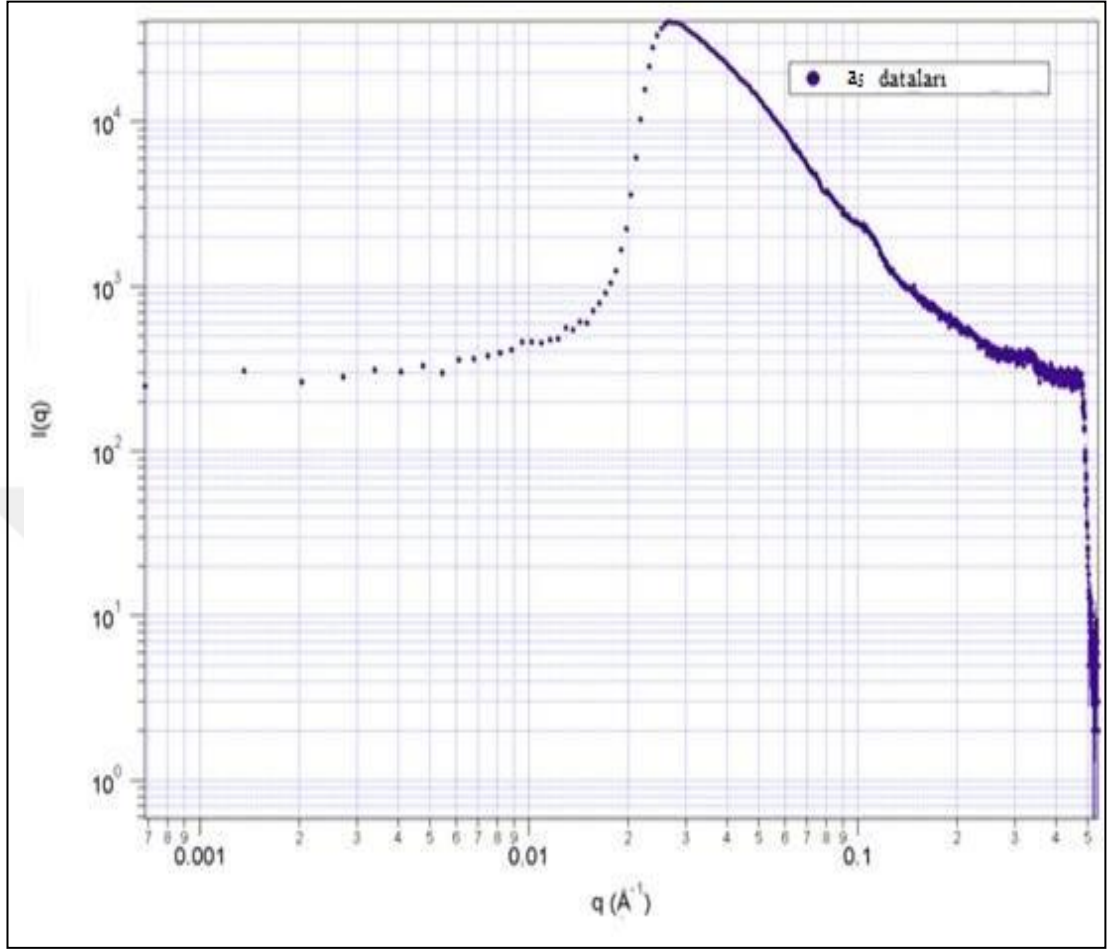
b. Ayak



Şekil 3.10. a₄ kıkırdak örneklerinin az yoğun ve çok yoğun dokuları için $I(q)$ (a.u.)- q (nm^{-1}) grafiği

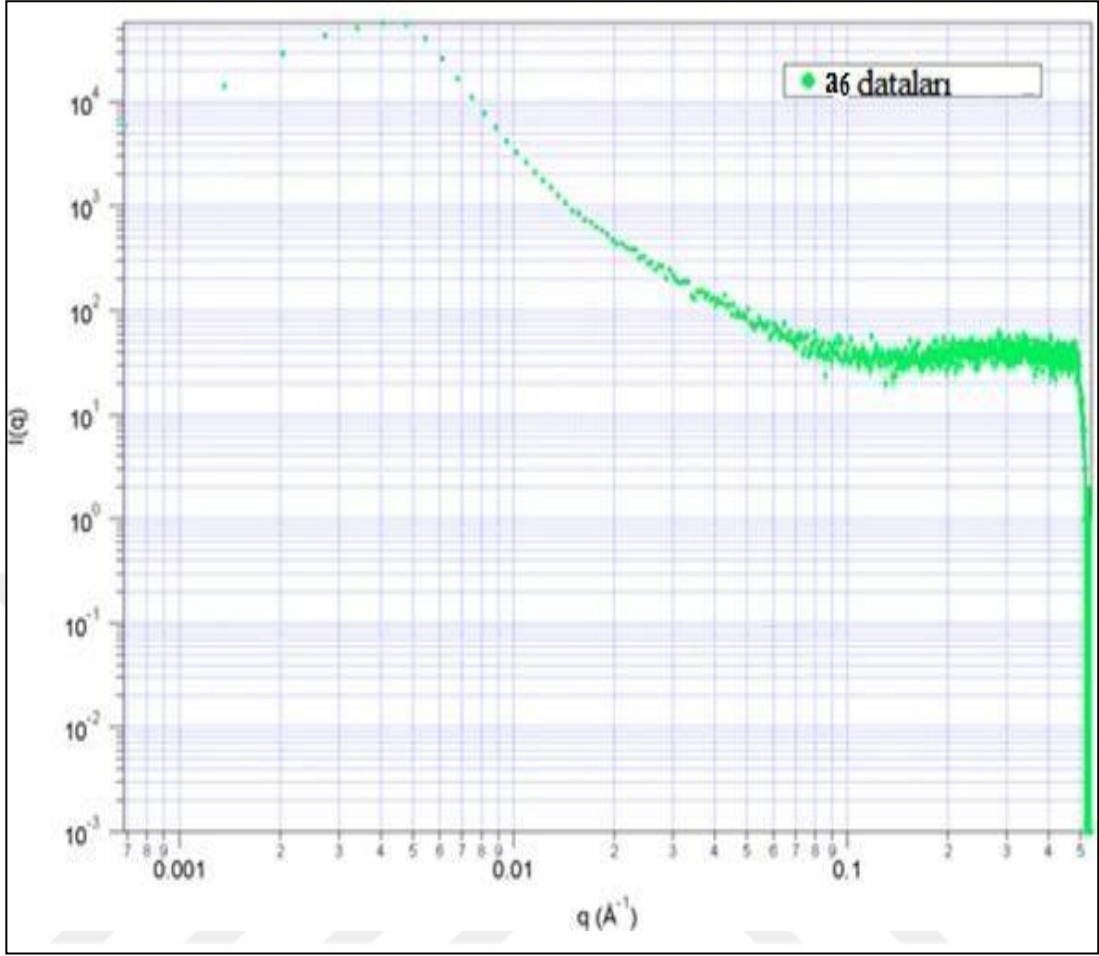
Şekil 3.10'da a₄ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı az yoğun doku için 5,99 nm, çok yoğun doku için 6,51 nm' dir. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku için $1,55 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$ çok yoğun doku için $0,43 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Kadınlarda az ve çok yoğun dokularda nano oluşumların boyutları ile ilgili farklar çok azdır.

c. Diz



Şekil 3.11. a₅ kıkırdak dokusu için $I(q)(\text{a.u.})-q(\text{nm}^{-1})$ grafiği

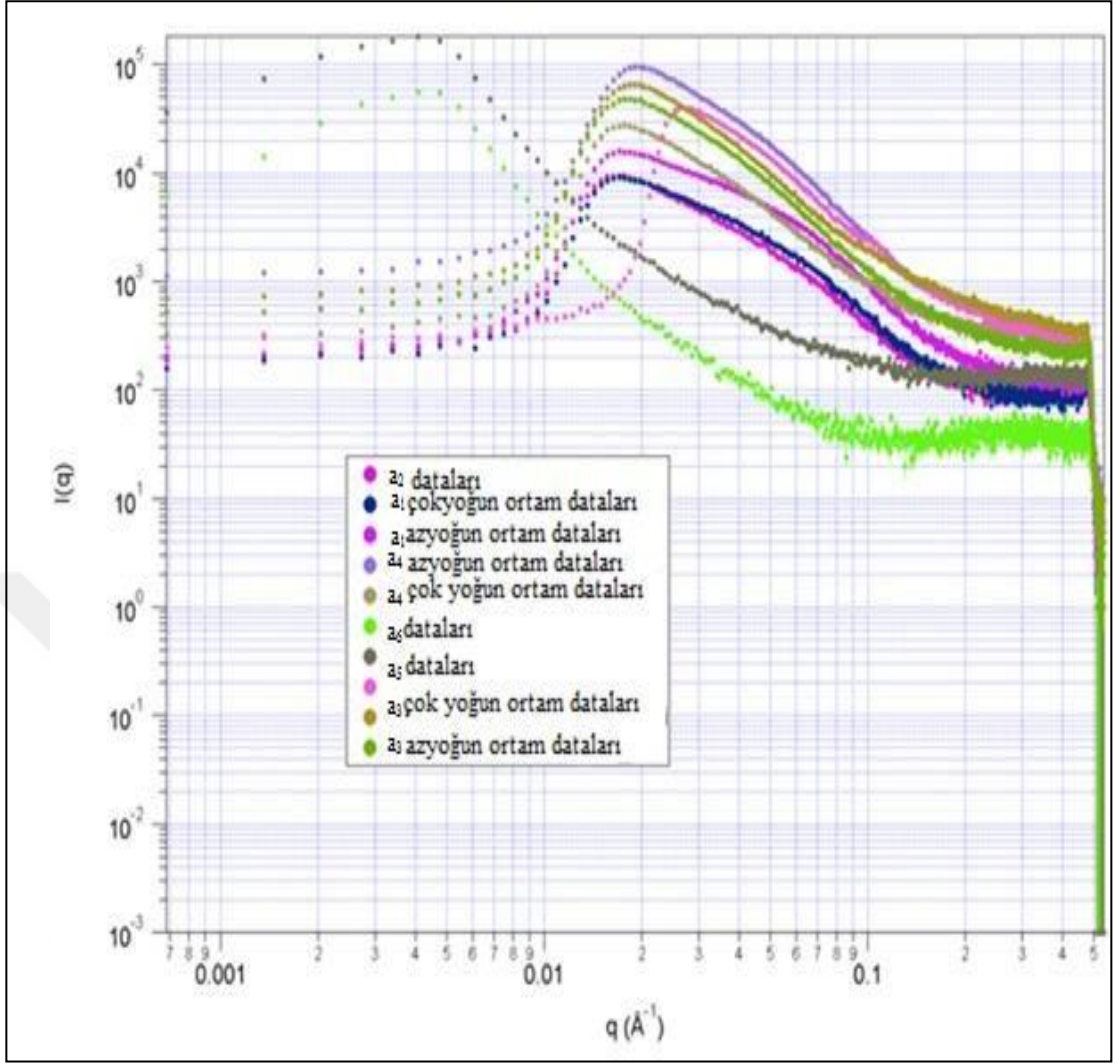
Şekil 3.11.'de a₅ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı 45,7 nm'dir. Kristal yapının pik şiddeti $0,69 \times 10^5 \text{g.mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. a₆ kıkırdak dokusu için I(q)(a.u.)-q(nm⁻¹) grafiği

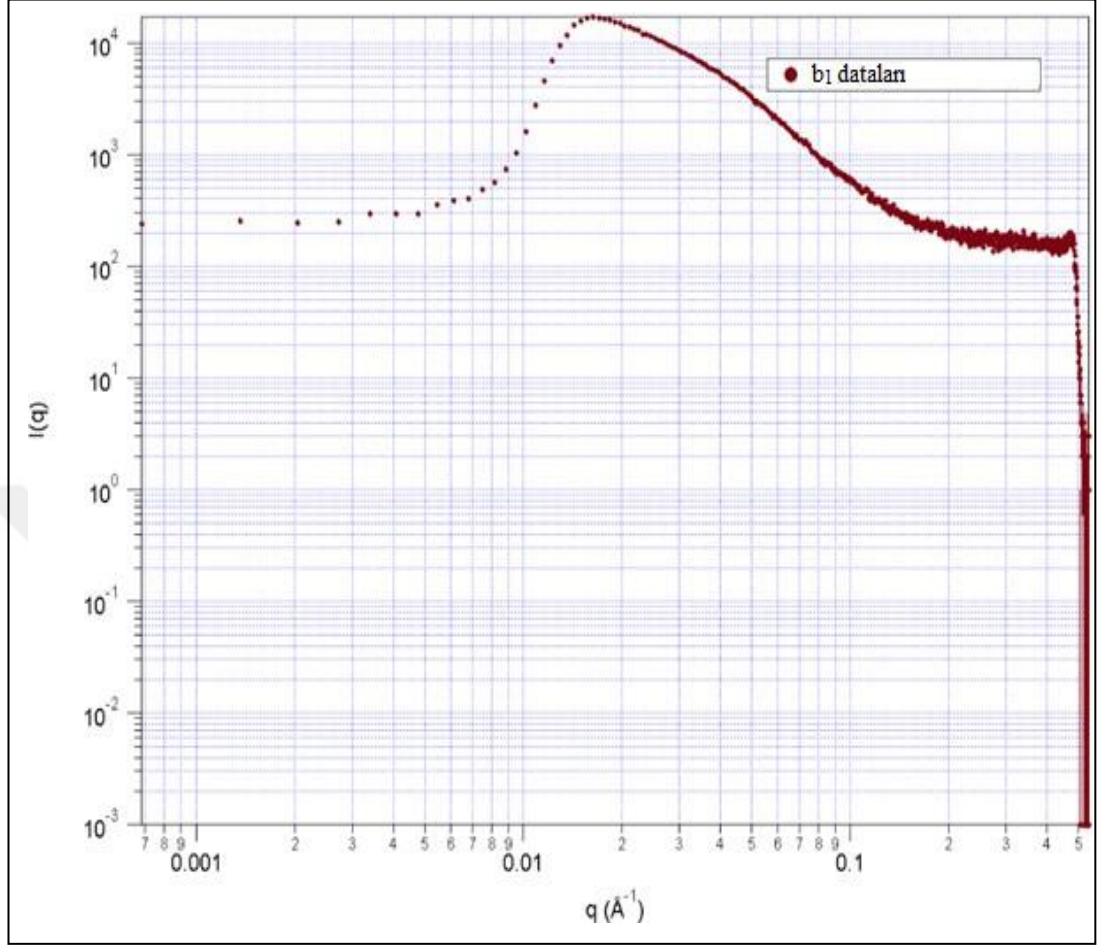
Şekil 3.12’de a₆ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı 35,01 nm’dir. Kristal yapının pik şiddeti 1,27×10⁵g.mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır. a₆’in dokusu kadın olmasına rağmen (boyut, morfoloji ve dağılım açısından) erkek kıkırdak dokusuna benzer özelliktedir.

a₅ olarak adlandırılan hastanın kemik dokusunun SAXS verisinde nano oluşumlar tabakalı düzenlenime sahiptir.Bu örnekte, 5,23 nm aralıklı kristalin tabakalar belirlenmiştir.



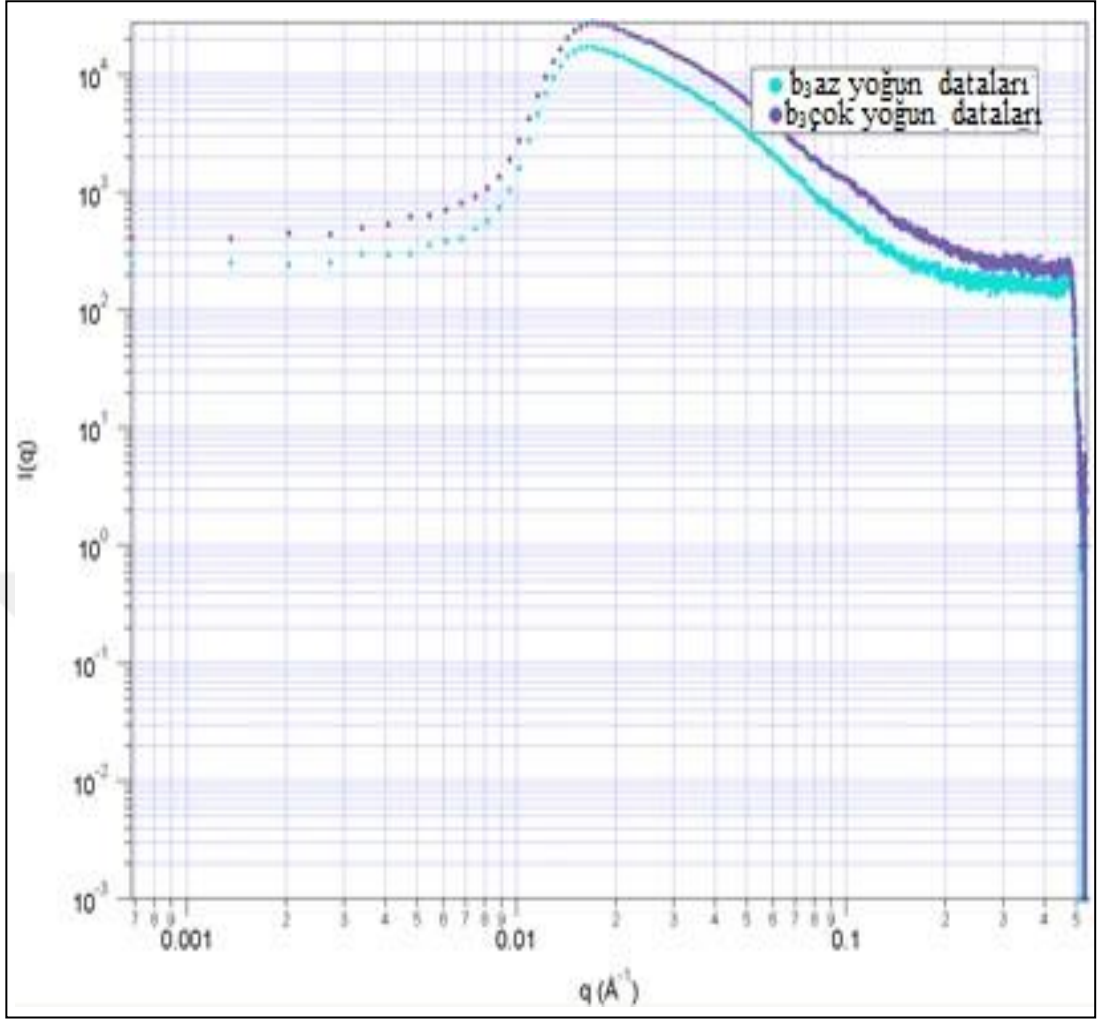
Şekil 3.13. Kadın grubu kıkırdak örnekleri için az bütün dokuların $I(q)(\text{a.u.})-q(\text{\AA}^{-1})$ grafiği.

a. Kalça kemiği



Şekil 3.14. b₁ kıkırdak örneği dokularının $I(q)(\text{a.u.})-q(\text{nm}^{-1})$ grafiği

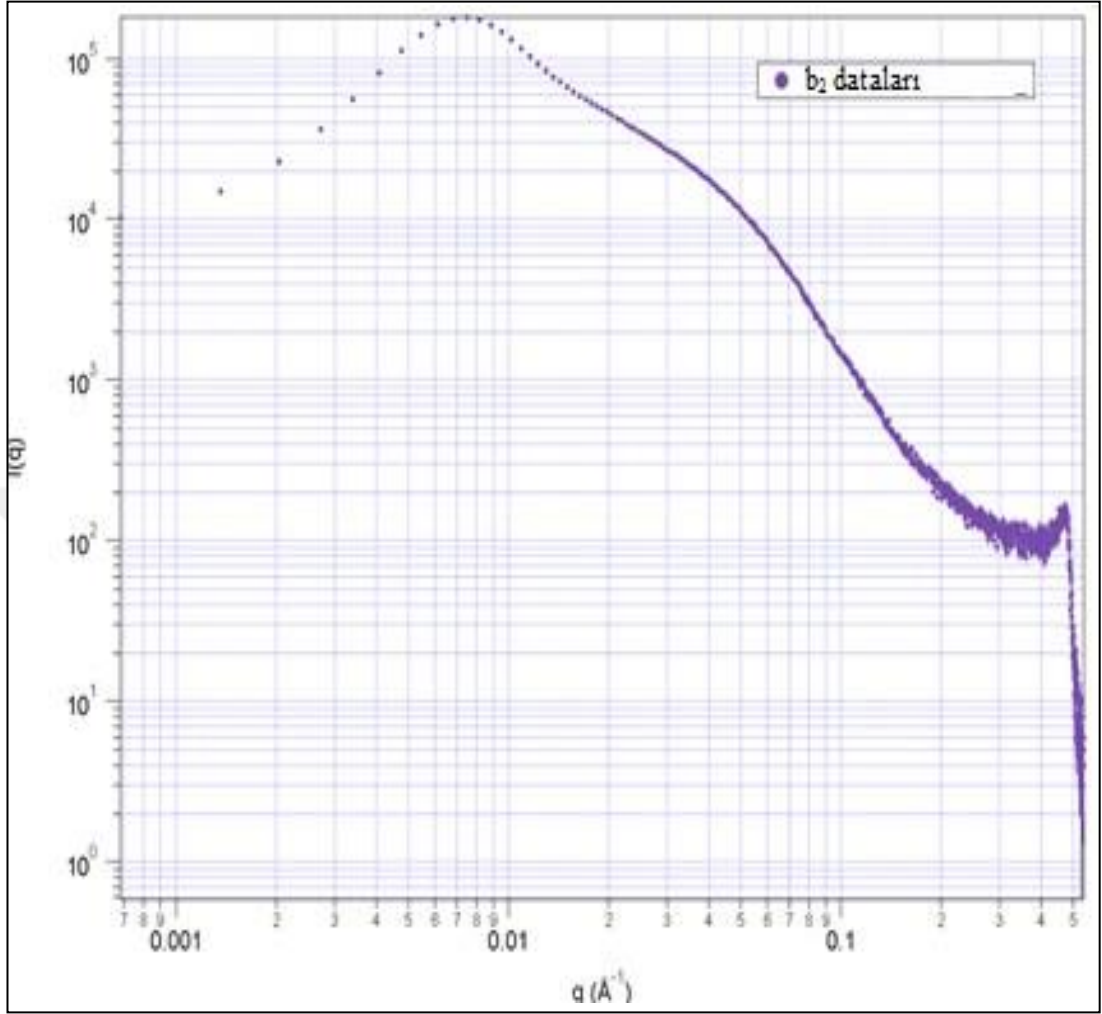
Şekil 3.14'de b₁ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı 46,48 nm'dir. Kristal yapının pik şiddeti $1,49 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.15. b_3 kıkırdak örneği dokularının $I(q)(a.u.)-q(nm^{-1})$ grafiği

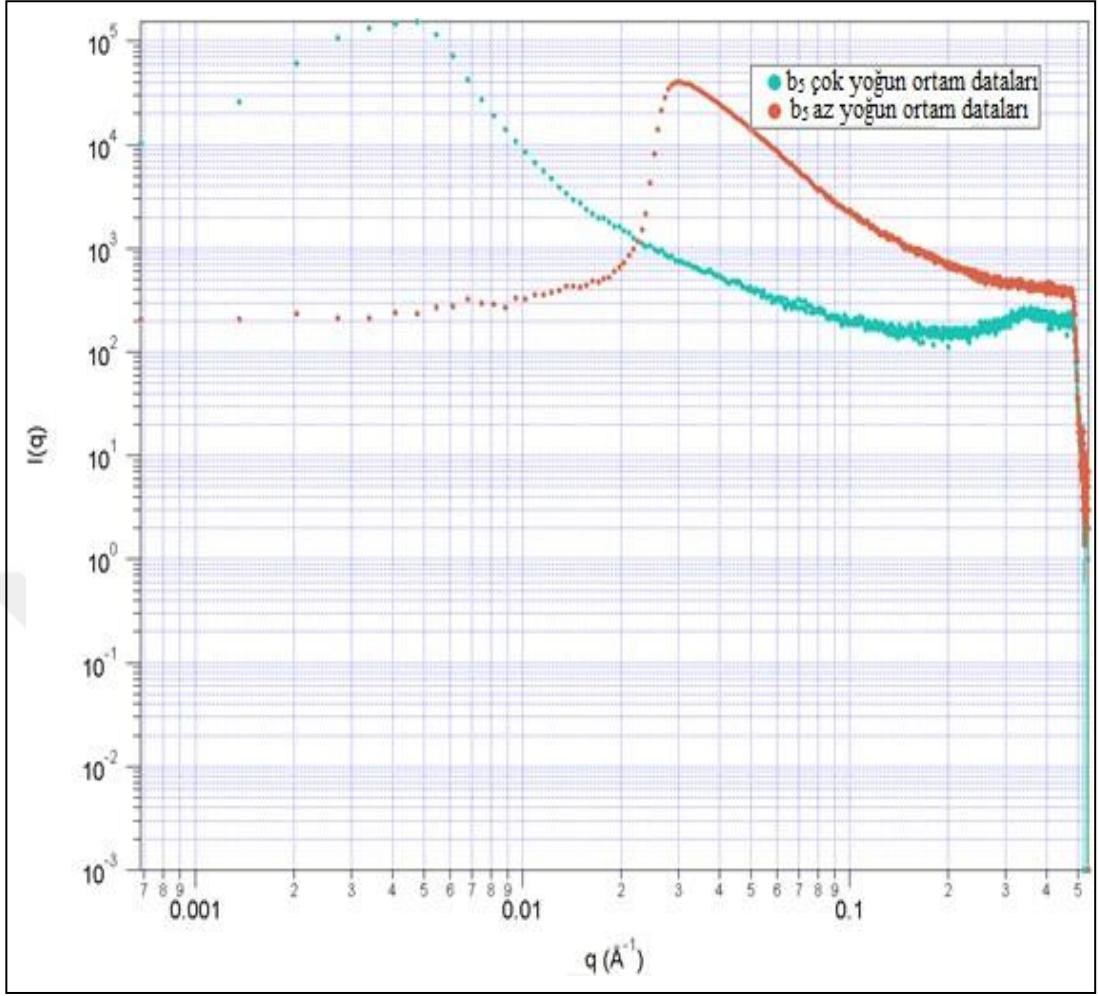
Şekil 3.15’de b_3 kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı az yoğun doku için 6,12 nm, çok yoğun doku için 5,56 nm’ dir. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku için $0,44 \times 10^5 g.mol^{-1}$ çok yoğun doku için $0,02 \times 10^5 g.mol^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

b. Ayak



Şekil 3.16. b₂ kıkırdak örneği dokularının I(q)(a.u.)-q(nm⁻¹) grafiği

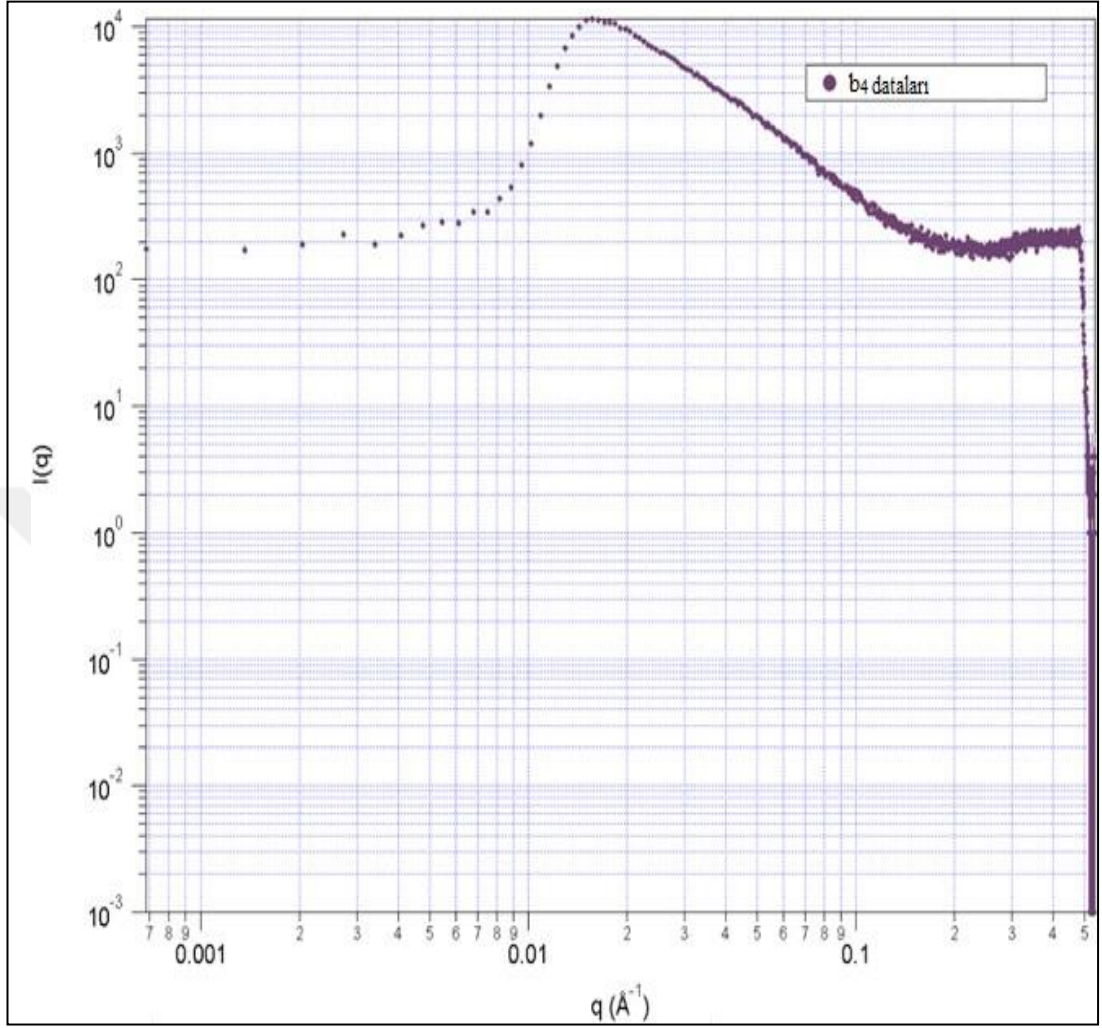
Şekil 3.16'da b₂ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı 14,85 nm'dir. Kristal yapının pik şiddeti $0,28 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.17. b₅ kıkırdak örneği için az yoğun ve çok yoğun dokularının I(q)(a.u.)-q(nm⁻¹) grafiği.

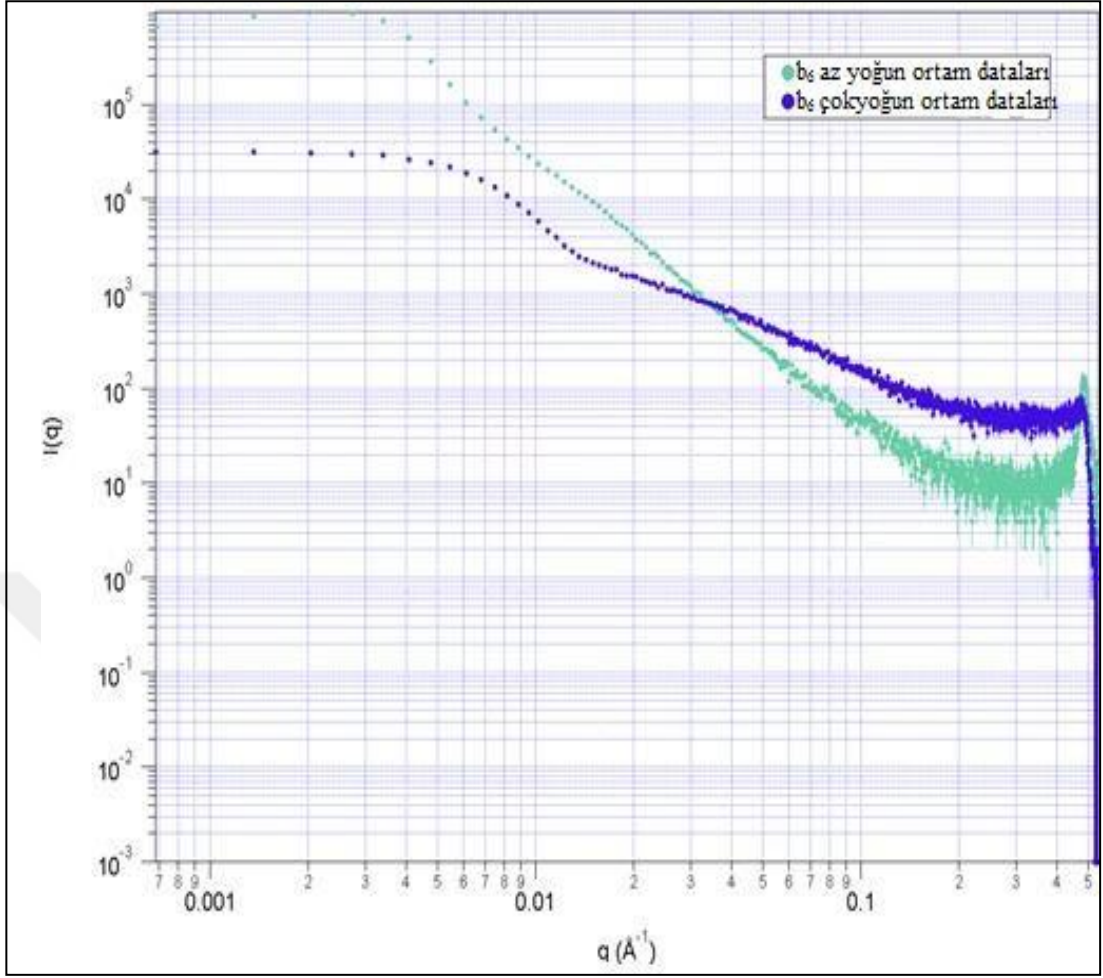
Şekil 3.17.'de b₅ kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı az yoğun doku için 46,23 nm, çok yoğun doku için 36,73 nm' dir. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku için 0,08×10⁵g.mol⁻¹ çok yoğun doku için 4,17×10⁵g.mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

c. Omuz



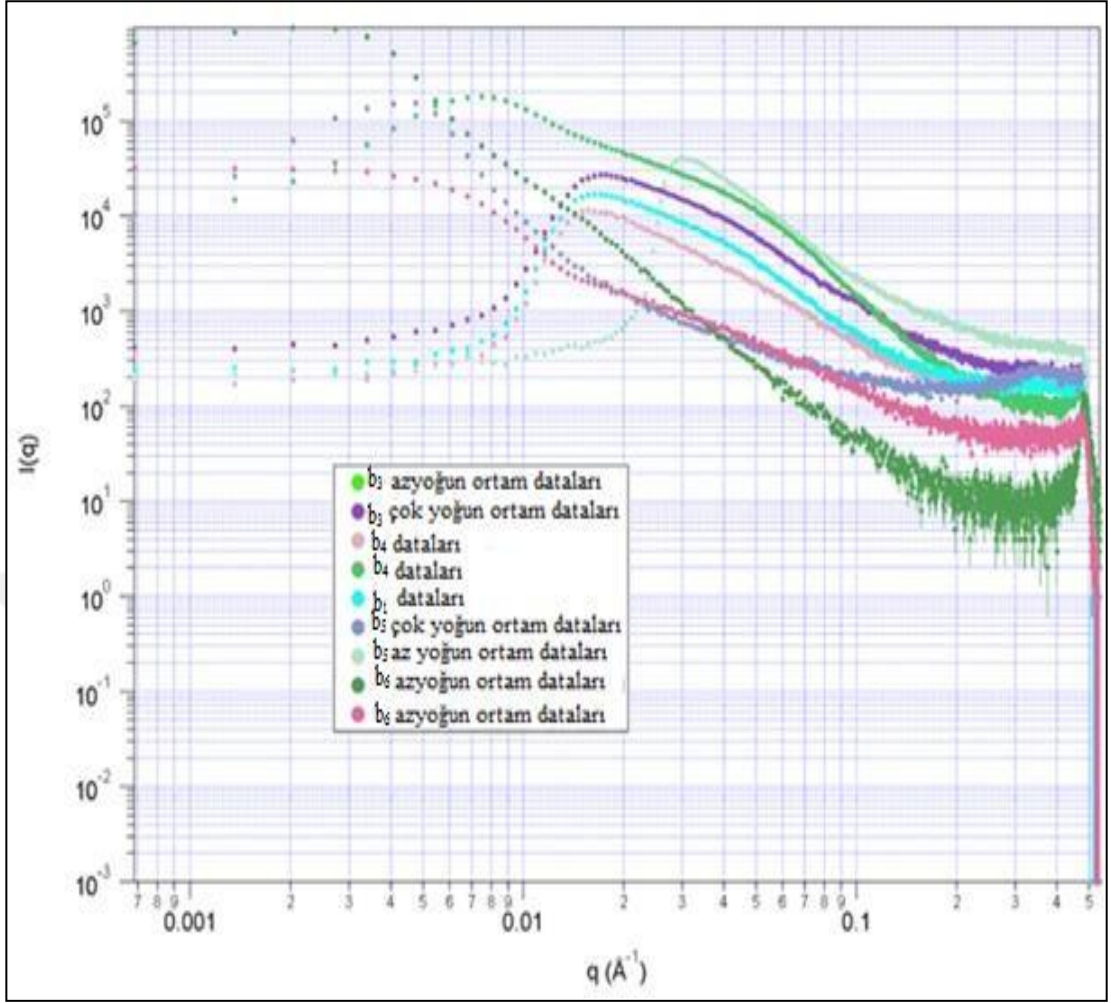
Şekil 3.18. b_4 kıkırdak örneği dokularının $I(q)(\text{a.u.})-q(\text{nm}^{-1})$ grafiği

Şekil 3.18.'de b_4 kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı $6,95 \text{ nm}$ 'dur. Kristal yapının pik şiddeti $0,02 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.19. b_6 kıkırdak örneği için az yoğun ve çok yoğun dokularının $I(q)(a.u.)-q(nm^{-1})$ grafiği

Şekil 3.19.'da b_6 kıkırdak örneğinin jirasyon yarıçapı az yoğun doku için 48,19 nm , çok yoğun doku için 21,53 nm' dur. Kristal yapının pik şiddeti az yoğun doku için $1,75 \times 10^5 g.mol^{-1}$ çok yoğun doku için $0,03 \times 10^5 g.mol^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.20. Erkek grubu kırık örnekleri için az bütün dokuların $I(q)(a.u.)-q(nm^{-1})$ grafiği

Şekil. 3.20.'de b_6 ile b_5 'in dokularında az yoğun ve çok yoğun ortamlara göre büyük farklılıklar belirlenmiştir. Guinier analizleri sonucunda belirlenen 1D-3D yapıların gözeneklere karşılık geldiği az yoğun çok yoğun örneklerin SAXS profillerinin aynı hastalar için karşılaştırılmasından anlaşılmaktadır. b_6 nolu örneklerde gözenek büyüklükleri artmakta, bununla birlikte sayı ve uzaklık dağılımları düzensiz farklılıklar göstermektedir. b_6 nolu'nun az yoğun örneği gözenek sayısı, büyüklüğü ve dağılımı açısından tüm örnekler için de en homojen olanıdır. Yani mekanik özellikleri en güçlü olanıdır denilebilir. Bu tür kemiklerde kristalin yapı (kırılgenlik) daha az ve esneklik daha fazladır.

Tablo 3. 2.'de kadın kırık dokularının öncü SAXS bilgileri, Tablo 3.3.'de ise erkek kırık örneklerinin SAXS bilgileri görülmektedir.

Tablo 3.2. Kadınlar grubu için jirasyon yarıçapları ve I_0 sabitlerinin tablo görünümü (Çubuksu) morfoloji de olup olmadıkları ve sırası ile etkin büyüklükler olan R_G , R_T , R_C 'nin hesaplanması

Örnek İsimleri	R_G (nm)	I_0 (x10 ⁵ g.mol ⁻¹)	R_C (nm)	I_0 (x10 ³ g.mol ⁻¹ . Å ⁻¹)	R_T (nm)	I_0 (g.mol ⁻¹ . Å ⁻²)
	3D		1D		2D	
a ₁ (Az Yoğun Doku)	5,33	0,21	1,45	3,13	-	6,70
a ₁ (Çok Yoğun Doku)	5,47	0,12	1,79	0,18	-	14,90
a ₂	6,17	0,15	2,65	0,19	-	5,25
a ₃ (AzYoğun Doku)	6,29	0,77	3,06	1,12	-	25,40
a ₃ (Çok Yoğun Doku)	6,54	1,14	3,19	0,16	-	31,50
a ₄ (Az Yoğun Doku)	5,99	1,55	3,03	2,49	-	49,40
a ₄ (Çok Yoğun Doku)	6,41	0,43	3,22	0,60	-	12,70
a ₅	4,57	0,69	2,43	1,45	-	38,90
a ₆	35,01	1,27	26,64	0,61	12,62	1,86

Kadın hastalar arasında kalça kemiği alınan hastaların analizleri sonucunda daha spesifik datarlar elde edilmiştir. Yaş arttıkça (64, 72, 87) kadın hastaların kemik yapısında gözenek miktarı artmış bununla birlikte jirasyon yarıçapı değeri de artmıştır. Jirasyon yarıçapı değerleri, protein ve nano oluşumların boyutu için yaklaşık 20-250 Å civarındadır. Bu değerler gözönünde bulundurulursa a₆ hastanın kollajen yapısı diğer hastalara göre bu değer üzerine çıktığı Tablo.3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.3. Erkekler grubu için jirasyon yarıçapları ve I_0 değerleri (Çubuksu) morfoloji de olup olmadıkları ve sırası ile etkin büyüklükler olan R_G , R_T , R_C 'nin hesaplanması

Örnek İsimleri	R_G (nm)	$I_0(x10^5 \text{ g.mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1})$	R_C (nm)	$I_0(x10^3 \text{ g.mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1})$	R_T (nm)	$I_0(\text{g.mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1})$
	3D		1D		2D	
b_1	46,48	1,49	36,39	6,28	22,62	21,49
b_2	14,85	0,28	8,06	1,87	-	34,39
b_3 (Az Yoğun Doku)	6,12	0,04	2,124	0,55	-	8,95
b_3 (Çok Yoğun Doku)	5,56	0,02	2,086	0,31	-	15,9
b_4	6,95	0,02	2,95	0,22	-	5,00
b_5 (Az Yoğun Doku)	46,23	0,08	27,96	1,83	18,34	46,44
b_5 (Çok Yoğun Doku)	36,73	4,17	25,56	1,58	17,78	8,90
b_6 (Az Yoğun Doku)	48,19	1,75	33,54	0,34	17,79	13,26
b_6 (Çok Yoğun Doku)	21,53	0,03	13,79	0,17	6,36	0,95

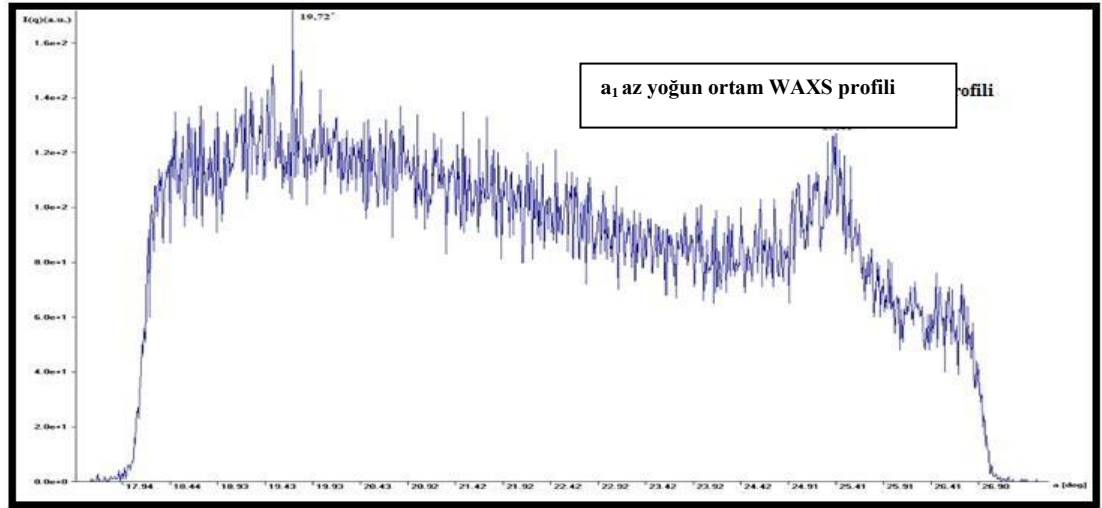
Erkek hastalar arasında kalça kemiği ve omuz bölgelerinden alınan kemik-kıkırdak örneklerinin ayak bölgesine göre jirasyon yarıçaplarında farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Yüzeyin elektron yoğunluk durumuna bağlı olarak alınan saçılma yoğunluğu değerleri de bu doğrultudadır. b_5 hastasının kemik ve kıkırdak bölgesindeki elektron yoğunluğunun farkının çok olduğu Tablo.3.3'teki grafikte görülmektedir. Kadın ve erkek hastalar karşılaştırıldığında saçılma yoğunluğu kalça

kemiğindeki kemik bölümünde b₁ hastasında daha fazladır. Ayak bölgesine bakacak olursak azyoğun bölge olan kemik kısmında kadın hastanın elektron yoğunluğuna bağlı saçılma yoğunluğu daha fazladır. b₅ hastasının kıkırdak kısmında saçılma yoğunluğu diğer bütün hastalara göre daha fazladır. Aslında bu bizim olmasını beklediğimiz bir durumdur. İnsan vücudunda hareketli eklemler arasında en sağlam olanı ayak bileğidir.

3.2.3. Geniş açıda X-Işını saçılması ile elde edilen verilerin analizi

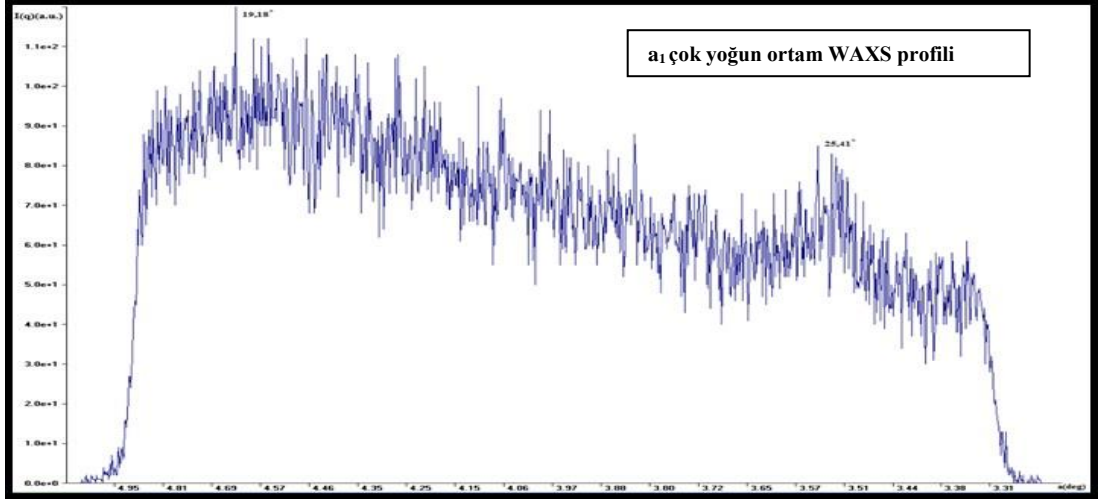
WAXS analizleri ile kemik-kıkırdak içeriğinde bulunan, alfa heliks yapıların periyodik atım mesafeleri ve kenar zincir yapıya ait kristalin düzlem uzaklıkları gibi (bir kaç Angstrom'luk mesafeler) bile ölçülebilmektedir. Gözenek boyutu sayısı ve dağılımı fazla olan çok yoğun görünümlü örnekte, gözenek duvar yapıları çok daha fazla kristalin yapıdadır. Kadın kıkırdak dokuda WAXS bölgesinde, yani moleküler boyutta kristalin yapıda da farklılık çok azdır.

a. Kadın Hastalar-Kalça kemiği



Şekil 3.21. a₁ az yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u)-θ(°) grafiği

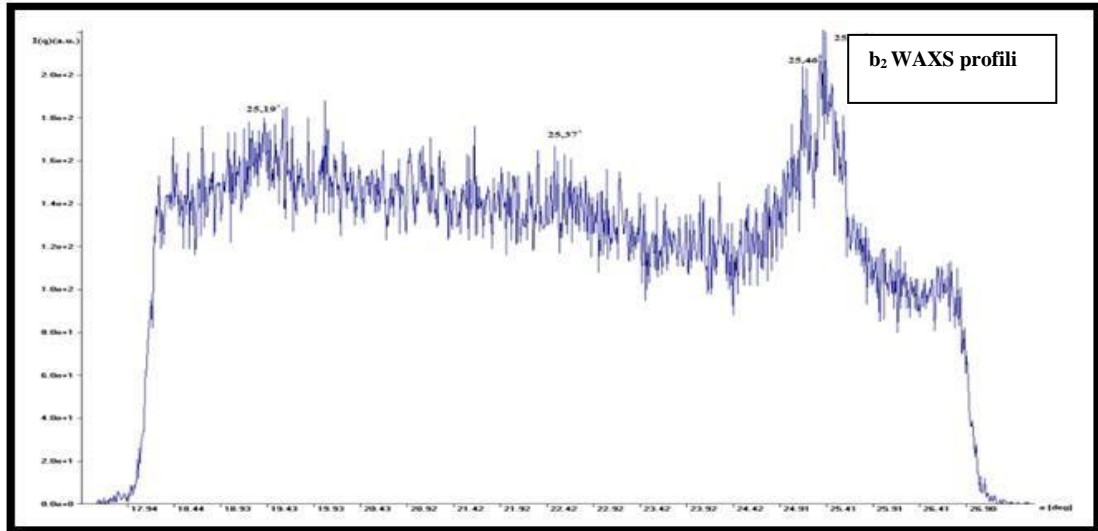
Şekil 3.21.'de a₁ az yoğun kıkırdak doku örneği için iki pikin 2θ değerleri sırasıyla 19,72° ve 25,41° olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.22. a₁ çok yoğun kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği

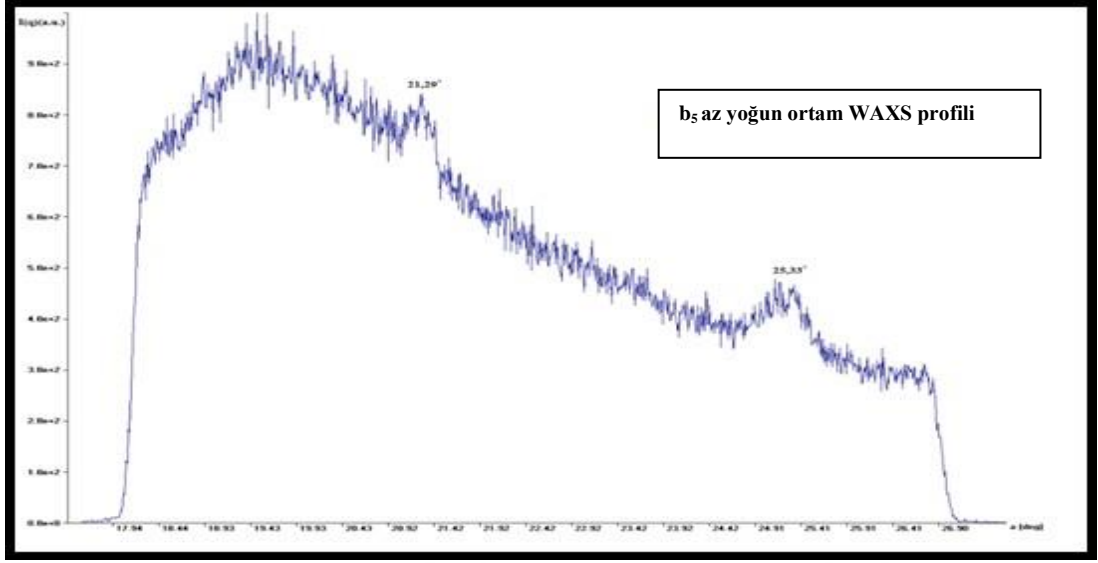
Şekil.3.22.'de a₁ çok yoğun kıkırdak doku örneği için iki pikin 2θ değerleri sırasıyla 19,18° ve 25,35° olarak belirlenmiştir. Erkeklerdeki kalsifiye dokunun farklılıkları WAXS profillerinde çok farklı kristalin yapıya işaret etmektedir.

b. Erkek Hastalar-Ayak



Şekil 3.23. b₂ kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği

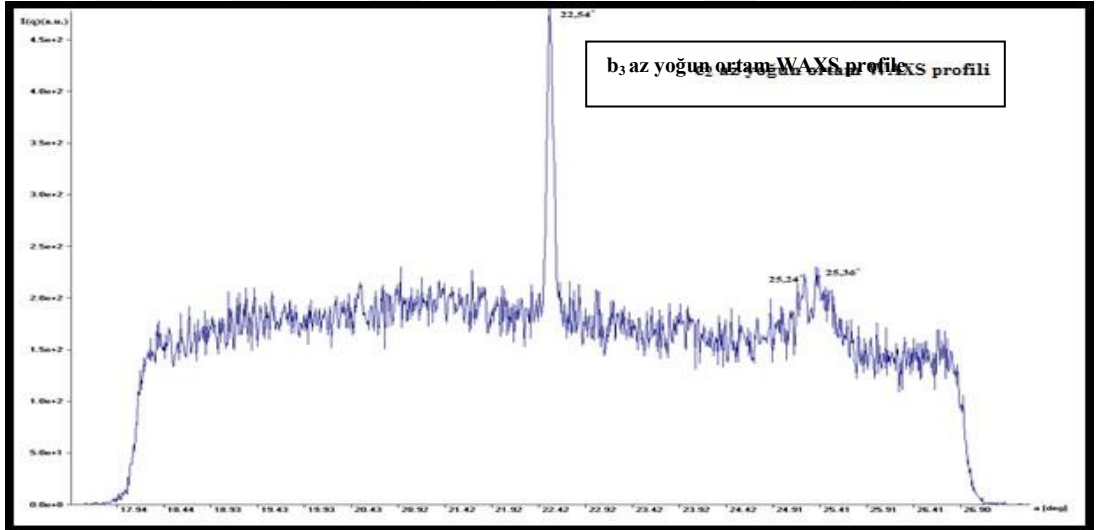
Şekil 3.23'de b₂ kıkırdak doku örneği için dört pikin 2θ değerleri sırasıyla 25,19°, 25,37°, 25,46° ve 25,59° olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.24. b_5 az yoğun kıkırdak doku örneği için $I(q)(a.u.)-\theta(^{\circ})$ grafiği

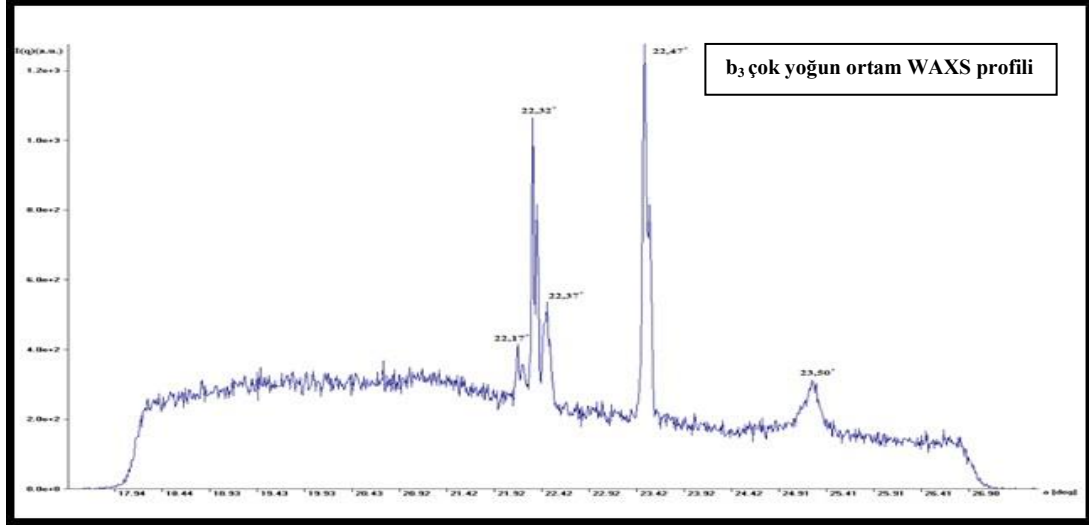
Şekil 3.24.'de b_5 az yoğun kıkırdak doku örneği için iki pikin 2θ değerleri sırasıyla $21,29^{\circ}$ ve $25,33^{\circ}$ olarak belirlenmiştir.

c. Erkek hastalar-Kalça kemiği



Şekil 3.25. b_3 az yoğun kıkırdak doku örneği için $I(q)(a.u.)-\theta(^{\circ})$ grafiği

Şekil 3.25.'de b_3 az yoğun kıkırdak doku örneği için üç pikin 2θ değerleri sırasıyla $22,54^{\circ}$, $25,24^{\circ}$ ve $25,36^{\circ}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.26. b_3 çok yoğun kırık doku örneği için $I(q)(a.u.)-\theta(^{\circ})$ grafiği

Şekil 3.26’da b_3 çok yoğun kırık doku örneği için belirlenen beş pikin 2θ değerleri sırasıyla $22,17^{\circ}$, $22,32^{\circ}$, $22,37^{\circ}$, $22,47^{\circ}$ ve $23,50^{\circ}$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.4. Kadın ve erkek hastalardan alınan örneklerin 2θ değerleri

Hasta Adı	2θ değeri	2θ değeri	2θ değeri	2θ değeri	2θ değeri
a₁	$19,72^{\circ}$	$25,41^{\circ}$			
a₁	$19,18^{\circ}$	$25,35^{\circ}$			
b₂	$25,19^{\circ}$	$25,37^{\circ}$	$25,46^{\circ}$	$25,59^{\circ}$	
b₅	$21,29^{\circ}$	$25,33^{\circ}$			
b₃	$22,54^{\circ}$	$25,24^{\circ}$	$25,36^{\circ}$		
b₃	$22,17^{\circ}$	$22,32^{\circ}$	$22,37^{\circ}$	$22,47^{\circ}$	$23,50^{\circ}$

WAXS’ta aynı SAXS gibi elektron yoğunluğuna bağlı ölçüm yapmaktadır. Eğer örnekler çok iyi elektron yoğunluğuna sahip değilse, kemiğin organik fazındaki yumuşak dokuların Bragg yasasına göre elde edilen pik şiddetleri azalacak, pik genişlikleri artacaktır. Dokunun bozulma durumuna bağlı olarak eğer ölçüm alıyorsak, saçılma şiddeti bozuk olan noktadan itibaren başlayarak ölçüm olacaktır. Bu durumlar gözönünde bulundurulacak olursa, erkek hastaların saçılma şiddeti kadınlara oranla daha fazladır. Buda pik genişliklerinin erkeklerde daha az olduğunu bize açıklamaktadır. Tablo 3.4’te verilen değerler gözönüne alınarak her bir hasta için en şiddetli pik değerine göre Bragg Yasası kullanılarak d değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.5. WAXS açıları ile hesaplanan düzlemlerarası mesafeler

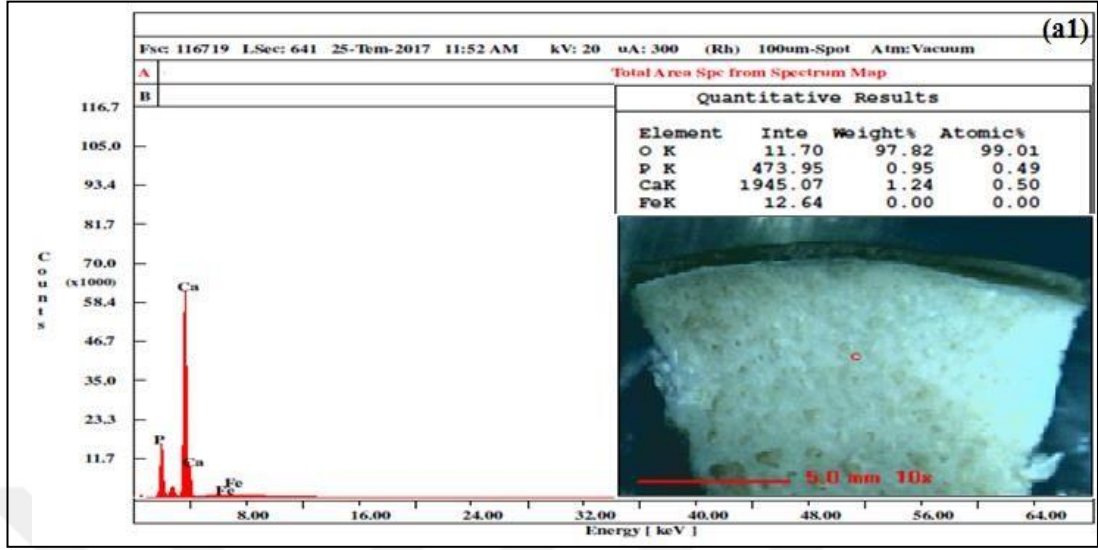
Hasta Adı	a ₁	a ₁	b ₂	b ₅	b ₃	b ₃
d değeri	2.22nm	2.16nm	2.88nm	2.39nm	2.53nm	2.53nm

HA gibi kristal materyaller, Bragg kırınım şiddetinin pikleri (2θ) ile tanımlanabilir. Enstrümental genişleme etkilerinin yanı sıra, kusursuz bir sıralamadan kaynaklanan herhangi bir sapma, kırınım piklerinin genişlemesine yol açar. Kemik-kıkırdağın mineral fazına bağlı olarak yapı amorf (düzensiz) ise tepe noktalarında genişlemeler meydana gelmektedir. Pik şiddeti, “amorf” mineral fazında bulunan kısa menzil mertebesinin mesafesini yansıtırken, tepe alanı, fazın miktarı ile orantılıdır.

3.3. X-Ray Floresans (XRF) Analizi

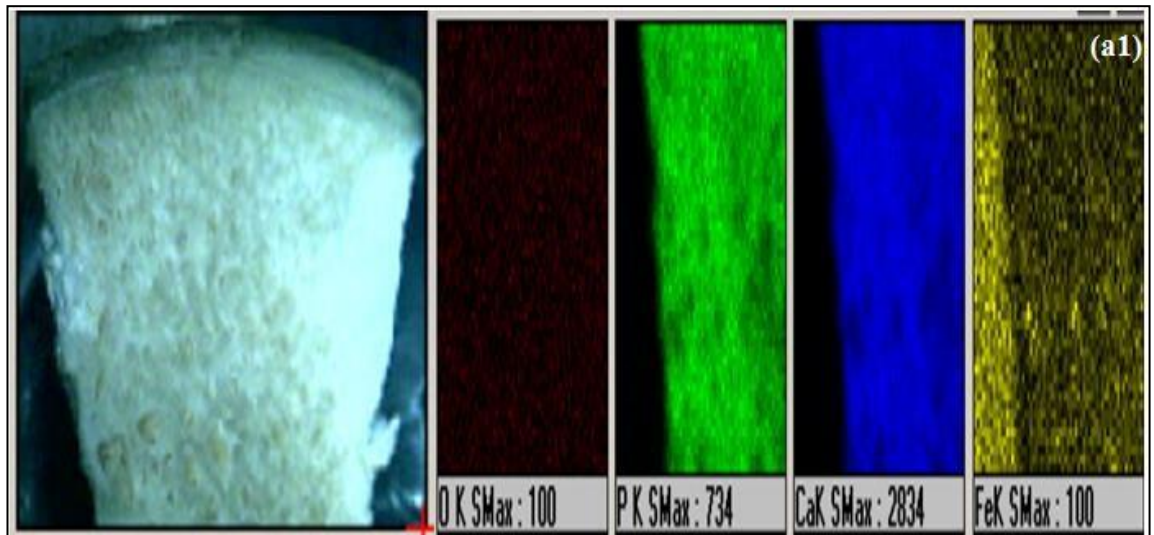
Hastaların farklı bölgelerinden (Kalça kemiği, ayak, omuz ve diz) alınan kemik-kıkırdak örneklerinin cinsiyete bağlı olarak nasıl elementsel dağılım gösterdiğini daha iyi anlayabilmek için XRF analiz yöntemi kullanılmıştır. Kullandığımız örnekler kıkırdak-arayüz-kemik olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Bu yöntem kullanılarak örneklerimizin yapısında bulunan elementlerdeki oranlar ve örneğin tamamı üzerinde, yapının her bölümünde bulunan elementsel dağılımı tespit etmek için bu yöntemi tercih ettik. Her bir örnek için 30 dk ölçüm alınmıştır. Örnekte olmasını beklediğimiz elementler kemik bölümü için; Kalsiyum, fosfat, kıkırdak bölümü için ise; kükürt gibi elementlerdir. Ölçümler alındıktan sonra Ca/P oranı hesaplanmıştır. Şekil 3.27-3.51’de elde edilen XRF ve XRF mapping görüntüleri yer almaktadır.

a. Kadın Hasta-Kalça kemiği



Şekil 3.27. a₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

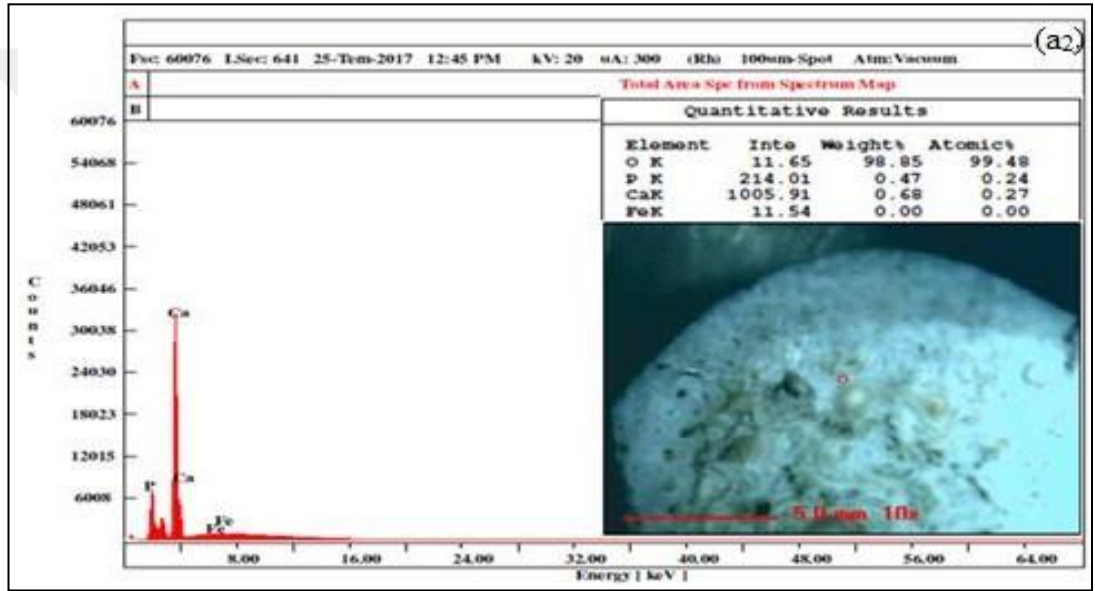
Şekil 3.27.'de a₁ hastasının elemental analizi XRF cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kemik-kıkırdak örneği XRF ölçümü alınmadan önce kurutma işlemine tabii tutulmuştur. Örnek spektroskopi hanesine yerleştirildikten sonra incelemeler yapılmıştır. Örnekte %0,50 oranında kalsiyum, %0,49 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



Şekil 3.28. a₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

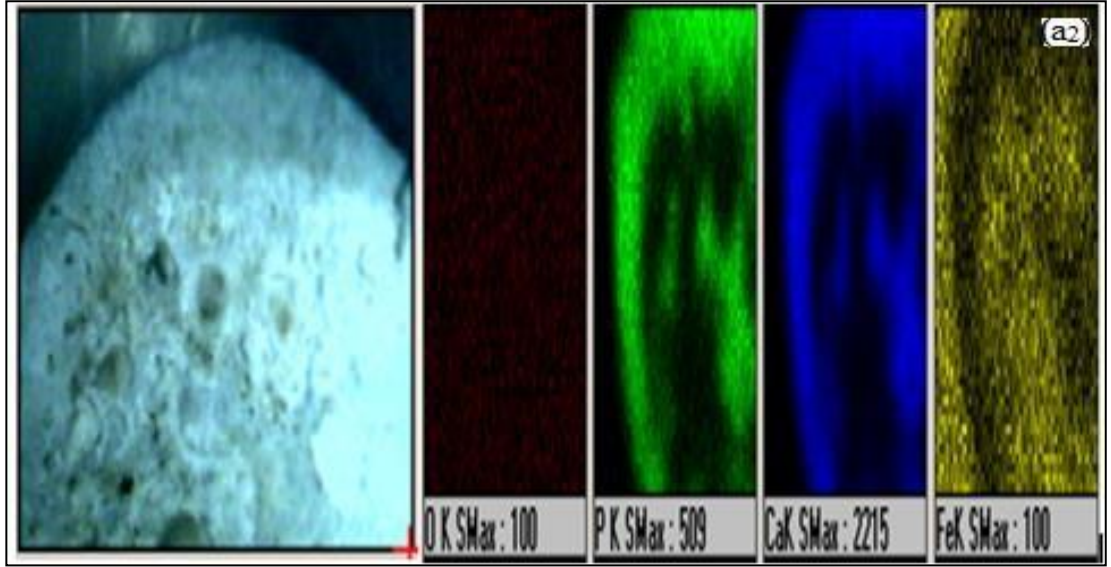
Şekil 3.28.'de a₁ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. XRF cihazı örnek yüzeyinin tamamını belli adımlarla yaklaşık yarım saat

taramıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin herbiri daha net anlaşılabilir olmasını farklı renklerle göstererek sağlamaktadır. Örneğimizi tanımlayacak olursak; en üst kısmı kıkırdak, çok az bir alt kısmı arayüz ve geri kalan yüzeyin tamamı kemik bölümünden oluşmaktadır. Yüzeyin tamamında fosfor ve kalsiyum elementine rastlanmıştır. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Biz mapping yapılan örneklerin kıkırdak bölümünde S(kükürt) elementi, kemik bölümünde Ca (kalsiyum) ve P (fosfor) elementi görülmesini beklememize rağmen bu kadın hastamız da kıkırdak bölümünde kükürt elementine rastlanmamıştır. Kıkırdak bölümünde kalsiyum elementi birikmesi olduğu söylenebilmektedir.



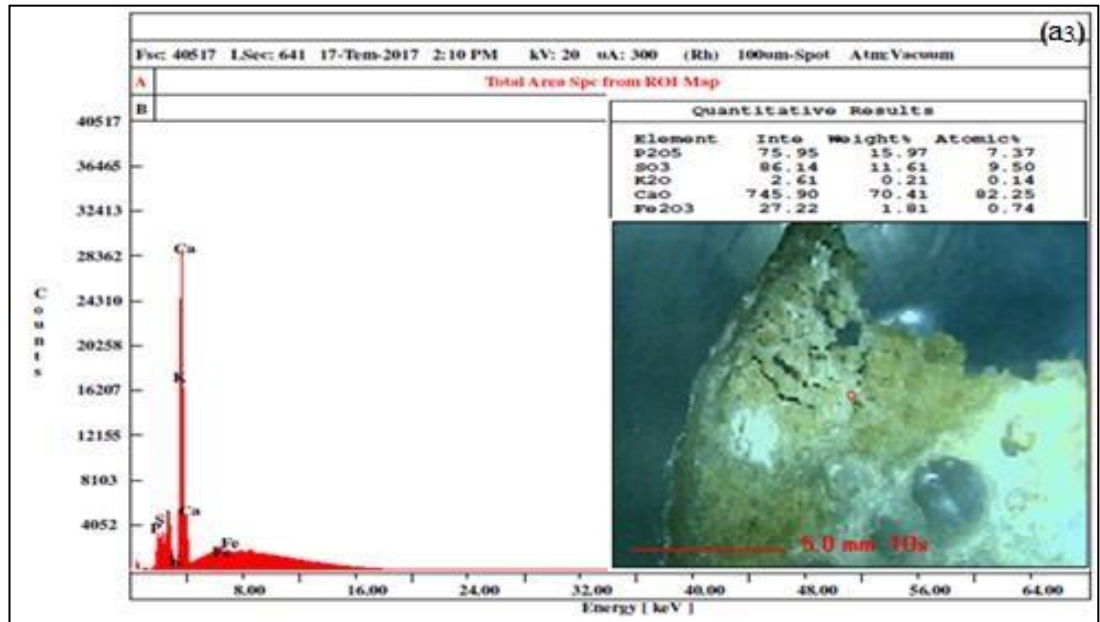
Şekil 3.29. a₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.29.'da a₂ hastasının elemental analizi sonucunda %0,27 oranında kalsiyum, %0,24 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



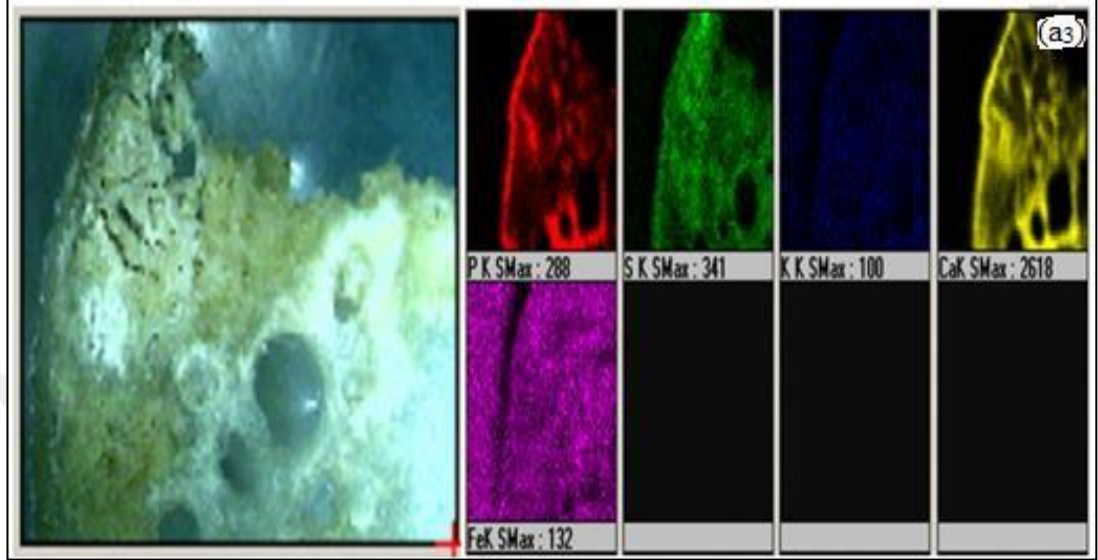
Şekil 3.30. a₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.30.'da a₂ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping(haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Bu örneğimizde de kıkırdak kısmında kalsiyum elementi birikmiş olduğu için başka herhangi bir elemente rastlanmamıştır.



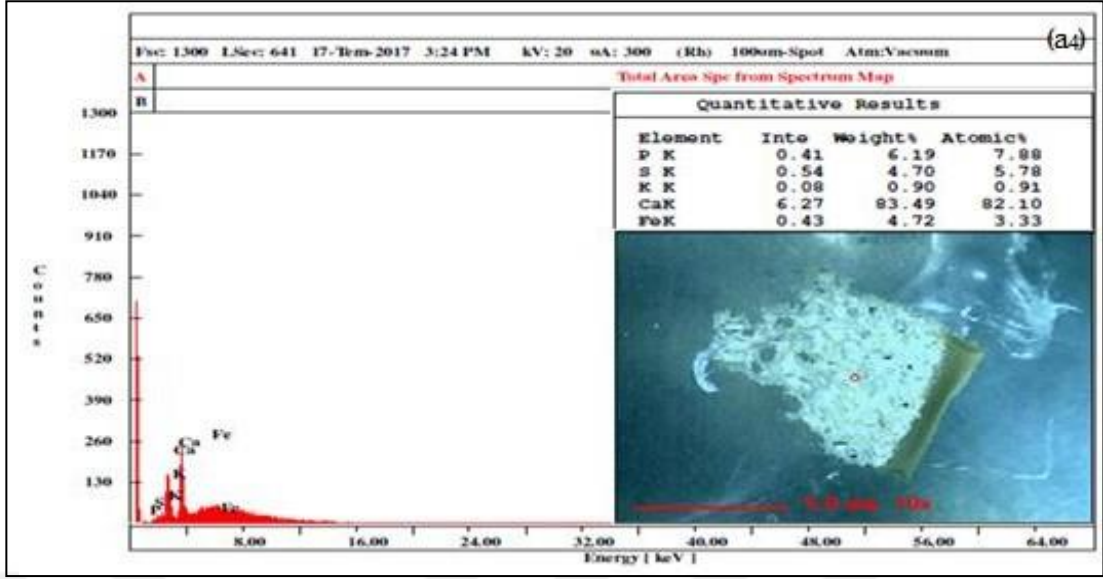
Şekil 3.31. a₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri.

Şekil 3.31.'de a₃ hastasının elemental analizi sonucunda %82,25 oranında kalsiyum, %7,37 oranında fosfor, %9,50 oranında kükürt ve %0,14 oranında potasyum elementinin varlığına rastlanmıştır.



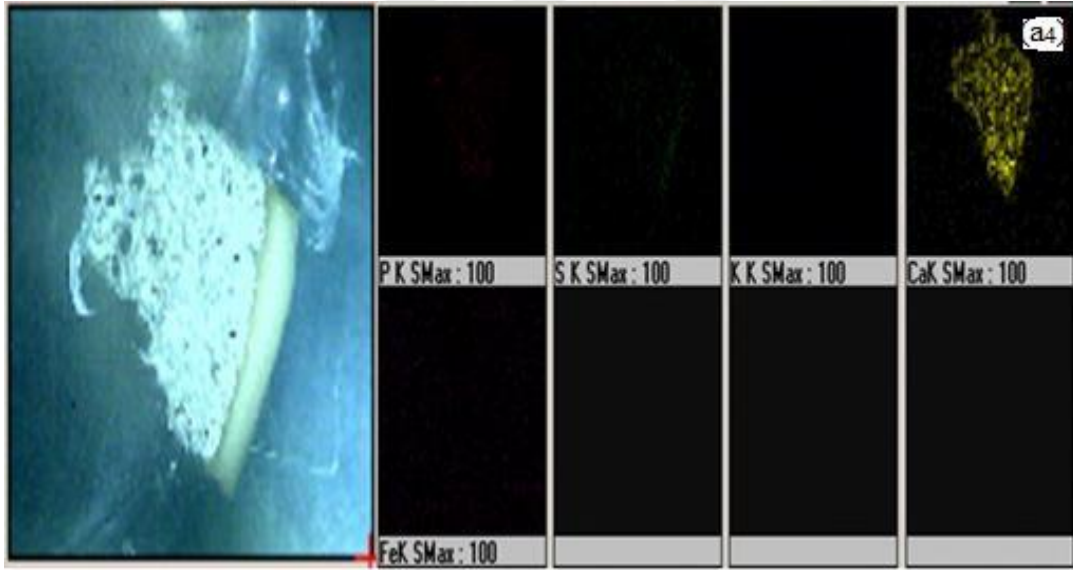
Şekil 3.32. a₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri.

Şekil 3.32.'de a₃ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping(haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görülebilmekteyiz. Fosfor elementi kırmızı, kalsiyum elementi sarı, kükürt elementi yeşil ve potasyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. a₃ hastasının XRF mapping sonucunda dört elementin varlığına rastlanmıştır. Kalsiyum ve fosfat elementi hesaplandığında oran sağlıklı bir insanda olması beklenen Ca/P oranının yani;1,67 değerinin çok üstünde bir değerdir. Bu da 87 yaşında olan bu hastanın kalça kemik-kıkırdak örneğinde kalsifikasyon meydana geldiğini göstermektedir.



Şekil 3.33. a4 hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.33.'de a4 hastasının elemental analizi sonucunda %82,10 oranında kalsiyum, %7,88 oranında fosfor, %5,78 oranında kükürt ve %0,91 oranında potasyum elementinin varlığına rastlanmıştır.

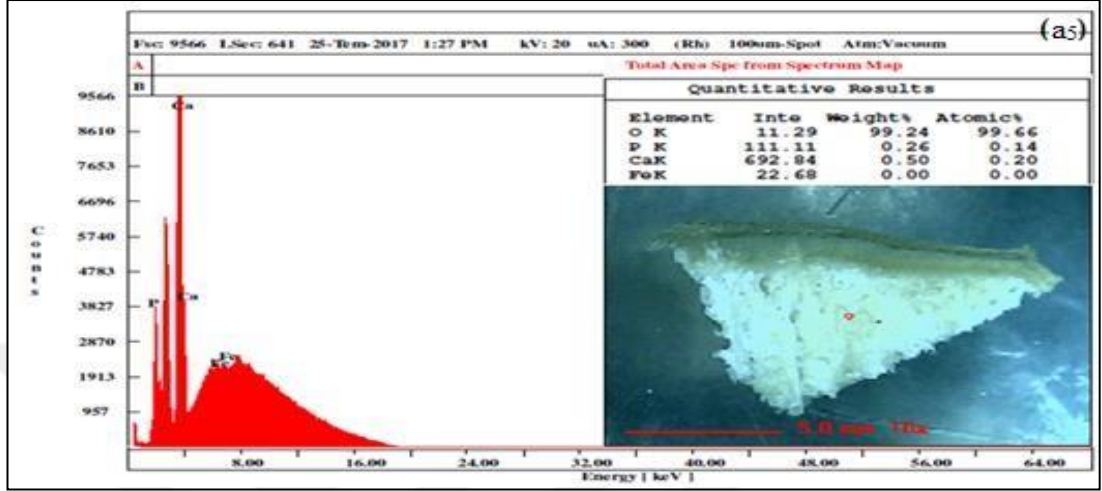


Şekil 3.34.a4 hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.34.'de a4 hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping(haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle gösterilmesine karşın bu örneğimizde net olarak sadece kalsiyum elementinin varlığına rastlanmıştır ve

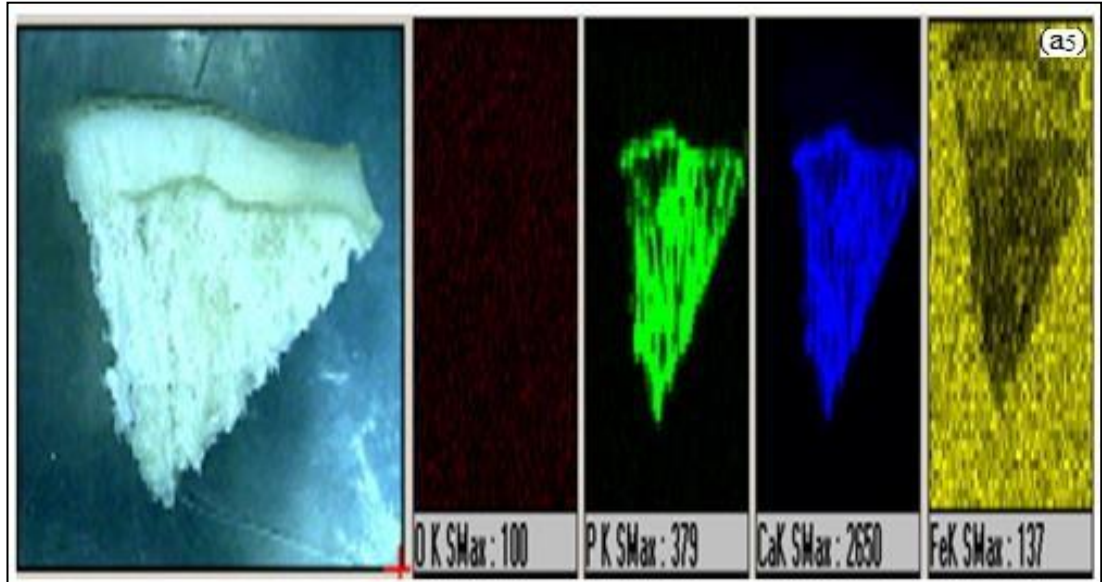
kalsiyum elementinin varlığı sarı renk ile görebilmekteyiz. Ayrıca, fosfor elementi kırmızı, kükürt elementi ise yeşil renk ile gösterilmiştir.

b. Kadın Hasta Diz



Şekil 3.35.a5 hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

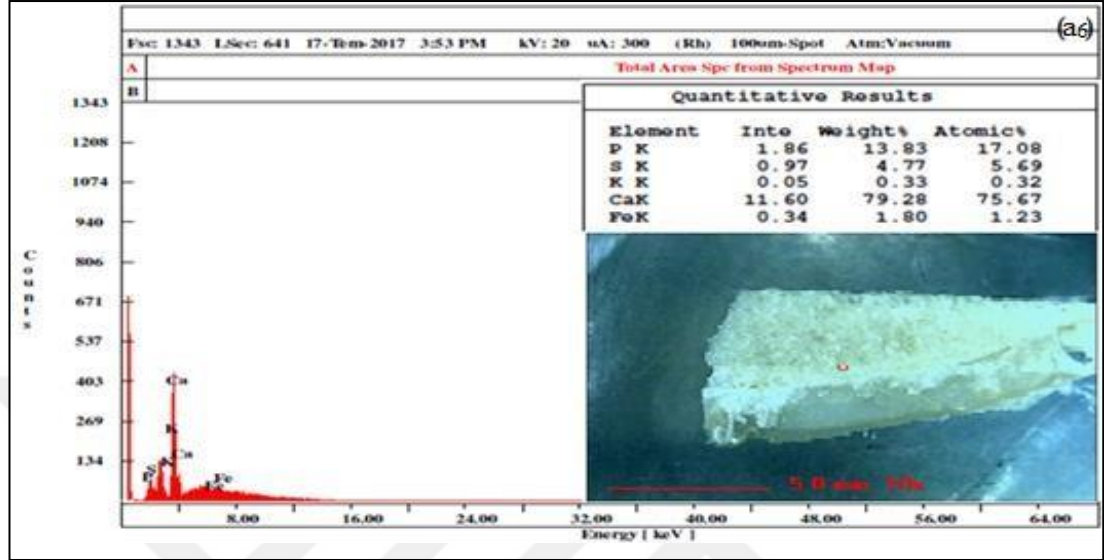
Şekil 3.35’de a5 hastasının elemental analizi sonucunda %0,20 oranında kalsiyum, %0,14 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



Şekil 3.36. a5 hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

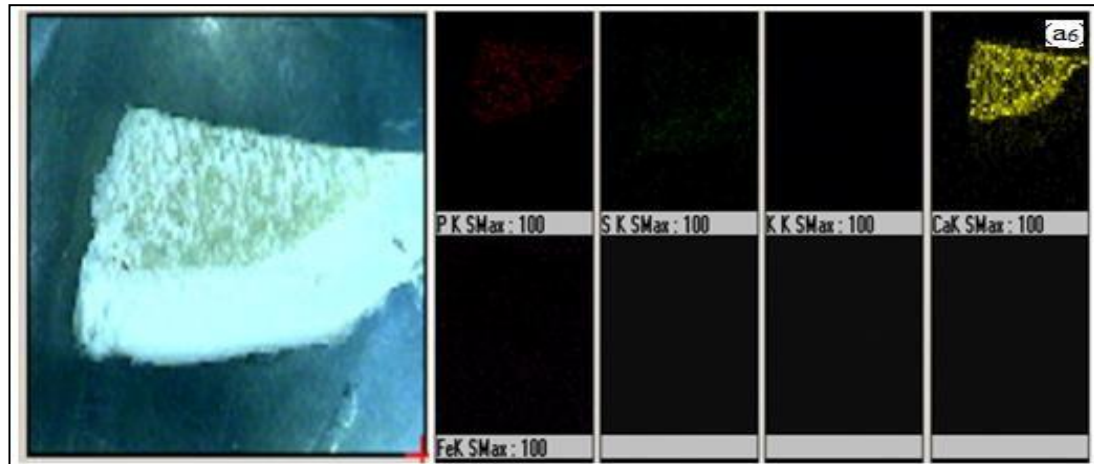
Şekil 3.36’da a5 hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama

sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Bu kadın hastamız da kıkırdak bölümünde kükürt elementine rastlanmamıştır.



Şekil 3.37.a₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.37.'de a₆ hastasının elemental analizi sonucunda %75,67 oranında kalsiyum, %17,08 oranında fosfor, %5,69 oranında kükürt ve %0,32 oranında potasyum elementinin varlığına rastlanmıştır.

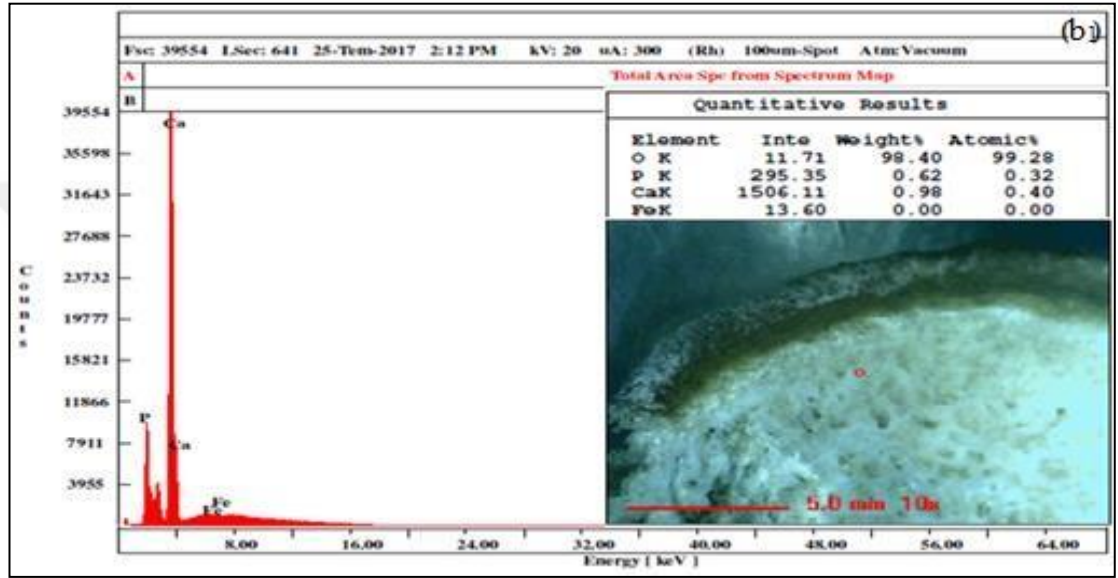


Şekil 3.38. a₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.38.'de a₆ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz.

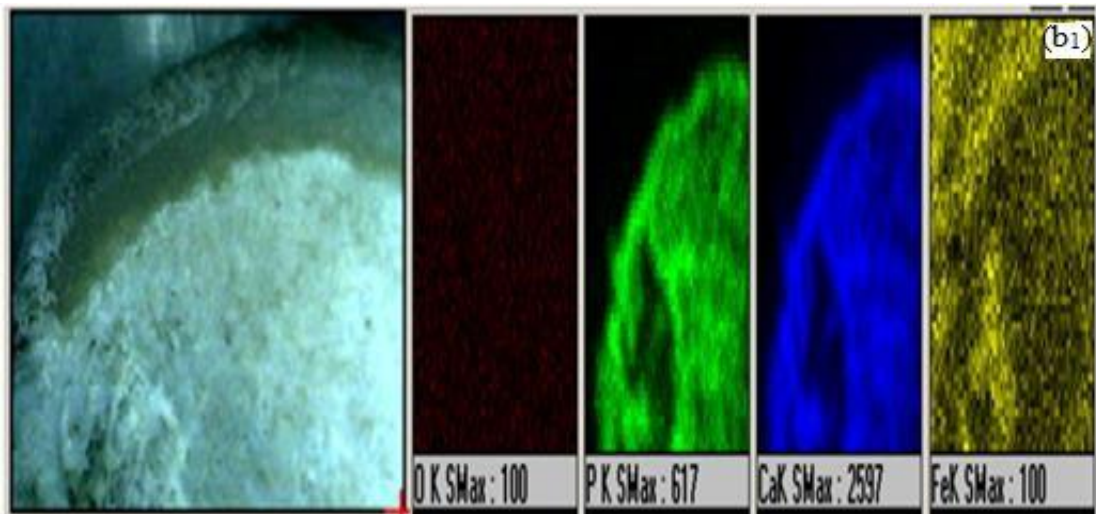
Fosfor elementi kırmızı, kalsiyum elementi sarı ve kükürt elementi ise yeşil renk ile gösterilmiştir. Kıkırdak bölümünde S (kükürt) elementi görülmektedir. Fakat kıkırdağın olduğu kısımda ayrıca kalsiyum elementinin varlığından da söz edebiliriz. Kemik bölümünde Ca (kalsiyum) ve P (fosfor) elementi görülmesini yapısını korumuş olarak gözükmemektedir.

a. Erkek Hasta-Kalça Kemiği



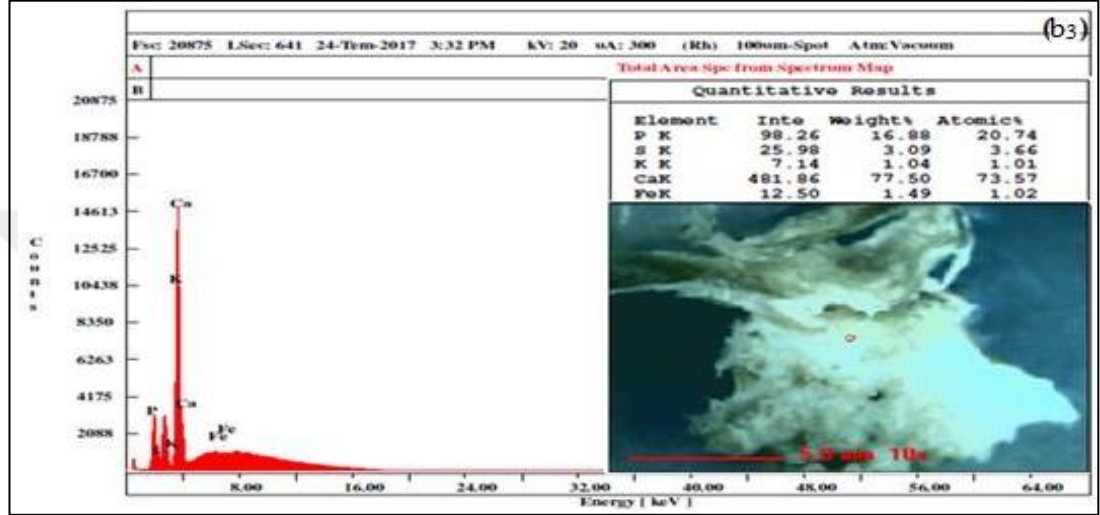
Şekil 3.39. b₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.39.'da b₁ hastasının elemental analizi sonucunda %0,40 oranında kalsiyum, %0,32 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



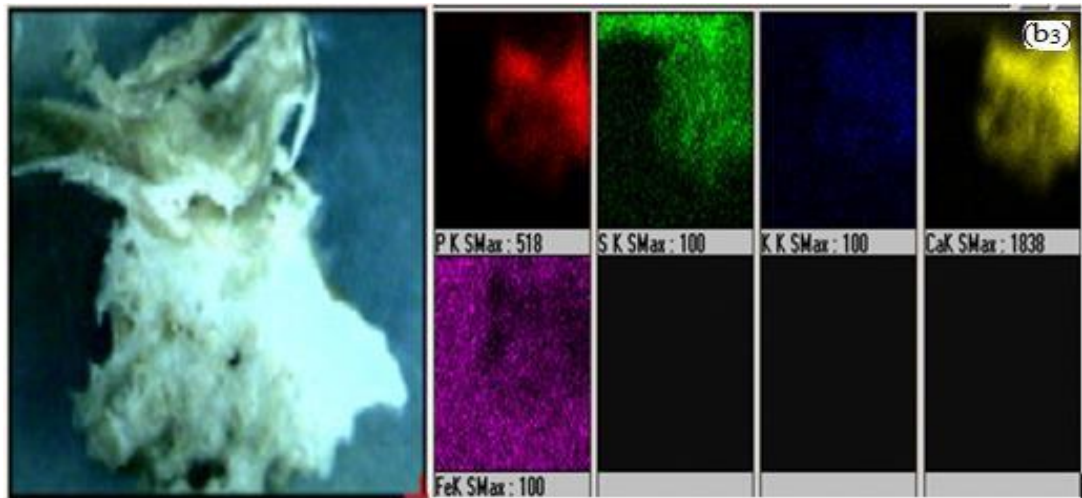
Şekil 3.40. b₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.40.'da b₁ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Kıkırdak yapının bulunduğu bölge de kalsiyum ve fosfor elementinin var olduğunu ve kıkırdak yapının elementsel yapısının bozulduğunu şekilden görebilmekteyiz.



Şekil 3.41. b₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

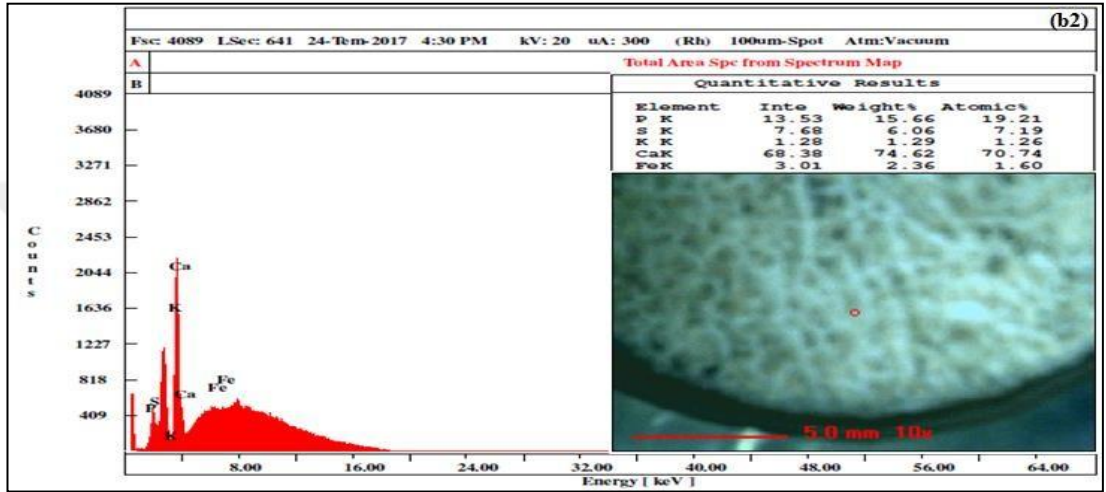
Şekil 3.41.'de b₃ hastasının elemental analizi sonucunda %73,57 oranında kalsiyum, %20,74 oranında fosfor, %3,66 oranında kükürt ve %1,01 oranında potasyum elementinin varlığına rastlanmıştır.



Şekil 3.42. b₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

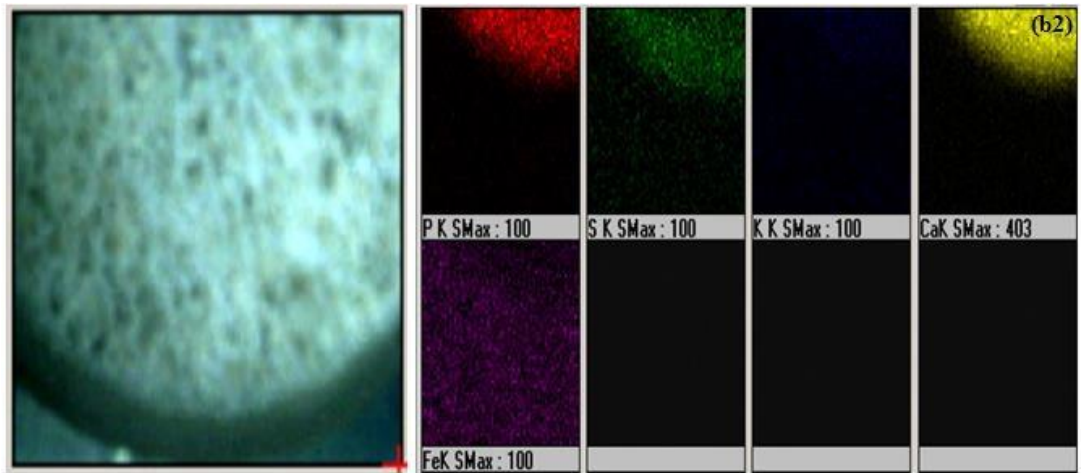
Şekil 3.42.'de b₃ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi kırmızı, kalsiyum elementi sarı, potasyum elementi mavi ve kükürt elementi yeşil renk ile gösterilmiştir.

b. Erkek Hasta-Ayak



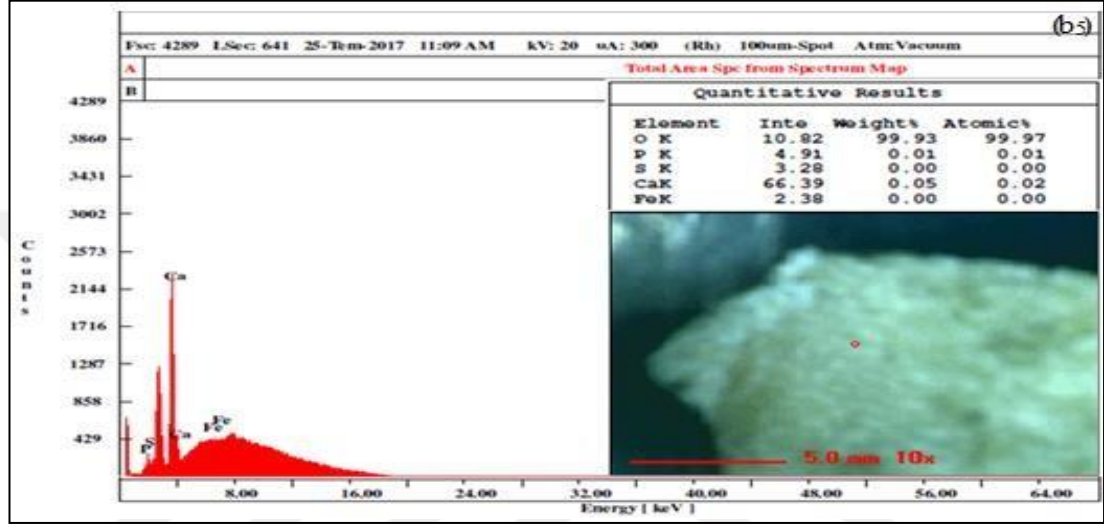
Şekil 3.43. b₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.43.'de b₂ hastasının elemental analizi sonucunda %70,74 oranında kalsiyum, %19,21 oranında fosfor, %7,19 oranında kükürt ve % 1,26 oranında potasyum elementinin varlığına rastlanmıştır.



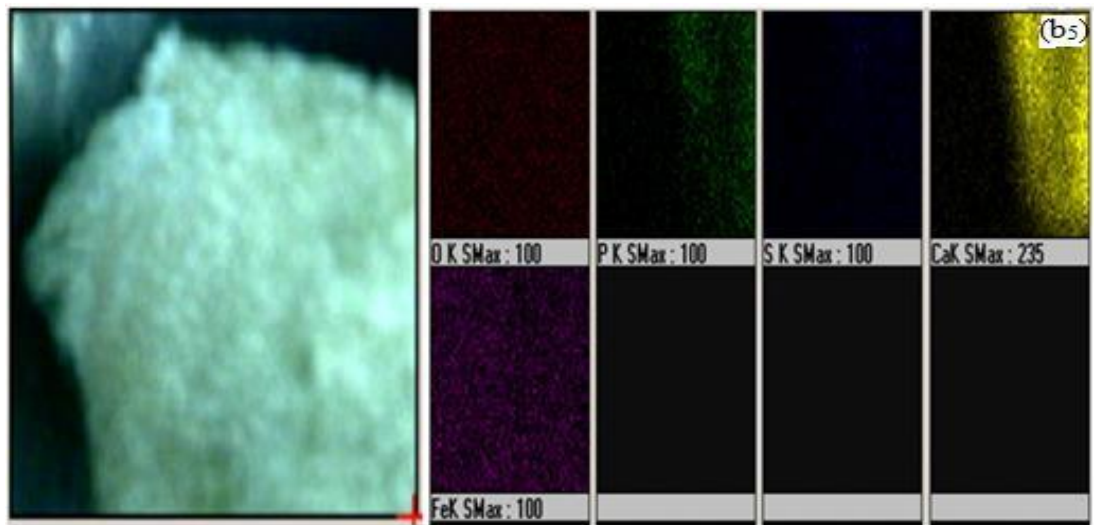
Şekil 3.44. b₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.44’de b₂ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementleri şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi kırmızı, kalsiyum elementi sarı, potasyum elementi mavi ve kükürt elementi yeşil renk ile gösterilmiştir. Diğer örneklerden farklı olarak kemik kısmında kükürt elementine rastlanmıştır.



Şekil 3.45. b₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

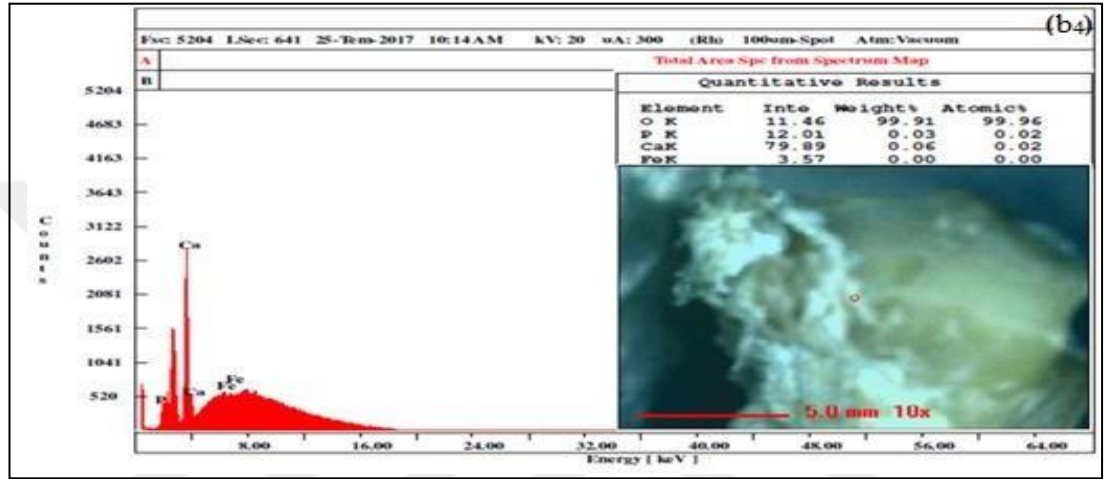
Şekil 3.45.’de b₅ hastasının elemental analizi sonucunda %0,02 oranında kalsiyum, %0,01 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



Şekil 3.46. b₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

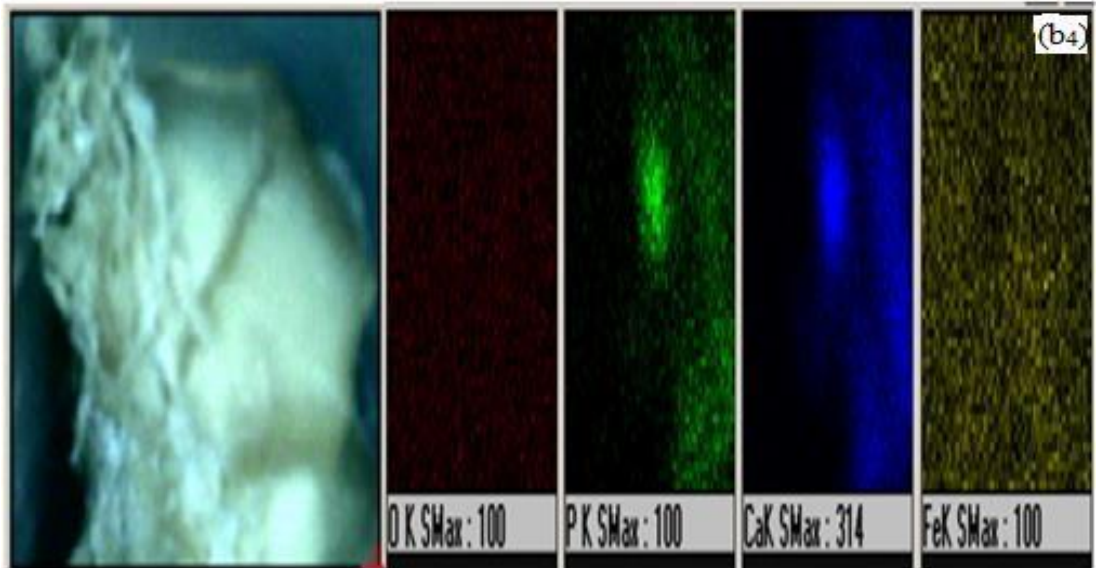
Şekil 3.46.'da b₅ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi sarı ve kükürt elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Yüzeyin tamamında kalsiyum ve fosfat elementlerine rastlanmıştır.

c. Erkek Hasta-Omuz



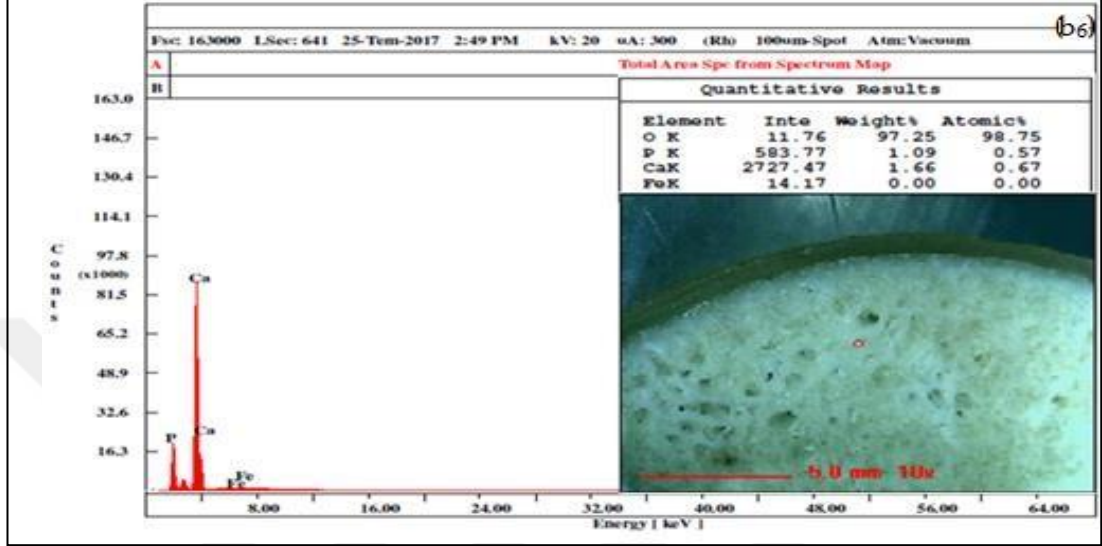
Şekil 3.47. b₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.47.'de b₄ hastasının elemental analizi sonucunda %0,02 oranında kalsiyum, %0,02 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



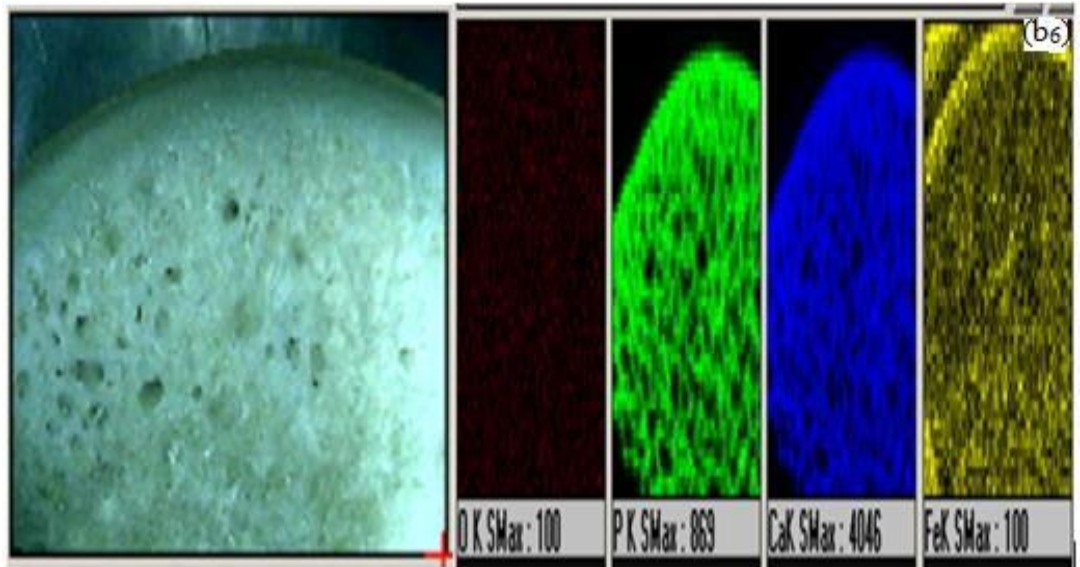
Şekil 3.48. b₄ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.48.'de b₄ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir.



Şekil 3.49. b₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF ölçümleri

Şekil 3.49.'da b₆ hastasının elemental analizi sonucunda %0,67 oranında kalsiyum, %0,57 oranında fosfor elementinin varlığına rastlanmıştır.



Şekil 3.50. b₆ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin XRF mapping ölçümleri

Şekil 3.50.'de b₆ hastasının kemik-kıkırdak örneğinin üzerinde mapping (haritalama) yapılmıştır. Yüzeyin tamamı belli adımlarla yaklaşık yarım saat taranmıştır. Tarama sonucunda bulunan elementlerin şekil üzerinde farklı renklerle görebilmekteyiz. Fosfor elementi yeşil, kalsiyum elementi mavi renk ile gösterilmiştir. Kıkırdak bölümünde kalsiyumve fosfat elementi net bir şekilde görülmektedir.

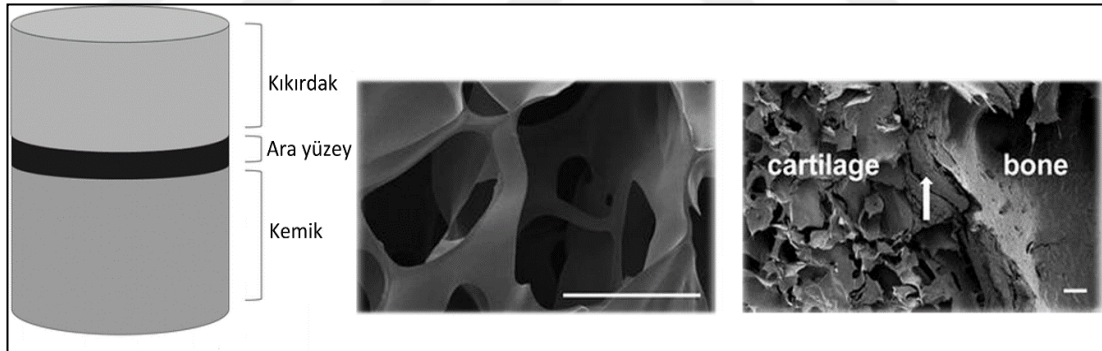
Bu tez çalışmasında kullanmış olduğumuz kadın ve erkek hastaların yaşları 60 ve üzeri olduğu için alınan ölçümlerimizin sonuçları kemik-kıkırdak yapının bozulduğunu ve bunun sonucunda meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Bir çok hastanın kıkırdak yapısı deformasyona uğramış ve kalsiyum birikmesi sonucu kalsifikasyon meydana gelmiştir.

Tablo 3.6. Kadın ve erkek hastaların Ca/P Oranı

Hasta ismi	Kemik Bölgesi	Ca (Kalsiyum)	P (Fosfat)	S (Kükürt)	K (Potasyum)	Ca/POran
a ₁	Kalça kemiği	0,50	0,49	-	-	1,02
a ₂	Kalça kemiği	0,27	0,24	-	-	1,125
a ₃	Kalça kemiği	82,25	7,37	9,50	0,14	11,16
a ₄	Ayak	82,10	7,88	5,78	0,91	10,41
a ₅	Diz	0,20	0,14	-	-	1,42
a ₆	Diz	75,67	17,08	5,69	0,32	4,43
b ₁	Kalça kemiği	0,40	0,32	-	-	1,25
b ₂	Ayak	70,74	19,21	7,19	1,26	3,68
b ₃	Kalça kemiği	73,57	20,74	3,66	1,01	3,54
b ₄	Omuz	0,02	0,02	-	-	1
b ₅	Ayak	0,02	0,01	-	-	2,0
b ₆	Omuz	0,67	0,57	-	-	1,18

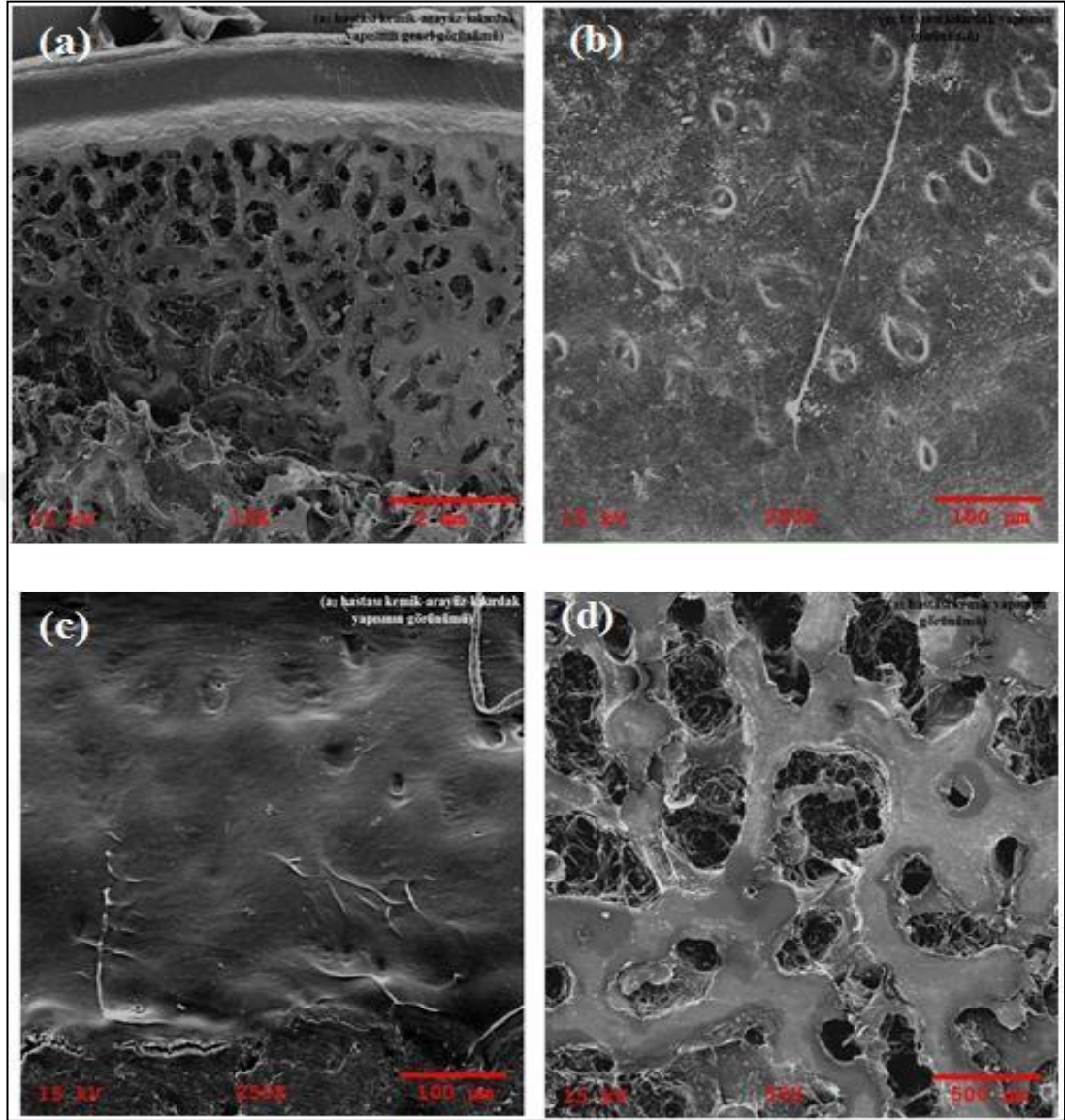
3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Kemiğin inorganik kısmını ise büyük oranda yarı kristalin formdaki hidroksiapatit (HA) oluşturmaktadır. Kimyasal formülü, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan HA, hekzagonal birim hücre yapısına sahiptir. HA kristallerinin kalınlığı ve çapı sırasıyla 2 – 5 nm ve 20 – 80 nm arasında değişebilmektedir. HA kristallerinin büyüklüğü kemiğin olgunlaşmasıyla ilişkilidir ve bu kristallerin küçüklüğü, o bölgedeki kemik matrisinin daha yeni oluştuğunun bir göstergesidir. Kemiğin sağlamlığı bu kristallerin, kemik matrisi içerisinde düzenli bir şekilde dağılmasıyla sağlanmaktadır. Taramalı elektron mikroskobisi (SEM) kollajen fibrilinin yönelimlerini ve farklı kemik dokularındaki kemik lakünalarını (boşluklarını) belirleyebilmektedir. SWAXS ve XRF sonuçları gözönüne alınarak incelenen oniki hastadan alınan kemik-kıkırdak örnekleri arasından üçü kadın üçü erkek olmak üzere elde edilen sonuçlar diğer hastalara göre daha net sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu durum gözönünde bulundurularak Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizlerimiz bu altı kemik-kıkırdak örneği için yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.52-3.57’de verilmiştir.



Şekil 3.51. (a) Çok fazlı osteokondral doku iskelesinin şematik görüntüsü, (b) kıkırdak bölgesini oluşturan malzemenin ve (c) malzemenin kıkırdak, kemik ve ara yüzeyini gösteren SEM görüntüleri [95]

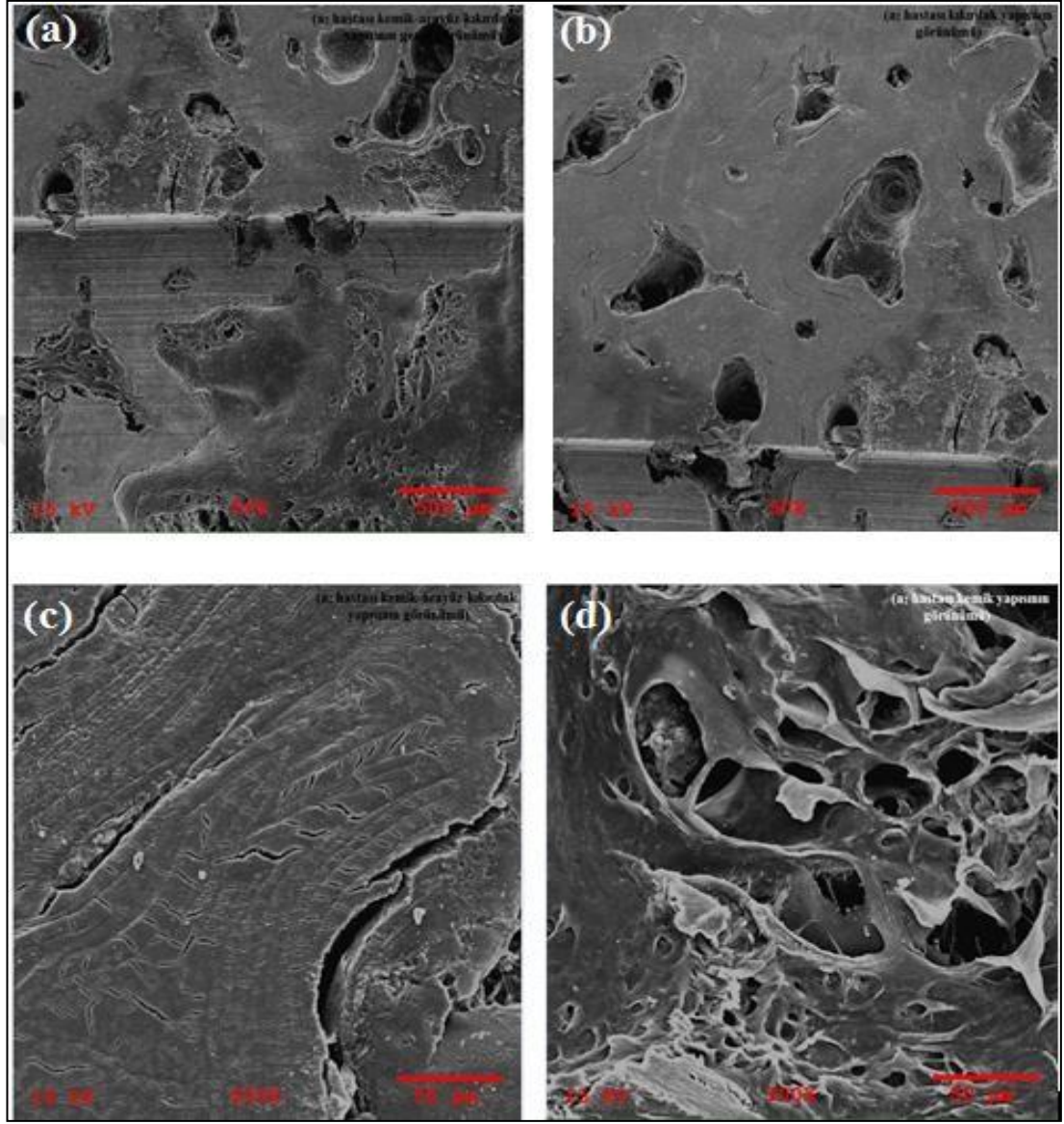
a. Kadın hastalar-Kalça kemiği



Şekil 3.52. a₁ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

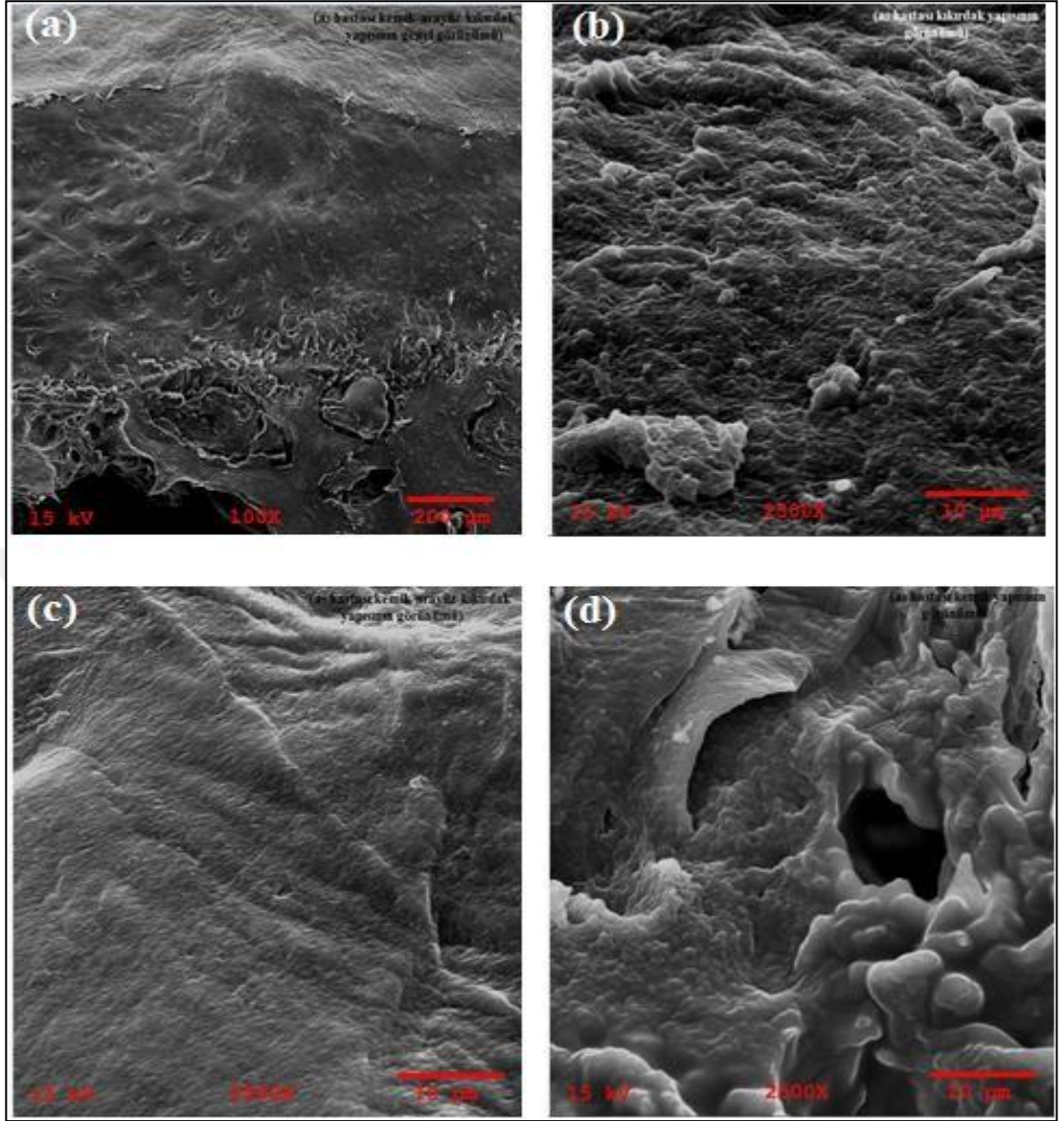
Şekil 3.52.'de Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak kemik-kıkırdak örneğinin yapısal durumunu ve aldığımız diğer ölçümleri destekleyici meydana gelen hasarlar sonucunda yapıdaki değişimi gördük. Şekil 3.52 (a)'da örneğimizin genel yapısında bulunan bölümleri daha net bir şekilde görmemiz açısından genel bir tarama yapıldı. Sonrasında kıkırdak, arayüz ve kemik bölümlerinin yapısal analizlerinin herbirini ayrı ayrı yaptık. Şekil 3.52 (b)'de kıkırdağın yüzeyinde laküna adı verilen boşluklara

rastlanmıştır. Şekil 3.52 (c)'de arayüz kısmının yapısını koruduğunu ve Şekil 3.52 (d)'de kemik yapısında gözenek yapısının bozulduğunu göstermiştir.



Şekil 3.53. a₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

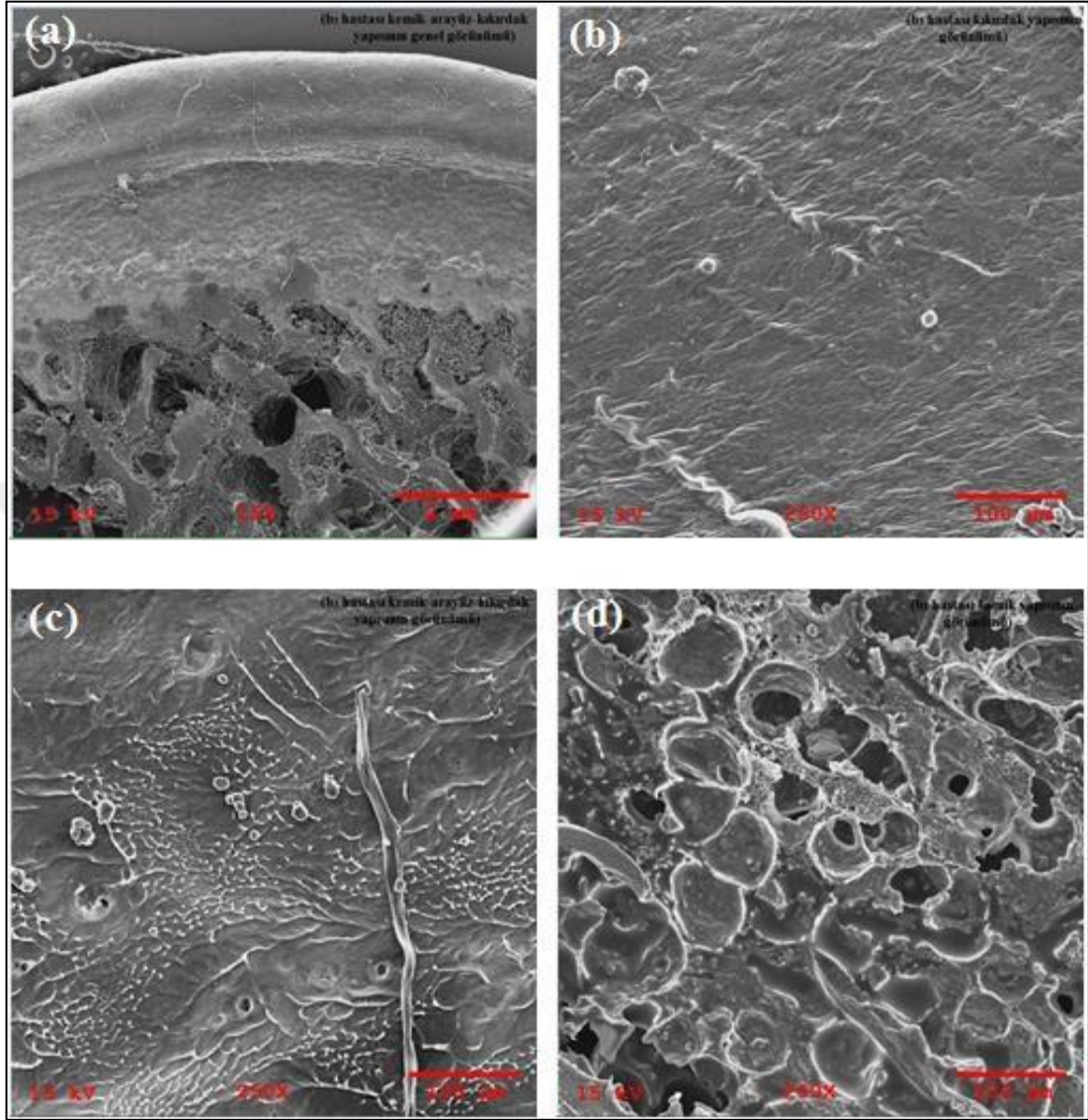
Şekil 3.53. (a)'da örneğimizin genel yapısı görülmektedir. Bu örnek için ölçüm alırken kıkırdak ve arayüzün bulunduğu bölgeyi kesen bir kesit olduğunu gördük. Şekil 3.53. (b)'de kıkırdak bölümündeki lakünaların boşlukların gittikçe büyüdüğünü göstermektedir. Şekil 3.53. (c)'de arayüz kısmında yapı üzerinden ayrılmış kollajen liflerin olduğu Şekil 3.53. (d)'de ise kemik yapının porozitesinin arttığı görülmektedir.



Şekil 3.54. a₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

Şekil 3.54. (a)'da diğer iki hastadan alınan ölçümlere kıyasen kıkırdak-arayüz-kemik bölümlerinin genel yapısına baktığımızda yapının deforme olduğu açıkça bellidir. Şekil 3.54. (b)'de kıkırdağın olduğu kısımda dalgalanmalar ve belli noktalarda yığılmalar meydana gelmiş kollajen yapıların varlığından bahsedebiliriz. Şekil 3.54. (c) ve Şekil 3.54. (d)'de kemik yapının organik kısmını görüldüğünü söyleyebiliriz.

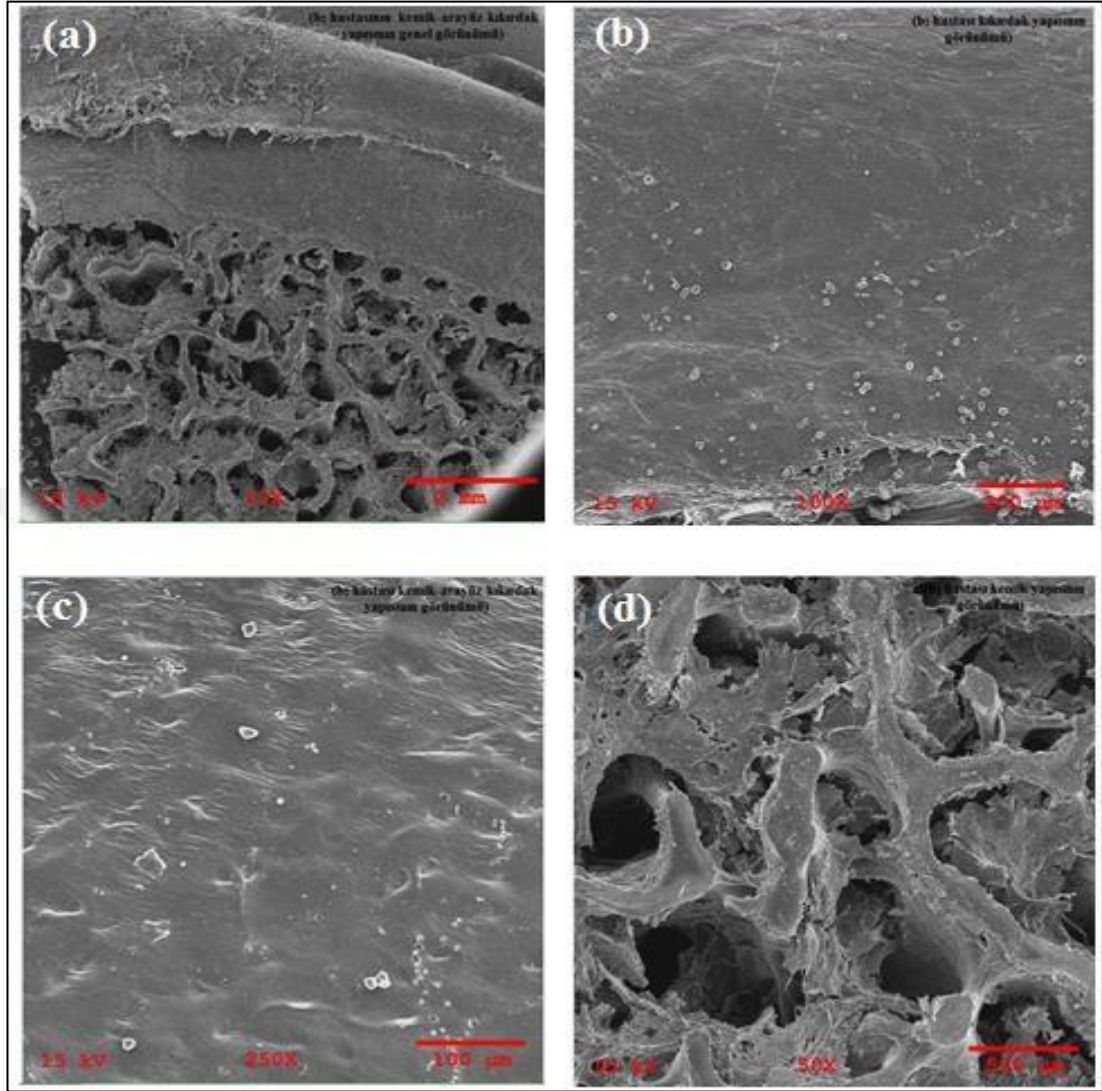
b. Erkek Hastalar-Kalça kemiği



Şekil 3.55. b₃ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

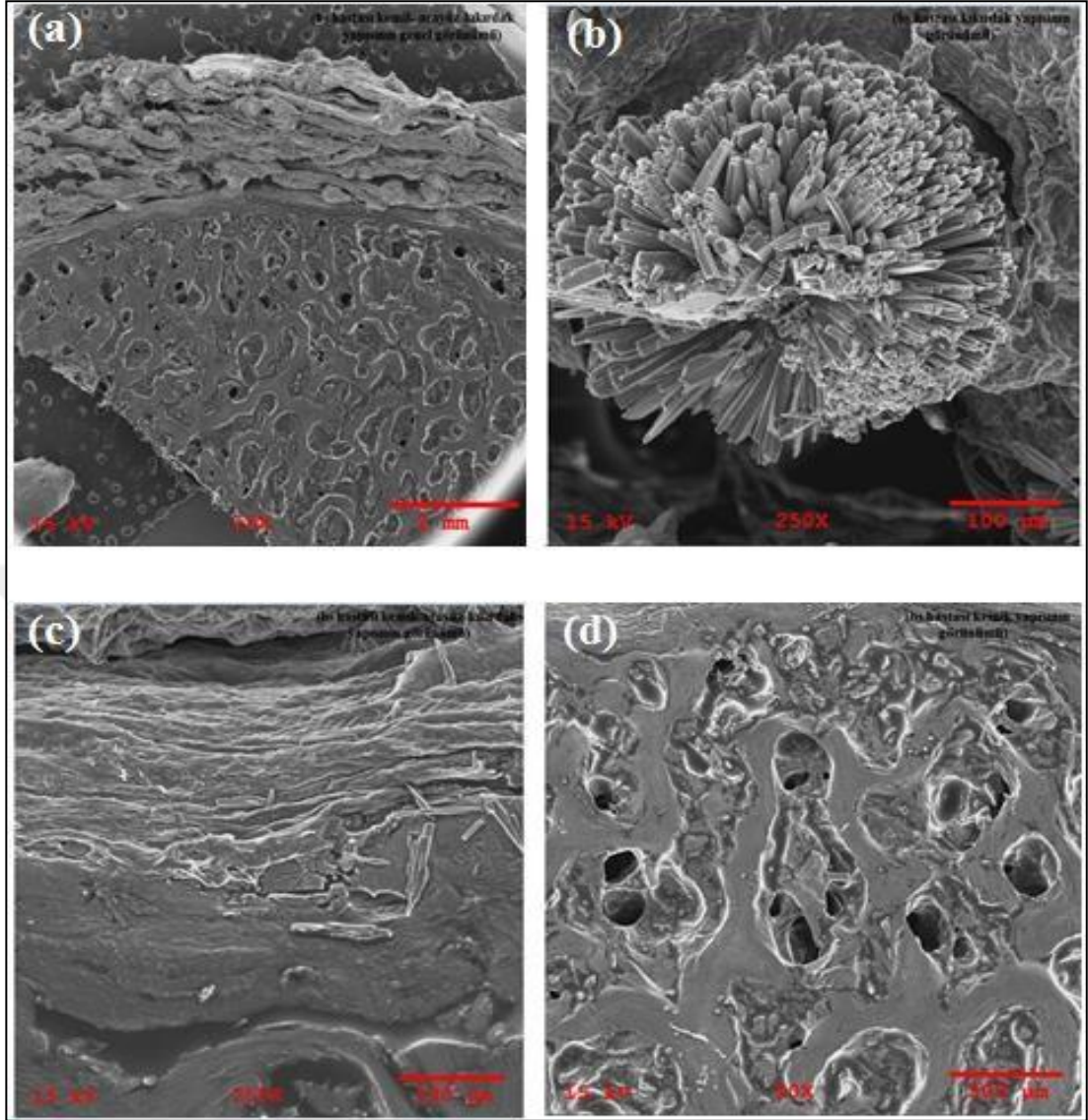
Şekil 3.55. (a)'da örneğimizin genel yapısı görülmektedir. Şekil 3.55. (b)'de kıkırdağın olduğu kısımda yapısında olması gereken boşluklar yerine dalgalanmalar ve belli noktalarda yığılmalar meydana gelmiştir. Şekil 3.55. (c)'de çizgisel yapıların varlığına rastlanmıştır. Şekil 3.55. (d)'de kadın hastalara göre daha farklı bir yapıda olduğunu ve gözeneklerin üstüste bindiğini söyleyebiliriz.

c. Ayak



Şekil 3.56. b₂ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

Şekil 3.56. (a)'da örneğimizin genel yapısı görülmektedir. Kemik kısmının porozitesi genel yapısına baktığımızda da görülmektedir. Şekil 3.56. (b)'de kıkırdak olduğu kısımda ve Şekil 3.56. (c)'de arayüz kısmında dalgalanmalar görülmektedir. Şekil 3.56. (d)'de kemiğin gözenek yapısının arttığını söyleyebiliriz.



Şekil 3.57. b₅ hastasından alınan kemik-kıkırdak örneklerinin (a) genel yapısının SEM görüntüsü, (b) kıkırdak yapının SEM görüntüsü, (c) arayüz kısmının SEM görüntüsü, (d) kemik yapının SEM görüntüsü

Şekil 3.57. (a)'da diğer iki hastadan alınan ölçümlere kıyasen kıkırdak-arayüz-kemik bölümlerinin genel yapısına baktığımızda yapının hepsinden farklı olduğunu söyleyebiliriz. Şekil 3.57. (b)'de kıkırdağın olduğu kısımda kristal yapılanma meydana gelmiştir. Kemik oluşumunda saptanabilen en erken katı faz yeterli kristalizasyon gösteremeyen ve karbonat içeren apatittir. Kristalizasyon kollajen dokusu üzerinde gerçekleşir ve fibriller zaman içerisinde kemik yapısına dönüşür. Yani, kıkırdak kısmın kemikleştiğini söyleyebiliriz. Şekil 3.57. (c)'de arayüzde kireçlenmeden dolayı kollajen liflerde paralel çatlaklar meydana geldiğini ve Şekil 3.57. (d)'de kemik yapısındaki gözenekliliğinde bozulduğunu söyleyebiliriz. Üç

erkek hasta arasında b₅ hastasının yapısında kristallenme meydana gelmiştir. WAXS sonuçları da bu durumu desteklemektedir.



4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Eklem kıkırdağı sert ve elastik bir örtü biçiminde eklemlerdeki kemik uçlarını kaplar ve iki kemiğin birbiri üzerinde yumuşak ve sürtünmesi en aza indirgenmiş biçimde hareketini sağlamaktadır. Bununla beraber eğer eklem kıkırdağı travma veya kullanıma bağlı olarak zarar görürse vücudun diğer dokuları gibi hızlı ve tam olarak iyileşemez. Hasar görmüş kıkırdak sonucunda ortaya çıkan kemiğin eklemde diğer tarafa direkt teması ile ağrı ve hareket kısıtlılığı ortaya çıkarmaktadır. Eklem kıkırdağı dejenerasyonunu etkileyen bir çok faktör olmasına karşın, yaş faktörü ve cinsiyeti bu çalışmamızda ele aldık. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Orthopedi ve Travmatoloji bölümünden ameliyat esnasında altı kadın, altı erkeğin farklı bölgelerinden alınan eklem kıkırdaklarının yapısal ve elemental analizleri yapılmıştır. Yapısal analiz için Küçük ve Büyük Açılı X-Ray Saçılması (SAXS/SWAXS), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), elemental analiz için mikro-X-Ray Floresans (XRF) cihazları kullanılarak yapılmıştır. Altı kadın hasta arasında kalça kemiği, ayak ve diz bölümü olarak sınıflandırma yaptık. Altı erkek hasta arasında kalça kemiği, ayak ve omuz bölümü olarak ayrı bir sınıflandırma yaptık. Kemik ve kıkırdak yapısında bulunan kollajen yapıların içerisindeki proteinlerin hesaplanması için SAXS/WAXS analizleri yapılmış, özellikle protein yapı tespiti için kullanılan jirasyon yarıçapı değerleri hesaplanmıştır. Proteinin peptit boyuna bağlı olarak jirasyon yarıçapı değerleri değişmektedir. Jirasyon yarıçapı Guiner bölgesinde kristal yapıların lineerliğe göz önüne alınarak hesaplanmaktadır. Kollajen peptit uzunluğu jirasyon yarıçapını belirleyen fonksiyondur. Kollajen peptitlerin uzunluğu arttıkça lineerlikten uzaklaşılır. Nonlineer bir durum meydana gelir. Daha önceki bölümlerde kollajen yapıdan ve kemik-kıkırdak yapıda olmasını beklediğimiz kollajen tiplerinden bahsetmiştik. Kollajen peptit uzunlukları arttığı ve kristal yapıların lineerliği bozulduğu için jirasyon yarıçaplarında azalma olmuştur. Kadın hastalarda yapının daha fazla bozulduğunu jirasyon yarıçapımında bu oranda azaldığını söyleyebiliriz. Kalça kemiği alınan kadın hastaların SAXS analizleri sonucunda a₁ hastasının az yoğun dokuda jirasyon yarıçapı 5,33 nm, çok yoğun dokuda 5,47 nm, a₂

hastasının jirasyon yarıçapı 6,57 nm, a₃ hastasının az yoğun ortamda 6,29 nm, çok yoğun ortam da ise 6,54 olduğu tespit edilmiştir.

Ayak örneği alınan a₄ kadın hastanın jirasyon yarıçapı azyoğun doku için 5,99 nm çok yoğun doku için 6,51 nm olarak tespit edilmiştir. Diz örnekleri alınan kadın hastaların jirasyon yarıçapları a₅ hastası için 4,57 nm a₆ hastası için 35,01 nm olarak tespit edilmiştir. Kalça kemiği alınan erkek hastaların SAXS analizleri sonucunda b₁ hastasının jirasyon yarıçapı 46,48 nm, b₃ hastasının jirasyon yarıçapı az yoğun ortamda 6,12 nm, çok yoğun ortam da ise 5,56 olduğu tespit edilmiştir. Ayak örneği alınan b₂ erkek hastasının jirasyon yarıçapı 14,85 nm, b₅ erkek hastasının az yoğun doku için 46,23, çok yoğun doku için 36,73 nm olarak tespit edilmiştir. Omuz örneği alınan erkek hastaların SAXS analizleri sonucunda b₄ hastasının jirasyon yarıçapı 6,95 nm, b₆ hastasının jirasyon yarıçapı az yoğun ortamda 48,19 nm, çok yoğun ortam da ise 21,53 nm olduğu tespit edilmiştir. Saçılma yoğunluğu değerleri kullanılan örneklerin elektron yoğunluğuna bağlı olarak elde edilmektedir. En yüksek saçılma yoğunluğu a₄ hastasına aittir. Ayak kemiğinin yapısı diğer bölgelere göre daha kompakttır. Kalça kemiği grubundaki hastalarda azyoğun ve çok yoğun olarak değerlendirdiğimizde kemik kısmında elektron yoğunluğundaki saçılmanın kıkırdak kısmına göre daha az olduğunu söyleyebiliriz. Diz grubuna baktığımızda a₆ hastasının a₅ hastasına göre saçılma yoğunluğunun daha fazla yani yapının elektron yoğunluğu daha iyi diyebiliriz.

Kemik ve kıkırdak yapıda bulunan kollajen tiplerine göre kollajen yapının değeri 46-67 nm aralığında çıkmaktadır. İncelenen kadın ve erkek hasta örneklerinin bir çoğunda özellikle bu değerden oldukça uzaktır. Kadın hastalardan sadece diz bölgesinde yaşa bağlı olarak kollajen yapının diğer kadın hastalara göre biraz daha korunduğunu söyleyebiliriz. Erkeklerde b₁, b₅ ve b₆ örneklerinin farklı bölgelere sahip olmasına rağmen kollajen yapılarının normale yakın olduğunu tespit edebiliyoruz. Kadın ve erkek hastaların elde edilen sonuçlarında erkek hastaların kemik ve kıkırdak yapısının kadına oranla daha iyi olduğunu söyleyebiliriz. WAXS analiz sonuçlarına göre elde edilen piklerin θ değerleri hesaplanmıştır. a₁ az yoğun kıkırdak doku örneği için $I(q)(a.u.)-\theta(^{\circ})$ grafiği için iki pikin θ değerleri sırasıyla 19,72° ve 25,41° olarak belirlenmiştir. a₁ çok yoğun kıkırdak doku örneği için $I(q)(a.u.)-\theta(^{\circ})$ grafiği için belirlenen iki pikin θ değerleri sırasıyla 19,18° ve 25,35°

olarak belirlenmiştir. Erkeklerdeki kalsifiye dokunun farklılıkları WAXS profillerinde çok farklı kristalin yapıya işaret etmektedir. Erkek hastalardan alınan ayak (b₂) kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği için belirlenen dört pikin θ değerleri sırasıyla 25,19°, 25,37°, 25,46° ve 25,59° olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde b₅ az yoğun ayak kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği için belirlenen iki pikin θ değerleri sırasıyla 21,29° ve 25,33° olarak belirlenmiştir. b₃ az yoğun kalça kemiği kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği için belirlenen üç pikin θ değerleri sırasıyla 22,54°, 25,24° ve 25,36° olarak belirlenmiştir. b₃ çok yoğun kalça kemiği kıkırdak doku örneği için I(q)(a.u.)-θ(°) grafiği için belirlenen beş pikin θ değerleri sırasıyla 22,17°, 22,32°, 22,37°, 22,47° ve 23,50° olarak belirlenmiştir. Bu değerler gözönünde bulundurularak en yüksek pik değerine göre d mesafeleri hesaplanmıştır.

Kemik mineral kısmı esas olarak kalsiyum, fosfat, hidroksil, karbanot ve sitrat ile az miktarda eser elementlerden meydana gelmiştir. Sağlıklı bir kemik mineral yapısında olması beklenen Ca/P oranının 1,5 ile 2,0 aralığındadır. Kemik mineralindeki esas yapı apatittir. Kemik mineral kristalleri inorganik yapı kristallerinden oluşmaktadır. Çubuk biçimindeki kristaller kollajen fibrillerin (3000-4000Å⁰) üzerinde uzanırlar. Yapısı Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ şeklindedir. Yapı içinde iyon yer değişimleri olabilir ve apatit genişliği değişebilir. Kristal genişliğin değişebilecek değer 150-215Å⁰ kadardır. Mikro-XRF spektroskopisi kullanılarak kadın ve erkek hastaların elemental analizleri yapılmıştır. Kadın hastalardan alınan kalça kemiği örnekleri mikro-XRF spektroskopisi ile incelenerek Ca/P oranı atomik orana bağlı olarak hesaplanmıştır. a₁, a₂, a₃ hastalarının sırasıyla Ca/P oranı, 1,02, 1,13, 11,16 olarak elde edilmiştir. Ayak kemiği incelenen a₄ hastasının Ca/P oranı 10,41, diz kemikleri incelenen a₅ ve a₆ hastalarının Ca/P oranı 1,42 ve 4,43 olarak elde edilmiştir. Ayrıca her bir örneğe ayrı ayrı yapılan mapping işleminde yüzey üzerinde bu elementlerin yoğunlaştığı bölgelerin dağılımı gösterilmektedir. Kemik-kıkırdak yapının olması gereken mineral yapıdan uzaklaştığı, hatta birkaç hastanın kemik yapısında kalsifikasyon olduğu kanısına varabiliriz. Erkek hastalar için aynı şekilde işlemler gerçekleştirilmiştir. Kalça kemiği örneği olan b₁ ve b₃ hastalarının Ca/P oranı sırasıyla, 1,25 ve 3,54 olarak hesaplanmıştır. Ayak kemiklerinde bu değer yani b₂ ve b₅ hasta örneklerinde 3,68 ve 2,0'dır. Omuz kemiklerinde Ca/P oranı b₄ ve b₆ için 1 ve 1,18 olarak

hesaplanmıştır. Erkekler de mineral yapıda farklılıklar olduğunu elde ettiğimiz sonuçlar tespit edebiliyoruz. Fakat kadın hastalarla kıyaslayınca mineral yapının erkeklerde kadınlara nispeten daha az bozunduğunu görebiliyoruz.

Taramalı elektron mikroskobu kemik ve kıkırdak yapıda bulunan lakünaları(boşlukları), kondrosit ve kondroblast hücrelerinin yapısını tespit etmemiz için kullanılmıştır. SWAXS sonuçlarında bu üç örneğin yaşa bağlı mukayese edersek; yani yaş arttıkça jirasyon yarıçapları a_1 , a_2 ve a_3 örnekleri için kemik yapısında, gözenek artacak bununla beraber jirasyon yarıçapıda artacaktır. XRF sonuçları elementsel açıdan bakacak olursak Ca/P oranı a_1 , a_2 ve a_3 örnekleri için 1,02, 1,12 ve 11,25, b_2 , b_3 ve b_5 örnekleri için 3,68, 3,54 ve 2,0 olarak değişmektedir. SEM sonuçları da elde edilen sonuçları destekleyici şekildedir. Yaş faktörü bu sonuçlara bakıldığında yaşın artması ile elde edilen değerlerin değerlendirilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Kadın ve erkek hastaların SEM analiz sonuçları kemik-kıkırdak yapısında boşlukların arttığını kıkırdak yapıda yüzey morfolojisinin homojenitesini yitirdiğini lakünaların ve kemik ve kıkırdak hücrelerinin yapısının bozulduğunu söyleyebiliriz. Erkek hastalardan birinde kıkırdak yapıda meydana gelen kristallenmeler kıkırdak yapıda kalsiyum elementinin birikip kalsifikasyon meydana geldiğini göstermektedir. Kadın hastalarda bu durum olmasa dahi yapının bozulduğu ve yüzeysel yıpranmaların olduğu erkeklerle kıyaslandığında daha fazladır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, insan vücudunun dört farklı bölümünden (kalça kemiği, omuz, ayak, diz) alınan kemik-kıkırdak örneklerinin yaşa ve cinsiyete bağlı nano oluşumların ve makromoleküler yapılarının X-ışını Saçılması (SAXS/WAXS), XRF ve SEM yöntemleri ile ülkemizde ilk kez incelenebilirliğinin sağlanmasıdır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 60 yaş ve üzeri kadın ve erkek hastalardan almış olduğumuz örneklerin teşhis ve tedavi için ilerleyen çalışmalarımızla birlikte tıp alanındaki hocalarımızda engin bilgileriyle bu gibi hastalıklara maruz kalan insanlara yardımcı bir alternatif imkan sunabilmektir.

KAYNAKLAR

- [1] Uluçay Ç., Diz Osteoartritinde Artroskopik Debridman ve Viskosüplemantasyonun Yeri, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2.Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü, İstanbul, 2005.
- [2] Mow V. C., Sugalski M. T., Physiology of Synovial Joints and Articular Cartilage. In: Gonzales Eg, Myers SJ, Edelman JE, Lieberman JS, Downey JA (Eds): *Physiological Basis of Rehabilitation Medicine*, 3rd ed., Butterworth- Heinemann, Woburn, 133-68, 2001.
- [3] Kaabar W., Lakloul A., Bunk O., Baily M., Farquharson M.J., Bradley D., Compositional and Structural Studies of The Bone–Cartilage Interface Using Pixe and Saxs Techniques, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2010, **619**, 78-82.
- [4] Moger C. J., Barrett R., Bleuet P., Bradley D. A., Ellis R. E., Green E. M., Knapp K. M., Muthuvelu P., Winlove C. P., Regional variations of collagen orientation in normal and diseased articular cartilage and subchondral bone determined using small angle X-ray scattering (SAXS), *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007, **15**, 682-687.
- [5] Zhang Y.X., Wang Y.S., Zhang Y.P., Zhang G.L., Huang Y.Y., He W., Investigation of Elemental Distribution in Human Femoral Head by PIXE and SRXRF Microprobe, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2007, **260**, 178-183.
- [6] Kaabar W., Daar E., Bunk O., Farquharson M.J., Lakloul A., Jeynes C., Gundogdu O., Bradley D.A., Elemental and Structural Studies at the Bone–Cartilage Interface, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2011, **652**, 786-790.
- [7] Ismail E.C., Kaabar W., Garrity D., Gundogdu O., Bunk O., Pfeiffer F., Farquharson M.J., Bradley D.A., X-ray Phase Contrast Imaging of the Bone–Cartilage Interface, *Applied Radiation and Isotopes*, 2010, **68**, 767–771.
- [8] Kaabar W., Daar E., Gundogdu O., Jenneson P.M., Farquharson M.J., Jeynes C., Bradley D.A., Metal Deposition at the Bone–Cartilage Interface in Articular Cartilage, *Applied Radiation and Isotopes*, 2009, **67**, 475-479.
- [9] Bradley D.A., Kaabar W., Gundogdu O., Farquharson M.J., Janousch M., Bailey M., Jeynes C., Synchrotron and Ion Beam Studies of the Bone–Cartilage Interface, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2010, **619**, 330–337.

- [10] Kaabar W., Gundogdu O., Laklouk A., Bunk O., Pfeiffer F., Farquharson M.J., Bradley D.A., m-PIXE and SAXS Studies at the Bone–Cartilage Interface, *Applied Radiation and Isotopes*, 2010, **68**, 730–734.
- [11] Camacho N. P., Rinnerthaler S., Paschalis E. P., Mendelsohn R., Boskey A. L., Fratzl P., Complementary Information on Bone Ultrastructure From Scanning Small Angle X-ray Scattering and Fourier-transform Infrared Microspectroscopy, *Bone*, 1999, **25**, 287-293.
- [12] Bradley D.A., Moger C.J., Winlove C.P., Zn Deposition at the Bone–Cartilage Interface in Equine Articular Cartilage, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2007, **580**, 473–476.
- [13] Fei Y., Zhang M., Li M., Huang Y., He W., Ding W., Yang J., Element Analysis in Femur of Diabetic Osteoporosis Model by SRXRF Microprobe, *Micron*, 2007, **38**, 637–642.
- [14] Lima I., Anjos M.J., Farias M.L.F., Pantaleão T.U., Corrêa da Costa V.M., Lopes R.T., Evaluation of Osteoporotic Bone Structure Through Synchrotron Radiation X-ray Microfluorescence Images, *European Journal of Radiology*, 2008, **68**, 95–99.
- [15] Lima I., Anjos M.J., Farias M.L., Parcegoni N., Rosenthal D., Duarte M.E., Lopes R.T., Bone Diagnosis by X-ray Techniques, *European Journal of Radiology*, 2008, **68**, 100-103.
- [16] Georgiadis M., Guizar-Sicairos M., Zwahlen A., Trüssel A.J., Bunk O., Müller R., Schneider P., 3D Scanning SAXS: A Novel Method for the Assessment of Bone Ultrastructure Orientation, *Bone*, 2015, **71**, 42–52.
- [17] Grünwald T.A., Rennhofer H., Hesse B., Burghammer M., Stanzl-Tschegg S.E., Cotte M., Leoffler J.F., Weinberg A.M., Lichtenegger H.C., Magnesium from Bioresorbable Implants: Distribution and Impact on the Nano- and Mineral Structure of Bone, *Biomaterials*, 2016, **76**, 250-260.
- [18] Pemmer B., Roschger A., Wastl A., Hofstaetter J.G., Wobrauschek P., Simon R., Thaler H.W., Roschger P., Klaushofer K., Strelci C., Spatial Distribution of the Trace Elements Zinc, Strontium and Lead in Human Bone Tissue, *Bone*, 2013, **57**, 184–193.
- [19] Sindhupakorn B., Thienpratharn S., Kidkhunthod P., A Structural Study of Bone Changes in Knee Osteoarthritis by Synchrotron-Based X-ray Fluorescence and X-ray Absorption Spectroscopy Techniques, *Journal of Molecular Structure*, 2017, **1146**, 254-258.
- [20] Mora-Macías J., Pajares A., Miranda P., Domínguez J., Reina-Romo E., Mechanical Characterization via Nanoindentation of the Woven Bone Developed During Bone Transport, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2017, **74**, 236–244.

- [21] Gibelli D., Mazzarelli D., Porta D., Rizzi A., Cattaneo C., Detection of Metal Residues on Bone Using SEM-EDS—Part II: Sharp Force Injury, *Forensic Science International*, 2012, **223**, 91–96.
- [22] Hortolà P., Human Bloodstains on Bone Artefacts: an SEM Intra- and Inter-Sample Comparative Study Using Ratite Bird Tibiotarsus, *Micron*, 2016, **90**, 108–113.
- [23] Jimenez-Palomar I., Shipov A., Shahar R., Barber A.H., Influence of SEM Vacuum on Bone Micromechanics Using in Situ AFM, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012, **5**, 149-155.
- [24] Gerritsen M., Oxford J.T., Frary M., Henderson J., Hampikian J.M., Immuno-SEM Characterization of Developing Bovine Cartilage, *Materials Science and Engineering: C*, 2008, **28**, 341-346.
- [25] Erkoçak A., *Genel Histoloji*, 3. Baskı, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1980.
- [26] Fawcett D. W., *A Text Book of Histology*, 11th Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1986.
- [27] Leeson T. S., Leeson C. R., Paparo A. A., *Text and Atlas of Histology*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1986.
- [28] Paker Ş., *Histoloji*, 2. Baskı, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, Bursa, 1990.
- [29] Tekelioğlu M., *Genel Tıp Histolojisi*, 1. Baskı, Beta Basın Yayın Dağıtım, İstanbul, 1989.
- [30] <https://www.bilgicik.com/yazi/kikirdak-doku/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [31] <http://www.biyolojisesitesi.net/uniteler/destek-ve-hareket/kikirdak-doku.html> (Ziyaret tarihi 09.10.2017).
- [32] <http://webders.net/hayvansal-dokular-ders-20-362p2.html> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [33] <http://www.iskelet.gen.tr/kikirdak.html> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [34] Arıncı K, Elhan A, *Anatomi I Hareket Sistemi (Kemikler-Eklemler-Kaslar)*, 1993 baskısı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 101-104, 1993.
- [35] <http://centralhospital.com/SaglikOnerileri/ellerde-kireclenme/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).

- [36] Lee J. H., Kisiday J., Grodzinsky A. J., Tissue-engineered Versus Native Cartilage: Linkage Between Cellular Mechano-transduction and Biomechanical Properties, *Novartis Found Symp.* Chichester, England, 2003.
- [37] Chen C. T., Bhargava M., Lin P. M., Torzilli P. A., Time, Stres and Location Dependent Chondrocyte Death and Collagen Damage in Cyclically Loaded Articular Cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, 2003, **21**, 888-898.
- [38] [http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/03-Eklem kıkırdağı](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/03-Eklem_kıkırdağı) (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [39] Wong M, Carter D.R., Articular Cartilage Functional Histomorphology and Mechanobiology: A research perspective, *Bone*, 2003, **33**, 1-13.
- [40] Hunziker E.B., Quinn T.M., Hauselmann H.J., Quantitative Structural Organization of Normal Adult Human Articular Cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage*, 2002, **10**, 564-572.
- [41] Huselstein C., Netter P., de Isla N., Wang Y., Gillet P., Decot V., Muller S., Bensoussan D., Stoltz J.F., Mechanobiology Chondrocyte and Cartilage, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2008, **18**, 213-220.
- [42] Skinner H. B., *Current Diagnosis & Treatment in Orthopedics*, 1. Baskı, Appleton & Lange Co., New York, 1995.
- [43] http://www.phschool.com/atschool/florida/pdfbooks/sci_Marieb/pdf/Marieb_ch06.pdf, (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [44] Albrektsson T., Branemark P.I., Hansson H.A., Lindström J., Osseointegrated Titanium Implants. Requirments for Ensuring a Long-lasting Direct Bone to Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop Scand*, 1981, **52**(2), 155-70.
- [45] Albrektsson T., *Bone Tisure Response. In P-I Brabemark, GA Zarb, T Albrektsson (eds) Tissue-Integrated Prostheses;* Quintessence Pub. Co. Inc., Chicago, 130, 1985.
- [46] Noyan A., *Kemik Dokusu ve Kemikleşme*, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 10. Baskı, Meteksan Yayınları, Ankara, 1998.
- [47] http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/k/Kem/pages/Kemik%20Dokusu_jpg.htm (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [48] <https://tr.pinterest.com/pin/162692605272160681/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [49] <http://uzun-kemik.nedir.org/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [50] <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2267> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [51] <http://testicoz.org/ygs-biyoloji-inorganik-besinler/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).

- [52] <http://slideplayer.biz.tr/slide/2922168/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [53] Altıntaş A., *Biyokimya AD Ders Notları*, Ankara Üniversitesi Açık Ders Notları, Ankara, 2013.
- [54] <http://classes.midlandtech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [55] <http://tipnotu.com/mineraller-ve-eser-elementler/> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [56] Erdman J. W., MacDonald I. A., Zeisel S. H., *Present Knowledge in Nutrition*, 6th ed., Wiley-Blackwell, New Jersey, 1990.
- [57] *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., National Research Council Washington (DC), 1989.
- [58] http://en.0wikipedia.org/wiki/Biological_small-angle_scattering (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).
- [59] Edwards M., Arrowsmith C. H., Christendat D., Dharamsi A., Friesen J. D., Greenblatt J.F., Vedadi M., Protein Production: Feeding the Crystallographers and NMR Spectroscopists, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 970–972.
- [60] Serduk I. N., Zaccai N. R., *Methods in Molecular Biophysics*, Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- [61] Svergun D. I., Koch M.H.J., Small-angle Scattering Studies of Biological Macromolecules in Solution, *Reports Prog. Phys.*, 2003, 66(10), 1735–1782.
- [62] Breyton C., Gabel F., Lethier M., Flayhan A., Durand G., Jault J.M., Juillan-Binard C., Imbert L., Moulin M., Ravaud S., Härtlein M., Ebel C., Small Angle Neutron Scattering for the Study of Solubilised Membrane Proteins, *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*, 2013, 36(7), 71.
- [63] Petoukhov M. V., Svergun D. I., Applications of Small-angle X-ray Scattering to Biomacromolecular Solutions, *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 2013, 45(2) 429–437.
- [64] Svergun D. I., Small-angle Scattering Studies of Macromolecular Solutions, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, 40, 10–17.
- [65] Petoukhov M. V., Konarev P. V., Kikhney A. G., Svergun D. I., ATSAS 2.1 - Towards Automated and Web-Supported Small-angle Scattering Data Analysis, *Journal of Applied Crystallography*, 2007, 40, 223-228
- [66] Svergun D. I., Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing, *Biophys. J.*, 1999, 76, 2879–2886.

- [67] Konarev P. V., Petoukhov M. V., Svergun D. I., MASSHA - A Graphics System for Rigid-body Modelling of Macromolecular Complexes Against Solution Scattering Data, *J. Appl. Crystallogr.*, 2001, **34**(4), 527–532.
- [68] Hirai M., Iwase H., Hayakawa T., Miura K., Inoue K., Structural Hierarchy of Several Proteins Observed by Wide-angle Solution Scattering, *J. Synchrotron Radiat.*, 2002, **9**(4), 202–205.
- [69] Neutze R., Wouts R., Techert S., Davidsson J., Kocsis M., Kirrander A., Schotte F., Wulff M., Visualizing Photochemical Dynamics in Solution Through Picosecond x-ray Scattering, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **87**(19), 195508.
- [70] Ihee H., Lorenc M., Kim T. K., Kong Q. Y., Cammarata M., Lee J. H., Bratos S., Wulff M., Ultrafast x-ray Diffraction of Transient Molecular Structures in Solution., *Science*, 2005, **309**(5738), 1223–1227.
- [71] Schnablegger H., Singh Y., *The SAXS Guide*, 3rd ed., Graz: Anton Paar GmbH, Graz, 2013.
- [72] O. Glatter and O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, London: Academic Press, New York, 1982.
- [73] Kratky O., Porod G., Röntgenuntersuchung Gelöster Fadenmoleküle, *J. Colloid Interface Sci.*, 1949, **68**, 1106–1122.
- [74] Hayter J. B., Penfold J., An Analytic Structure Factor for Macroion Solutions, *Mol. Phys.*, 1980, **42**, 109–118.
- [75] Schmidt P. W., Collimation Corrections in Small Angle X-ray Scattering, *Acta Crystallogr.*, 1965, **19**(6), 938–942.
- [76] Kalkhoran I., Farklı Hayvan Gözleri Retina Çubuklarında Bulunan Rodopsin Yapıların ve Nano Disk Oluşumlarının X-Işını Saçılma Yöntemleri (SAXS/WAXS) ile İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016, 444656.
- [77] Kirste R. G., Oberthür R. C., *In Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, 1982.
- [78] Debye P., Zerstreung von Röntgenstrahlen, *Ann. Phys.*, 1915, **351**(6), 809–823.
- [79] Debye P., Bueche A. M., Scattering by an Inhomogeneous Solid, *J. Appl. Phys.*, 1949, **20**(6), 518–525.
- [80] He B. B., *Two Dimensional X-Ray Diffraction*, 1. Baskı, Wiley, New Jersey, 2009.
- [81] <http://usaxs.xray.aps.anl.gov/staff/ilavsky/irena.html> (Ziyaret tarihi: 09.10.2017).

- [82] Kline S. R., Reduction and Analysis of SANS and USANS Data Using 170 IGOR Pro, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 895–900.
- [83] Konarev P. V., Petoukhov M. V., Volkov V. V., Svergun D. I., ATSAS 2.1, a Program Package for Small-angle Scattering Data Analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**(2), 277–286.
- [84] Semenyuk A. V., Svergun D. I., GNOM. A Program Package for Small-angle scattering Data Processing, *J. Appl. Crystallogr.*, 1991, **24**(5), 537–540.
- [85] Franke D., Svergun D. I., DAMMIF, A Program for Rapid Abinitio Shape Determination in Small-angle Scattering, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**(2), 342–346.
- [86] Fritz G., Glatter O., Structure and Interaction in Dense Colloidal Systems: Evaluation of Scattering Data by the Generalized Indirect Fourier Transformation Method, *J. Phys. Condens. Matter*, 2006, **18**(36), 2403–2419.
- [87] Glatter O., A New Method for the Evaluation of Small-angle Scattering Data, *J. Appl. Crystallogr.*, 1977, **10**(5), 415–421.
- [88] Glatter O., Convolution Square Root of Band-limited Symmetrical Functions and Its Application to Small-angle Scattering Data, *J. Appl. Crystallogr.*, 1981, **14**, 101–108.
- [89] <http://www.erzincan.edu.tr/tr/cihazlarimiz-2/#post/0> (Ziyaret tarihi: 19.03.2018).
- [90] Chamot E. M., Mason C. W., *Handbook of Chemical Microscopy*, 3rd ed., John Wiley&Sons,Inc., 1958.
- [91] Heinrich K. F. J., *Electron Beam X-ray Microanalysis*, Nostrand Reinhold Company, New York, 1981.
- [92] <http://nukbilimler.ankara.edu.tr/sem/> (Ziyaret tarihi: 19.03.2018).
- [93] Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed., Brooks Cole, Utah, 1997.
- [94] Kline S. R., Reduction and Analysis of SANS and USANS Data Using IGOR Pro, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 895–900.
- [95] Cao Z., Hou S., Sun D., Wang X., Tang J., Osteochondral Regeneration by a Bilayered Construct in a Cell-free or Cell-based Approach, *Biotechnology Letters*, 2012, **34**(6), 1151-1157.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Çayır T., Akaltun Y., Memişoğlu K., Gündoğdu Ö., Structural, Elemental and Molecular Characterization of Normal And Osteoarthritic Human Articular Cartilage, *Journal of Materials Science & Nanotechnology*, 2017, **5**, 1-6.

Çayır T., Akaltun Y., Çomaklı O., Çelik A., Titanyum Üzerine Kaplanan Ca₃(PO₄)₂ Bileşiğinin Biyomekanik Özellikleri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2014, **2**(3), 153-157.

Çayır T., Akaltun Y., Gündoğdu Ö., 316L Yüzeyine SILAR Metoduyla Hidroksiapatit Kaplanması, *Fırat Üniv. Müh. Bil. Dergisi*, 2016, **28**(1), 1-5.

Akaltun Y., **Çayır T.**, Fabrication and characterization of NiO thin films prepared by SILAR method, *Journal Of Alloys And Compounds*, 2015, **625**, 144-148.

Akaltun Y., Aslan M., Yetim T., **Çayır T.**, Çelik A., The effect of wettability on corrosion resistance of oxide films produced by SILAR method on magnesium, aluminum and copper substrates, *Surface & Coatings Technology*, 2016, **292**, 121-131.

ÖZGEÇMİŞ

Tuba ayır 1987'de Erzincan'da doğdu. Lise ęrenimini Kazım Karabekir Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında girdiği Balıkesir Üniversitesi Fizik Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl içinde Erzincan Üniversitesi Fizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans ęitimine başladı. Yüksek lisans ęitiminde NiO yarıiletken ince filmin Sılar tekniği kullanılarak cam yüzey üzerine kaplanması ve karakterizasyonu konusunda çalışmaları bulunmaktadır. Ayrıca, 2013 yılında Erzincan niversitesi'nde araştırma görevlisi olup 2016 yılında 35. Madde kapsamında Kocaeli Üniversitesi Teknoloji Fakültesi'ne doktora ęitimini tamamlamak üzere görevlendirilmiş ve Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı araştırma görevlisi görevini halen sürdürmektedir.