



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**BÖBREK HASTALIKLARI BELİRTECİ OLAN
ÜRİN METABOLİTLERİNİN
RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE
HIZLI VE EŞ ZAMANLI TESPİTİ**

EMİNE FERİDE KAHVECİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EKİM 2016



**BÖBREK HASTALIKLARI BELİRTECİ OLAN ÜRİN
METABOLİTLERİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE HIZLI VE EŞ
ZAMANLI TESPİTİ**

Emine Feride KAHVECİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2016

Emine Feride KAHVECİ tarafından hazırlanan “Böbrek Hastalıkları Belirteci Olan Ürün Metabolitlerinin Raman Spektroskopisi İle Hızlı Ve Eş Zamanlı Tespiti” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

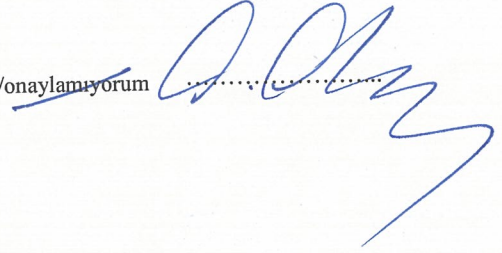
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan: Prof. Dr. Cemal ÇEVİK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Yr. Doç. Dr. İrem Doğan TURAÇLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ufuk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 19/10/2016

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Emine Feride Kahveci

19.10.2016

BÖBREK HASTALIKLARI BELİRTECİ OLAN ÜRİN METABOLİTLERİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE HIZLI VE EŞ ZAMANLI TESPİTİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Emine Feride KAHVECİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2016

ÖZET

İdrar analizi; diyabet, hipertansiyon gibi çeşitli metabolik hastalıklar, idrar yolu enfeksiyonları, böbrek fonksiyonu ve diğer bazı hastalıklar hakkında bilgi edinmek için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan bir tanesidir. Raman spektroskopisi, organik ve inorganik moleküllerin parmak izi analizini yapan optik bir teknik olup tek ya da çoklu idrar bileşiklerinin tespitinde kullanılabilir. Bu çalışmanın amacı; idrarda anormal düzeylerde bulunabilen glukoz, üre, kreatinin ve ürik asit değerlerini, alternatif ve hızlı bir metot olan Raman Spektroskopi yöntemiyle eş zamanlı olarak tespit ederek böbrek rahatsızlıklarının erken tanısını sağlayabilmektir. Bunun için öncelikle, belirlenen optimum cihaz parametreleri kullanılarak her metabolite ait Raman referans spektrumları elde edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan sentetik idrarda farklı konsantrasyonlarda bulunan dört idrar metabolitinin Raman'da ölçümleri yapılmıştır. Spesifik bantların şiddet ve alanlarından yola çıkarak her bileşen için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bant intensiteleri kullanılarak üre 2,5 ile 75 mg/ml, kreatinin 2,5 ile 70 mg/ml, glukoz 1,75 ile 70 mg/ml ve ürik asit 0,25 ile 24 mg/ml arasında sırasıyla 0,949; 0,935; 0,958 ve 0,988 R^2 değerleri ile tayin edilebilmiştir. Yöntemin tespit sınırı üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit için sırasıyla 30 mg/dl, 35 mg/dl, 27 mg/dl ve 14 mg/dl, tayin sınırı ise 89 mg/dl, 106 mg/dl, 81 mg/dl ve 43 mg/dl olarak hesaplanmıştır. Ayrıca dört idrar bileşenini içeren sentetik idrarın, Raman haritalama yöntemi ile ileri analizi gerçekleştirilmiştir. Yöntemin geçerliliği, homojenite ve tekrarlanabilirlik deneyleri ile doğrulanmıştır. Özellikle diyabet ve hipertansiyon hastalarında ileride kronik böbrek hastalığı ve sonrasında böbrek yetmezliği oluşma riski yüksek olduğundan, idrardaki potansiyel biyobelirteçlerin analizi büyük önem taşımaktadır. Çalışmamız, bu metabolitlerin düşük konsantrasyonlarda hassas bir şekilde ve saniyeler içinde eş zamanlı olarak tespit edilebildiğini göstermiştir. Bu çalışmanın, klinik uygulamaya hazırlık için önemli bir basamak olacağına inanılmaktadır. İleride taşınabilir bir Raman tanı cihazı ile hastanelerde böbrek hastalıklarıyla beraber diğer birçok hastalığın daha hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde tanısının yapılabilmesi öngörülmektedir.

Bilim Kodu : 1055.1

Anahtar Kelimeler : Raman spektroskopisi; böbrek hastalıkları; üre; kreatinin; glukoz; ürik asit

Sayfa Adedi : 97

Danışman : Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

RAPID AND SIMULTANEOUS DETECTION OF RENAL DISEASES-RELATED METABOLITES IN URINE BY RAMAN SPECTROSCOPY

(M. Sc. Thesis)

Emine Feride KAHVECI

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

October 2016

ABSTRACT

Urine analysis is one of the commonly used method to get information about the metabolic diseases such as diabetes and hypertension, urinary tract infections, kidney function and some other diseases. Raman Spectroscopy is an optical technique that analyses fingerprint of organic and inorganic molecules and also can be used for detection of single or multiple urine components. The aim of this study, to simultaneously detect glucose, urea, creatinine and uric acid that can be found at the abnormal levels in urine by using an alternative and rapid technique, Raman spectroscopy, so to provide early detection of renal diseases. Therefore, Raman reference spectra for every metabolite were firstly obtained by using optimized device parameters. Next, Raman measurements of four urine metabolites which have different concentrations in prepared synthetic urine were performed. The calibration curves were created for every metabolite via investigating the intensity and also areas of spesific bands. Based on the band intensities, urea which is between 2.5 and 75 mg/ml, creatinine which is between 2.5 and 70 mg/ml, glucose which is between 1.75 and 70 mg/ml and uric acid which is between 0.25 and 24 mg/ml were determined with the R^2 values of 0.949, 0.935, 0.958 and 0.988, respectively. Limit of detection of the method for urea, creatinine, glucose and uric acid were respectively calculated as 30 mg/dl, 35 mg/dl, 27 mg/dl and 14 mg/dl, and limit of quantification as 89 mg/dl, 106 mg/dl, 81 mg/dl and 43 mg/dl. In addition, further analysis of synthetic urine including four urine components was performed with Raman mapping. Validation of the method was confirmed with the homogeneity and reproducibility experiments. Analysis of potential urine biomarkers is greatly important particularly in diabetes and hypertension patients, since their risk at improving chronic kidney diseases and followingly renal failure is high. Our study showed that these metabolites at the low concentrations can be detected sensitively and simultaneously within seconds. It is believed that; this study would be a significant step for the preparation of clinical application. In the future, with a portable Raman diagnostic device in hospitals, many other diseases as well as renal diseases could be diagnosed more rapidly, reliably and sensitively.

Science Code : 1055.1

Key Words : Raman spectroscopy; renal diseases; urea; creatinine; glucose; uric acid

Page Number : 97

Advisor : Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

TEŞEKKÜR

Derin bilgi birikimlerini paylaşarak ufkumu açan yakın dönem tez danışmanım ve aynı zamanda bölüm başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye,

Laboratuvarında çalışmama imkân sağlarken özellikle Raman Spektroskopisi ile ilgili bilgilerini aktarmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, azmini ve çalışma disiplini örnek aldığım değerli hocam Uzm. Dr. N. Oya San KESKİN'e,

Maddi manevi yardımlarını benden esirgemeyen çalışma arkadaşım Biyolog Elifcan ONBAŞI'ya,

Hayatım boyunca desteklerini, sevgilerini yürekten hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük emeği olan ve ne yapsam haklarını ödeyemeyeceğim anneme ve babama,

Sıkıntılarımı her daim paylaşarak azaltan sevgili ablama, sen yaparsın kardeşim diyerek bana benden çok inanan abime,

Yüksek lisansım boyunca anlayışını, desteğini esirgemeyen ve aynı zamanda tezimin yazımı sırasında çeşitli bilgisayar programlarının kullanımı ile beraber birçok konuda bana yardımcı olan sevgili eşim Dr. Zafer KAHVECİ'ye ve üzerimde emeği olan adlarını sayamadığım herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	iv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı	3
2.1.1. Böbrek.....	3
2.1.2. Kronik böbrek hastalığının epidemiyolojisi.....	4
2.1.3. Kronik böbrek hastalığının tanısı	5
2.1.4. Kronik böbrek hastalığı için risk faktörleri.....	6
2.1.5. Kronik böbrek hastalığının evreleri	7
2.1.6. Kronik böbrek hastalığının etiyolojisi.....	8
2.2. İdrar Metabolitleri ve Hastalıklar ile İlişkisi.....	9
2.2.1. Üre.....	10
2.2.2. Kreatinin	12
2.2.3. Glukoz.....	14
2.2.4. Ürik asit.....	15
2.3. Raman Spektroskopisi	18

	Sayfa
2.3.1. Tarihi.....	19
2.3.2. Raman spektroskopisi bileşenleri	20
2.3.3. Raman spektroskopisinin çalışma prensibi	23
2.3.4. Bölgesel Raman taraması.....	26
2.3.5. Raman spektroskopisinin çeşitleri	27
2.3.6. Raman spektroskopisinin uygulama alanları	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1. Kimyasal malzemeler	33
3.1.2. Cihazlar	33
3.1.3. Sarf malzemeler	33
3.1.4. Ölçüm sistemleri	33
3.1.5. Veri analiz sistemleri	35
3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı	35
3.2.1. Sentetik idrar hazırlanması	36
3.2.2. Üre çözeltilerinin hazırlanması	37
3.2.3. Kreatinin çözeltilerinin hazırlanması	37
3.2.4. Glukoz çözeltilerinin hazırlanması	37
3.2.5. Ürik asit çözeltilerinin hazırlanması	37
3.2.6. Tüm metabolitleri içeren sentetik idrar çözeltisinin hazırlanması	38
3.3. Yöntemler	38
3.3.1. Raman spektroskopi cihazının kalibrasyonu	38
3.3.2. Optimizasyon çalışmaları.....	38
3.3.3. Raman spektroskopisi ölçümü	39

	Sayfa
3.3.4. Yöntemin geçerliliği	41
4. BULGULAR	43
4.1. Silikon Plaka ile Raman Spektroskopisinin Kalibrasyonu	43
4.2. Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	43
4.2.1. Lazer ışının dalga boyu seçimi	44
4.2.2. Lazerin integrasyon süresinin belirlenmesi	47
4.2.3. Lazerin tekrar sayısının belirlenmesi	48
4.3. Raman Spektroskopisi Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi	49
4.3.1. Alüminyum folyo ve cam yüzey analizlerinin karşılaştırması	49
4.3.2. Sentetik idrar ve gerçek idrara ait Raman spektrumları karşılaştırması ...	49
4.3.3. İdrar metabolitlerine ait Raman referans spektrumlarının belirlenmesi ...	50
4.3.4. Konsantrasyon ölçümleri	54
4.3.5. Sentetik idrardaki dört metabolitin eş zamanlı tespiti.....	57
4.4. Yöntemin Geçerliliğinin Doğrulanması.....	60
4.4.1. Kalibrasyon grafikleri ile doğrusallığın değerlendirilmesi	60
4.4.2. Tekrarlanabilirlik deneyleri ile kesinliğin değerlendirilmesi.....	69
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	85
EKLER.....	95
EK-1. 785 nm’de alınan insan idrarına ait Raman spektrumu	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kronik böbrek hastalığının GFR değerlerine göre sınıflandırılması	8
Çizelge 2.2. RS’de yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları (Nd/YAG: neodymium-kaplanmış itriyum alüminyum garnet)	22
Çizelge 3.1. Hazırlanan sentetik idrar içeriği.....	36
Çizelge 4.1. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik ölçüm sonuçları.....	75



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 Üre döngüsü reaksiyonları.....	11
Şekil 2.2. Kreatin ve kreatinin sentezi reaksiyonları	13
Şekil 2.3. Pürin nükleotidlerinden ürik asit sentezi	16
Şekil 2.4. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.5. Elektromanyetik spektrum.....	21
Şekil 2.6. Yakın UV, görünür ışık ve yakın IR dalga boylarının ışık spektrumunda yer aldığı bölgeler	21
Şekil 2.7. Işığın bir madde ile etkileşimi sırasında oluşan farklı süreçler	23
Şekil 2.8. Raman saçılmasının molekülün titreşim enerji düzeyleri ile olan ilişkisi	24
Şekil 2.9. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılma hatları.....	25
Şekil 4.1. Cihaz kalibrasyonu için silikon plakadan alınan Raman bandı.....	43
Şekil 4.2. Sentetik idrarın 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları	44
Şekil 4.3. Distile su içerisindeki 75 mg/ml ürenin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları	45
Şekil 4.4. Distile su içerisindeki 75 mg/ml kreatininin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları.....	45
Şekil 4.5. Distile su içerisindeki 75 mg/ml glukozun 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları.....	46
Şekil 4.6. Distile su içerisindeki 25 mg/ml ürik asitin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları.....	46
Şekil 4.7. Ürenin distile sudaki çözeltisinden, lazerin 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 sn integrasyon süreleri ile elde edilen Raman spektrumları.....	47
Şekil 4.8. Ürenin distile sudaki çözeltisinden, lazerin 1, 3, 5, 10 ve 15 tekrarları ile elde edilen Raman spektrumları.....	48
Şekil 4.9. Alüminyum folyo ve cam yüzeyinden alınan Raman spektrumları.....	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Hazırlanan sentetik idrar ve ticari sentetik idrar negatif kontrol örneklerine ait Raman spektrumlarının karşılaştırması.....	50
Şekil 4.11. Üre çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu.....	51
Şekil 4.12. Kreatinin çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu.....	52
Şekil 4.13. Glukoz çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu.....	52
Şekil 4.14. Ürik asit çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu.....	53
Şekil 4.15. Distile su, üre, glukoz, kreatinin ve ürik asite ait Raman referans spektrumları	54
Şekil 4.16. Artan konsantrasyonlarda üre içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları	55
Şekil 4.17. Artan konsantrasyonlarda kreatinin içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları	55
Şekil 4.18. Artan konsantrasyonlarda glukoz içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları	56
Şekil 4.19. Artan konsantrasyonlarda ürik asit içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları	57
Şekil 4.20. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit metabolitlerini aynı anda içeren sentetik idrarın Raman spektrumu ve eş zamanlı tespitin gösterimi.....	58
Şekil 4.21. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asiti aynı anda içeren sentetik idrarın Raman haritalaması ile 3600 noktadan elde edilen ortalananmış Raman spektrumu...	59
Şekil 4.22. Sentetik idrarın Raman haritalaması ile elde edilen a. dört metabolitin çözeltide dağılımını gösteren görüntü ve b. tarama görüntüsündeki her bir metaboliti temsil eden dört bölgeden alınan Raman spektrumları...	60
Şekil 4.23. Farklı üre konsantrasyonlarına ait 1004 cm ⁻¹ merkezli Raman bantları.....	61
Şekil 4.24. Sentetik idrardaki farklı üre konsantrasyonlarına karşı 1004 cm ⁻¹ 'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri..	62
Şekil 4.25. Farklı kreatinin konsantrasyonlarına ait 682 cm ⁻¹ merkezli Raman bantları.	63

Şekil	Sayfa
Şekil 4.26. Sentetik idrardaki farklı kreatinin konsantrasyonlarına karşı 682 cm ⁻¹ 'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	64
Şekil 4.27. Farklı glukoz konsantrasyonlarına ait 521 cm ⁻¹ merkezli Raman bantları ...	65
Şekil 4.28. Sentetik idrardaki farklı glukoz konsantrasyonlarına karşı 521 cm ⁻¹ 'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	66
Şekil 4.29. Farklı ürik asit konsantrasyonlarına ait 627 cm ⁻¹ merkezli Raman bantları.	67
Şekil 4.30. Sentetik idrardaki farklı ürik asit konsantrasyonlarına karşı 627 cm ⁻¹ 'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	68
Şekil 4.31. 35 mg/ml üre içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları	70
Şekil 4.32. 1004 cm ⁻¹ 'deki üre bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri.....	70
Şekil 4.33. 35 mg/ml kreatinin içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları	71
Şekil 4.34. 682 cm ⁻¹ 'deki kreatinin bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri	71
Şekil 4.35. 35 mg/ml glukoz içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları	72
Şekil 4.36. 521 cm ⁻¹ 'deki glukoz bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri.....	72
Şekil 4.37. 10 mg/ml ürik asit içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları	73
Şekil 4.38. 627 cm ⁻¹ 'deki ürik asit bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri.....	73
Şekil 4.39. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit örneklerinden gün içinde 5 bağımsız analiz ile toplam 3 günde alınan Raman spektrumları.....	74

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Hintli fizikçi Sir C. V. Raman ve ona Nobel ödülünü getiren çalışmasının kapak resmi.....	19
Resim 2.2. NanoRam® elde taşınabilir Raman spektrometresi	32
Resim 3.1. Konfokal Raman spektroskopi düzeneği a. 785 nm lazer kaynağı b. 532 nm lazer kaynağı.....	34
Resim 3.2. Raman spektroskopik ölçümleri almada kullanılan Witec Control yazılımın ekran görüntüsü.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
λ	Dalga boyu
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
cm	Santimetre
cm^{-1}	Dalga sayısı
dk	Dakika
dl	Desilitre
g	Gram
l	Litre
m^2	Metrekare
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
nm	Nanometre
R^2	Korelasyon katsayısı
sn	Saniye
Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ATP	Adenozin Trifosfat
a.u.	Arbitrary Unit
BUN	Kan Üre Azotu
CARS	Koherent Anti-Stokes Raman Spektroskopisi
CCD	Yük Eşleşmiş Cihaz
CREDIT	Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevalans Çalışması
CRR	Kozmik Işın Giderimi
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
eGFR	Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometresi
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HLA	Hibrid Doğrusal Analiz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KBH	Kronik Böbrek Hastalığı
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
LOD	Tespit Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
NIR	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi
Nd/YAG	Neodimiyum-Yag Lazeri
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
PCA	Temel Bileşen Analizi
PDA	Foto Diyot Dizileri
pH	Hidrojenin Gücü
pmp	Milyon Nüfus Başına Düşen Hasta Sayısı
PMT	Foto Çoğaltıcı Tüp
RNA	Ribonükleik Asit
RRS	Rezonans Raman Spektroskopisi
RS	Raman Spektroskopisi

Kısaltmalar**Açıklamalar****RSD**

Bağıl Standart Sapma

SD

Standart Sapma

SDBH

Son Dönem Böbrek Hastalığı

SDBY

Son Dönem Böbrek Yetmezliği

SNOM

Yakın Alan Taramalı Optik Mikroskop

SNP

Tek Nükleotid Polimorfizmi

TND

Türk Nefroloji Derneği

UHTS

Ultra-High Throughput Spectrometers

UV

Ultraviyole

YGRRS

Yüzeyde Güçlendirilmiş Rezonans RS

YGRS

Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH) artan insidans ve prevalansı ile dünya çapında önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. KBH farkındalığının ve erken tanısının düşük olması sebebiyle sıklıkla böbrek fonksiyonlarında bozulma, kronik böbrek yetersizliği ve ardından son dönem böbrek yetersizliği ile sonuçlanır [1]. Son dönem böbrek yetmezliği çok önemli ekonomik, sosyal ve tıbbi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek olumsuz sonuçların engellenebilmesi için erken tanı büyük önem taşımaktadır. Tanı ne kadar hızlı ve doğru ise tedavi süreci o kadar hızlı ve başarılı olacaktır.

Klinik olarak böbrek fonksiyonlarının ölçülmesinde ve KBH'nın tanısında yaygın olarak glomerüler filtrasyon hızı (GFR) kullanılır [2]. Bir dakika süresinde her iki böbrekteki glomerüler boyunca filtre edilen sıvı miktarı olarak tanımlanan GFR, serum veya idrar kreatinin düzeyleri ile çeşitli parametreler (hastanın yaşı, cinsiyeti, ırkı, kilosu, serum üre ve albümin düzeyleri) kullanılarak hesaplanır [1, 2].

İdrar örnekleri, kandan fazla miktarda ve kolayca elde edilebilir. İdrar analizi; diyabet, hipertansiyon gibi çeşitli metabolik hastalıklar, idrar yolu enfeksiyonları, böbrek fonksiyonu ve diğer bazı hastalıklar hakkında bilgi edinmek için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan bir tanesidir [3-5]. İdrar, özellikle böbreğin sıvı biyopsisi olarak düşünülebilir. İdrardaki metabolitlerin kantitatif analizine yönelik kullanılan güncel metotlardan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kapiller elektroforez yöntemi, zaman alan ve rutin analizler için uygun olmayan metotlardır [6]. HPLC yönteminde birçok organik çözücüye ihtiyaç olmakta ve kolonlar kolayca kontamine olabilmektedir [7]. Sıklıkla kullanılan ve toz ilaçların emdirilmiş olduğu test kağıtları ise kreatinin, üre, glukoz gibi idrar metabolitlerinin yarı kantitatif ölçümünü sağlamaktadır [6]. Yine rutin olarak kullanılan fotometrik ve enzimatik metotlar, çeşitli endojen ve ekzojen bileşiklerin karışımından ötürü idrar metabolitlerinin analizinde sınıtlıdır [7].

Son yıllarda kullanımı giderek artan Raman spektroskopisi (RS), organik ve inorganik moleküllerin parmak izi analizini yapan optik bir teknik olup tek ya da çoklu idrar bileşiklerinin tespitinde kullanılabilir [8, 9]. Literatürde, idrar analizi için RS'nin kullanılabilirliğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. İlk olarak Dou ve diğerleri insan

idrarından kantitatif Raman analizi yapmışlardır [6]. Premasiri ve diğerleri idrar bileşiklerinin analizi için yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) aktif substratı olarak altın kolloid kullanmışlardır [9]. McMurdy ve Berger idrar örneklerinden RS ile kreatinin ölçümü yapmışlardır [8]. Yakın zamanda Bispo ve diğerleri, şeker ve hipertansiyon hastalarının idrar analizini RS yöntemi ile çalışmışlardır [4]. Tüm bu grupların çalışmaları ve elde edilen sonuçlar, daha basit ve metabolit sayısı daha fazla olan bir yöntemin geliştirilebilmesine ışık tutmuştur.

Bu çalışmanın amacı; idrarda anormal düzeylerde bulunabilen glukoz, üre, kreatinin ve ürik asit değerlerini, alternatif ve hızlı bir metot olan RS yöntemiyle eş zamanlı olarak tespit ederek böbrek rahatsızlıklarının erken tanısını sağlayabilmektir. Bunun için her metabolite ait Raman referans spektrumlarının belirlenmesinin ardından konsantrasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Raman haritalama yöntemi ile tüm idrar bileşenlerini içeren sentetik idrarın ileri analizi yapılmıştır. Yöntemin geçerliliği doğrusalılık, hassasiyet ve kesinlik parametreleriyle araştırılmıştır. Özellikle diyabet ve hipertansiyon hastalarında ileride böbrek rahatsızlığı oluşma riski yüksek olduğundan, idrardaki bu potansiyel biyobelirteçlerin analizi büyük önem taşımaktadır [4].

Bu çalışmanın önemi; Raman spektroskopisi yöntemi ile her hangi bir nanopartikül kullanmadan düşük konsantrasyonlardaki dört farklı idrar metabolitinin son derece hassas bir şekilde ve saniyeler içinde eş zamanlı olarak tespit edilebildiğini göstermektedir. Örnek üzerinde herhangi bir tahribata yol açmayan bu analiz, ayırma, seyreltme ya da diğer ajanlarla karıştırma gibi ek bir kimyasal basamak gerektirmemesi ile güncel tekniklere göre üstünlük sağlamaktadır [9].

Bu zamana kadar cihazın yüksek maliyetinden ve büyük boyutlarından dolayı laboratuvar dışında kullanımı zor olmuştur [10]. Fakat ileride düşük maliyetli taşınabilir bir Raman tanı cihazı ile klinik alanda yaygın uygulamaya geçilebileceği öngörülmektedir [11]. Sadece idrarın değil, kan, serum, tükürük, ter gibi diğer vücut sıvılarının biyokimyasal analizinde bu alternatif teknik kullanılabilir ve hatta var olan laboratuvar metotlarının yerine geçebilir [9, 12, 13].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı

KBH genel bir ifade olarak böbreğin yapı ve fonksiyonunu etkileyen heterojen bir bozukluktur [14]. Son dönem böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler komplikasyonlara yol açması sebebiyle tüm dünyada gittikçe büyüyen bir sağlık problemi haline gelmiştir [15]. KBH, nedeni ne olursa olsun en az üç ay süren ve GFR ile ifade edilen böbrek hasarı ve/veya azalmış böbrek fonksiyonu olarak da tanımlanır [1, 16]. Hastalığın şiddetine göre beş evrede sınıflandırılır [17]. KBH rutin laboratuvar testleriyle saptanabilir ve bazı tedaviler hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir. Böylece hayatta kalma şansı ve yaşam kalitesi artabilmektedir.

2.1.1. Böbrek

Böbrekler, omurgalılarda bulunan düzenleyici rol oynayan boşaltım organlarıdır. Temel fonksiyonu pH homeostazını korumakla beraber kandaki elektrolitlerin dengesini düzenlemektir. Aynı zamanda en bilinen fonksiyonu olarak kandaki organik moleküllerin fazlasını gidererek metabolizmadan atık ürünlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Homeostatik fonksiyonları içerisinde elektrolitlerin düzenlenmesi, asit-baz dengesinin korunması ve kan basıncının düzenlenmesi yer alır. Kanın doğal bir filtresi olarak vücuda hizmet ederler. Başta üre ve amonyum gibi azotlu atıkları kandan süzerek su ile birlikte idrar olarak boşaltırlar. Su, glukoz ve amino asitlerin geri emiliminden de böbrekler sorumludur. Ayrıca kalsitrol ve eritropoetin gibi hormonları salgılar. Negatif geribildirimde rol oynayan önemli bir enzim olan renin de böbreklerde üretilir [18].

Karınzarı arkası (retroperitoneal) bölgesinde yer alan böbrekler, sağ ve sol renal arterlerden kanı alıp süzerek sağ ve sol renal venlere iletirler. Her böbrek, mesaneye boşalan üreter içine doğru idrarı boşaltır ve kan için mikroskobik filtre görevi gören yaklaşık bir milyon nefron içerir [18]. Böbrek fonksiyonunun çalışma alanı renal fizyoloji kapsamında olup, böbrek hastalıklarıyla ilgilenen tıp dalı nefrolojidir. “Nephros” Yunanca “böbrek” anlamına gelir. Böbrek (ler) ile ilgili anlamında kullanılan renal sözcüğü ise Latince “renalis” kelimesinden gelir [19].

Böbrek hastalıkları çok çeşitli olmasına rağmen genellikle karakteristik klinik belirtiler gösterir. Yaygın olarak görülen klinik olgular nefritik ve nefrotik sendromlar, renal kistler, akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek hastalığı, idrar yolu enfeksiyonu, nefrolitiasis ve idrar yolu tıkanıklığıdır [20]. Ayrıca çeşitli böbrek kanserleri mevcut olup en yaygını renal hücreli karsinomdur. Kanserler, kistler ve diğer bazı renal hastalıklar, nefrektomi olarak bilinen böbreğin alınması yoluyla tedavi edilebilir. GFR sonucunda böbrek fonksiyonlarının çok zayıfladığı görülürse diyaliz ve böbrek nakli tedavi seçenekleri arasında olabilir.

2.1.2. Kronik böbrek hastalığının epidemiyolojisi

KBH, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yetişkin popülasyonunun yaklaşık %11'ini etkilemektedir. Hastalığın erken evrelerinin prevalansı (%10,8), böbrek yetmezliği prevalansından (%0,1) 100 kat daha fazladır. ABD'de diyaliz ve nakil yolu ile tedavi edilen böbrek yetmezliği olan hastaların sayısı 1999 yılında 340 000 iken 2010'da 651 000'e çıkmıştır [1]. 2013 yılı ABD Renal Veri Sistemi raporuna göre son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) insidansının¹ en yüksek olduğu ülkeler Jalisco (Meksika), ABD ve Tayvan'dır. SDBY prevalans² sıralaması ise Tayvan, Japonya ve ABD şeklindedir [21].

2008 yılı Türk Nefroloji Derneği (TND) verilerine göre, Türkiye'deki son dönem böbrek yetmezliği insidansı, 2000 yılından beri dört kat artış gösterirken prevalans değeri iki kat artış göstermiştir (insidans, 52-188 pmp- milyon nüfus başına düşen hasta sayısı-; prevalans, 358-756 pmp) [22, 23]. 2010 yılında TND tarafından yapılan Türkiye Kronik Böbrek Hastalığı Prevalans Çalışmasına (CREDIT) göre ülkemizde erişkinlerin %15,7'sinde KBH mevcuttur. Bu oran ülkemizde 7 milyondan fazla KBH'lı kişi bulunduğunu, yani her 6-7 yetişkinden birinin herhangi bir evresinde böbrek hastası olduğunu göstermektedir. Nüfusun %5,09'unda ise KBH'ya bağlı olarak gelişen ve son döneme ilerleme riski olan orta veya ileri derecede böbrek yetersizliği görülmüştür. Bu da ülkemizdeki her 20 yetişkinden birinde kritik düzeyde KBH olduğunu göstermiştir. Yine TND verilerine göre ülkemizde diyaliz tedavisi gören hasta sayısı ise 13 000 civarındadır [24]. Tüm bu sonuçlar ışığında, KBH'nın dünyada olduğu gibi Türkiye'de de boyutları giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu söylemek mümkündür [17].

1 Belirli bir zaman aralığında (sıklıkla 1 yılda) başlayan yeni hasta sayısı

2 Herhangi bir zaman kesitindeki bütün hastalar

2.1.3. Kronik böbrek hastalığının tanısı

Kronik böbrek hastalığının tanısı kan tahlili, idrar tahlili, görüntüleme yöntemleri veya biyopsi ile yapılabilmektedir [25].

İdrar analizinin ilk aşaması olan fiziksel incelemede idrarın rengine, konsantrasyonuna ve berraklığına bakılır. İdrar dipstick testi ile yapılan kimyasal incelemede idrarda olmaması gereken protein, kan, glukoz gibi anormal bileşenlerin varlığı incelenir. Bir sonraki değerlendirme aşaması, idrarın mikroskop altında incelenmesi ile sağlanır. İdrarda bulunmaması gereken maddeler ile normalde görülen maddelerin miktarı araştırılır. Epitel hücreleri, lökosit, eritrosit, kristaller ve mikroorganizmalar tanımlanıp sayılır. Dipstick ile idrarda proteinüri ile eritrosit ve lökosit saptanması böbrek hasarının bir göstergesi olabilir. Hastadan istenen 24 saatlik idrarda protein ve atık ürünlerin (üre nitrojen ve kreatinin) analizi yapılır. Ayrıca idrardaki kreatinin ve üre miktarı böbrek fonksiyonunun seviyesi ile GFR hesaplanmasında kullanılabilir [25].

Böbrek fonksiyonlarının ölçülmesinde ve böbrek hastalığının evresini tanımlamada kullanılan en iyi yöntem glomerüler filtrasyon hızının ölçülmesidir. GFR, bir dakika süresinde her iki böbrekteki glomerüllerin bowman boşluklarında biriken filtratın miktarı olarak tanımlanmaktadır [2]. GFR, çoğunlukla 24 saatlik üriner kreatininin serum kreatinine bölünmesiyle elde edilen kreatinin klirensinden¹ hesaplanır [4]. Kan kreatinin düzeyi, yaş, ırk, cinsiyet, kilo ve diğer bazı faktörler kullanılarak da GFR hesaplanabilir. Tahmini GFR (eGFR) ise sadece serum kreatinininden hesaplanabilmektedir. GFR değeri sağlıklı genç erişkinlerde 120 ile 130 ml/dk/1,73 m² olmakta ve yaşla beraber giderek azalmaktadır [26-29]. KBH tanısı koyulabilmesi için GFR değerinin en az üç ay süreyle 60 ml/dk/1,73 m²'nin altında olması veya en az 3 ay süreli böbrek hasarının varlığının kanıtlanması gerekmektedir [14]. Bu durum böbreğin normal işlevinin yarısının ya da daha fazlasının kaybedildiğini göstermekte ve böbrek hastalığı ilerledikçe GFR değeri azalmaktadır [1].

Serum kreatinini ve kan üre azotu (BUN) böbrek hastalıklarının tespitinde en yaygın kullanılan kan testleridir. Kreatinin, kaslarda bulunan kreatin ve fosfokreatin maddelerinin

¹ Bir dakikada kreatinininden temizlenen plazma hacmi (ml/dk)

yıkımı sonucu ortaya çıkar. Üre ise protein yıkımı sonucu oluşan atık bir üründür. Böbrek işlevi bozuldukça bu maddelerin kandaki düzeyleri artmakta ve idrarda kreatinin klirensi azalmaktadır. Ayrıca böbreğin fonksiyon bozukluğu özellikle kandaki potasyum, fosfor ve kalsiyum gibi elektrolitlerde dengesizliğe yol açar. Beraberinde genellikle kanın asit-baz dengesi de bozulmaktadır [25].

Ultrason, böbrek hastalıklarının tanısında sıklıkla kullanılan naninvaziv bir görüntüleme yöntemidir. Özellikle kronik böbrek yetmezliği tanısında pratikte en çok kullanılan yöntem radyolojik olarak böbreklerin küçük olduğunun gösterilmesidir. KBH'da böbrekler genellikle küçüldüğü gibi normal boyutlarda ya da erişkin polikistik böbrek hastalığı, diyabetik nefropati ve amiloidozis durumlarında daha büyük boyutlarda görülebilir. Ultrason, böbreklerde veya idrar yolunda bir problem olup olmadığı, böbrek taşı ya da tümör varlığı ile böbreklerdeki kan dolaşımı hakkında bilgi vermektedir [25].

Böbrek hastalığının nedeninin belirsiz olduğu durumlarda ya da belirli bir böbrek hastalığı tipini kontrol için biyopsi gerekebilir. Biyopsi böbrek dokusundan küçük bir örnek alınarak mikroskop altında incelenmek suretiyle gerçekleştirilir [25].

2.1.4. Kronik böbrek hastalığı için risk faktörleri

Her insan her yaşta KBH'ya yakalanabilir. Ancak bazı insanlarda böbrek hastalığı diğerlerine göre daha yüksek oranla gelişebilmektedir. KBH'ya yatkınlığı artıran risk faktörleri arasında; ileri yaş, akut böbrek yetmezliği görülen aile öyküsü, belirli bir ırka ait olma (Afrikalı Amerikalı, İspanyol Amerikalı, Asyalı, Pasifik adalı ve Amerikalı Kızılderililer gibi), azalmış nefron kütlesi (nefrektomi öyküsü, düşük doğum kilosu) ve genetik özellikler bulunmaktadır [14].

KBH'ya yol açan hastalık ve durumlar da risk faktörlerindedir. Bunlardan en önemlileri kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için risk faktörleri olan hipertansiyon, diyabet ve obezite ile KVH, otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritematozus, vaskülit), enfeksiyonlar (bakteri, HBV, HCV, HIV, şistozomyas, sıtma), çeşitli ilaç ya da toksinlerdir [14]. Böbrek hasarına neden olan idrar yolları enfeksiyonu, üriner sistem taşları ve üriner sistem obstrüksiyonu da risk faktörleri arasındadır [1].

Türkiye’de 2010 yılında yapılan CREDIT çalışmasında KBH’lı hastalarda hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, obezite ve metabolik sendrom hastalıklarının, KBH’lı olmayanlara göre daha yaygın olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber ileri aşamadaki kronik böbrek hastalarında bu kardiyovasküler risk faktörlerinin giderek daha da yaygın hale geldiği görülmüştür. Bu sebeple KBH ile KVVH’nın risk faktörleri arasında güçlü bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Yine CREDIT çalışması Türkiye’de KBH prevalansının kadınlarda, yaşlılarda, kırsal ve bazı coğrafik bölgelerde (Marmara, Güneydoğu Anadolu) daha yüksek olduğunu göstermiştir [17]. İsveç’deki bir çalışmada kadın ve erkeklerde, hayatın herhangi bir evresinde görülen obezitenin, KBH riskinde 3-4 kat artmaya neden olduğu belirtilmiştir [30].

Sonuç olarak KBH ve kardiyovasküler risk faktörlerinin beraber görülmesi, morbidite (hastalık oranı) ve mortaliteye (ölüm oranı) etki eden en büyük faktördür [17].

2.1.5. Kronik böbrek hastalığının evreleri

Giderek artan çalışmalar, KBH’nın erken tanı ve tedavisi ile bazı kötü sonuçların önlenebileceğini veya geciktirilebileceğini göstermiştir [31]. Maalesef tanısı koyulamamış ve tedavi edilmemiş KBH’nın önlenmesi de mümkün olmamaktadır [32-34]. Tanıyı engelleyen sebeplerin bir kısmı KBH’nın tanımı ve progresyonundaki evrelerin sınıflandırılması üzerindeki uyumsuzluktur [35]. Bir kısmı da tanıda kullanılan basit testlerin tek bir uygulamasının olmamasından kaynaklanmaktadır [1].

National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) tarafından hazırlanan 2002 yılı Kronik Böbrek Hastalığı Değerlendirme ve Sınıflama Kılavuzu’na göre KBH, GFR değerlerine göre beş evrede sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.1.). Böylece uluslararası bir kriter oluşturulmuştur. 1’den 5’e kadar olan tüm evreler KBH’lı hastaları kapsamaktadır. İlk sırada herhangi bir evreye girmeyen kişiler, KBH geliştirme riski yüksek olanları ifade etmektedir. Böbrek hastalığı ilerledikçe GFR değerinde düşme gözlenmektedir. Böbrek yetmezliği terimi, son dönem böbrek hastalığı (SDBH) ile aynı manaya gelmemektedir. SDBH diyaliz ya da transplantasyon ile tedavi edilen hastayı ifade etmekte olup KBH’nın herhangi bir evresini tanımlamaz [1].

Çizelge 2.1. Kronik böbrek hastalığının GFR değerlerine göre sınıflandırılması [1]

KBH Evresi	Tanımı	GFR (ml/dk/1,73 m ²)
-	Normal GFR ile KBH için risk faktörleri	≥60
1	Normal ya da artmış GFR ile böbrek hasarı	≥90
2	GFR’de hafif azalma ile böbrek hasarı	60-89
3	GFR’de orta derece azalma	30-59
4	GFR’de ciddi (çok fazla) azalma	15-29
5	Böbrek yetmezliği (SDBY)	<15 veya diyaliz

2.1.6. Kronik böbrek hastalığının etiyojisi

Diyabetik kökenli böbrek hastalığı Amerika’daki böbrek yetersizliğinin en büyük nedenidir. Olguların yaklaşık 2/3’ünden diyabet ve hipertansiyon sorumludur. Kandaki şeker oranı çok yükseldiğinde, böbrek, kalp, kan damarları, sinirler ve göz gibi vücudun birçok bölümü zarar görür. Kanın, kan damarlarının duvarlarına karşı yaptığı basıncın artmasıyla oluşan yüksek tansiyon, eğer kontrol edilmezse kalp krizi, felç ve KBH’ya yol açabilir. Bunun tersi olarak KBH da yüksek tansiyon sebebi olabilir. Diyabetik kökenli olmayan böbrek hastalıkları; glomerüler, vasküler, tübülointerstitial ve kistik böbrek hastalıklarını kapsamaktadır. Bunlardan glomerülo nefrit, böbrek hastalıklarının üçüncü en yaygın nedenidir [1].

KBH’nın Amerika’daki yaygın nedenleri [36];

- Tip1 ya da tip 2 diyabet
- Hipertansiyon
- Glomerülo nefrit (böbrekte süzme işlevini yapan glomerüllerin inflamasyonu)
- İnterstisyel nefrit (böbrek tübüllerinin ve çevre yapıların inflamasyonu)
- Polikistik böbrek hastalığı gibi kalıtsal hastalıklar

- Vücudun immün sistemini etkileyen lupus ve diğer bazı hastalıklar
- Prostat büyümesi, böbrek taşları veya tümör gibi problemlerden dolayı üriner sistemin uzun süreli obstrüksiyonu (tıkanıklığı)
- Vezikoüreteral reflü (böbreğe idrar kaçağına sebep olan bir malformasyon)
- Tekrarlayan böbrek enfeksiyonu (piyelonefrit)

TND 2012 yılı Böbrek Kayıt Sistemi verilerine göre ülkemizdeki yeni kronik böbrek yetersizliği olgularının etiyolojik nedenleri ve yüzdelik dilimleri şu şekildedir [37];

- Diyabetik nefropati (%36,6)
- Hipertansiyon, nefroskleroz (%27,4)
- Kronik glomerülonefrit (%7,3)
- Kistik böbrek hastalıkları (%4,2)
- Ürolojik hastalıklar (Taş, obstrüksiyon, vezikoüreteral reflü) (-)
- Kronik interstisyel nefrit (%2,7)
- Bilinen diğer nedenler (%11,3)
- Belirsiz (%10,5)

Geçmişte KBH oluşmasında en önemli sebep glomerülonefrit iken, günümüzde diyabetik nefropati tüm ırklarda KBH'nın nedenleri arasında ilk sırada gelmektedir [21]. Ülkemizde 1995 yılından bu yana olan kayıtlar incelendiğinde, SDBY nedenlerinden glomerülonefrit oranının giderek azaldığı, diyabet ve hipertansiyon oranlarının ise zamanla arttığı görülmektedir. Nitekim yukarıdaki TND'ye ait insidans verilerine göre SDBY'li hastaların %64'ünde etiyolojik neden diyabet ve hipertansiyondur.

2.2. İdrar Metabolitleri ve Hastalıklarla İlişkisi

Nefronlarda filtrasyon, geri emilim ve salgılama olmak üzere üç aşamada oluşan idrarın %91-96'sı sudan oluşmaktadır. Geri kalanı üre, klorür, sodyum, potasyum, kreatinin, ürik asit ve diğer çözülmüş iyonlar ile inorganik ve organik bileşikleridir [38]. Bu tez kapsamında idrar bileşenlerinden üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit üzerinde çalışıldığı için sadece bu metabolitlerle ilgili bilgilere yer verilmiştir.

2.2.1. Üre

Üre, kimyasal formülü $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ olan organik bir bileşiktir. İki amin grubuna bağlanmış bir karbonil grubu içeren ve azotlu bir bileşik olan üre karbamid olarak da bilinir. Katı ve kokusuz beyaz kristaller ya da peletler şeklindedir. Su ve alkolde iyi çözünen üre, asidik veya bazik özelliğe sahip değildir [39].

Fizyolojik önemi büyük olan üre, idrarda bulunan nitrojen içeren bileşiklerin başında gelmektedir [9]. İdrarla atılan kısım vücuttaki ürenin %90'ını oluştururken, geri kalan az bir kısım ter, süt ve gözyaşı ile atılmaktadır. Yetişkin bir insanın vücudundan günde 25-30 g üre idrarla atılırken, bu miktar yaşlanmayla beraber her yıl daha da azalmaktadır. Böbreklerden süzilemeyen ürenin kanda birikerek normal değer üzerine çıkması halinde üremi oluşur. Ürenin kan serumundaki düzeyi normalde 10,2-49,8 mg/dl arasında değişmektedir [40]. Ancak bu değer akut böbrek hastalığı durumunda 720-900 mg/dl'ye, KBH'de 300-420 mg/dl'ye kadar yükselebilmektedir [41].

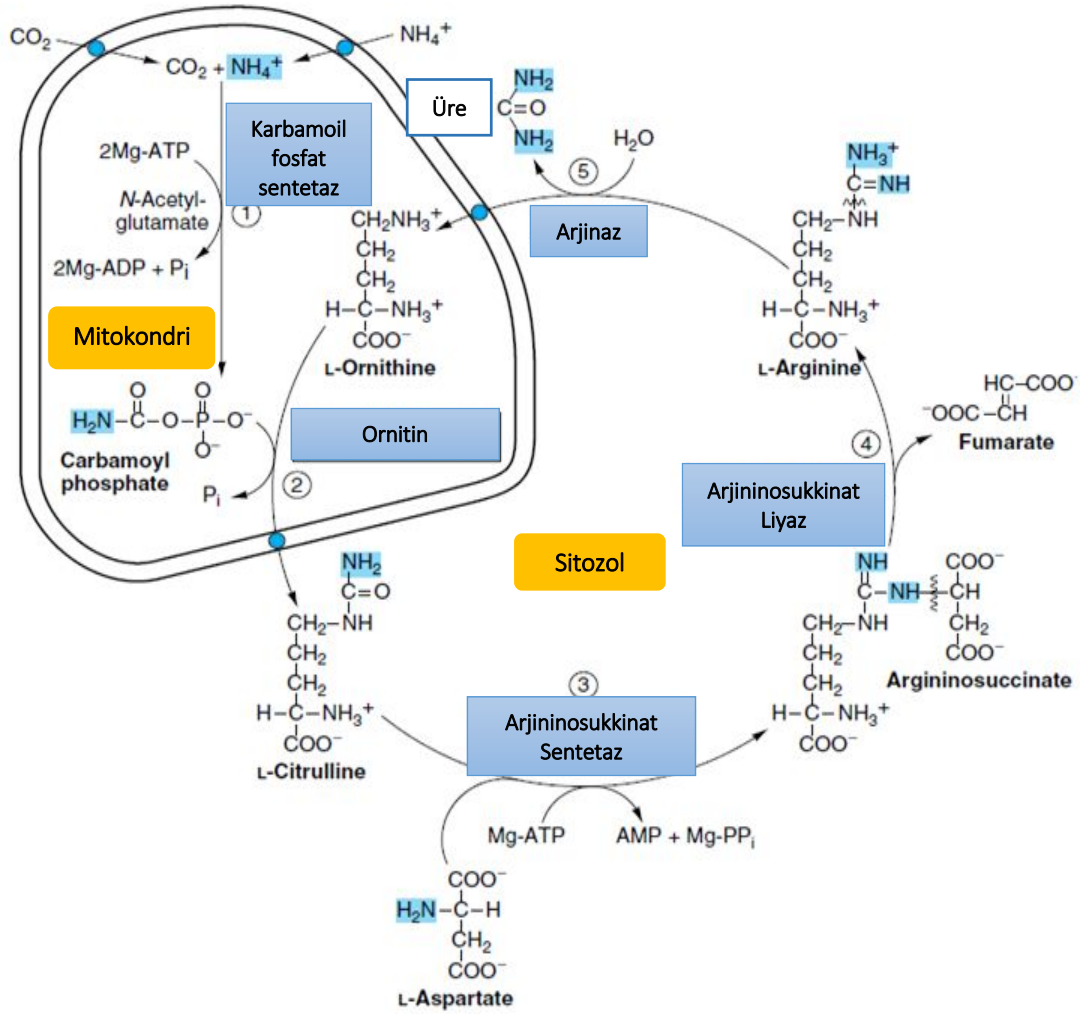
Ürenin idrardaki miktarı değişken olup günlük üre atılımı, 490-2690 ml idrarda 342 ± 67 mmol'dur [42]. 1996 yılında yapılan bir araştırmada idrardaki normal üre seviyesinin < 20 mg/dl olduğu belirtilmiştir [6]. Anormal üre düzeyleri çoğunlukla karaciğer hastalığı [43], böbrek hastalığı, kalıtsal üre döngüsü bozuklukları (örneğin, argininosüksinik asidüri) [44] ve kalp yetmezliği [45] gibi çeşitli metabolik hastalıkların ya da beslenme problemlerinin [46] bir göstergesidir.

Çalışma alanımızla ilgili olarak hipertansiyon, diyabet ve diyaliz hastalarının idrar örneklerinde, üre miktarının sağlıklı insanlara göre daha az olduğu bilinmektedir [4].

Memeli organizmasında üre sentezi

Protein metabolizmasının son ürünü olan üre, memelilerde aminoasitlerin deaminasyonu sonucu oluşan amonyağın (NH_3), karaciğerde karbondioksitle birleşmesi sonucu sentezlenmektedir. Buradan kana karışan üre böbreğe gönderilir ve idrarla dışarıya atılır [47]. Karaciğerde amonyaktan, ürenin sentezlenmesi olayı üre ya da ornitin döngüsü olarak bilinir ve 1932 yılında keşfedilen ilk metabolik döngüdür. Amonyak, azotlu bileşiklerin metabolizması sonucu oluşan ortak bir yan üründür. Amonyak üreden daha küçük, daha

uçucu ve daha hareketlidir. Amonyak, böbreklerde H^+ iyonları ile birlikte atıldığı için asit-baz dengesinin sağlanmasında da önemlidir. Vücutta biriktiğinde hücre pH'sını artırarak toksik hale gelir. Suda nötr ve yüksek derecede çözünebilir olan üre, fazla nitrojenin taşınımı ve atılımını sağlamada vücut için güvenli bir araçtır. Bu sebeple sentezi için enerji gereksinimine rağmen birçok organizma amonyağı daha az toksik olan üreye çevirmektedir [48].



Şekil 2.1. Üre döngüsü reaksiyonları [50]

Üre döngüsü, ikisi mitokondride üçü sitoplazmada olmak üzere beş evreden oluşur (Şekil 2.1.). Altı aminoasit ve beş enzim görev alır. Döngü sırasında bir molekül üre sentezi için 3 ATP harcanır ve 4 yüksek enerjili fosfat bağı koparılır. Ürede bulunan iki azotun biri amonyaktan, diğeri aspartattan sağlanır. Görevli enzimlerden arjinaz, başlıca karaciğerde bulunduğu için ürenin sentezi burada gerçekleşir [49]. Böbrek, beyin, meme, testis ve deride de az miktarda arjinaz bulunmaktadır [50]. Üre döngüsü kan plazmasının ozmolalitesini (bir

kilogram solusyondaki çözülmüş partiküllerin miktarı) yükseltmekte ve böylece dokulardan, beyinden, beyin-omurilik sıvısından ve gözden, dokulararası sıvıya ve plazmaya suyun akışını artırmaktadır. Dolayısıyla bu dokulardaki basınç azalmakta ve idrar çıkışı artmaktadır [39].

2.2.2. Kreatinin

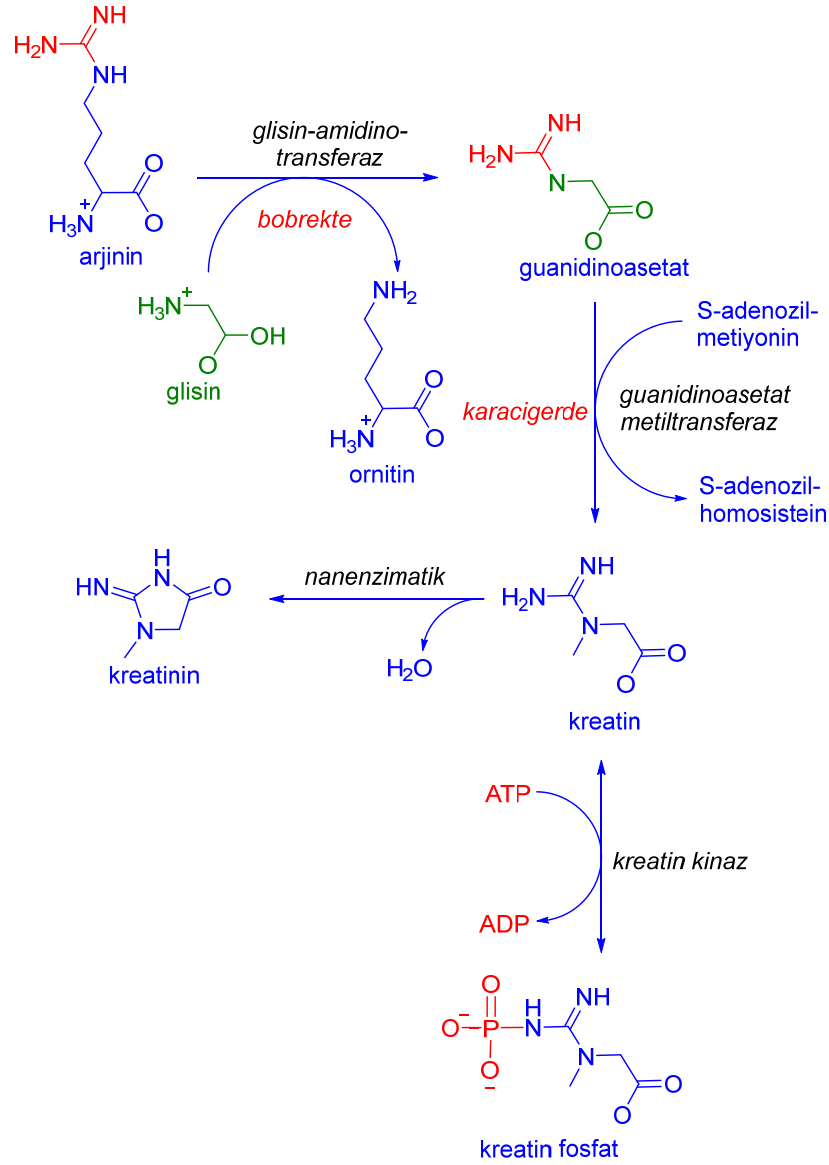
Kimyasal formülü $C_4H_7N_3O$ olan kreatinin, beyaz kristaller şeklindedir. Kreatinin, kreatin ve fosfokreatinin enzimatik olmayan dönüşümünden elde edilen metabolik bir atık ürün olup kaslardaki enerji transferi için gerekli esas moleküldür. Böbrekler tarafından atılan kreatininin serumdaki düzeyi böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [51].

Kreatin, guanidinoasetatın S-adenozil metiyonin aracılığıyla metilasyonu ile öncelikli olarak karaciğerde sentezlenir (Şekil 2.2.). Guanidinoasetat ise böbrekte arjinin ve glisin aminoasitlerinden oluşmaktadır. Daha sonra kan yoluyla diğer organlara, kaslara ve beyne taşınarak fosforilasyon ile yüksek enerjili bir bileşik olan fosfokreatini oluşturur [52]. Kreatinin fosfokreatinine dönüşümü kreatin kinaz ile katalizlenir ve bu reaksiyon sırasında böbrekte spontan bir şekilde kreatinin oluşur [53]. Her gün kaslardaki kreatinin %1-2'si kreatinine çevrilmektedir [52]. Kreatinin, çoğunlukla glomerular filtrasyon yolu ile ve bir kısım da proksimal tübülerden salgılanarak kandan idrara aktarılır. Eğer böbreklerin süzme yeteneği azalırsa kreatininin kandaki seviyesi artmakta ve dolayısıyla idrardaki seviyesi azalmaktadır.

Kreatinin, böbrekler tarafından süzülerek üriner boşaltım yolu ile vücuttan elimine edilir [54]. Kas metabolizmasının son yan ürünü olan kreatinin, insan idrarında bulunan biyokimyasal maddelerin ana bileşenlerindedir [55]. Normal şartlar altında salınımı nispeten sabit olup üretilen kreatinin miktarı kişilerin kas kütlesiyle orantılıdır [56]. Atılım hızının sabit olması sebebiyle idrar analizinde (renal klirensin belirlenmesinde) kullanılan önemli bir metabolittir [8, 55].

Serum kreatininin normal düzeyleri yetişkin erkeklerde 0,5–1,2 mg/dl, yetişkin bayanlarda 0,4–1,1 mg/dl ve çocuklarda 0,0–0,7 mg/dl arasındadır [57]. Erkeklerde iskelet kası kütlesinin kadınlara göre daha fazla olması sebebiyle kreatinin seviyesi daha yüksektir [52].

Normal popülasyonda üriner kreatinin konsantrasyonu 2,5-23 mM (280-2590 mg/l)'dir [56]. 24 saatlik idrarda kreatinin değeri ise yaşa ve vücut kütleğine bağlı olarak 500-2000 mg arasında değişmektedir [58].



Şekil 2.2. Kreatin ve kreatinin sentezi reaksiyonları [53]

İdrar ve serumdaki kreatinin konsantrasyonu böbrek, kas ve tiroid fonksiyonları hakkında bilgi vermektedir. Aynı zamanda kreatinin; metabolik bozukluklar, nöroendokrin aktivasyonu ve vasküler hastalıkların bir belirteçidir [59]. Üriner kreatininin anormal düzeyde olması, büyük oranda böbrek rahatsızlıklarından kaynaklanabileceği gibi protein yönünden zengin beslenme ve üriner sistem obstrüksiyonu gibi sebeplerden de kaynaklanabilmektedir [60].

Musküler distrofi, hipertiroidizm, poliomyelit (çocuk felci) gibi hastalıkların idrardaki kreatinin seviyesini yükselttiği bilinmektedir [9]. Bunlara ek olarak çalışmamız kapsamında hipertansiyon, diyabet ve diyaliz hastalarının idrar örneklerinde, üre gibi kreatinin miktarının da normale göre daha az olduğu bilinmektedir [4].

2.2.3. Glukoz

Üzüm şekeri olarak da bilinen ve molekül formülü $C_6H_{12}O_6$ olan glukoz, yaşam için çok önemli bir monosakkarittir. Glukozun doğada bulunan izomeri D-glukozdur (dekstroz). Fotosentez sırasında CO_2 ve H_2O 'dan üretilen glukoz, hücre sel solunumda başlıca enerji kaynağı olarak kullanılır. Gram başına 3,75 kilo kalori gıda enerjisi sağlamaktadır. Vücuda alınan nişasta gibi karbonhidratların yıkımıyla oluşan monosakkarit ve disakkaritlerin çoğu glukozdur [61]. Glikoliz, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon reaksiyonları ile glukoz CO_2 ve suya oksitlenirken, ATP enerjisi üretilmektedir.

Oligo- ve polisakkaritler, duodenum ve ince bağırsak lümeninde pankreatik ve intestinal glikozidazlarla monosakkaritlere parçalanırlar. Oluşan glukoz, enterositlerin apikal ve bazal membranı boyunca taşınarak kana verilir [62]. Glukozun bir kısmı laktik aside çevrilerek beyin hücrelerinde enerji kaynağı olarak bir kısmı da bağırsak hücreleri ve alyuvarlar tarafından kullanılır. Kalanı ise glikojen şeklinde depo edilmek üzere karaciğer ile kas hücrelerine ve çeşitli yağların sentezinde kullanılmak üzere adipoz dokuya ulaşır. Sadece karaciğer hücrelerindeki glikojen, insülin seviyesi azaldığında glukozla çevrilerek tekrar kana verilir.

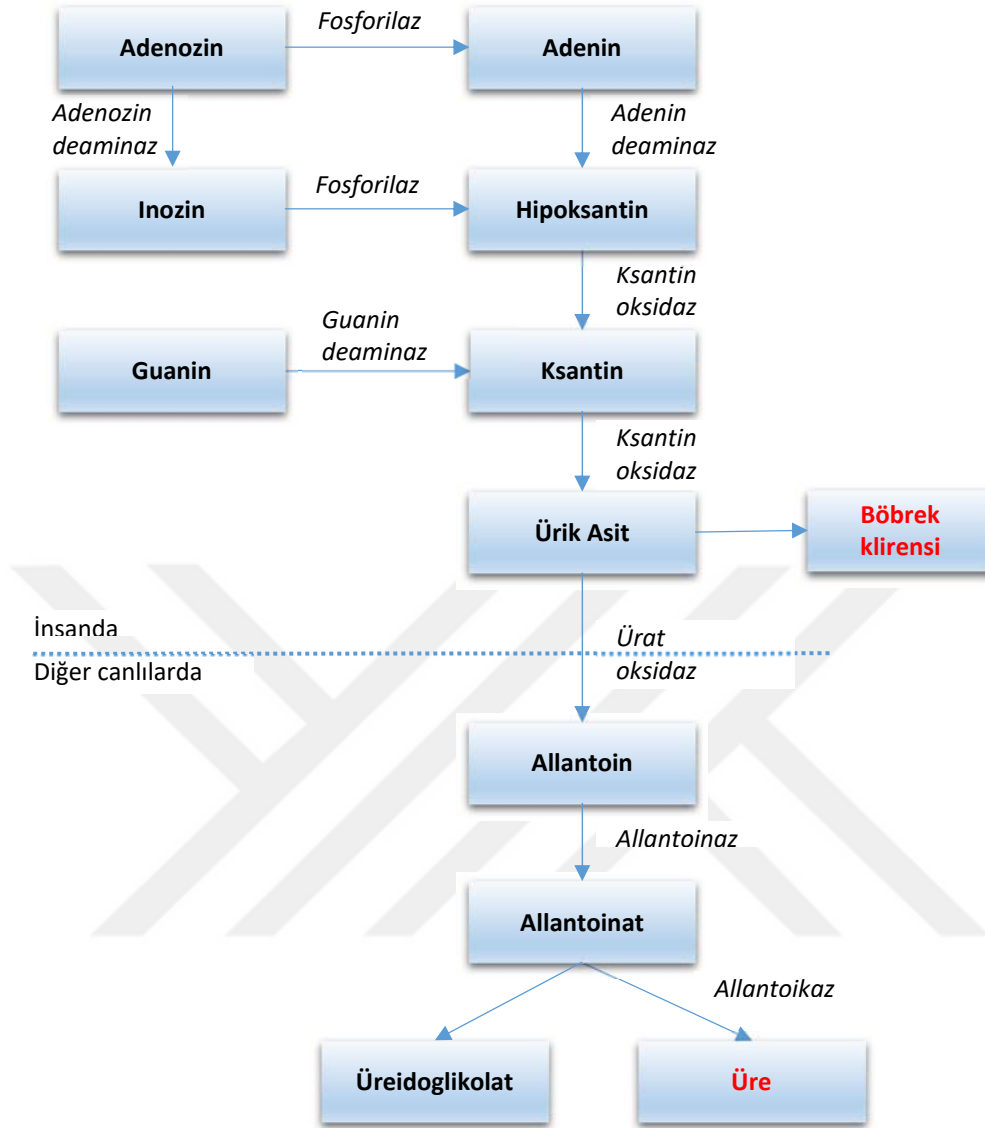
Glukoz, tıbbi muayenede kan örneklerinde bakılan yaygın bir metabolittir. Kandaki glukoz seviyesi insülin ve glukagon hormonları ile düzenlenmektedir. Açlık durumunda kan glukoz seviyesinin yüksek olması diabetes mellitus (DM) hastalığının habercisi olabilir. Kan şekerinin normalden düşük olması durumunda ise hipoglisemiden söz edilebilir. Diyabet, vücutta insülin hormonunun eksikliği ya da etkisindeki bir bozukluktan dolayı kandaki glukoz seviyesinin yükseldiği metabolik bir bozukluktur [63]. İnsülin hormonu olmadan glukoz hücrelere giremez ve sonuçta vücut fonksiyonları için gerekli yakıt olarak kullanılamaz [64]. 8 saatlik açlık kan şekeri, 2 saatlik oral glukoz tolerans testi (OGTT) gibi çeşitli şekillerde kandaki glukoz seviyesi ölçülmektedir. Açlık plazma glukozunun normal seviyesi 126 mg/dl (7,0 mmol/l) veya daha düşük olmalıdır. Plazma glukoz seviyesi 75 g'lık

glukoz yüklemesinden 2 saat sonra ise 200 mg/dl (11,1 mmol/l) ya da daha az olmalıdır. Yine plazma glukoz seviyesinin rastgele ölçümü 200 mg/dl (11,1 mmol/l)'nin üzerinde olmamalıdır [65].

Glukozun idrarda görülmesi durumuna ise glikozüri denir. Normal şartlarda böbrekler, süzülen glukozun tamamını renal tübüllerden geri emerek kan dolaşımına aktardığı için idrar glukoz içermemektedir. Fakat kan glukoz seviyesi 160–180 mg/dl'nin üzerine çıktığında glukozun tümü böbrekteki proksimal tübüllerden geri emilemez ve bir kısmı idrara geçmeye başlar. Glikozüri, genellikle tedavi edilmemiş DM'nin sebep olduğu yüksek kan şekerinden kaynaklanmaktadır. Nadir olarak da renal glikozüri denilen, böbreklerde glukozun geri emilimindeki yapısal bir problemden kaynaklanabilir. Glikozüri, ozmotik diürece yol açmaktadır ki, bu da idrarla beraber fazla su kaybından dolayı oluşan dehidrasyon durumudur [66]. İdrardaki glukozun tayini yaygın olarak kullanılan çubuk testlerle +1, +2, +3 ve +4 şeklinde rapor edilerek yarı kantitatif olarak yapılabilir. Kolorimetrik bir metot olan Benedict testi ile de idrardaki glukozun kalitatif tespiti yapılabilir. Ancak DM'nin tespitinde Benedict belirtecinin kullanılması tavsiye edilmez; çünkü idrarda vitamin takviyesinden kaynaklanan askorbik asit, çeşitli ilaçlar ve homogentisik asit gibi diğer indirgen maddelerin bulunması durumunda yalancı pozitif reaksiyon verebilmektedir. Normal fizyolojik şartlarda idrarda bulunan glukoz konsantrasyonunun 30 mg/dl'den daha az olduğu belirtilmektedir [6, 67]. Hipertansiyon, diyabet ve diyaliz hastalarının idrar örneklerinde, glukoz miktarının sağlıklı insanlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir [4].

2.2.4. Ürik asit

Ürik asit molekül formülü $C_5H_4N_4O_3$ olan heterosiklik bir bileşiktir. Kokusuz ve kristal bir yapıda olan ürik asit vücutta kanda, idrarda ve eser miktarda çeşitli organlarda bulunmaktadır. Ürik asit ve tuzlarının çözünürlüğü, sıcak suda soğuk suya göre (~7 kat) daha fazladır [68]. Ürik asit, insan idrarında bulunan önemli bir diğer bileşen olup pürin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) metabolik yıkımı sonucunda oluşan bir üründür [9]. Pürin maddeleri vücutta hücrelerin doğal yıkımı sırasında üretilebildiği gibi biftek, sakatat ve deniz ürünleri gibi yiyeceklerin sindirimi sırasında da oluşabilmektedir [69].



Şekil 2.3. Pürin nükleotidlerinden ürik asit sentezi [69]

Ürik asit, diğer pürinlerden üretilen ksantin ve hipoksantin ile ksantin oksidaz enzimi ile katalizlenmesinden oluşur (Şekil 2.3.). İnsanlarda ve gelişmiş primatlarda, ürik asit pürin metabolizmasının son oksidasyon ürünüdür. Çoğunlukla kanda çözünerek böbreklere geçmekte ve oradan idrarla atılmaktadır. Diğer birçok memelilerde ise ürik asit, boşaltımdan önce ürikaz (ürat oksidaz) enzimi ile daha çözünebilir bir madde olan allantoin okside olur [70].

İnsan kan plazmasında ürik asitin normal referans aralığı erkeklerde 3,4-7,2 mg/dl (200-430 $\mu\text{mol/l}$) iken, kadınlarda 2,4-6,1 mg/dl (140-360 $\mu\text{mol/l}$)'dir [71]. Kan plazmasında ürik asit konsantrasyonunun normal aralıktan yüksek olması hiperürisemi, az olması hipöürisemi

olarak bilinmektedir. Benzer şekilde idrardaki ürik asit konsantrasyonunun normalden yüksek olması durumuna hiperürokozüri, az olması durumuna ise hipöürokozüri denmektedir. İdrarda ürik asit testi için 24 saat boyunca idrarın toplanması gerekir. Bu sürede test sonucunu etkileyecek aspirin, gut ilaçları, diüretik ilaçlar, alkollü içkiler, vitamin C gibi bazı maddelerin vücuda alınmaması gerekmektedir. 24 saatlik idrar örneğinde bulunan normal ürik asit düzeyi 250–750 mg (1,48–4,43 mmol) arasındadır. Genelde kadınlarda ürik asit düzeyleri erkeklere göre daha azdır [72]. İnsanlarda günlük ürik asitin %70'i böbrekler vasıtasıyla atılmaktadır ve insanların %5-25'inde böbreklerin süzme kabiliyetinin azalması hiperürisemiye yol açmaktadır [73].

İdrardaki yüksek ürik asit konsantrasyonu; vücudun pürin metabolizmasındaki kalıtsal bozukluktan (Lesch-Nyhan sendromu), metastatik kanserlerden, lösemiden, multipl miyelomdan, kas liflerinin yıkımına neden olan rhabdomyolysis hastalığından, kemik iliğini etkileyen bozukluklardan (myeloproliferatif bozukluk), Fanconi sendromundan, gut hastalığından, gebelikte görülen preeklampsi rahatsızlığından [3] ya da pürin yönünden zengin gıdalardan kaynaklanabilmektedir. Yükselmiş ürik asit seviyesinin yol açtığı durumlardan en önemlileri gut, böbrek hastalıkları ve nükleik asidin yüksek oranda yıkımıdır [74]. Gut hastalığında, urat kristalleri eklemlerde birikerek iltihaplanmaya neden olabilmekte ya da kıkırdak gibi yumuşak dokularda iltihapsiz birikebilmektedir [75]. İdrardaki düşük ürik asit konsantrasyonu ise; böbreklerin ürik asidi veya diğer atık ürünleri yeterince süzememesinden, kurşun zehirlenmesinden ya da uzun dönem alkol kullanımından kaynaklanabilmektedir. Ürik asit seviyesinin serumda yükselmesi, artmış kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkilendirilmektedir [76, 77].

İdrardaki yüksek ürik asit düzeyi böbrek taşlarının bir belirtisi olabilir [78]. İdrar yollarında başlıca kalsiyum okzalat, kalsiyum fosfat, magnezyum fosfat, amonyum fosfat, ürik asit ve sistin taşlarının oluşumu ürolitiazise neden olmaktadır. Bu nedenle bu hastalığın tespiti ve tedavisinde idrarda bulunan kalsiyum, magnezyum, fosfor, oksalat, sitrat ve ürik asit seviyelerinin tespiti önem arz etmektedir [79]. Güneydoğu Anadolu'da ürolitiazis akut böbrek yetmezliğinin %20, kronik böbrek yetmezliğinin %22 nedenidir [80]. Bu sonuç ürik asit ve böbrek hastalıkları arasındaki güçlü ilişkiyi göstermektedir.

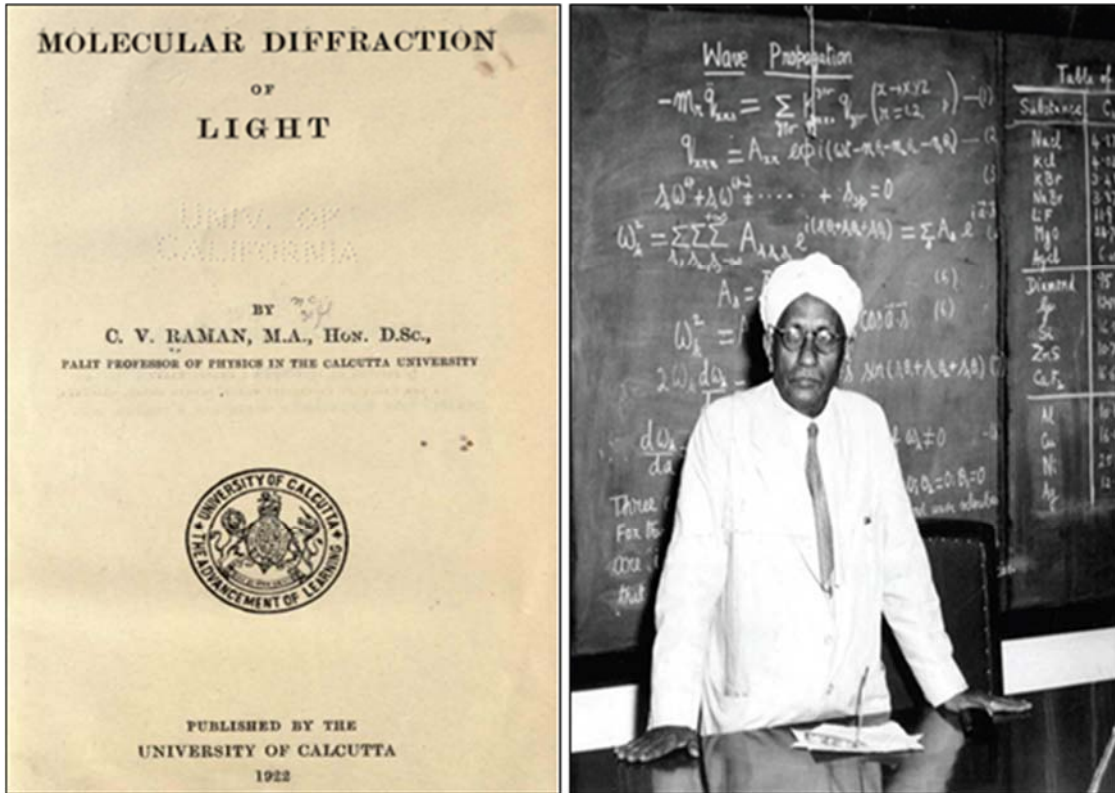
2.3. Raman Spektroskopisi

Moleküllerdeki titreşimleri tespit etmek için kullanılan temel spektroskopiler, infrared absorpsiyonu ve Raman saçılması yöntemlerine dayanır. Bu yöntemler; kimyasal yapılar ve fiziksel formlar üzerinde bilgi sağlamak, maddeleri karakteristik spektral modellerinden (fingerprinting) tanımlamak ve bir örnekteki maddelerin miktarını kantitatif ya da yarı kantitatif olarak tespit etmek için yaygın olarak kullanılırlar. Örnekler; maddenin katı, sıvı, gaz, sıcak, soğuk gibi tüm fiziksel durumlarında ve mikroskobik partiküller, yüzey tabakaları ya da yığın halinde analiz edilebilirler [81].

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kimyasal bağların elektriksel dipol moment değişimine, Raman spektroskopisi ise polarite değişimine dayalı sistemler olduğu için farklı titreşimsel spektroskopik bilgi sağlamaktadırlar [82]. Bu iki yöntem karşılaştırıldığında, RS floresan probleminden dolayı IR spektroskopisine göre daha az kullanılmaktadır. Ancak RS'nin sulu çözeltilerde daha iyi analiz yapabilmesi sebebiyle biyolojik uygulamalar için daha uygun olduğu belirtilmektedir [83]. Sulu çözeltilerde daha iyi sonuç vermesinin nedeni; suyun zayıf bir Raman saçındırıcısı, ancak kuvvetli bir infrared ışını absorblayıcısı olmasından dolayıdır [84]. Moleküllerin yapısında bulunan $-C=C-$, $-C\equiv C-$, $-N=N-$, $-S-S-$, $-C-O-C-$ türü titreşimler ile halkalı bileşiklerde görülen halka daralması ve halka genişlemesi gibi titreşimler IR spektrumunda zayıf pikler oluştururken Raman spektrumunda şiddetli hatlar vererek kolaylıkla incelenebilir [81]. Buna ek olarak RS'de daha az dayanıklı kristal halojenürler yerine camların kullanılabilir olmasından dolayı, IR spektroskopisine göre numune hazırlamak daha basittir. Ayrıca lazer kaynağı, numunenin küçük bir alanına slit üzerinden kolaylıkla odaklanabileceğinden çok ufak örnekler dahi rahatça ve doğru bir şekilde analiz edilebilir. RS'nin sulu çözeltileri ve cam kaplar içindeki örnekleri hiçbir ön hazırlık olmadan inceleyebilme yeteneği ile beraber cihaz teknolojisi alanındaki son gelişmeler, RS uygulamasında hızlı bir artışa yol açmıştır [81]. RS'nin çeşitli tipleri IR tekniğinin tamamlayıcısı olarak birçok farklı alanda uzun yıllar kullanılmaktadır [85].

2.3.1. Tarihi

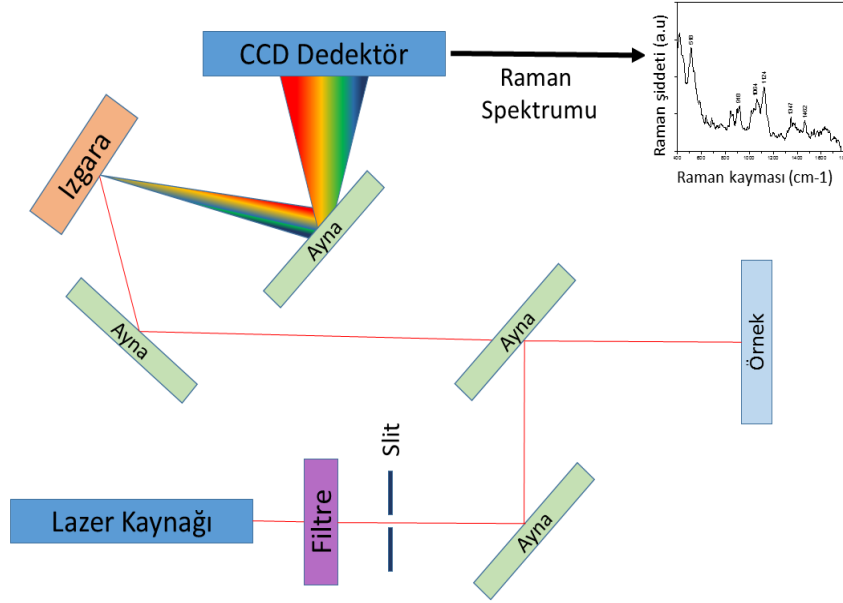
Elastik olmayan saçılım olarak da bilinen Raman etkisi ilk olarak, Hintli fizikçi Sir Chandrasekhara Venkata Raman tarafından 1928 yılında ilkel bir düzenele keşfedildi. Bu ilk deneylerde Raman, ışık kaynağı olarak güneş ışığı, toplayıcı olarak teleskop ve dedektör olarak gözlerini kullandı [86]. Güneş ışığı, teleskop yardımıyla saflaştırılmış sıvı ya da tozdan arındırılmış gaz olabilen bir örnek üzerinde odaklandırıldı. Saçılan ışığın toplanması için örneğe bir lens yerleştirildi. Saçılan ışığın dalga boyunun gelen ışığından farklı olduğunu göstermek için optik filtreler sistemi kullanıldı [81]. 1922 yılında yayınlanan Raman'ın "Işığın Moleküler Kırınımı" adlı çalışması ve sonrasında bahsi geçen buluşları Raman'a 1930 yılında Nobel Fizik ödülünü kazandırmıştır (Resim 2.1.) [87]. Özellikle lazer ışık kaynaklarının gelişimiyle saçılım sinyali artırılarak RS günümüzde kullanılan modern halini aldı. Son yıllarda hem basit araştırmalar bakımından hem de etkili spektroskopik tekniklerin birçok pratik uygulamada kullanımı bakımından RS dikkatleri çekmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [88].



Resim 2.1. Hintli fizikçi Sir C. V. Raman ve ona Nobel ödülünü getiren çalışmasının kapak resmi [87]

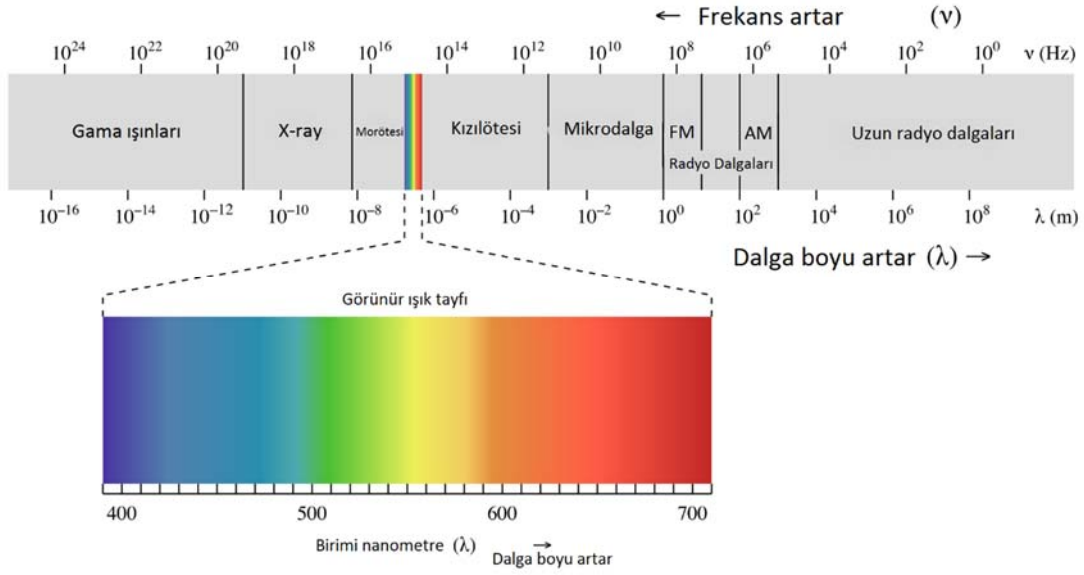
2.3.2. Raman spektroskopisi bileşenleri

Bir Raman sistemi, genel olarak dört ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; ışın kaynağı (lazer), örnek aydınlatma sistemi ile ışık toplama optikleri, dalga boyu seçici (filtre ya da spektrofotometre) ve dedektördür (fotodiyot dizisi, CCD veya PMT) (Şekil 2.4.) [89, 90].

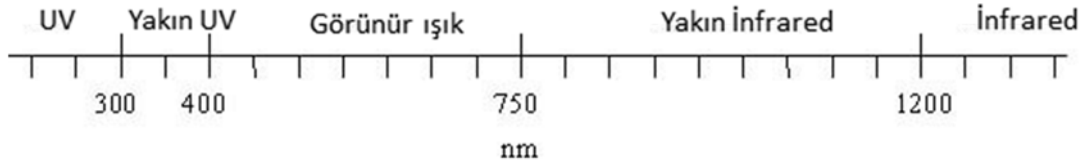


Şekil 2.4. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi [90]

Kabul edilebilir bir sinyal/gürültü oranı ile beraber Raman saçılımının oluşabilmesi için yüksek şiddetli ışın kaynakları gerektiğinden RS’de çoğunlukla lazerler kullanılmaktadır. Lazer, uyarılmış emisyon ile ışık çoğaltılması anlamındaki “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” kelimelerinin başharflerinden türetilmiş bir kısaltmadır. Numune genellikle görünür bölge, yakın UV ya da yakın IR spektrum aralığından gelen bir lazerle aydınlatılır [91]. Şekil 2.5.’de elektromanyetik spektrum [92] ve Şekil 2.6.’da RS’de kullanılan dalga boylarının ışık spektrumunda yer aldığı bölgeler [93] görülmektedir.



Şekil 2.5. Elektromanyetik spektrum [92]



Şekil 2.6. Yakın UV, görünür ışık ve yakın IR dalga boylarının ışık spektrumunda yer aldığı bölgeler [93]

Deneylerin başarılı olabilmesinde lazer dalga boyunun seçimi çok önemlidir. RS’de kullanılabilen lazer dalga boyları aşağıda verilmiştir.

Ultraviyole: 244 nm, 257 nm, 325 nm, 364 nm

Görünür: 457 nm, 473 nm, 488 nm, 514 nm, 532 nm, 633 nm, 660 nm

Yakın kızılötesi: 785 nm, 830 nm, 980 nm, 1064 nm

Görünür bölgede yer alan mavi ya da yeşil lazerler inorganik materyaller, rezonans Raman deneyleri ve yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) deneyleri için idealdir. Kızılötesi bölgeden gelen lazerler floresan baskılanması için iyidir. UV lazerler biyomoleküllerin (proteinler, DNA ve RNA vb.) rezonans Raman analizleri ve yine floresan baskılanması için tercih edilmektedir. RS’de yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları ve bunların dalga boyları Çizelge 2.2.’de gösterilmektedir [84]. Bunlardan en çok kullanılan Raman lazer kaynağı, 632,8 nm’de üretilen helyum/neon lazeridir. Ancak spektrumun mavi ve yeşil bölgesinde yayılım yapan argon ve kripton iyonu lazer kaynakları diğerlerine göre daha avantajlıdır. Örneğin argon iyonu lazeri, He/Ne lazer kaynağından yaklaşık üç kat daha şiddetli Raman hattı vererek yüksek hassasiyet sağlamaktadır. Diyod lazeri ve Nd/YAG kaynakları yakın infrared ışını yayarlar. Bunların daha kısa dalga boyuna sahip lazerlere göre bazı üstünlüklerinden dolayı kullanımları giderek artmaktadır. Bu üstünlüklerinin ilki, floresan etkilerinin çok daha düşük veya hiç olmamasıdır. Diyod lazerler floresanı önemli ölçüde düşürürken, Nd/YAG kaynağı floresanın tamamen giderilmesinde etkilidir. Çünkü bu lazerler, birçok molekülde floresan oluşturucu uyarılmış elektronik enerji hallerini doldurmaya yetecek kadar enerjili değildirler. Kısacası uzun dalga boylu lazerlerin kullanımı zeminde oluşan floresan sinyalini ortadan kaldırılabilmektedir. Yakın infrared dalga boyundaki lazerlerin bir diğer üstünlüğü ise, numunenin foto parçalanmasına yol açmadan yüksek güçte çalıştırılabilmesidir. Özellikle biyomedikal uygulamalarda doku zararını en aza indirmek için bu lazer tipleri seçilmektedir [84, 94].

Çizelge 2.2. RS’de yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları [84]
(Nd/YAG: neodimium-kaplanmış itriyum alüminyum garnet)

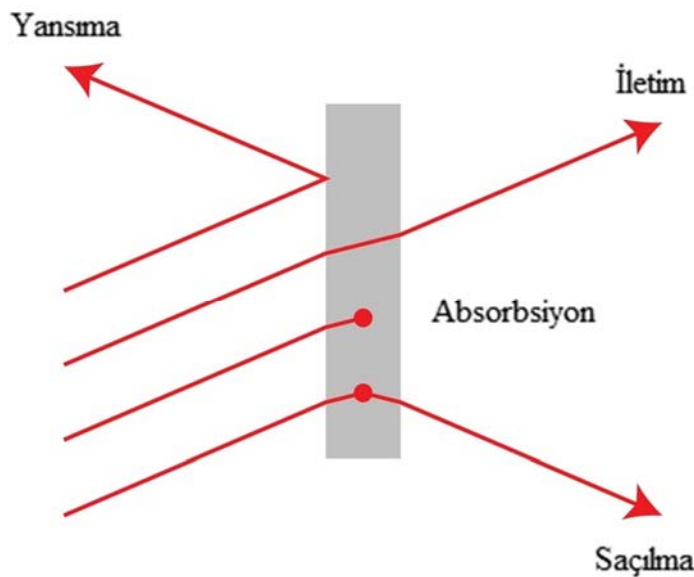
Lazer Tipi	Dalga Boyu (nm)
Argon iyonu	488,0 veya 514,5
Kripton iyonu	530,9 veya 647,1
Helyum/Neon	632,8
Diyod lazeri	785 veya 830
Nd/YAG	1064

RS’de keskin monokromatik ışık elde edildiğinden lazer kaynağından sonra filtre kullanılması yeterli iken bazı durumlarda dalga boyu seçicilere ihtiyaç vardır. Dalga boyu

seçiciler, Raman saçılım şiddetinin zayıf olduğu durumlarda istenilen dalga boyu dışındaki hatların uzaklaştırılması amacıyla örnek ile dedektör arasında kullanılır. Dalga boyu seçiciden geçen ışığın elektrik sinyaline dönüştürülmesi, kullanılan dalga boyuna hassas bir dedektör ile gerçekleştirilir. RS’de dedektör olarak; foto çoğaltıcı tüp (PMT), fotodiyot dizileri (PDA) veya yük-eşleşmiş cihazlar (CCD) kullanılmaktadır [94]. Daha eski zamanlarda kullanılan PMT dedektörü ile tek bir Raman spektrumu elde edilmesi oldukça zaman aldığı için günümüzde yerini PDA veya çoğunlukla CCD dedektöre bırakmıştır. Son olarak dedektörden çıkan elektrik sinyali, Raman spektrumu şeklinde bilgisayara kaydedilmektedir [90].

2.3.3. Raman spektroskopisinin çalışma prensibi

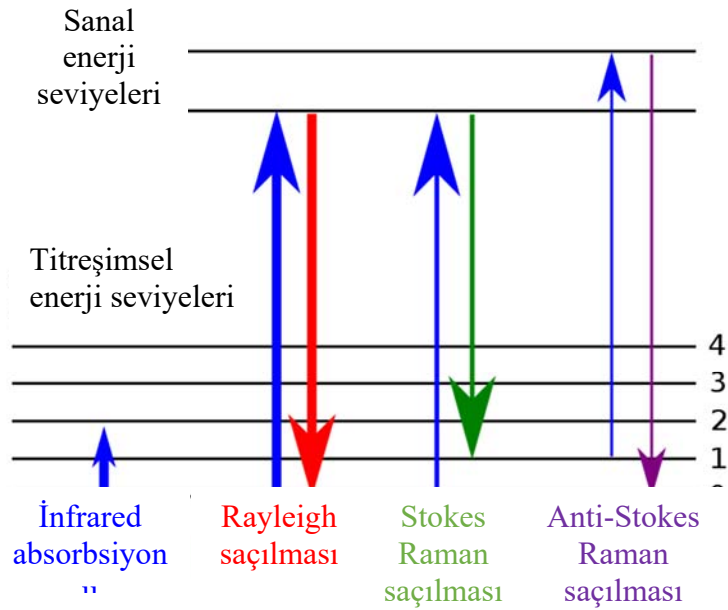
Işık bir madde ile etkileşime girdiğinde, ışığı oluşturan fotonlar absorbe edilebilir, saçılabilir ya da maddeyle hiç bir etkileşime geçmeden doğrudan geçebilir (Şekil 2.7.). Eğer maddeye gelen fotonun enerjisi, bir molekülün temel düzeyi ile uyarılmış düzeyi arasındaki enerji boşluğuna karşılık gelirse foton absorbe edilebilir ve molekül bir üst enerji seviyesine yükseltilir. Bu değişiklik, absorpsiyon spektroskopisinde radyasyon enerjisinin kaybı ile ölçülür. Ayrıca gelen foton, molekül ile etkileştikten sonra saçılıma da uğrayabilir. Bu durumda fotonun, molekülün iki enerji düzeyi arasındaki farka denk gelecek bir enerjiye sahip olması gerekmez. Moleküler tanımlamada saçılıma dayalı tekniklerden en yaygın kullanılanı Raman saçılımıdır [81].



Şekil 2.7. Işığın bir madde ile etkileşimi sırasında oluşan farklı süreçler

Saçılımlar elastik ve elastik olmayan saçılım olmak üzere iki çeşittir. Elastik saçılımda saçılan ışığın enerjisinin büyük bir kısmı gelen ışığın enerjisine eşittir ve bu olaya “Rayleigh saçılması” denmektedir. Elastik olmayan saçılıma göre ışık saçılımı 10^4 - 10^5 kat daha şiddetlidir. Fakat tek bir pik verir ve titreşim geçişleri hakkında bilgi vermez. Elastik olmayan saçılımda ise saçılan ışığın enerjisi, madde ile etkileşime giren ışığın enerjisinden farklı olur. Saçılan ışığın yaklaşık 10^6 - 10^8 tanesinden sadece bir tanesinde görülen bu olay “Raman saçılması” olarak bilinmektedir [95]. Raman saçılmasında saçılan ışığın enerjisinde, gelen ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki fark kadardır. Yani bu enerji farkı saçılan moleküllerin titreşim enerjisiyle orantılıdır. Raman saçılmasının spektroskopik olarak incelendiği ve moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi veren bu yöntem Raman spektroskopisi adını alır. Kısacası RS çoğunlukla görünür, yakın kızılötesi veya yakın ultraviyole bölgede bir lazerden gelen monokromatik ışığın molekül ile etkileşmesi sırasında oluşan elastik olmayan saçılması esasına dayanır. Saçılan ışının dalga boyu ile gelen ışının dalga boyu arasındaki fark Raman kayması/etkisi olarak adlandırılır. Raman kayması, RS ölçümü sonucu elde edilen grafiklerde x ekseninde dalga sayısı cinsinden ifade edilir ve birimi cm^{-1} olarak kullanılır. Y ekseninde ise saçılan ışığın şiddeti gösterilmektedir. Raman kayması basit olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanabilir [96, 97].

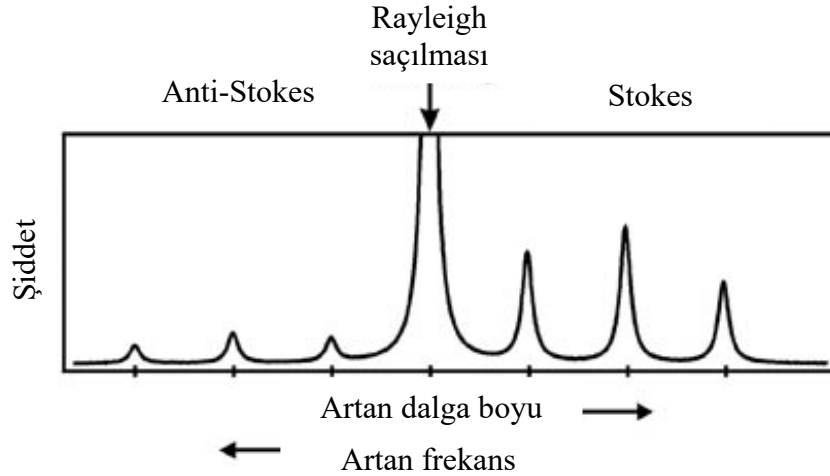
$$\text{Raman kayması} = (1/\lambda_{\text{kullanılan ışın}}) - (1/\lambda_{\text{saçılan ışın}}) \quad (2.1)$$



Şekil 2.8. Raman saçılmasının molekülün titreşim enerji düzeyleri ile olan ilişkisi

Enerji kaymaları saçılma gerçekleşen moleküllerin kimyasal yapılarına özeldirler ve moleküllerin analizleri için karakteristik Raman spektrumları oluşturur. Saçılma verimi gelen ışığın dalga boyuna bağlı olduğu için enerji kayması her durumda sabit kalmaktadır [96, 97].

Raman saçılmasının Stokes ve anti-Stokes türleri bulunmaktadır. $H\nu_0$ ($h\nu$, molekülün iki enerji seviyesi arasındaki farkı) enerjiye sahip bir foton molekül ile etkileşime girdiğinde saçılmadan önce bir kısım enerjisini moleküllere aktarır veya moleküllerden bir kısım enerji fotona aktarılır. Moleküllerin fotonla etkileştiği bu enerji aktarımı sonucunda moleküller farklı titreşim enerji düzeylerinde bulunurlar (Şekil 2.8.). Fotonla etkileşmeden önce temel titreşim enerji düzeyinde bulunan molekül, etkileşmeden sonra uyarılmış bir titreşim düzeyine geçiyorsa fotonun enerjisinde azalma olur. Bu durumda saçılan ışımalar Stokes hatları olarak isimlendirilir (Şekil 2.9.). Fotonla etkileşmeden önce uyarılmış bir titreşim düzeyinde bulunan bir molekül, etkileşme sonrası temel titreşim enerji düzeyine dönüyorsa fotonun enerjisi saçılma sonrası artar. Böylece molekülden fotona molekülün iki enerji düzeyi arasındaki fark kadar bir enerji aktarılmış olur. Bu olay sonunda görülen Raman kaymalarına anti-Stokes hatları denir [98].



Şekil 2.9. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılma hatları [84]

Boltzman dağılım yasasına göre, oda sıcaklığında bir molekülün temel titreşim düzeyinde bulunma ihtimali uyarılmış enerji düzeyinde bulunma olasılığından daha fazla olduğu için Stokes Raman saçılmaları anti-Stokes Raman saçılmalarından daha yaygın görülmektedir [99].

Bir molekülün bir fotonla Raman türü saçılma verebilmesi için molekülün titreşim sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi yani periyodik ve geçici bir dipol momentinin oluşması gereklidir. Molekülün titreşimi sırasında oluşan polarlanabilme değişim frekansı, titreşim frekansı ile uyumuyor ise oluşan titreşim türü Raman aktif değildir [97]. Raman hatlarının şiddeti, titreşen molekülün polarize olabilme özelliğine, lazer kaynağının şiddetine ve moleküldeki aktif grubun konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir [84].

2.3.4. Bölgesel Raman taraması

Raman spektral görüntüleme (ya da haritalama) olarak da bilinen bölgesel Raman taraması, örneğin Raman spektrumuna dayanarak detaylı kimyasal görüntülerin oluşturulduğu güçlü bir tekniktir. RS'den daha kapsamlı olan bu teknik örnek hakkında hem spektral hem de uzamsal bilgi verir. Görüntünün her pikselinden toplanmasıyla elde edilen tüm spektrum, incelenen maddenin kompozisyonuna ve yapısına göre renkli görüntülerin oluşturulması için düzenlenir [100].

- Görüntülerde maddenin konsantrasyonunu ve dağılımını göstermede Raman pik şiddeti,
- Moleküler yapı, moleküler faz ve maddenin türünü belirlemede Raman pik pozisyonu,
- Maddelerin kristallilik ve faz bilgileri için Raman pik genişliği kullanılmaktadır.

Belirlenen tarama alanından veriler toplanırken numunenin hareketi ve spektrum alınması işlemleri ardışık olarak yüzlerce, binlerce hatta milyonlarca kez gerçekleşir. Raman spektral görüntüler; XY, XZ ve YZ kesitleri veya XYZ veri küpleri oluşturmak için iki ya da üç boyutlu olarak toplanabilmektedir [100].

Raman spektral görüntüleme tekniği, standart optik mikroskopi ile görülemeyecek kimyasal dağılımların görüntülenmesini sağlaması yönünden birçok alandaki araştırmacılar için paha biçilemez bir tekniktir [100].

2.3.5. Raman spektroskopisinin çeşitleri

1970’li yıllardan sonra ayarlanabilir lazerlerin bulunmasıyla çeşitli Raman spektroskopik yöntemler geliştirilmiştir. Hassasiyeti zenginleştirmek, uzamsal çözünürlüğü artırmak ya da spesifik bilgi elde etmek gibi amaçlarla hala RS’nin yeni yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden bazıları hakkında kısa bilgiler aşağıda yer almaktadır.

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS)

RS’deki en büyük sorun saçılmanın çok zayıf olmasıdır [101]. Bu sebeple spektrum alımında yüksek konsantrasyondaki numuneye ihtiyaç vardır. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi ya da saçılması (YGRS), pürüzlü metal yüzeyler üzerinde adsorbe edilen moleküller veya nanoyapılar ile Raman saçılımının zenginleştirildiği yüzeye duyarlı bir tekniktir [102]. Zenginleştirme faktörü 10^{10} - 10^{11} ’e kadar çıkabilir [103]. Birbirine çok yakın metal nanoparçacıkların yüzey plazmonlarının üst üste çakışması ile Raman saçılması 10^{14} kat zenginleşebilmektedir [88]. Böylelikle YGRS tekniği ile tek bir molekül bile tespit edilebilir [104].

YGRS ilk olarak Martin Fleischmann tarafından pürüzlü gümüş yüzey üzerinde soğurulmuş piridinde 1974’de gerçekleştirilmiştir [105]. Daha sonra Jeanmaire ve Van Duyne tarafından 1977 yılında plazmoniklerden kaynaklı sinyal zenginleştirilmesi gözlenmiştir [106]. YGRS’nin zenginleştirme etkisinin tam mekanizması hala tartışma konusudur. Mekanizmaları oldukça farklı ancak deneysel ayrımı basit olmayan iki önemli teoriden söz edilmektedir. Biri elektromanyetik teori [107], diğeri ise kimyasal teoridir [108]. Elektromanyetik teoride zenginleştirme, nanoparçacıkların oluşturdukları yüzey plazmonlarından kaynaklanırken, kimyasal zenginleştirme metal ile moleküller arasındaki yük transferinden kaynaklanmaktadır. Elektromanyetik zenginleştirme kimyasal zenginleştirmeye göre daha yüksektir. Kimyasal teori sadece yüzey ile kimyasal bağ oluşturan moleküller için geçerli olup her durumdaki sinyal zenginleştirmesini açıklayamaz. Yakın dönemde, uyarılmış bir molekülün yüzey plazmonu oluşturan metal nanopartikül yüzeyinden uzakta olduğu durumda bile YGRS zenginleştirilmesi gösterilmiştir [109]. Bu gözlem YGRS’nin elektromanyetik teorisini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

YGRS başarısı, büyük oranda adsorbe edilen moleküller ile plazmonik nanoyapıların yüzeyi

arasındaki etkileşime bağlıdır. Genel olarak kullanılan klasik YGRS substratları altın (Au), gümüş (Ag) ve bakırdır (Cu). Au ve Ag havada kararlı halde olduklarından dolayı YGRS substratı olarak sıklıkla kullanılır. Ayrıca YGRS tekniğinde altın ve gümüş kullanımı floresandan gelen girişimleri engellemektedir. [110].

YGRS analizi için numuneler farklı tekniklerle hazırlanabilir. Örneğin; kimyasal olarak bir solusyon içinde oluşturulabilen kolloidal metal nanoparçacıklar, numunenin seyreltik çözeltisi ile karıştırılabilir. Bir diğer teknikte; sıvı örneği, ince bir film şeklindeki nanoyapılı metal bir yüzeye sahip silikon ya da cam yüzeye yerleştirilebilir [111]. En popüler YGRS substratları, elektrokimyasal olarak tutundurulmuş gümüş elektrodlar ile ortalama boyutları 20 nm'den daha az olan gümüş ve altın kolloidlerdir [90].

YGRS tekniğinin birçok uygulama alanları olup bunlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır. Bu yöntemin çok düşük miktarlardaki biyomolekülleri bile tespit edebilmesi, vücut sıvılarındaki protein tayinini mümkün kılmaktadır. Bu yöntem kanserin tanı ve görüntülemesinde yeni nesil teknoloji olarak kullanılabilir [112]. Ayrıca hedefe-yönelik DNA ve RNA sekansları, YGRS'de nanoparçacıklarla beraber Raman-aktif boyaların kullanımı ile tespit edilebilmektedir [113].

YGRS'nin bir dezavantajı spektra yorumlamasının zor oluşudur. Sinyal zenginleştirilmesi çok yüksek olduğundan normal Raman spektrasında görülemeyen çok zayıf Raman bantları dahi YGRS'de gözlenebilmektedir. Ayrıca bazı eser miktardaki kontaminantlar ekstra pikler verebilmektedir. Diğer bir yandan normal Raman'da güçlü olan bazı pikler, YGRS'de metal yüzey ile olan kimyasal etkileşimden dolayı hiç gözükmeyebilir. Sonuç olarak YGRS spektrası yorumlanırken tüm fiziksel ve kimyasal faktörler dikkate alınması gerektiğinden bu yöntemin pratikte kullanımı zor görülmektedir [90].

Rezonans Raman spektroskopisi (RRS)

Çoğu maddeler ve özellikle renkli olanlar, lazer ışını emerek Raman spektrumunun kontaminasyonuna yol açan güçlü floresan üretmektedirler. Bu floresan girişimi, RS'de özellikle UV lazerlerin kullanıldığı durumlarda karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. Fakat bazı renkli moleküllerin belli şartlar altında floresan yerine güçlü Raman saçılımları ürettiği bulunmuştur. Bu etki rezonans Raman etkisi olarak bilinmektedir [90].

Raman saçılımının rezonans güçlendirmesi, kullanılan lazerin dalga boyunun molekülün elektronik geçişteki dalga boyuna yakın olmasını gerektirir. Bu frekans uygunluğu (veya rezonans), Raman saçılımının şiddetini büyük ölçüde artırarak düşük konsantrasyonlarda (μM - mM) bulunan bileşiklerin analizini kolaylaştırmaktadır. Geleneksel RS ile karşılaştırıldığında RRS'nin en önemli avantajı, ilgili piklerin şiddetini 10^6 kata kadar artırmasıdır. Bu da 10^{-8} M'a kadar düşürülebilen analit derişimlerinden bile RR spektrasının elde edilebilmesini sağlamaktadır. Normal RS analizleri ise genellikle 0,01 M'dan daha yüksek konsantrasyonlarla sınırlıdır [114].

RRS ile yapılan analizlerde hassasiyetin yanısıra seçicilik de yüksektir. Rezonans kuvvetlendirmesi, kromofor ile ilgili Raman bantlarına ilişkin olduğundan rezonans Raman spektrumları genellikle birkaç çizgiden oluşur [94]. Bu sebeple RRS, geleneksel Raman spektrumunda yüzlerce bant verebilen polipeptitler gibi büyük moleküller ile çalışırken büyük avantaj sağlar [115]. Seçicilik sayesinde molekül ya da proteinlerin spesifik bölümlerinin (örneğin; miyogloblin içindeki hem grubu gibi) titreşimsel modlarından gelen bantların tanımlanmasına yardım eder [116].

Konfokal Raman mikrospektroskopisi

Konfokal Raman mikrospektroskopisi yönteminin, yüksek bir uzamsal çözünürlüğe sahip olması, resim kalitesinin net olması, kimyasal ayrımın çok iyi olması ve kütleli numunelerde 3D haritalama yapabilmesi gibi birçok avantajları bulunmaktadır [100]. Bu teknik örneklendirmeyi mikrobeyutlu alanlardan yaptığı için floresan girişimi engellenebilmektedir [117]. Ancak resim oluşturması için bir kaç saat gibi fazla zamana ihtiyaç duyulması Konfokal Raman spektroskopisinin en büyük dezavantajıdır. Çözünürlüğün normal mikroskoba göre yüksek olması, hücrelerin doğal ortamında son derece detaylı bir analizini mümkün kılmaktadır. Elde edilen görüntülerdeki her piksel tüm spektra bilgisini içerebilir. Böylece hücre içerisindeki bileşenlerin dağılımı Raman imzalarına göre görüntülenebilmektedir [100]. Sonuç olarak Konfokal Raman spektroskopisi kullanılarak bakteri ve ökaryot hücreler dâhil birçok hücredeki değişiklikler [118] ile sağlıklı ve hastalıklı dokuların karşılaştırması kolaylıkla incelenebilmektedir.

Koherent (uyumlu) anti-Stokes Raman spektroskopisi (CARS)

CARS yöntemi, doğrusal olmayan RS'nin bir çeşididir. Koherent anti-Stokes saçılımı elde edebilmek için iki lazer ışını kullanılır. Yani RS'nin tersine CARS tekniğinde çoklu fotonlar moleküler titreşimleri sağlamaktadır. Böylece normal Raman saçılımından daha güçlü bir lazer demeti elde edilerek floresan girişimi engellenebilmektedir [117].

CARS sinyalinin sıcaklığa bağımlı özelliğinden dolayı bu yöntem, sıcak gazların ve alevlerin ısı derecesini gözlemede kullanılan popüler bir teknik olmuştur [119]. Son zamanlarda CARS tekniği, biyolojik örneklerde lipidlerin hem in-vivo hem de in-vitro olarak görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca yol kenarındaki bombaların tespiti için CARS-temelli dedektörler gelişme aşamasındadır [120].

Yüzeyde güçlendirilmiş rezonans Raman spektroskopisi (YGRRS)

YGRS ve RRS'nin kombinasyonuyla yüzeyde güçlendirilmiş rezonans Raman spektroskopisi tekniği oluşturulmuştur. YGRRS, Raman şiddetini artırmak için yüzeye yakınlığı ve analiz edilecek molekülün maksimum absorpsiyona denk gelen dalga boyunu kullanır. Bu teknik ile Raman sinyalinin şiddeti 10^{14} kat güçlendirilebilmektedir [90]. YGRRS'nin en büyük avantajı, spektrasının normal rezonans Raman spektrasına çok benzemesinden ötürü yorumlanmasının daha kolay olmasıdır [90]. Günümüzde bu teknik DNA incelemelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [81].

2.3.6. Raman spektroskopisinin uygulama alanları

RS inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılmaktadır [121].

RS'nin; malzeme bilimleri, adli bilimler, çevresel analizler, gıda analizleri, sanat ve arkeolojik araştırmalar, oligonükleotid hedeflemesi ve kanser araştırmaları ile kimyasal savaş ajanları, tıbbi ilaç, uyuşturucu madde, viral ya da bakteriyel patojen, parazit ve çeşitli hastalıkların tespiti gibi birçok alanda uygulamaları bulunmaktadır [81, 110].

Raman spektroskopisinin biyolojik uygulamaları

RS biyolojik örneklerin analizinde yaygın olarak kullanılan güçlü bir tekniktir [122]. Analizin hızlı olması, örnek üzerinde tahribata yol açmaması ve en önemlisi sulu ortamlarda dahi moleküller hakkında yapısal bilgi verebilmesi gibi birçok avantajları bulunmaktadır [123]. RS'de kullanılacak lazer incelenecek örneğe bağlı olarak seçilmektedir. Biyolojik örneklerin incelenmesinde numunenin zarar görmemesi ve floresan girişiminin en aza indirilmesi için genellikle yakın kızılötesi bölgeden gelen lazer kaynakları kullanılmaktadır. IR spektroskopisine kıyasla RS'de su girişiminin çok daha az olması, biyolojik örneklerin doğal ortamında titreşimsel bilgisinin elde edilebilmesini mümkün kılmaktadır [83].

RS'nin biyolojik moleküllerde kullanımı ancak 1970'li yıllardan sonra gerçekleşmiştir. Biyolojik sistemlerin sıcaklık, pH, iyonik bağ, oksijen alımı, enzim, virüs, antikor ve çeşitli ilaçlarla etkileşiminden kaynaklanana yapısal değişiklikler ile temel aminoasitlerin tespiti, proteinlerin ikincil yapısının anlaşılması ve hücre zarlarının yapısının incelenmesi Raman ile biyolojik örneklerin ele alındığı ilk çalışmalara örnek olarak verilebilir [124]. Daha sonraları mitoz bölünme, solunum, oksidatif stres gibi olaylar sırasındaki hücresel değişiklikler, bakteri ve maya hücrelerinin Raman spektrumları sayesinde gösterilmiştir [81]. YGRS tekniği ile ilk mikroorganizma tespiti 1998 yılında gümüş kolloidler kullanılarak yapılmıştır [125].

YGRS ile aminoasitlerin, peptitlerin, pürin ve pirimidin bazlarının yanı sıra spesifik DNA ve RNA sekans analizleri ile SNP (tek nükleotid polimorfizmi) tespitleri de gerçekleştirilmiştir [113]. Klorofil ve diğer pigmentler gibi kendinden renkli birçok biyomoleküller için de RS başarıyla uygulanmıştır [81].

Gerek hastalıkların teşhisi gerek doping kontrolü gerekse adli tıp araştırmaları için kan, serum, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarının biyokimyasal analizinde RS'nin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [13, 126, 127].

Son yıllarda çeşitli kanser tiplerinde potansiyel tanı cihazı olarak RS büyük ilgi görmektedir. Kolon, özofagus, meme ve mesane kanserinde birçok RS çalışmaları mevcuttur [112]. Ayrıca çeşitli biyolojik örneklerin ve hastalıkların -bazı kanser türleri, diyabet, alzheimer ve parkinson hastalığı- tespitinde kullanılmak üzere YGRS biyosensörleri geliştirilmektedir

[110]. RS yanında temel bileşenler ve ayırma analizleri gibi kemometrik tekniklerin kullanımının artmasıyla, hastalıkların teşhisinde daha belirgin sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Özellikle kanserli hücrelerin teşhisinde hastalıklı ve sağlıklı grupların ayırımı oldukça hassas bir şekilde yapılabilmektedir [112].

RS'nin tıp alanındaki uygulamaları hastalıkların tespitine ilave olarak ilaç dizaynı, ilaç-hücre etkileşiminin karakterizasyonu, in-vivo deri analizi, stentler ve implantlar ile ilgili diğer birçok çalışmaları da kapsamaktadır.

Raman Spektroskopisinin kantitatif uygulamaları

Raman spektrumunda infrared spektruma göre daha az sayıda pik bulunmakla beraber karışımlarda çakışan piklere de daha az raslanmaktadır. Dolayısıyla kantitatif ölçümler daha kolay yapılmaktadır. Ayrıca Raman sistemi nemden etkilenmediği gibi örneklerde bulunan az miktardaki su da analizi etkilememektedir. Lazer demetleri örneğe yüksek kesinlikle odaklanabildiğinden çok az miktardaki numunelerin kantitatif analizi mümkün olmaktadır. Tüm bu avantajlarına rağmen RS kantitatif analizlerde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu durum absorpsiyon cihazlarına kıyasla RS'nin yüksek maliyetinden kaynaklanabilir. Düşük maliyetli lazer diyodların ve taşınabilir Raman spektroskopi cihazlarının geliştirilmesiyle bu engelin kalkacağı düşünülebilir [94]. Resim 2.2'de son teknoloji ürünü olan ve çeşitli ilaçların içeriklerinin tespitini yapabilen taşınabilir bir Raman spektroskopi cihazı görülmektedir [128].



Resim 2.2. NanoRam® elde taşınabilir Raman spektrometresi [128]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Potasyum klorür (KCl) (Merck, Almanya), sodyum klorür (NaCl) (Carlo-erba, Fransa), üre ($\geq\%99,5$, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) (Merck, Almanya), sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Sigma-Aldrich, ABD), askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Merck, Almanya), potasyum fosfat (KH_2PO_4) (Riedel-de Haen, Almanya), kreatinin ($\geq\%98,0$, $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$) (Sigma-Aldrich, ABD), sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich, Almanya), sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Zag Kimya, Türkiye), sülfürik asit (H_2SO_4) (Merck, Almanya), D-glukoz ($\geq\%99,0$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Sigma-Aldrich, Almanya), ürik asit ($\geq\%99,0$, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$) (Sigma-Aldrich, Almanya), sentetik idrar negatif kontrol (Cerilliant, ABD).

3.1.2. Cihazlar

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi bünyesinde bulunan distile su cihazı (Merck Millipore, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), pH metre (Hanna, İtalya), hassas terazi (Precisa, İsviçre), manyetik karıştırıcı (Benchmark, ABD), otoklav (Tomy, Japonya) ve buzdolabı (Arçelik, Türkiye) kullanılmıştır.

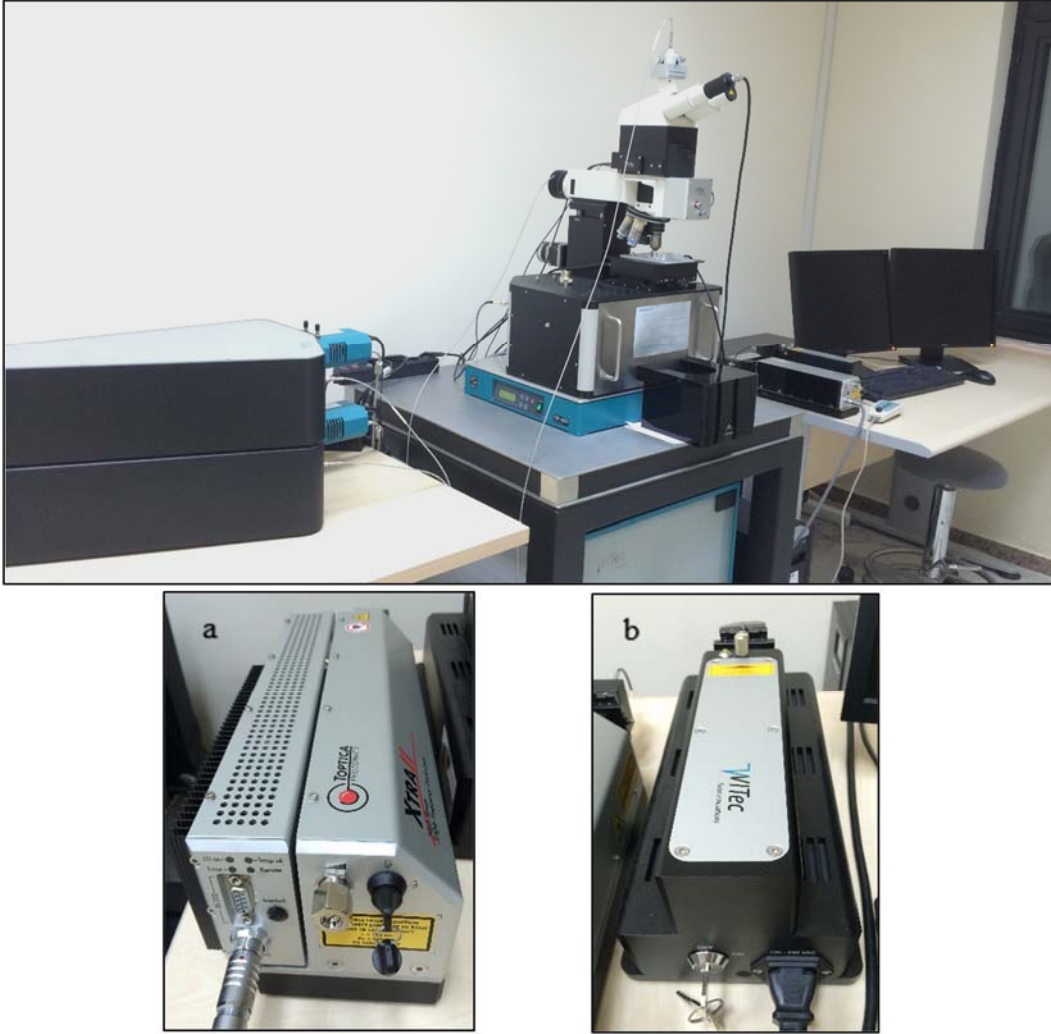
3.1.3. Sarf malzemeler

Erlenmayer (Isolab, Almanya), falkon tüpleri (Isolab, Almanya), lam (Thermo Scientific, ABD), mikropipetler (Eppendorf, Almanya), pipet uçları (Isolab, Almanya), ependorf tüpleri (Isolab, Almanya), alüminyum folyo.

3.1.4. Ölçüm sistemleri

Spektroskopik analizler, Gazi Üniversitesi bünyesinde bulunan WITec Alpha300S SNOM/AFM/Raman Sistemi (Almanya) ile gerçekleştirilmiştir (Resim 3.1.). Konfokal Raman Spektroskopi cihazı kapsamında Raman mikroskop (20x, 50x, 100x, 63x,

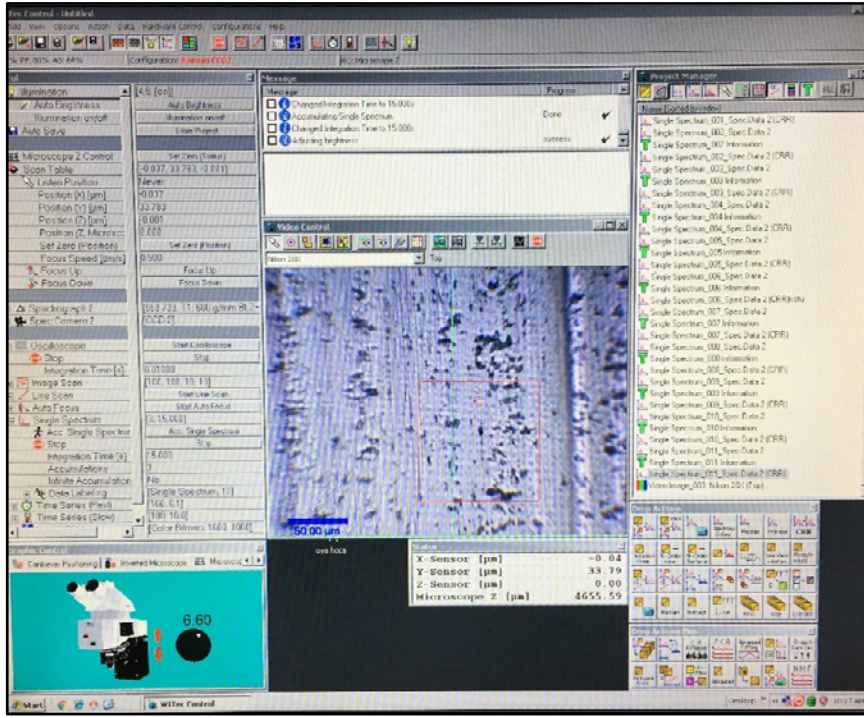
immersiyon tip objektifler), mikroskop için hareketli lamel haznesi, numunelerin $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ile $+120\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında ısıtma-soğutma işlemini sağlayacak ünite, lazer ışınının polarizasyonunu sağlayacak filtre seti, 532 nm ve 785 nm dalga boylarında lazerler, bu bölgeler (VIS ve NIR) için yüksek optik verimliliğe sahip iki adet UHTS 300 spektrograf ve iki adet CCD dedektör bulunmaktadır. Ayrıca numune üzerine uygulanacak lazer ışın şiddetini ölçen dijital optik güç ve enerji ölçer (Thorlabs, ABD) cihazı da mevcuttur. 532 nm dalga boyunda lazerin çıkış gücü 75 mW olup, fiber çıkışında $\sim 50\text{ mW}$ 'a düşmektedir. 785 nm dalga boyundaki lazerin çıkış gücü $\sim 300\text{ mW}$ olup, fiber çıkışında örneğe aktarılan güç $<150\text{ mW}$ 'dır. Kullanılan Raman sistemi 200 ile 4000 cm^{-1} dalga boyları arasında ölçüm alabilmekte olup 4 cm^{-1} spektral çözünürlüğe sahiptir.



Resim 3.1. Konfokal Raman spektroskopi düzeni a. 785 nm lazer kaynağı b. 532 nm lazer kaynağı

3.1.5. Veri analiz sistemleri

WITec Software kapsamında üç adet bilgisayar programı bulunmaktadır. Witec Control (2.10) ile Konfokal Raman Spektroskopik ölçümler yapılmakta, Witec Project (2.10) ile veriler analiz edilmekte ve Witec Project Plus (2.10) programı ile ileri analizler yapılabilmektedir. Raman spektrum verilerinin işlenmesi, düzenlenmesi ve sunuma hazır hale getirilmesi OriginPro 9.1 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. RS'de iki bilgisayar ekranı kullanılmaktadır. Birinde numune odaklamasının yapıldığı ve ölçüm parametrelerinin girildiği ekran görünürken diğerinde spektrum sonuçları görüntülenmektedir. Aşağıda Witec Control programının ekran görüntüsü verilmiştir (Resim 3.2.).



Resim 3.2. Raman spektroskopik ölçümleri almada kullanılan Witec Control yazılımının ekran görüntüsü

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

İlk olarak klinik uygulamaya hazırlık için önemli bir basamak olarak görülmesi sebebiyle, sentetik idrar hazırlandı. Daha sonra her metabolite ait Raman parmakizi bandını elde etmek amacıyla, belirlenen konsantrasyonlardaki glukoz, üre, kreatinin ve ürik asitin distile su içerisindeki çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı. Son olarak kalibrasyon grafiklerinin

oluşturulabilmesi amacıyla her idrar metaboliti için 15-16 farklı konsantrasyon olmak üzere toplamda 62 tane sentetik idrar örnekleri hazırlandı.

3.2.1. Sentetik idrar hazırlanması

Sentetik idrar hazırlanmasında Lee ve diğerleri (2013)'nin çalışmasında kullandığı yöntem referans alındı [129]. Hazırlanan sentetik idrarın içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Sadece kreatinin ve üreye ait konsantrasyon deneyleri için bu iki metaboliti içermeyen sentetik idrar ayrıca hazırlandı. Sentetik idrarı taze kullanabilmek için her defasında 100'er ml olacak şekilde hazırlandı. Tüm kimyasallar belirtilen miktarların 1/5'i olacak şekilde tartılıp tamamı 100 ml olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlandı. Steril erlenmayerde hazırlanan sentetik idrar yaklaşık yarım saat manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. pH değeri 6,8 olarak ayarlandı [9]. İnsanda idrarın normal pH'sının 5,5-7,0 aralığında olduğu bilinmektedir [38]. Fakat sağlıklı koşullarda idrar pH'sı 4,5'a kadar düşebilmekte veya 8,5'a kadar çıkabilmektedir. Hazırlanan sentetik idrar hemen kullanılmayacaksa +4 °C buzdolabında saklandı.

Çizelge 3.1. Hazırlanan sentetik idrar içeriği [129]

İçerik Adı	Kimyasal Formülü	Miktar
Potasyum klorür	KCl	3,8 g
Sodyum klorür	NaCl	8,5 g
Üre	CH ₄ N ₂ O	24,5 g
Sitrik asit	C ₆ H ₈ O ₇	1,03 g
Askorbik asit	C ₆ H ₈ O ₆	0,34 g
Potasyum fosfat	KH ₂ PO ₄	1,18 g
Kreatinin	C ₄ H ₇ N ₃ O	1,4 g
Sodyum hidroksit	NaOH	0,64 g
Sodyum bikarbonat	NaHCO ₃	0,47 g
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	0,28 ml
Distile su	dH ₂ O	500 ml

3.2.2. Üre çözeltilerinin hazırlanması

-Üreye ait Raman referans spektrumu eldesi için 75 mg toz üre eppendorf tüpünde 1 ml distile su ile çözdürüldü.

-Sentetik idrarda konsantrasyonları 2,5-5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65-70 ve 75 mg/ml olacak şekilde 16 farklı üre çözeltisi hazırlandı. Ürenin tamamen çözünerek homojen bir çözelti eldesi için karışım 5 dk vortekslendi. Burada kullanılan sentetik idrar hazırlanırken içerisine üre hiç eklenmedi.

3.2.3. Kreatinin çözeltilerinin hazırlanması

-Kreatinine ait Raman referans spektrumu eldesi için 75 mg toz kreatinin eppendorf tüpünde 1 ml distile su ile çözdürüldü.

-Sentetik idrarda konsantrasyonları 2,5-5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65 ve 70 mg/ml olacak şekilde 15 farklı kreatinin çözeltisi hazırlandı. 5 dk vortekslendi. Burada kullanılan sentetik idrar hazırlanırken kreatinin hiç eklenmedi.

3.2.4. Glukoz çözeltilerinin hazırlanması

-Glukoza ait Raman referans spektrumu eldesi için 75 mg toz glukoz eppendorf tüpünde 1 ml distile su ile çözdürüldü.

-Sentetik idrarda konsantrasyonları 1,75-2,5-5-10-15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65 ve 70 mg/ml olacak şekilde 16 farklı glukoz çözeltisi hazırlandı. 5 dk vortekslendi.

3.2.5. Ürik asit çözeltilerinin hazırlanması

-Ürik asite ait Raman referans spektrumu eldesi için 25 mg toz ürik asit eppendorf tüpünde 1 ml distile su ile çözdürüldü.

-Sentetik idrarda konsantrasyonları 0,25-0,5-1-2-4-6-8-10-12-14-16-18-20-22 ve 24 mg/ml olacak şekilde 15 farklı ürik asit çözeltisi hazırlandı. 5 dk vortekslendi.

3.2.6. Tüm metabolitleri içeren sentetik idrar çözeltisinin hazırlanması

Hazırlanan sentetik idrara konsantrasyonları 49 mg/ml üre, 25 mg/ml kreatinin, 25 mg/ml glukoz ve 2,5 mg/ml ürik asit olacak şekilde dört metabolit eklendi. Tüm metabolitleri içeren sentetik idrar 5 dk vortekslendi.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Raman spektroskopi cihazının kalibrasyonu

Her analiz öncesinde Raman spektroskopi cihazından en yüksek verimi alabilmek için Raman ayar işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için 520 nm ve 950 nm’de iki belirgin pik veren silikon plaka kullanıldı. Cihazın kalibrasyonu kullanma kılavuzunda belirtildiği üzere; Raman sisteminin enerji ayarlaması, objektif/kamera ayarlaması ve lazer ışını merkezlemesi olmak üzere üç adımda gerçekleştirildi. Böylece cihaz maksimum performansta kullanılmaya hazır hale getirildi.

3.3.2. Optimizasyon çalışmaları

Çalışmamızda kullanılacak en uygun lazer kaynağı, lazer şiddeti, lazerin birikme süresi ve toplanma sayısını belirlemek amacı ile Raman spektroskopisinde optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Literatürdeki, idrar metabolitlerinin RS ile analizinin yapıldığı çeşitli çalışmalarda 632.8 nm, 785 nm ve 830 nm dalga boylarındaki lazer kaynaklarının kullanıldığı görülmektedir [4, 55, 59]. Çalışmamızda kullanılan Raman sisteminde 532 nm safir yeşil ve 785 nm diyot kırmızı lazer olmak üzere iki adet lazer kaynağı bulunmaktadır. Uygun lazer kaynağının seçimi amacıyla bu dalga boyları, hem sentetik idrar için hem de dört farklı metabolitin sulu çözeltileri için ayrı ayrı denendi.

Lazerin birikme süresini ve tekrar sayısını belirleme çalışmalarında 75 mg ürenin 1 ml distile su içerisindeki çözeltisi kullanıldı. Bu çalışmada üre, idrar metabolitleri arasında en belirgin karakteristik Raman bandına sahip olduğu için seçildi. Optimum koşullar, ürenin 1004 cm^{-1} dalga boyunda verdiği pik temel alınarak belirlendi. RS ile idrar metabolitlerinin çalışıldığı

araştırmalarda 1, 5, 10 ve 20 sn integrasyon sürelerinin kullanıldığı gözlenmektedir [4, 6, 9-11, 55, 59]. Bu sebeple çalışmamızda en uygun lazer integrasyon süresinin (örnek-lazer etkileşim süresi) seçimi için 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 sn ayrı ayrı denendi. Lazerin tekrar sayısını (accumulation) belirlemek için 1, 3, 5, 10 ve 15 tekrarlar çalışıldı.

3.3.3. Raman spektroskopisi ölçümü

Analizi yapılacak her çözeltilerden homojen olması için vortekslenerek 50 µl örnek alındı. Alüminyum folyo ile sarılı lam üzerine damlatıldı. 20X/0.40 objektifte, 785 nm dalga boyunda ve ~35 mW lazer gücü kullanılarak RS'de ölçüm alındı. Lazerin gücü her deney başlangıcında numune odaklamasından sonra osiloskop mod kullanılarak en üst seviyeye ayarlandı. Osiloskop mod, lazerin gücünü artırıp azaltırken aynı anda dalga sinyalinin frekansını ekranda görmemizi sağlar. Daha sonra örneğe gelen lazer gücü, dijital optik güç ve enerji ölçer (Thorlabs) cihazı ile ölçüldü. Tüm analizler için integrasyon süresi 15 sn ve üç tekrarlı olacak şekilde ayarlanarak tekli spektrum ile ölçüm alındı. Böylece her örneğin toplam analiz süresi 45 sn olarak belirlendi. Bütün Raman spektrumları 200 ile 1700 cm^{-1} arasındaki dalga boylarında toplandı. Kullanılan idrar metabolitlerine ait Raman bantları ve literatürdeki çalışmalar da incelendiğinde 1700 cm^{-1} dalga boyundan sonraki ölçüme gerek görülmedi. Ölçüm esnasında analizlerin ışıktan ve havadan etkilenmemesi için mikroskop bölgesi siyah bir kapakla kapatıldı.

-Öncelikle, yapılmış çalışmalardan herhangi bir Raman sinyaline sahip olmadığı bilinen alüminyum folyo yüzeyi Raman'da analiz edildi [55, 130]. Elde edilen spektrum cam yüzeyden alınan spektrum ile karşılaştırılarak kullanılacak en uygun yüzey tespit edildi.

-Sonra hazırlanan sentetik idrar içine hiç bir eklenti yapılmadan Raman'da ölçümü yapıldı. Elde edilen spektrum, ticari olarak temin edilmiş sentetik idrar negatif kontrol örneğinden alınan Raman spektrumu ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda bu spektrumlar literatürde bulunan gerçek idrardan yapılmış bir Raman analizi verisi ile karşılaştırıldı.

-Metabolitlerin distile su içindeki çözeltilerinden, her metabolite ait Raman referans spektrumlarını elde etmek amacıyla analizler yapıldı.

-Sentetik idrarda 15-16 farklı konsantrasyonda hazırlanan üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit çözeltilerinden 50'şer µl alınarak RS'de ayrı ayrı ölçümleri alındı.

-Son olarak eş zamanlı analiz için, tüm metabolitleri içeren sentetik idrar örneği Raman'da analiz edildi. Tüm analizlerde, belirlenen optimum cihaz parametreleri kullanıldı.

Bölgesel Raman spektrumu alınması

Tüm metabolitleri içeren çözelti vortekslenerek 50 µl örnek alındı. 785 nm dalga boyunda, lazer süresi 1 sn ve tek tekrarlı olacak şekilde tarama koşulları ayarlandı. Numune odaklamasından sonra tarama alanı belirlendi. “Genişlik” ve “yükseklik” değerleri 20 µm olarak girildi. Bunun üç katı olacak şekilde “çizgi başına nokta sayısı” ve “tarama başına çizgi sayısı” değerleri 60 olarak belirlendi. Böylece ~20×20 µm’lik bir alanda, x-y eksenindeki 3600 noktadan (pikselden) spektrum toplandı. Z eksenini ise görüntü kaydedilirken sabitlendi. Burada x-y piksel koordinatlarını, üçüncü boyut olan z ise spektrumun dalga boyunu göstermektedir. Tarama esnasında, görülen farklı yapıların karakteristik piklerinin olduğu dört bant belirlendi. Bu bantların yoğunluk haritalarını görüntülemek için her bant bölgesi ayrı ayrı taranarak filtre edildi. Bir saat süren bölgesel Raman tarama analizinden sonra verinin değerlendirilme aşamasına geçildi.

Bölgesel Raman tarama verisinin değerlendirilmesi Witec Project programı ile yapıldı.

- İlk olarak spektrumda keskin uzun pikler şeklinde görülen kozmik pikler, kozmik ışın giderme (CRR) işlemi ile kaldırıldı.
- Spektrumun taban çizgisi belirlenerek “auto polynomial” seçeneği ile arkaplan çıkarımı yapıldı.
- Filtrelenmiş bölgelerden ortalama spektrum alındı. Bu işlem için filtre ile oluşturulmuş görüntü üzerinde gezinerek değerlendirilebilecek en küçük sinyal yoğunluğu tespit edildi. Bu değer üzerinde bölge için maske oluşturuldu. Sonuçta filtrelenmiş dört bölgeye ait ortalama spektrumlar ayrı ayrı oluşturuldu.
- “Taban analizi” işlemi ile oluşturulan ortalama spektrumlara göre dağılım bölgeleri belirlendi. Lazer ana sinyalini içeren 400 nm’ye kadar olan bölge spektrumdan çıkarıldı. Bu işlem sonunda ilk görüntülerin daha belirginleşmiş ve yapıların yerleri keskinleşmiş hali elde edildi.
- “Görüntü renk kombinasyonu” işlemi ile renkli görüntü oluşturuldu. Bu işlem için elde edilen son görüntüler bir araya getirildi ve her farklı yapı bölgesi farklı renkler

ile kodlanarak son görüntü oluşturuldu. Her iki x ve y eksenindeki uzamsal çözünürlük 1 µm olacak şekilde harita kaydedildi.

- Son basamakta, elde edilen renkli görüntü ile buradaki farklı yapılara ait dört ortalama spektrum birlikte gösterildi. Spektrumların renkleri ait oldukları bölgelerin renkleri ile aynı olacak şekilde ayarlandı.

3.3.4. Yöntemin geçerliliği

Yöntemin geçerliliği; doğrusallık, hassasiyet ve kesinlik değerleri hesaplanarak gösterildi. Bu kriterler belirlenen optimum analiz koşulları altında tespit edildi.

Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Hazırlanan sentetik idrardaki üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit konsantrasyonlarına karşılık, Raman bantlarındaki değişimin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Her metabolit için en az 15 farklı konsantrasyon kullanıldı ve kalibrasyon grafiklerindeki her nokta 3 tekrarlı ölçüm ile elde edildi. Her metabolit için referans bandı merkezde olacak şekilde bandın başlangıç ile bitiş noktaları belirlendi ve OriginPro 9.1 yazılımı ile bu aralıktaki maksimum yükseklik ile alan değerleri hesaplandı. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesinde, kimi çalışmalarda pik şiddetlerinin [6] kimi çalışmalarda pik alanlarının [9] kullanıldığı görüldü. Bu çalışmada her ikisiyle de kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve korelasyon katsayısının (R^2) elde edilmesiyle doğrusallık değerlendirildi.

Doğrusallığın test edilmesi ve aynı zamanda hassasiyetin belirlenmesi için, elde edilen kalibrasyon eğrilerinden tespit sınırı (limit of detection, LOD) ve tayin sınırı (limit of quantification, LOQ) değerleri hesaplandı. Tespit sınırı, örnekte ölçülebilen ancak miktarı kesin olarak belirlenemeyen en düşük miktar ya da konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Tayin sınırı ise kabul edilebilir bir güvenilirlikle tayin edilebilen en düşük değerdir. LOD ve LOQ değerlerinin standart sapma ve eğim kullanılarak hesaplandığı eşitlikler aşağıda gösterilmektedir [131].

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (3.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (3.2)$$

σ = regresyon katsayısının standart sapması

S = kalibrasyon eğrisinin eğimi

LOD değerinin tahmininde sinyal/gürültü oranı genellikle 3,3 olarak kabul edilir. ISO/TS 13530'da LOQ değerinin LOD'nin 3 katı olarak hesaplanabileceği belirtilmiştir. Bu sebeple LOQ hesaplamasında sinyal/gürültü oranı genellikle 10 olarak alınır [132].

Tekrarlanabilirlik deneyleri

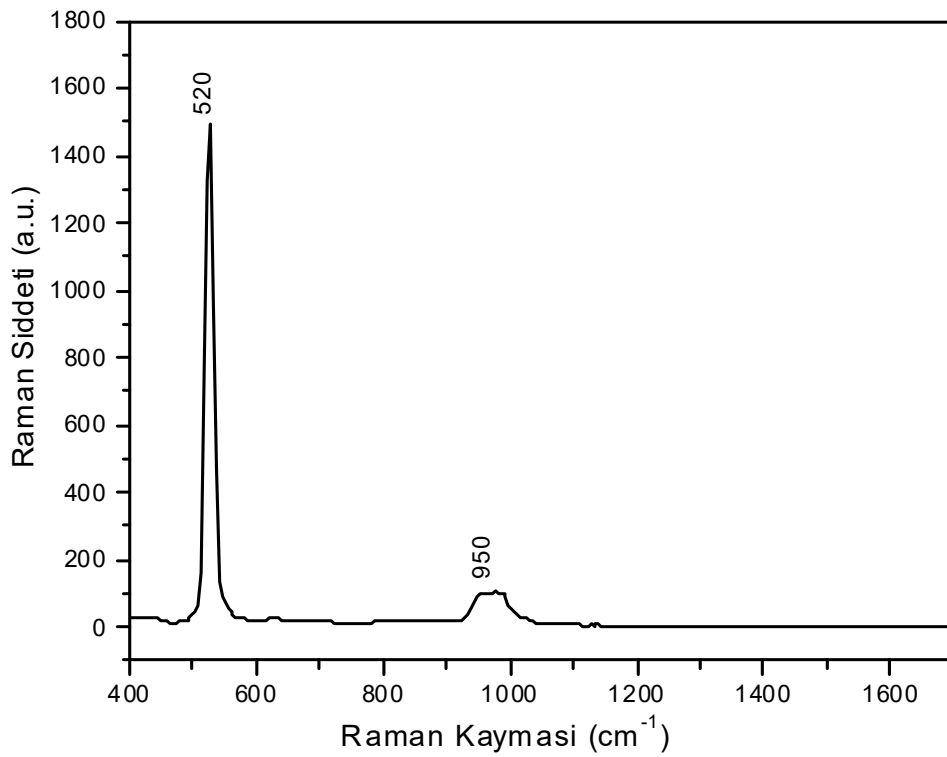
Hem Raman spektrumlarının tekrar edilebilirliğini ölçmek için hem de çözeltilerin homojenite testi için her metabolite ait sentetik idrar karışımlarından alınan 50 µl örnekte, aynı yüzeyin 10 farklı noktasından ölçüm yapıldı. Bu çalışmada üre, kreatinin ve glukoz için 35 mg/ml'lik, ürik asit için 10 mg/ml'lik konsantrasyonlar seçildi. Daha sonra her bir idrar metaboliti için elde edilen spektrumlardaki referans bandının şiddetleri y eksenine, yapılan analiz sayısı x eksenine yazılarak grafikler oluşturuldu. Her biri için ortalama, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı.

Yine Raman spektrumlarının kesinliği için belirlenen dört konsantrasyondan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik deneyleri yapıldı. Bu çalışmada üre, kreatinin ve glukoz için seçilen konsantrasyon 20 mg/ml iken ürik asit için 5 mg/ml'dir. Dört örnekten gün içinde 5 kez ve birer gün arayla 3 günde ölçümler alındı. Her örnek için toplamda 15 analiz gerçekleştirilmiş oldu. Analizler esnasında tüm çalışma koşulları sabit tutuldu. Dört bileşen için de Raman referans bant şiddetlerinin gün içi ve günler arası ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Silikon Plaka ile Raman Spektroskopisinin Kalibrasyonu

Raman spektroskopi cihazının kalibrasyonu için silikon plaka kullanılmış ve analiz sonrası elde edilen spektrum Şekil.4.1.'de gösterilmiştir. Silikon plakadan gelen 520,6 ve 950 cm^{-1} 'deki pikler maksimum olacak şekilde ayar işlemleri gerçekleştirildi. Her analiz öncesi yapılan bu işlem sayesinde cihaz performansı en üst seviyeye çıkarıldı.



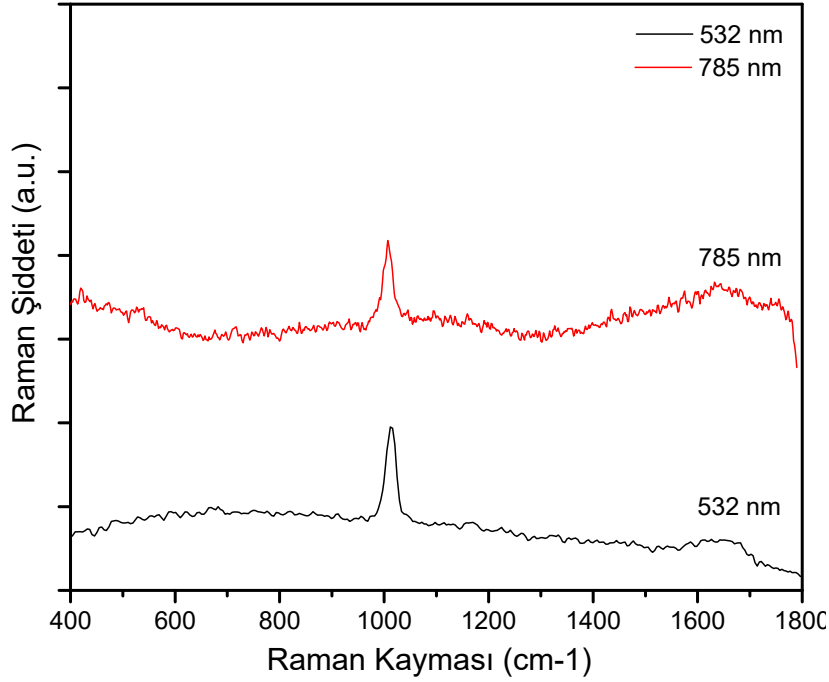
Şekil 4.1. Cihaz kalibrasyonu için silikon plakadan alınan Raman bandı

4.2. Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tüm analizlerde kullanılacak olan optimum cihaz parametrelerinin belirlenmesi için farklı lazer kaynakları, integrasyon süreleri ve tekrar sayıları denenmiştir.

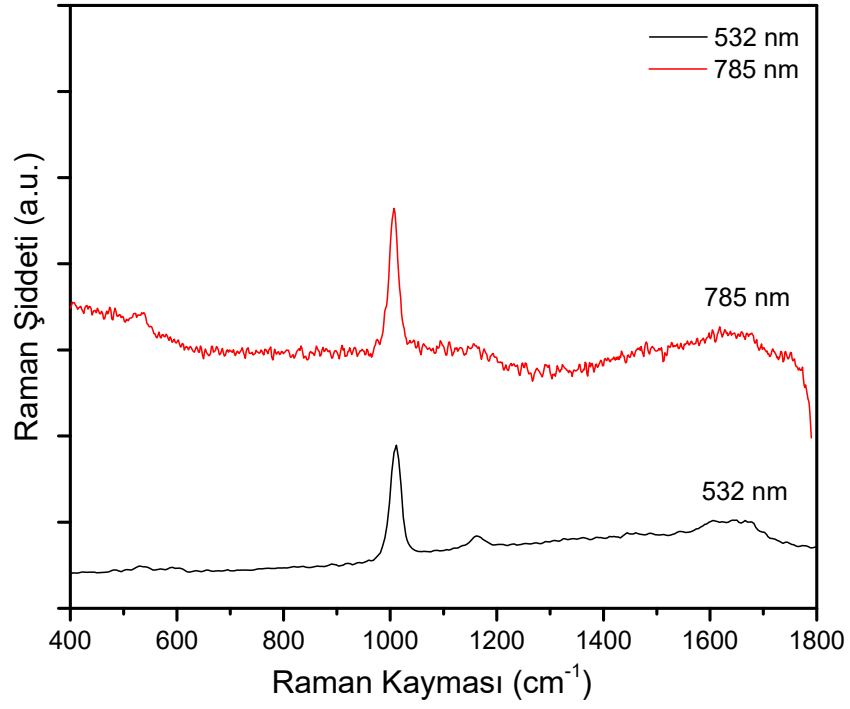
4.2.1. Lazer ışının dalga boyu seçimi

Yüksek enerjili 532 nm lazeri, genelde ~ 3 mW lazer gücünde kullanılmaktadır. 532 nm ile bu lazer gücünde çalışığımızda hiç bir Raman sinyali gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla uygun lazer kaynağının seçimi için 532 nm güç ölçer ile 15 mW lazer gücüne, 785 nm ise 35 mW lazer gücüne ayarlanmıştır. Şekil 4.2.'de sentetik idrara ait 532 ve 785 nm dalga boylarındaki lazer kaynaklarından alınan spektrumlar görülmektedir.

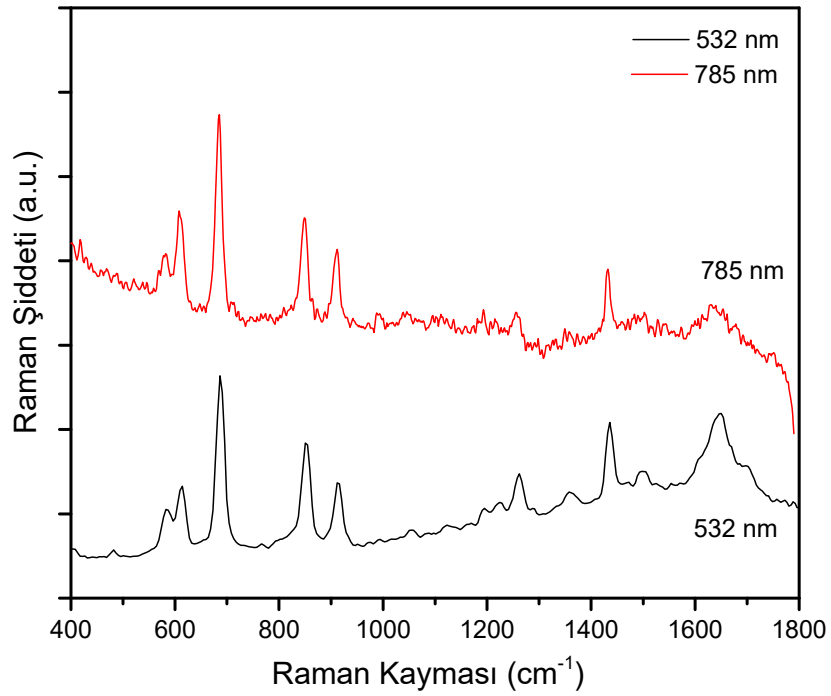


Şekil 4.2. Sentetik idrarın 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları

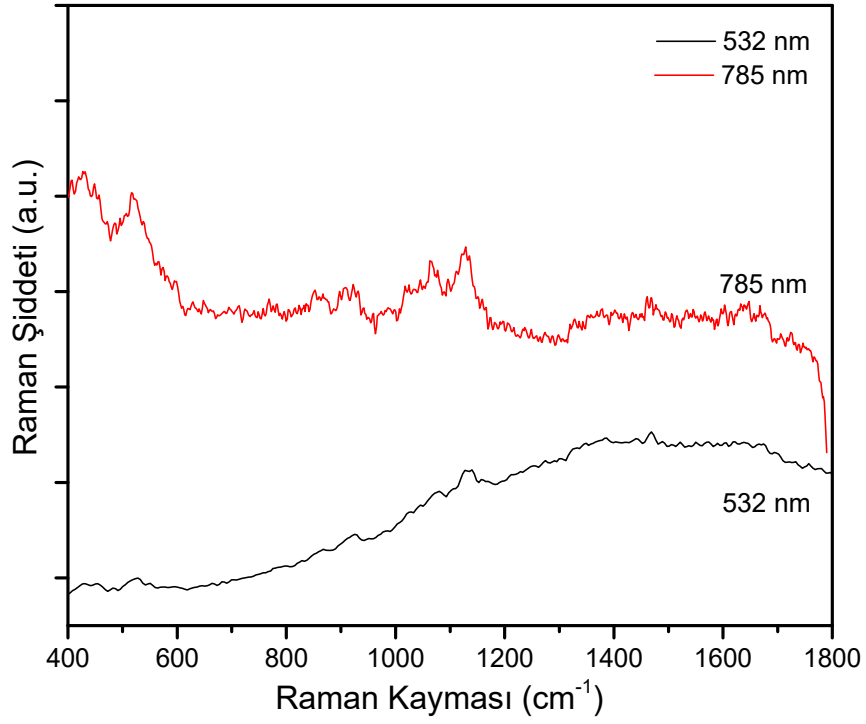
Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da sırasıyla 75 mg/ml ürenin, 75 mg/ml kreatininin, 75 mg/ml glukozun ve 25 mg/ml ürik asitin distile sudaki çözeltilerinin 532 ve 785 nm dalga boylarındaki Raman spektrumları görülmektedir. Tüm analizler incelendiğinde her iki lazer kaynağından elde edilen bantların aynı dalga boyundan geldiği söylenebilir. Bu da Raman spektroskopisinde gözlenen frekansların uyarma dalga boyundan bağımsız olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca 532 nm'den alınan spektrumlarda lazer ışınının emiliminden kaynaklanan floresan etki görülmektedir. Bu etki gerçek spektrumu baskılayabileceğinden deneylerde 785 nm dalga boyundaki lazerin kullanımı uygun görülmüştür.



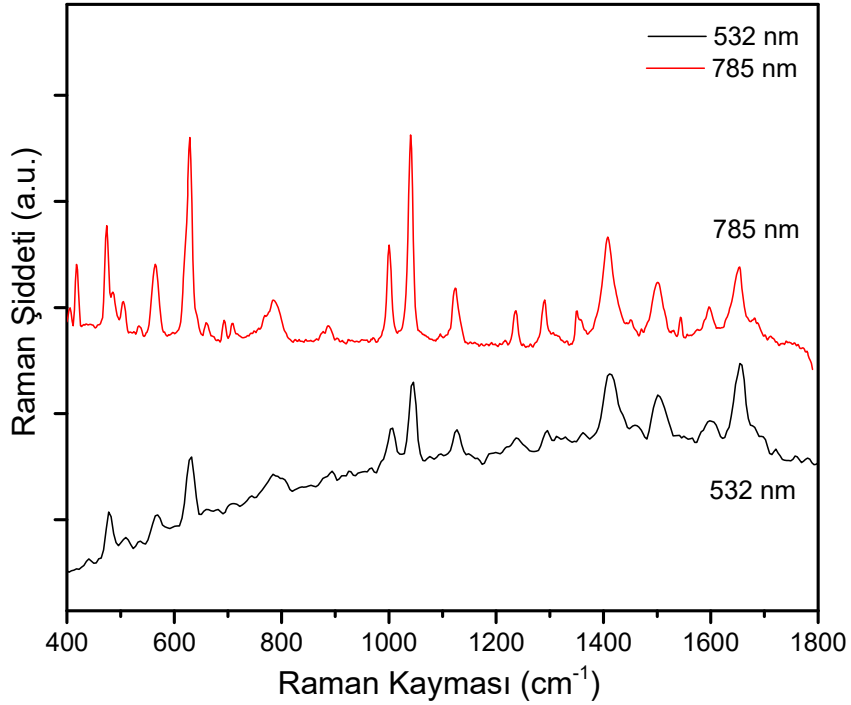
Şekil 4.3. Distile su içerisindeki 75 mg/ml ürenin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları



Şekil 4.4. Distile su içerisindeki 75 mg/ml kreatininin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları



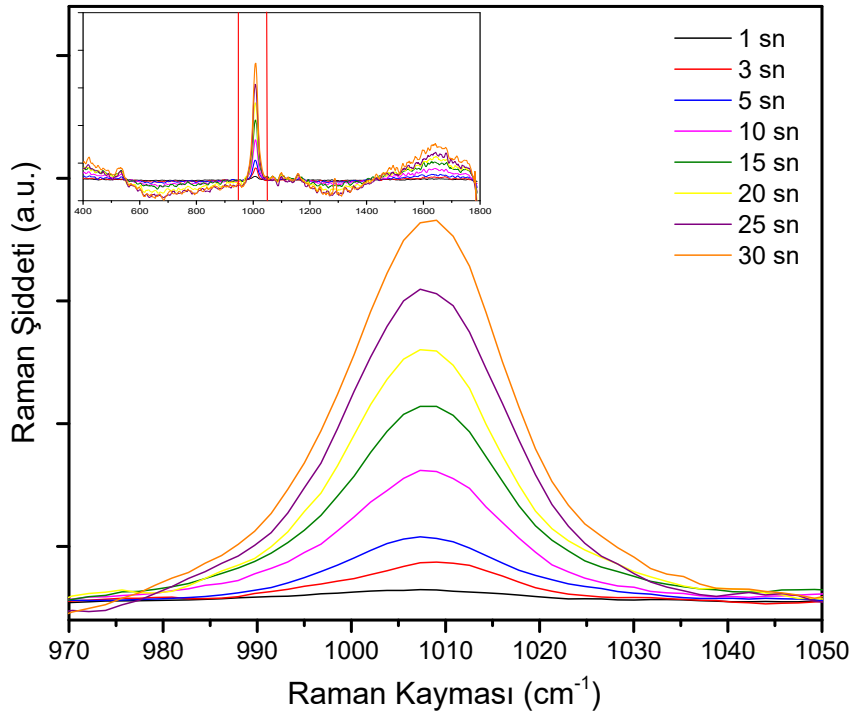
Şekil 4.5. Distile su içerisindeki 75 mg/ml glukozun 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları



Şekil 4.6. Distile su içerisindeki 25 mg/ml ürik asitin 532 ve 785 nm lazer kaynaklarından alınan Raman spektrumları

4.2.2. Lazerin integrasyon süresinin belirlenmesi

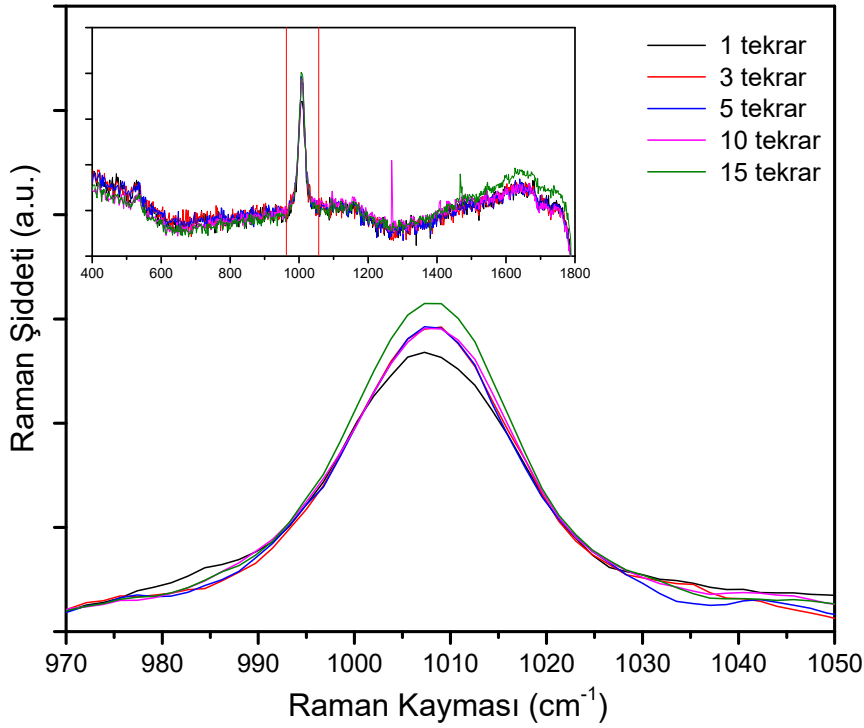
Çalışmamızda en iyi verimlilikle spektrum alınabilmesi için farklı örnek-lazer etkileşim süreleri araştırılmıştır. Üre çözeltilisinden alınan örnekte 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 sn integrasyon süreleri denenmiştir. Farklı integrasyon sürelerinin denenmesi sırasında, lazerin tekrar sayısı (3 tekrar) ve diğer analiz parametreleri sabit tutulmuştur. Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi numunenin lazere maruz kalma süresi uzadıkça Raman şiddetinde de orantılı bir artış söz konusudur. 1, 3 ve 5 sn integrasyon süreli ölçümlerde sinyal şiddeti yetersiz görülmektedir. 10 sn'den elde edilen Raman şiddetinin ise düşük konsantrasyonlu örneklerde yetersiz kalabileceği düşünülmüştür. 15 sn'den sonraki denemelerde integrasyon süresinin artmasıyla sinyal şiddetlerinin artmaya devam ettiği, ancak arka plan gürültüsünün çoğaldığı ve kozmik ışınların belirmediği gözlenmiştir. Bu sebeple analizler için en uygun örnek-lazer etkileşim süresi 15 sn olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Ürenin distile sudaki çözeltilisinden, lazerin 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 sn integrasyon süreleri ile elde edilen Raman spektrumları

4.2.3. Lazerin tekrar sayısının belirlenmesi

Tüm analizlerde uygulanacak lazerin tekrar sayısını (accumulation time) belirlemek amacıyla üre çözeltilisinden alınan örnekte 1, 3, 5, 10 ve 15 tekrarlar çalışıldı. Tekrar sayıları değiştirilirken 15 saniyelik integrasyon süresi ve diğer tüm analiz parametreleri sabit tutuldu. Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi 1 tekrarda sinyal şiddeti düşük iken 3, 5 ve 10 tekrarlarda sinyal şiddetinde belirgin bir fark gözlenmedi. 15 tekrarda 1004 cm^{-1} 'deki üre pikinin diğerlerine göre daha şiddetli olduğu görüldü. Ancak tekrar sayısının çoğalmasıyla 10 ve 15 tekrarda kozmik ışınlar belirlemeye başladı. 3, 5 ve 10 tekrarlarda farklılık görülmemesi sebebiyle ve tekrar sayısının fazla olması analiz süresini uzatacağından çalışmalarımızda üç tekrarın kullanılması uygun görülmüştür.

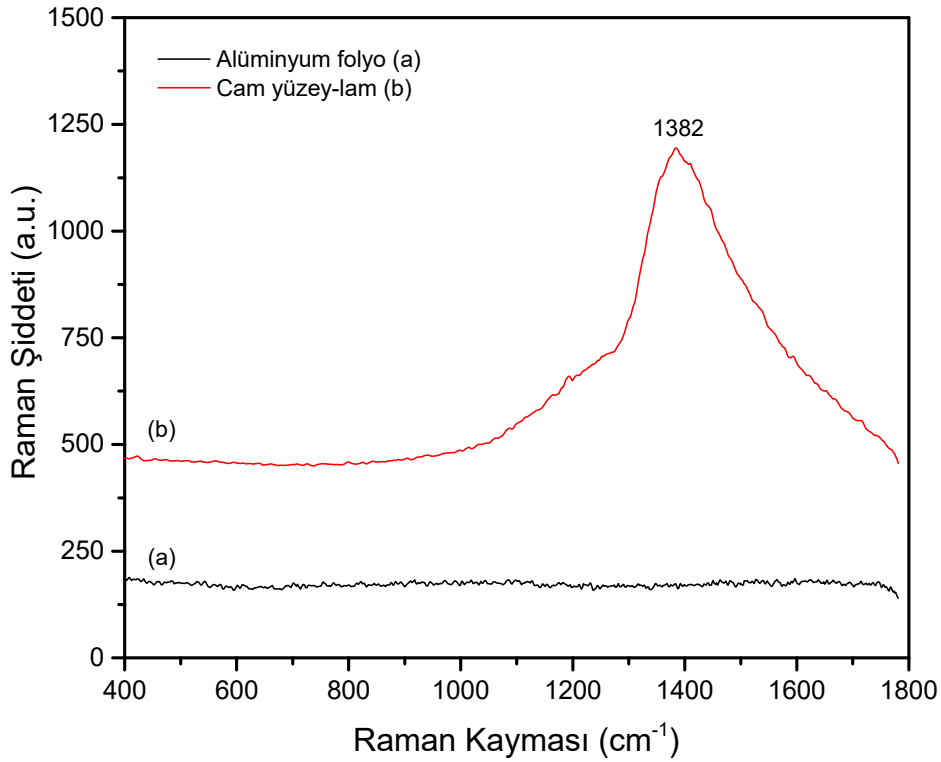


Şekil 4.8. Ürenin distile sudaki çözeltilisinden, lazerin 1, 3, 5, 10 ve 15 tekrarları ile elde edilen Raman spektrumları

4.3. Raman Spektroskopisi Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.3.1. Alüminyum folyo ve cam yüzey analizlerinin karşılaştırması

Analiz için üzerine örneklerin damlatılacağı lama sarılı alüminyum folyodan ve karşılaştırma için sadece steril bir lam üzerinden RS’de ölçümler alındı. Elde edilen alüminyum folyo spektrumu, literatür bilgisini doğrular nitelikte hiçbir sinyale sahip olmazken cam yüzeyde 1382 cm^{-1} ’de geniş bir floresan bandı gözlemlendi (Şekil 4.9.) [133]. Deneysel lam kullanılması, arkaplandaki bu güçlü floresan girişiminden dolayı verilerin işlenmesini ve yorumlanmasını zorlaştıracığından alüminyum folyo tercih edilmiştir.

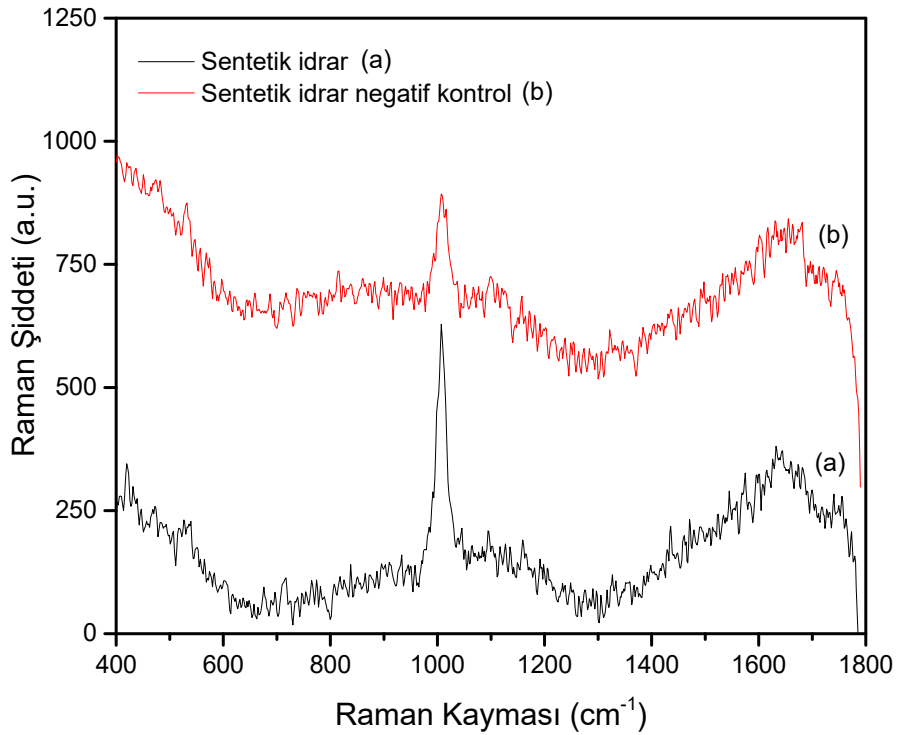


Şekil 4.9. Alüminyum folyo ve cam yüzeyinden alınan Raman spektrumları

4.3.2. Sentetik idrar ve gerçek idrara ait Raman spektrumları karşılaştırması

Hazırlanan sentetik idrardan ve ticari sentetik idrar negatif kontrol örneğinden elde edilen Raman bantlarının karşılaştırması Şekil 4.10.’da görülmektedir. Literatürde mevcut bir çalışmadan alınan, normal bir insan idrarının Raman bandı EK-1.’de verilmiştir [127]. Bu çalışmada idrar örnekleri beş sağlıklı kişiden toplanmış ve 785 nm ’de Raman ölçümleri

yapılmıştır. Beş spektrumun ortalaması alınarak standart bir spektrum oluşturulmuştur. Sentetik idrar ve gerçek idrar örneklerinde üre, nitrojen içeren bileşiklerin başında geldiği için idrar spektrumunda en kolay tespit edilebilen sinyal üre pikidir [9]. Hazırlanan sentetik idrardan alınan spektrumun, sentetik idrar negatif kontrol örneğinden ve gerçek idrardan gelen spektrumlar ile uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Yalnız, sentetik idrar negatif kontrol çözeltisinden elde edilen üre sinyalinin şiddetinin gerçek idrardakine göre daha zayıf olduğu, hazırlanan çözeltidekinin ise gerçek idrardakine daha yakın olduğu görülmektedir.

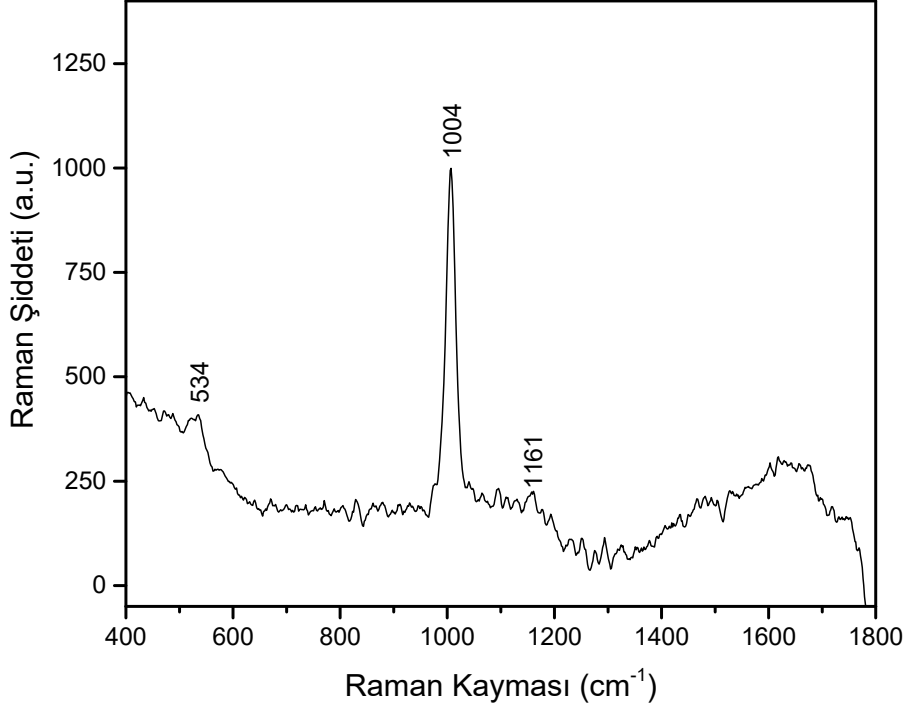


Şekil 4.10. Hazırlanan sentetik idrar ve ticari sentetik idrar negatif kontrol örneklerine ait Raman spektrumlarının karşılaştırması

4.3.3. İdrar metabolitlerine ait Raman referans spektrumlarının belirlenmesi

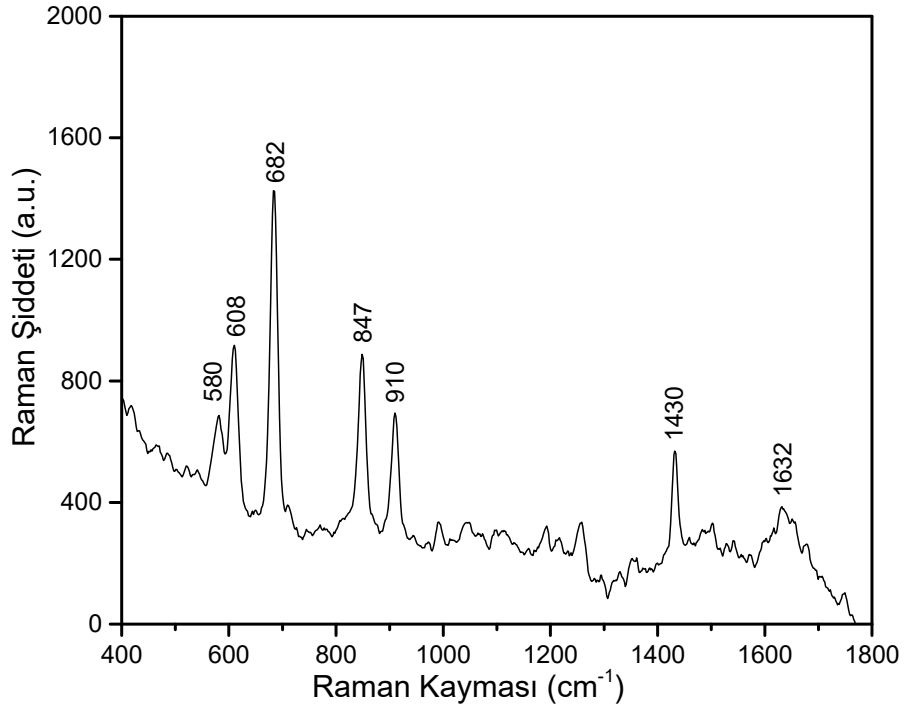
Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asitin distile sudaki çözeltileri kullanılarak, her birine ait Raman referans spektrumları elde edilmiştir. Şekil 4.11.'de konsantrasyonu 75 mg/ml olan üre çözeltisinden alınan Raman referans bantları görülmektedir. Burada 534, 1004 ve 1161 cm⁻¹'de beliren pikler üre varlığına işaret etmektedir. Çalışmamızda elde edilen bu bantlar diğer birçok çalışmayı doğrular niteliktedir. Üre piki denilen 1004 cm⁻¹'deki güçlü bant, simetrik C-N gerilme bağının varlığını; 1161 cm⁻¹'de görülen zayıf bant ise NH₂ varlığını

göstermektedir [4, 134]. RS yöntemi kullanılan farklı çalışmalarda üre pikinin 1000 cm^{-1} [9], 1006 cm^{-1} [135] ve 1013 cm^{-1} [6] dalga boylarında geldiği de görülmüştür. Dalga boyundaki bu kaymalar; kullanılan lazer kaynağından, cihaz parametrelerinden, farklı çözeltiler içerdiğinden ve/veya oda sıcaklığından kaynaklanabilmektedir.

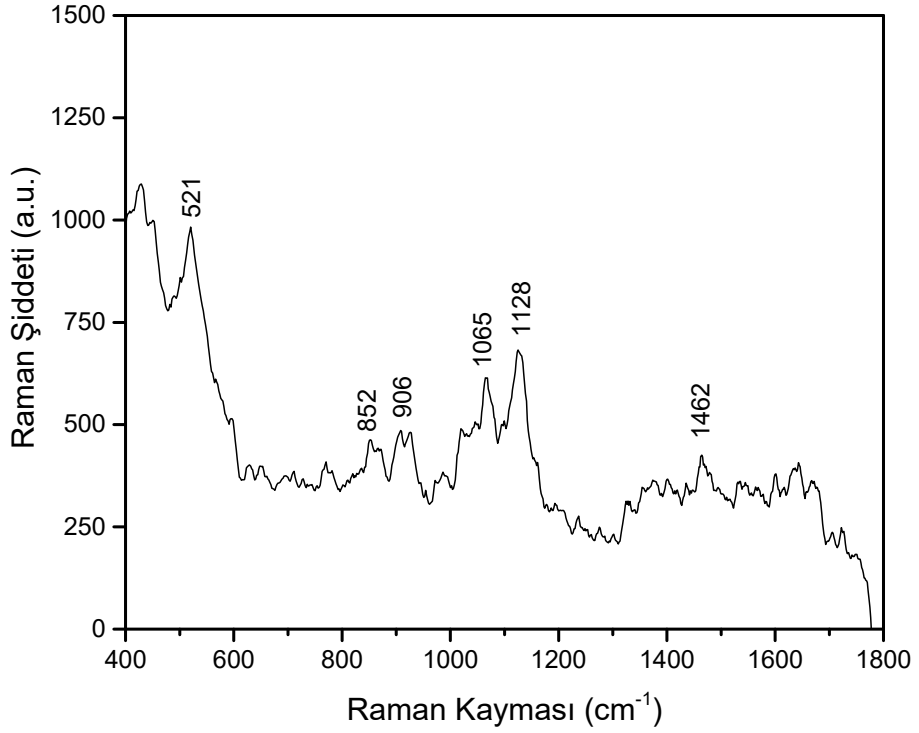


Şekil 4.11. Üre çözeltilisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu

Şekil 4.12.'de 75 mg/ml kreatinin distile sudaki çözeltilisine ait Raman referans bantları verilmiştir. En belirgin kreatinin pikleri $580, 608, 682, 847, 910, 1430$ ve 1632 cm^{-1} dalga boylarında görülmektedir. Bu bantlardan 608 cm^{-1} dalga boyunda görülen N-CH_3 gerilmesine, C=O deformasyonuna ve halka titreşimine işaret etmektedir. 682 cm^{-1} 'deki en güçlü bant C-NH_2 ve C=O gerilme ve aromatik halka titreşimlerini göstermektedir. 847 cm^{-1} 'de bulunan bant C-NH_2 deformasyonu ve halka titreşimini belirtmektedir. $910, 1430\text{ cm}^{-1}$ ve nispeten zayıf 1632 cm^{-1} dalga boylarındaki bantlar ise sırasıyla C-C-N gerilmesi, CH_2 bükülmesi ve C=N gerilmesi varlığını göstermektedir [4]. Kreatinine ait referans bantlarının $608, 680, 846$ ve 910 olarak rapor edildiği bir çalışma ile elde ettiğimiz sonuçların uyum içinde olduğu gözlenmiştir [4]. Bir diğer çalışmada 573 ve 1645 cm^{-1} dalga boylarındaki bantların da kreatinine ait olduğu gösterilmiştir [136]. Çalışmamızda bu dalga boyları civarından gelen bantlar da elde edilmiştir.



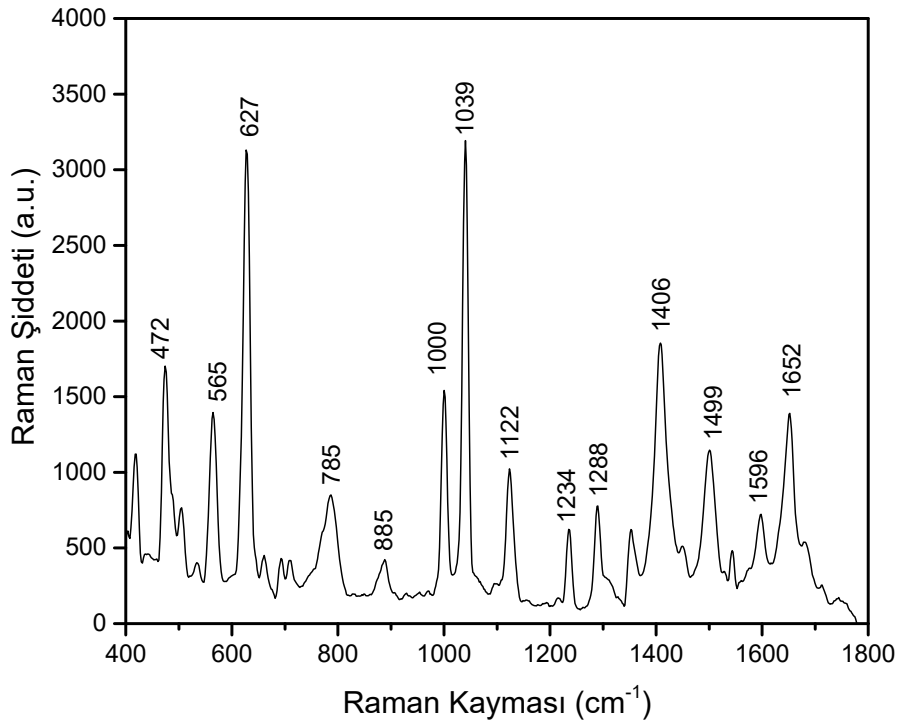
Şekil 4.12. Kreatinin çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu



Şekil 4.13. Glukoz çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu

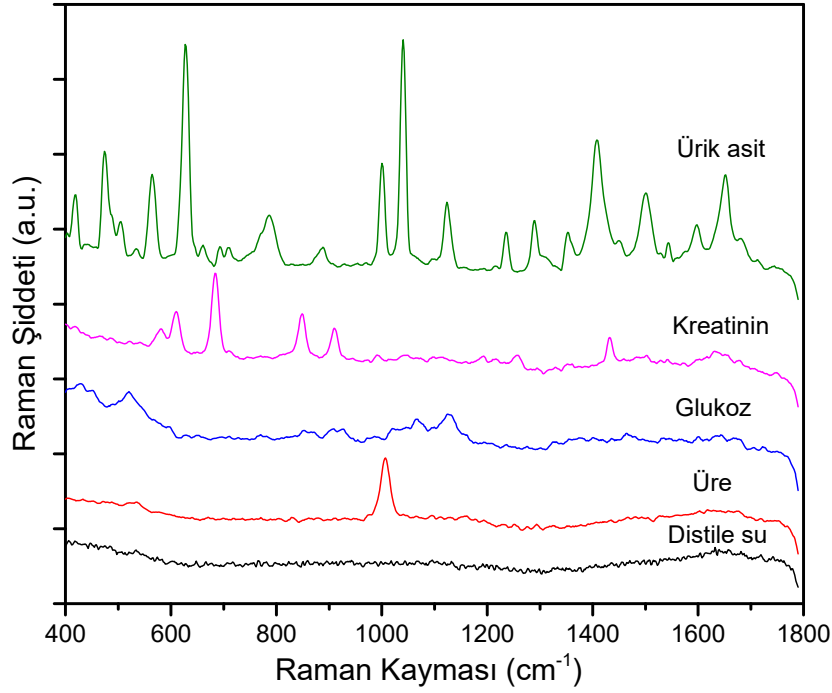
Şekil 4.13.'de 75 mg/ml glukozdan elde edilen Raman referans bantları gösterilmektedir. 521, 852, 906, 1065, 1128 ve 1462 cm^{-1} dalga boylarında glukozu ait belirgin pikler görülmektedir. Bunlar arasında en güçlü olan 521 cm^{-1} 'deki ve C-O gerilmesine işaret eden 1128 cm^{-1} 'deki bantlardır [4]. 1128 cm^{-1} 'de elde ettiğimiz bu bandın Raman kaymasından dolayı 1123 cm^{-1} [137] ve 1130 cm^{-1} [6] dalga boylarında görüldüğü farklı çalışmalar da mevcuttur.

Şekil 4.14'de 25 mg/ml ürik aside ait Raman referans spektrumu verilmiştir. En belirgin ürik asit pikleri 472, 565, 627, 785, 885, 1000, 1039, 1122, 1234, 1288, 1406, 1499, 1596 ve 1652 cm^{-1} dalga boylarında görülmektedir. Bu bantlar RS ile ürik asit tipi böbrek taşlarının çalışıldığı bir araştırma sonuçları ile uyum içindedir [78]. 627 cm^{-1} 'de gelen en güçlü bant ürik asitin iskeletsel halka deformasyonuna ve 1039 cm^{-1} 'deki diğer güçlü bant C-O, C-C, C-N titreşimlerinin varlığına atfedilmektedir [3, 59]. Bu çalışmada 627 cm^{-1} 'de görülen ve ürik asidin direk analizini sağlayan en güçlü bandın; 634 [3], 643 [59] ve 649 cm^{-1} [138] dalga boylarında gösterildiği farklı kaynaklar da mevcuttur.



Şekil 4.14. Ürik asit çözeltisinden 785 nm dalga boyunda alınan Raman referans spektrumu

Son olarak 785 nm dalga boyunda, üre, glukoz, kreatinin ve ürik asitin distile sudaki çözeltilerinden alınan karakteristik Raman bantları Şekil 4.15.'de gösterilmiştir. 400 ve 1800 cm^{-1} dalga boyları arasında distile sudan gelen herhangi bir pik görülmektedir. Bu da elde edilen referans bantlarının tamamıyla ilgili metabolitlere ait olduğunu ve bu sebeple arkaplan çıkarımına gerek olmadığını göstermektedir.



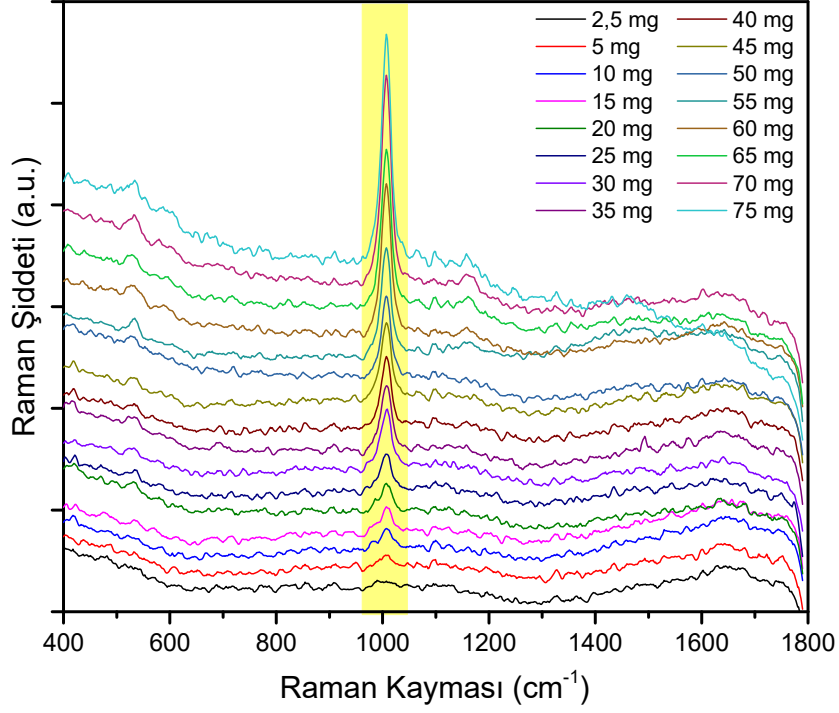
Şekil 4.15. Distile su, üre, glukoz, kreatinin ve ürik asite ait Raman referans spektrumları

4.3.4. Konsantrasyon ölçümleri

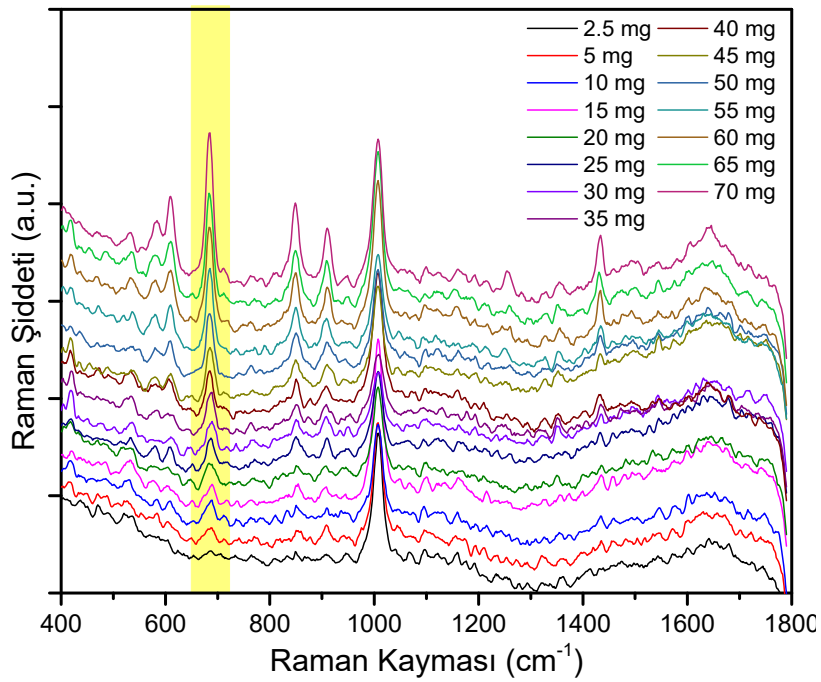
Sentetik idrar içerisinde farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı hazırlanan üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit çözeltilerinin 785 nm dalga boyunda RS'de ölçümleri alınmıştır. Tüm analizlerde, belirlenen optimum cihaz parametreleri kullanılmıştır. Her metabolit için elde edilen spektrumlar o metabolite ait referans spektrumu ile karşılaştırılarak değerlendirmeler yapılmıştır.

Şekil 4.16.'da 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70 ve 75 mg/ml üre içeren sentetik idrar karışımlarından elde edilen RS ölçüm sonuçları verilmiştir. Artan

konsantrasyonla beraber üreye ait 1004 cm^{-1} dalga boyunda gelen pik şiddetinin de belirgin derecede arttığı görülmektedir.



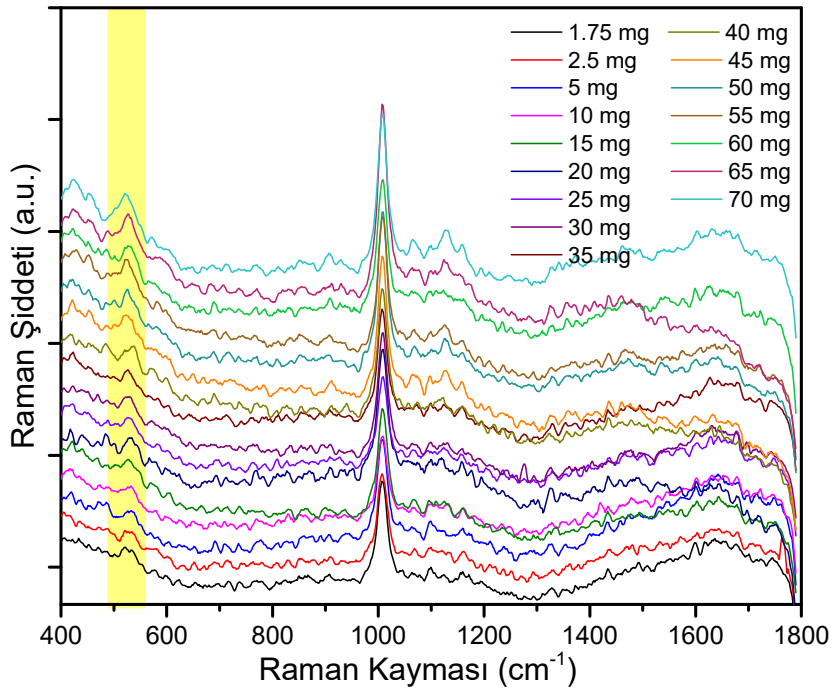
Şekil 4.16. Artan konsantrasyonlarda üreye ait sentetik idrara ait Raman spektrumları



Şekil 4.17. Artan konsantrasyonlarda kreatininin içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları

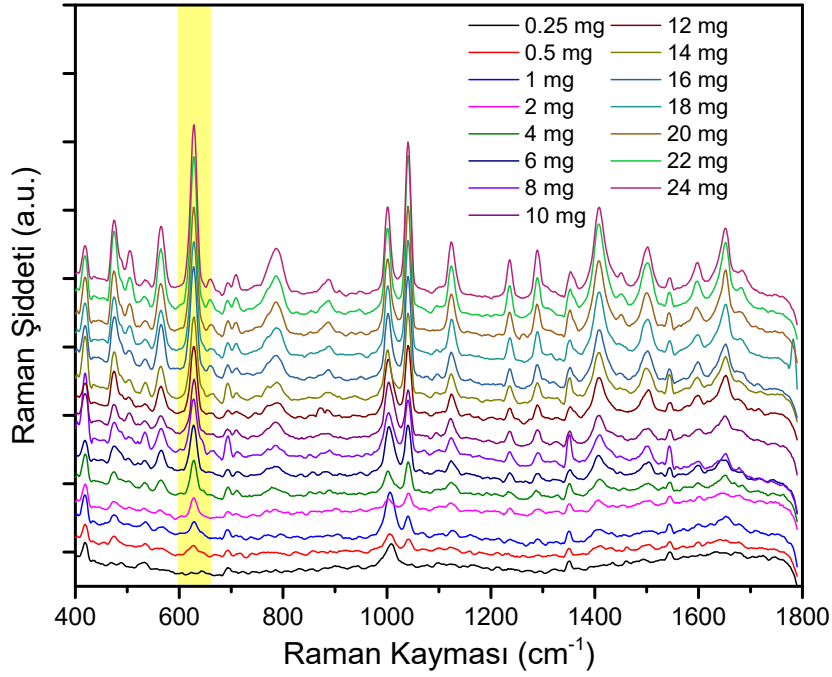
Şekil 4.17.'de 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65 ve 70 mg/ml kreatinin içeren sentetik idrar örneklerinden alınan Raman spektrumları gösterilmektedir. Kreatininin sentetik idrardaki konsantrasyonu arttıkça 682 cm^{-1} dalga boyunda bulunan kreatininin en güçlü pikinin şiddetinin de arttığı gözlenmektedir.

Şekil 4.18.'de 1,75; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65 ve 70 mg/ml glukoz içeren sentetik idrar karışımlarının Raman analizi sonuçları görülmektedir. Glukozun çözeltideki artan konsantrasyonu ile beraber 521 cm^{-1} dalga boyundaki en güçlü glukoz bandının şiddetinin de arttığı görülmektedir. Kreatinin ve glukoz spektrumlarında sentetik idrardan gelen 1004 cm^{-1} 'deki üre pik şiddetlerinin ise nispeten sabit kaldığı görülmektedir.



Şekil 4.18. Artan konsantrasyonlarda glukoz içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları

Şekil 4.19.'da 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22 ve 24 mg/ml ürik asit içeren sentetik idrar örneklerinden elde edilen RS ölçüm sonuçları verilmiştir. Ürik asitin 627 cm^{-1} dalga boyundan gelen en güçlü pikinin şiddetinin, artan konsantrasyonla beraber arttığı gözlenmektedir. Ancak sentetik idrardan gelen 1004 cm^{-1} 'deki üre pikinin, yoğun derişimlerdeki ürik asitin 1000 ve 1039 cm^{-1} 'den gelen bantlarından dolayı baskılandığı görülmektedir.

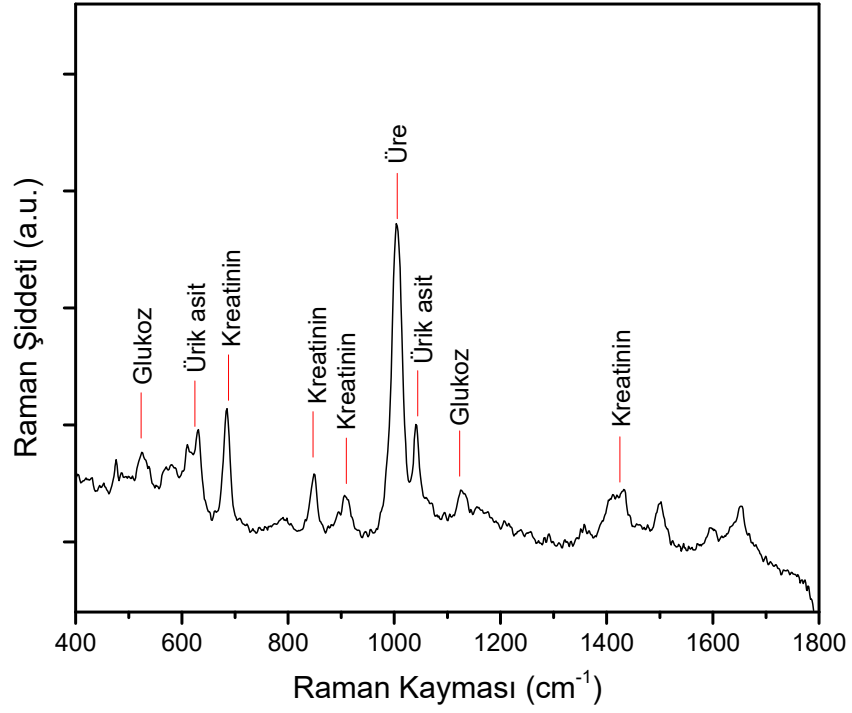


Şekil 4.19. Artan konsantrasyonlarda ürik asit içeren sentetik idrara ait Raman spektrumları

Genel olarak dört metabolitin artan konsantrasyonları ile beraber Raman referans bantlarının da şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında en güçlü bant değerleri kullanılacağı için grafiklerde sadece bu bantlar vurgulanmıştır.

4.3.5. Sentetik idrardaki dört metabolitin eş zamanlı tespiti

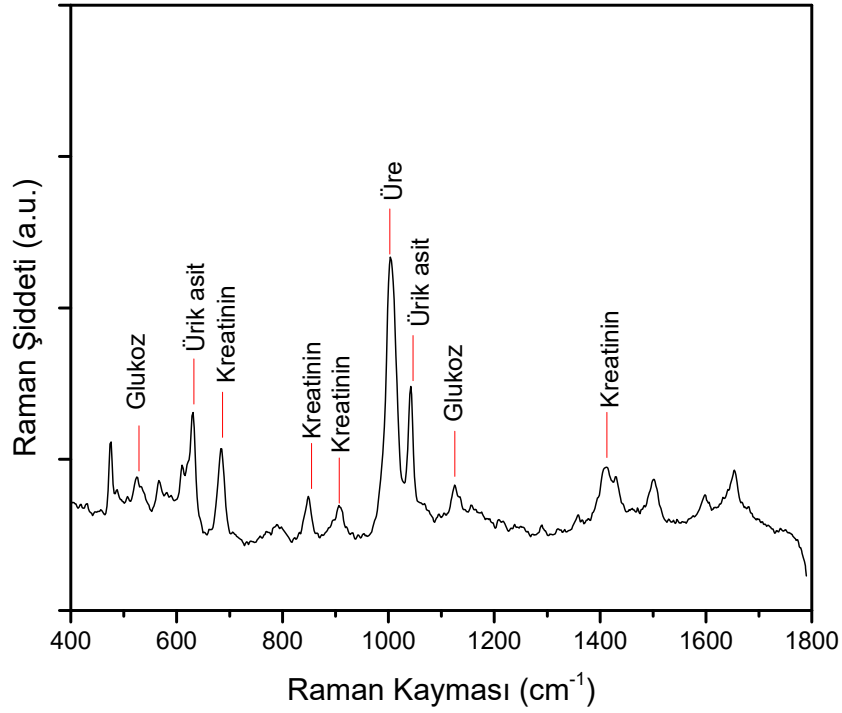
Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit metabolitlerini aynı anda içeren sentetik idrar Raman'da analiz edildi. 785 nm'de ve 15 sn integrasyon süresi 3 tekrarlı olacak şekilde alınan spektrumda, dört metabolite de ait en güçlü referans bantları herhangi bir çakışma olmadan elde edilmiştir (Şekil 4.20.). Böylece tüm metabolitlerin toplam 45 sn gibi kısa bir sürede RS ile eş zamanlı tespitinin yapılabilirliği gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit metabolitlerini aynı anda içeren sentetik idrarın Raman spektrumu ve eş zamanlı tespitin gösterimi

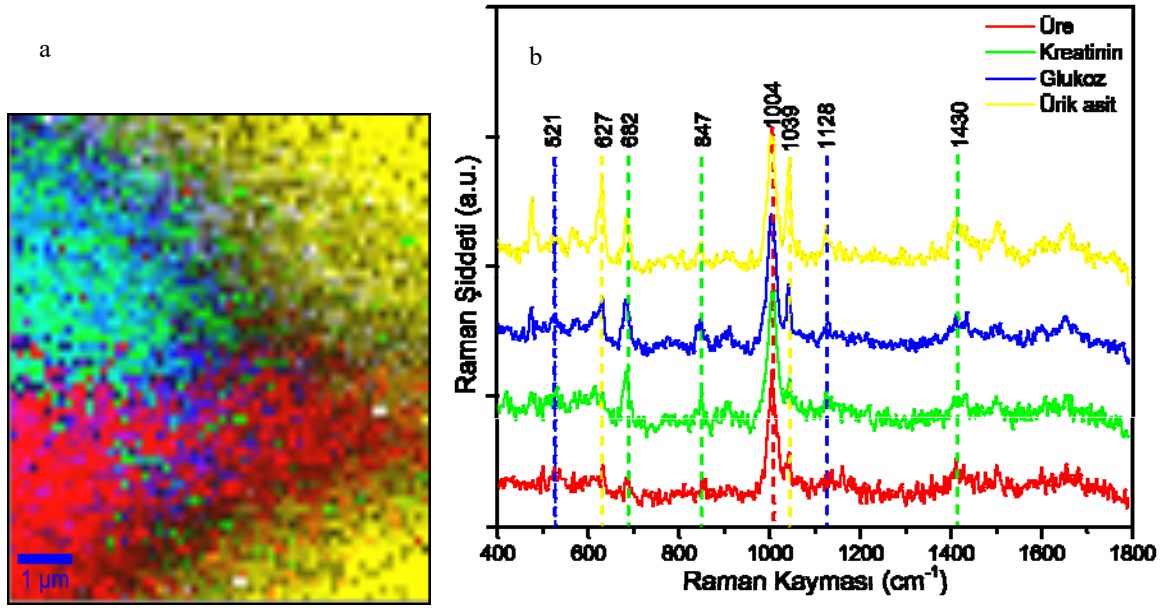
Bölgesel Raman spektrumunun değerlendirilmesi

~20×20 µm'lik bir alanda 3600 noktadan yapılan ve 1 saat süren bölgesel Raman taraması sonucunda elde edilen ortalananmış spektrum Şekil 4.21.'de gösterilmektedir. Buradaki Raman bantları ile 45 saniyelik tek spektrum ile edilen Raman bantları (Bkz. Şekil 4.20.) arasında ufak sinyal şiddetleri farklılığı dışında büyük bir benzerlik olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.21. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asiti aynı anda içeren sentetik idrarın Raman haritalaması ile 3600 noktadan elde edilen ortalanmış Raman spektrumu

Şekil 4.22.a.'da Raman haritalamasının asıl amacı olan sentetik idrardaki dört ayrı metabolitin farklı renklerle kodlanarak çözeltideki dağılımlarını gösteren görüntü verilmiştir. Üre için kırmızı, kreatinin için yeşil, glukoz için mavi ve ürik asit için sarı renk kodlanmıştır. Bu dört farklı yapı bölgesinden alınan ve aynı renklerle gösterilen Raman spektrumları ise Şekil 4.22.b.'de görülmektedir. Raman haritalamasında bazı bölgelerin özellikle mavi-yeşil ile kırmızı-mavi bölgelerin yer yer üst üste geldiği görülmektedir. Buradan metabolitlerin sentetik idrar içinde iyice çözüldükleri anlaşılmaktadır. Şekil 4.22.b.'de her metabolite ait spektrumdaki baskın pikler, temsil ettikleri metabolite ait olsa da diğer piklerin de olduğu gözlenmiştir. Örneğin sarı ile gösterilen ürik asit spektrumunda 627 ve 1039 cm^{-1} dalga boylarından gelen ürik asit pikleri diğer spektrumdakilere göre daha şiddetlidir. Bununla beraber kreatinin, glukoz ve ürik asite ait piklerin de bu spektrumda görülmesi, yine tüm metabolitlerin birbiri içerisinde çözüldüğünü göstermektedir.



Şekil 4.22. Sentetik idrarın Raman haritalaması ile elde edilen a. dört metabolitin çözeltide dağılımını gösteren görüntü ve b. tarama görüntüsündeki her bir metaboliti temsil eden dört bölgeden alınan Raman spektrumları

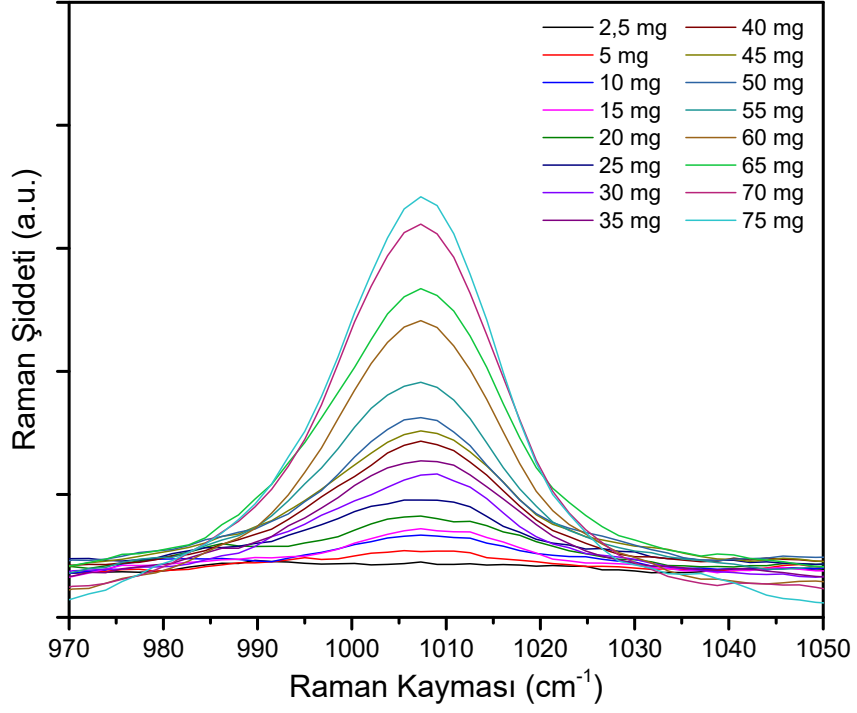
4.4. Yöntemin Geçerliliğinin Doğrulanması

4.4.1. Kalibrasyon grafikleri ile doğrusallığın değerlendirilmesi

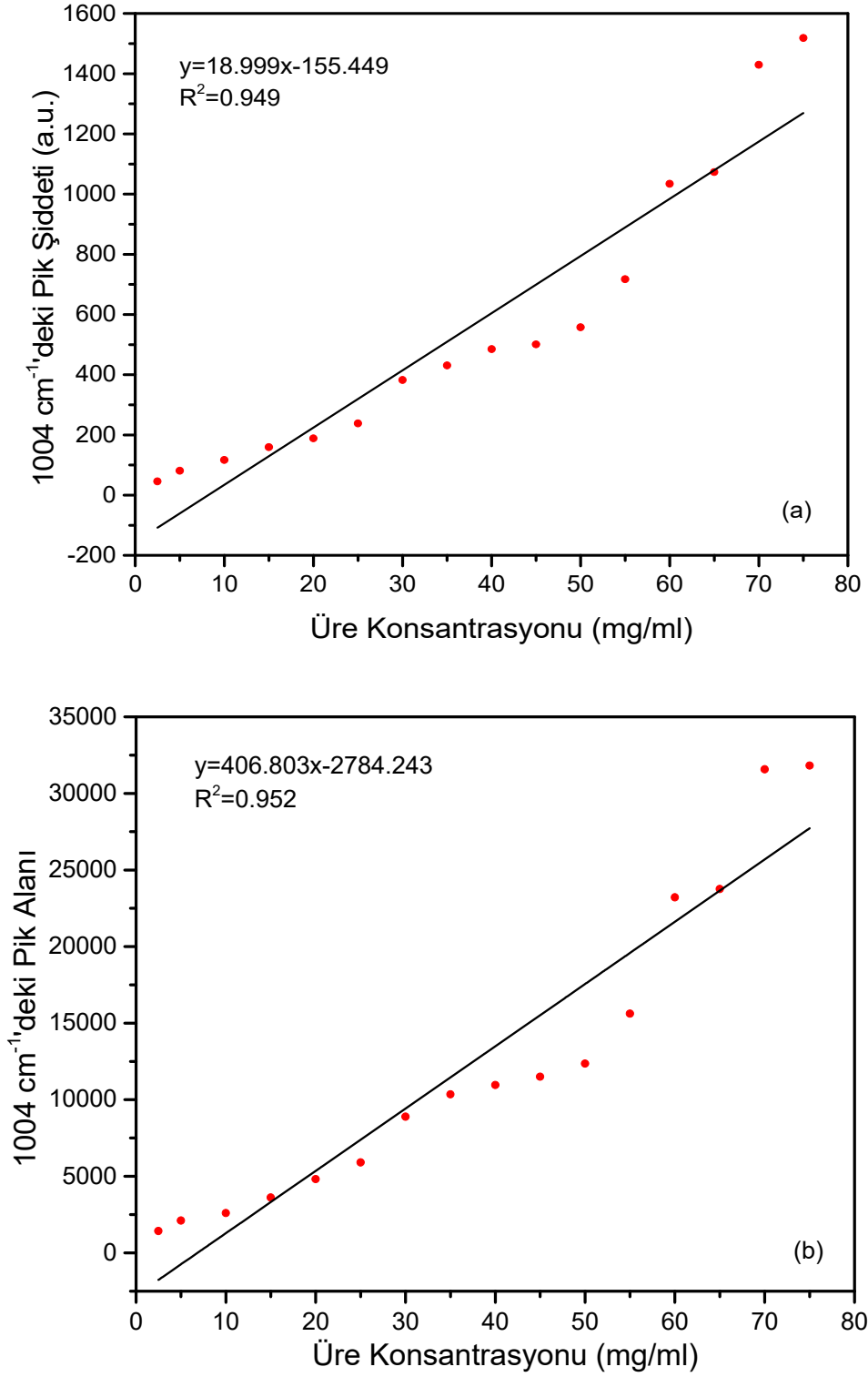
Öncelikle üre, kreatinin, glukoz ve ürik aside ait en güçlü Raman bantlarının sahip oldukları şiddet ve alanlar belirlenmiştir. Daha sonra sentetik idrar içindeki konsantrasyonlarına karşı hem bant şiddetleri hem de bant alanları grafiğe çizilerek iki yöntemle kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

Şekil 4.23.'de ürenin kalibrasyon eğrisinin çıkarılmasında kullanılan 1004 cm^{-1} merkezli bantlar görülmektedir. 2,5 ile 75 mg/ml arasındaki 16 örnekten alınan Raman spektrumlarındaki bu bant şiddeti kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayısı (R^2) 0,949 olarak bulunmuştur. Aynı bantın alanı ile oluşturulan doğrusal kalibrasyon eğrisinde R^2 değeri 0,952 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24.). Kalibrasyon denkleminde doğrusallığın test edilmesi için bulunan tespit sınırı 30 mg/dl ve tayin sınırı 89 mg/dl olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda sentetik idrar içerisindeki üre

konsantrasyonunun RS yöntemi ile yüksek hassasiyet ve doğrulukla saptanabildiği gösterilmiştir.

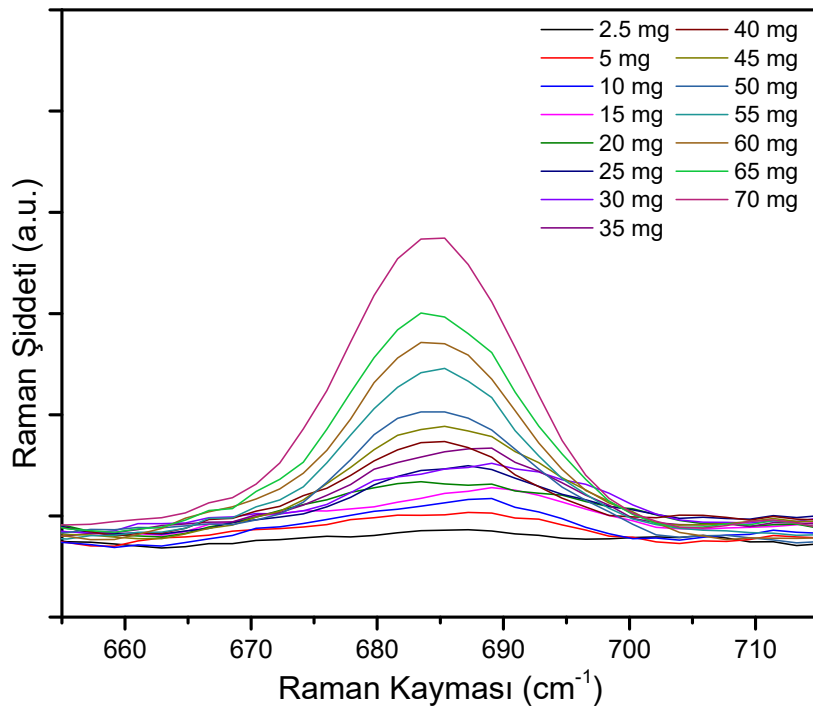


Şekil 4.23. Farklı üre konsantrasyonlarına ait 1004 cm⁻¹ merkezli Raman bantları

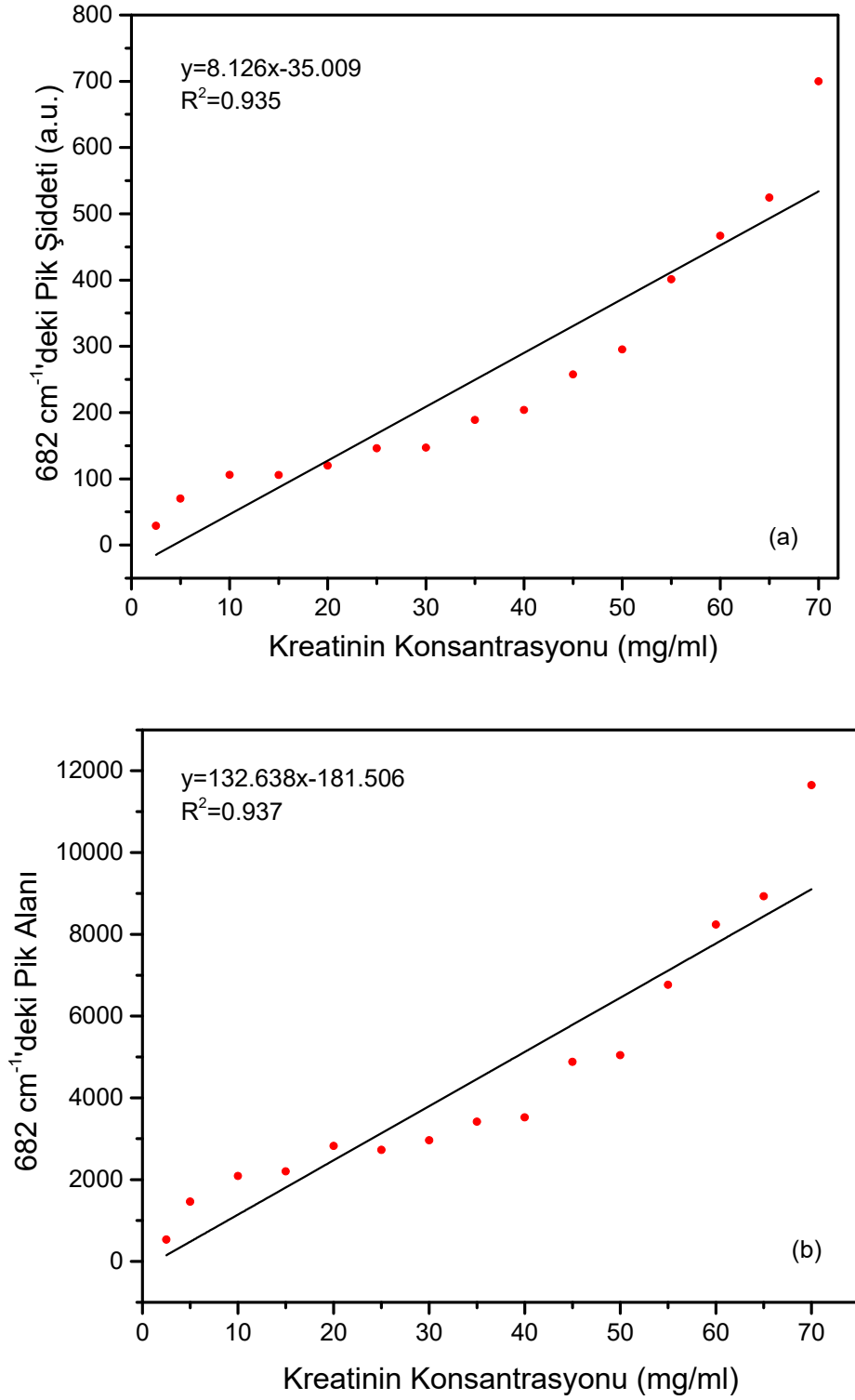


Şekil 4.24. Sentetik idrardaki farklı üre konsantrasyonlarına karşı 1004 cm⁻¹'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri

Şekil 4.25.'de kreatinine ait 682 cm^{-1} merkezli bantlar görülmektedir. 2,5 ile 70 mg/ml arasındaki 15 farklı kreatinin konsantrasyonuna karşı bu bant şiddetlerinin gösterilmesiyle, R^2 değeri 0,935 olan doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bant alanları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiğinde ise R^2 değeri 0,937 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.26.). Tespit sınırı 35 mg/dl, tayin sınırı 106 mg/dl olarak bulunmuştur. Bu veriler, sentetik idrar içerisindeki kreatinin konsantrasyonunun RS ile yüksek hassasiyet ve doğrulukla belirlenebildiğini göstermektedir.

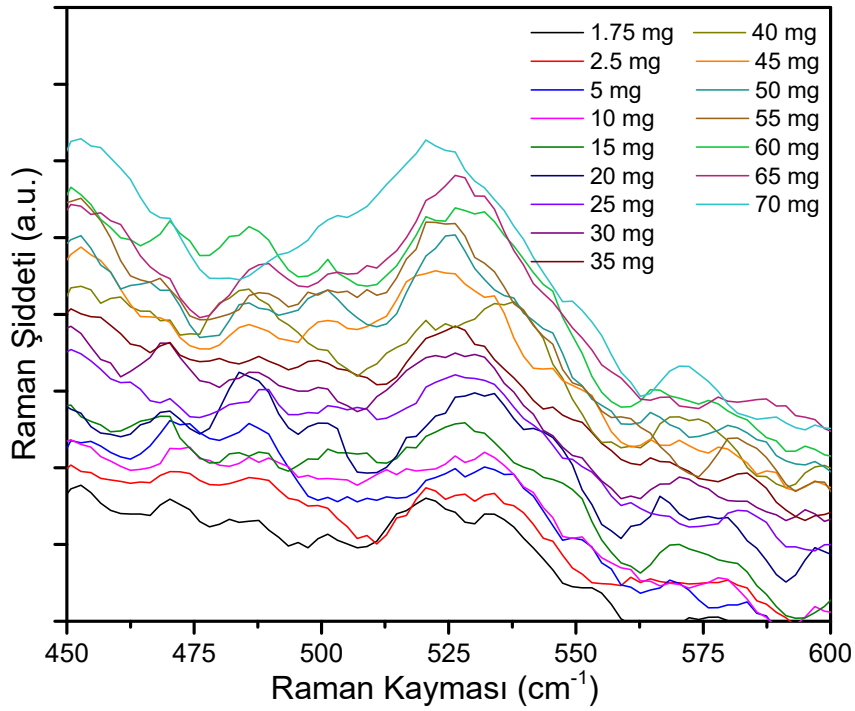


Şekil 4.25. Farklı kreatinin konsantrasyonlarına ait 682 cm^{-1} merkezli Raman bantları

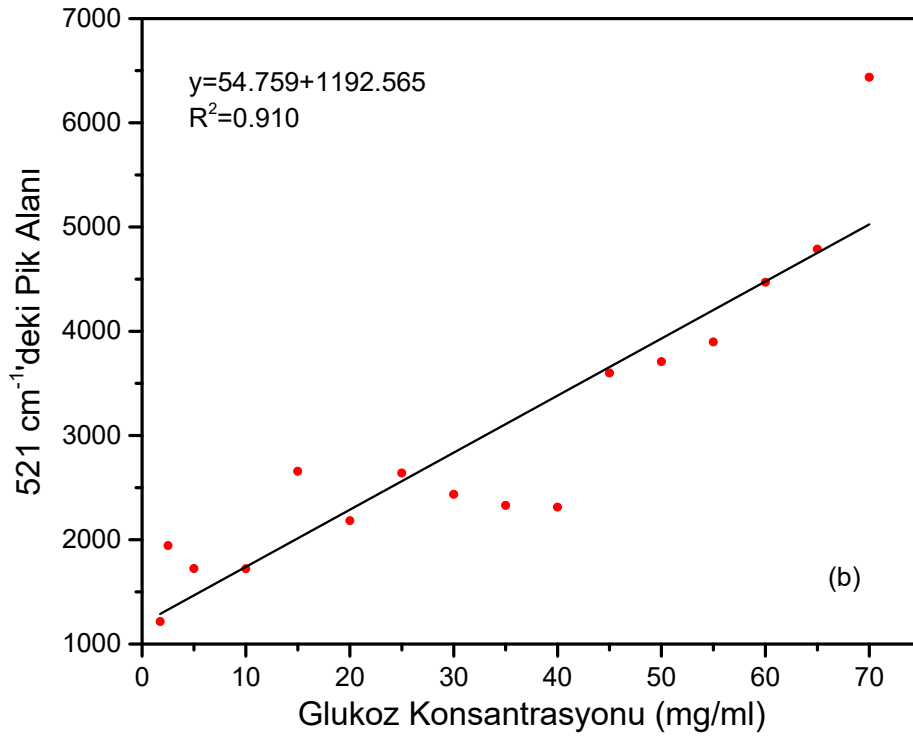
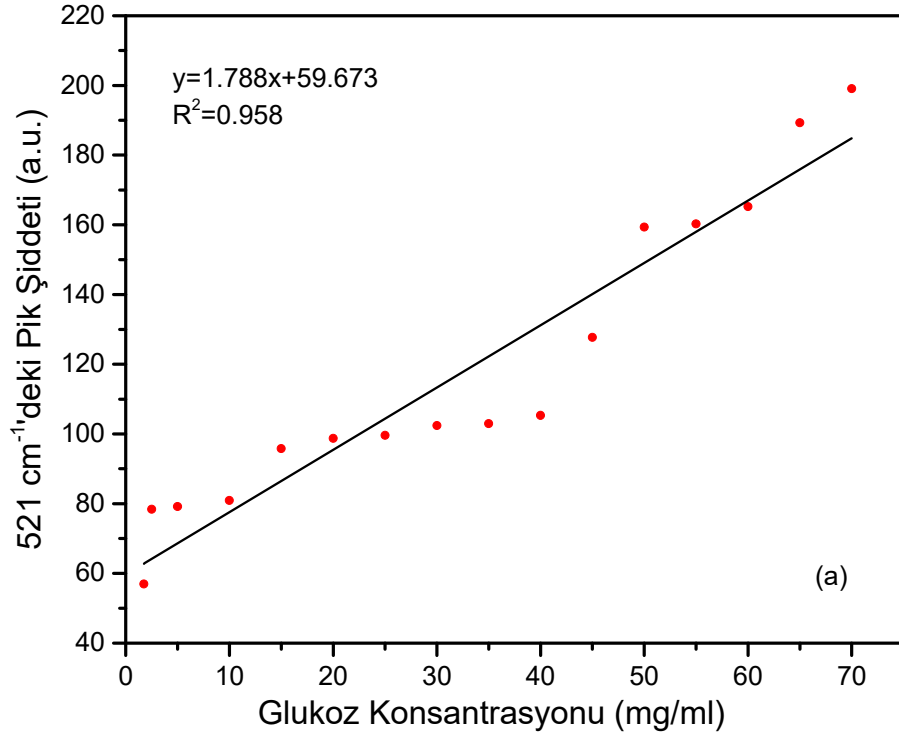


Şekil 4.26. Sentetik idrardaki farklı kreatinin konsantrasyonlarına karşı 682 cm⁻¹'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri

Şekil 4.27.'de glukozun kalibrasyon grafiğinde kullanılacak 521 cm^{-1} merkezli geniş bantlar görülmektedir. Sentetik idrarda 1,75 ile 70 mg/ml arasındaki 16 farklı glukoz derişimine karşı bu bant şiddetlerinden oluşturulan kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu gösterilmiş ve R^2 değeri 0,958 olarak bulunmuştur. Aynı bandın alanlarından elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrisinde is R^2 değeri 0,910 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.28.). Tespit sınırı 27 mg/dl ve tayin sınırı 81 mg/dl bulunmuştur. Bu sonuçlar, RS yöntemi ile sentetik idrardaki glukoz konsantrasyonunun yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit edilebileceğini göstermektedir.

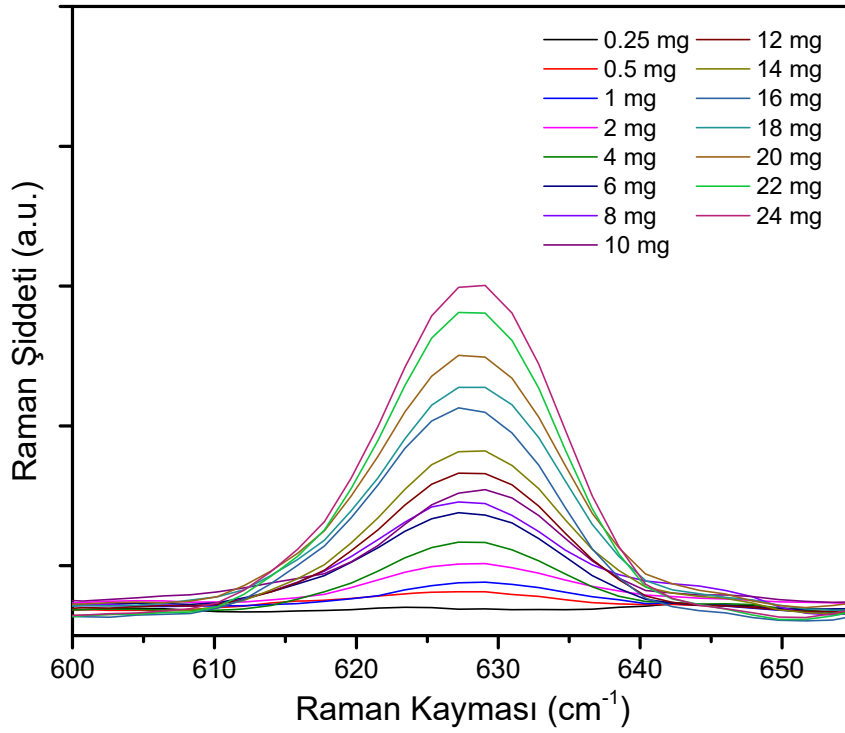


Şekil 4.27. Farklı glukoz konsantrasyonlarına ait 521 cm^{-1} merkezli Raman bantları

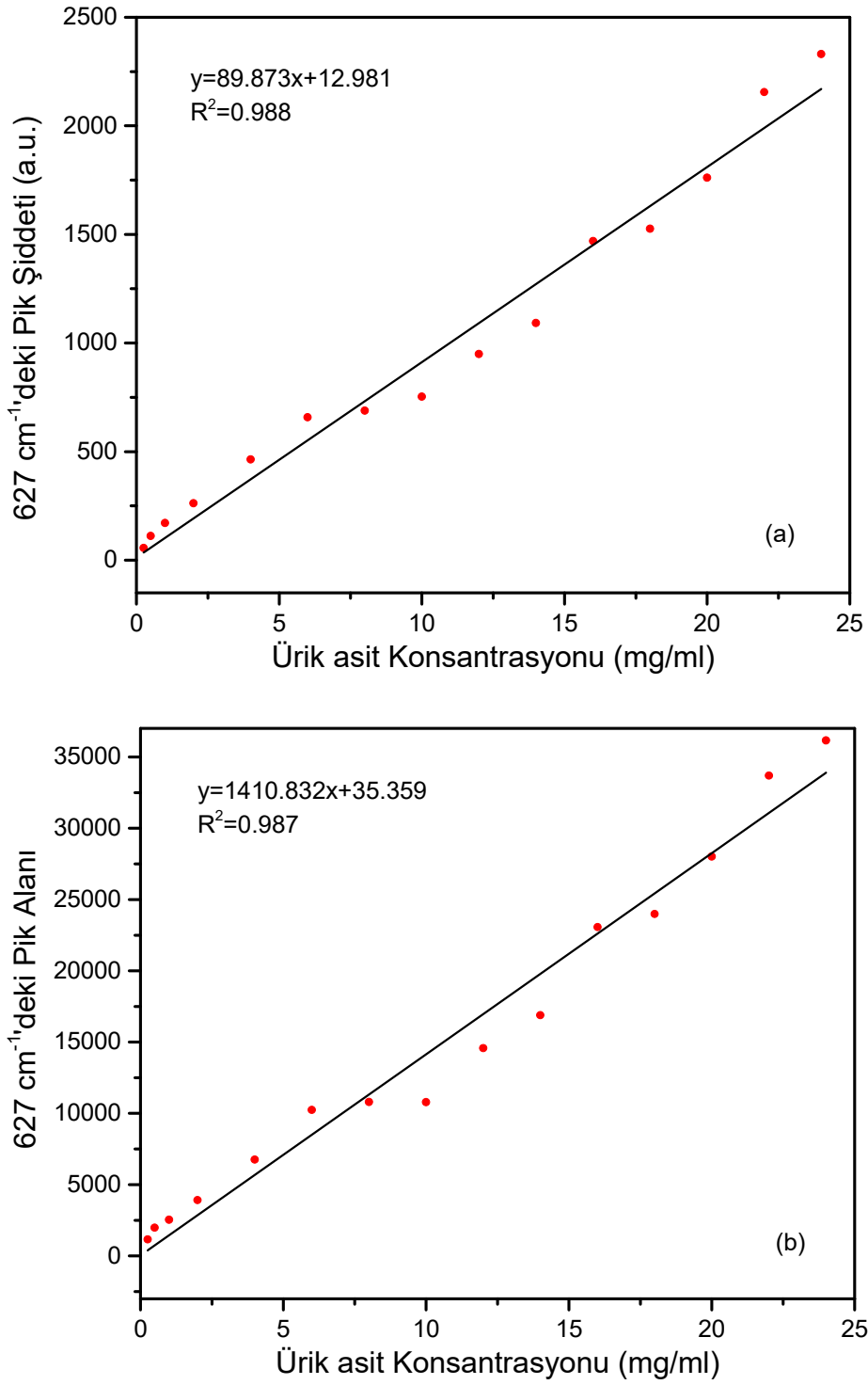


Şekil 4.28. Sentetik idrardaki farklı glukoz konsantrasyonlarına karşı 521 cm⁻¹'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri

Şekil 4.29.'da ürik asite ait Raman spektrumunun 627 cm^{-1} merkezli bandının büyütülmüş hali gösterilmektedir. Sentetik idrarda 0,25 ile 24 mg/ml arasındaki 15 farklı ürik asit derişimlerine karşılık gelen bu bant şiddetlerinden doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve R^2 0,988 olarak bulunmuştur. Aynı bant alanından yola çıkarak oluşturulan doğrusal kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri ise 0,987 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30.). Kalibrasyon denkleminin tespit sınırı 14 mg/dl ve tayin sınırı 43 mg/dl olarak bulunmuştur. Bu değerler sentetik idrardaki ürik asit konsantrasyonunun RS yöntemi ile yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit edilebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.29. Farklı ürik asit konsantrasyonlarına ait 627 cm^{-1} merkezli Raman bantları



Şekil 4.30. Sentetik idrardaki farklı ürik asit konsantrasyonlarına karşı 627 cm⁻¹'deki a. bant şiddetlerinden b. bant alanlarından elde edilen kalibrasyon grafikleri

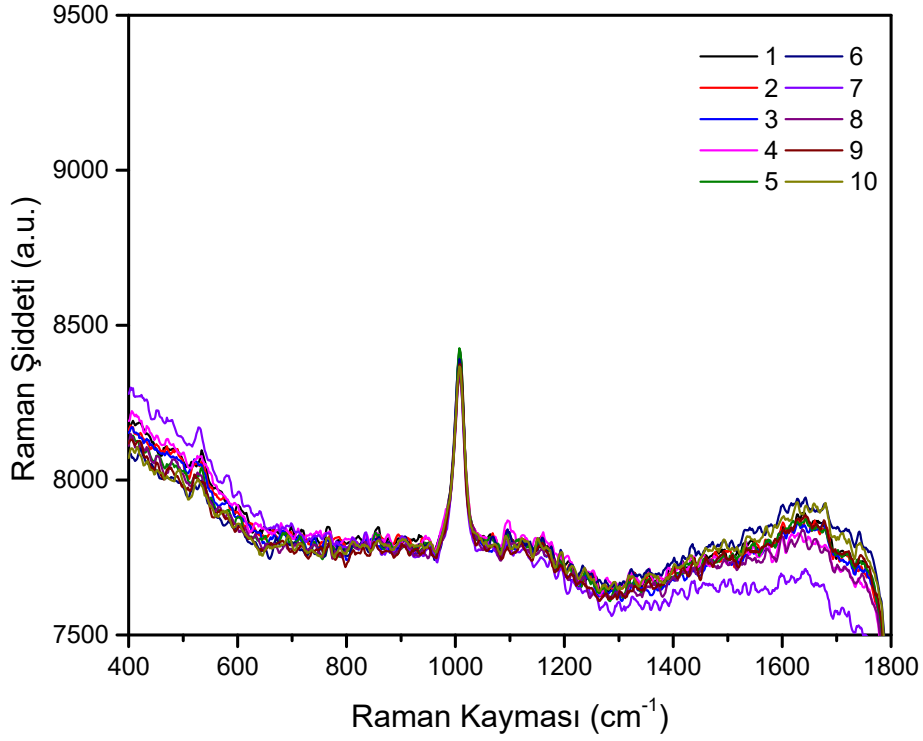
Tüm bu grafiklerde görüldüğü gibi, sentetik idrar içindeki dört farklı metabolitin artan konsantrasyonları ile bunlara ait Raman bantlarının şiddetleri ve alanları arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca referans bantlarının şiddet ve alanlarından oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak idrarda hastalık belirteci olan üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit miktarlarının RS ile tespitinde pik şiddetlerinin veya alanlarının kullanılabilceği öngörülmektedir.

4.4.2. Tekrarlanabilirlik deneyleri ile kesinliğin değerlendirilmesi

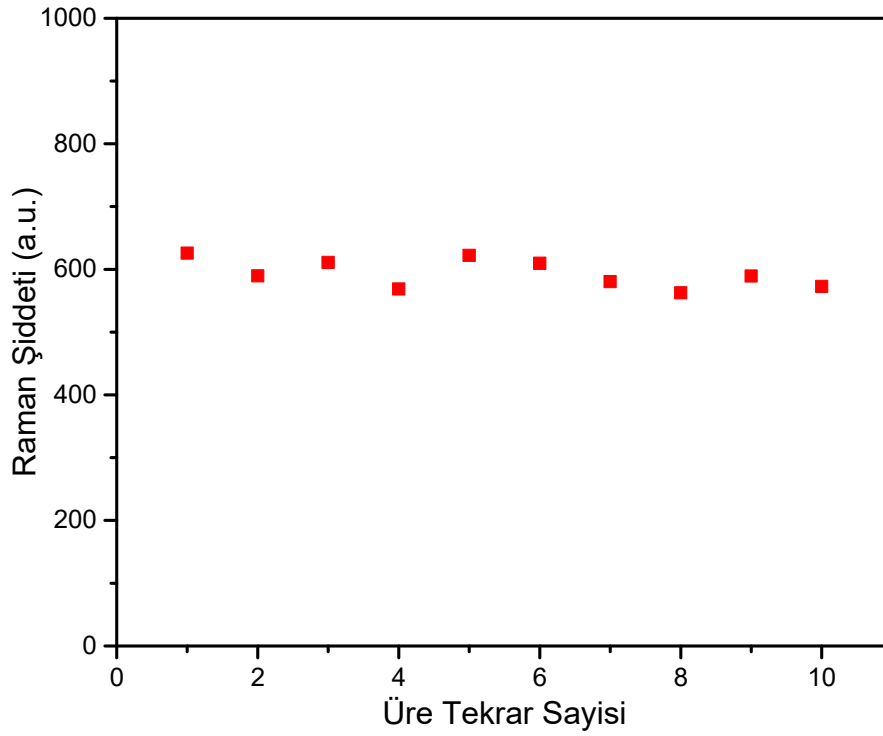
Homojenite testi sonuçları

35 mg/ml üre, 35 mg/ml kreatinin, 35 mg/ml glukoz ve 10 mg/ml ürik asit içeren sentetik idrar numunelerinden alınan birer damla üzerindeki 10 ayrı noktadan elde edilen Raman spektrumları sırasıyla Şekil 4.31., Şekil 4.33., Şekil 4.35. ve Şekil 4.37.'de gösterilmektedir. Genel olarak tekrarlar arasındaki spektrumlarda aşağı yukarı dalgalanmalar olsa da referans bantlarının şiddetlerinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.32.'de üre örneğinin aynı yüzeyindeki farklı bölgelerden yapılan analiz sayısı x eksenine, 1004 cm^{-1} 'den gelen pik şiddetleri ise y eksenine konularak oluşturulan bir grafik verilmiştir. Aynı tarz grafikler kreatinin için 682 cm^{-1} , glukoz için 521 cm^{-1} ve ürik asit için 627 cm^{-1} dalga boylarından gelen bantların yükseklikleri baz alınarak dört metabolit için ayrı ayrı oluşturulmuştur (Şekil 4.34., Şekil 4.36. ve Şekil 4.38.). Bu çalışmayla aynı zamanda, metabolitlere ait referans bant intensitelerinin tekrar edilebilirliği de test edilmiş olmaktadır.

Ölçümler sonucunda ürenin bant şiddet değeri 562 ile 626 arasında değişmiş, ortalaması 593 ± 23 ve bağıl standart sapması %3,8 olarak hesaplanmıştır.

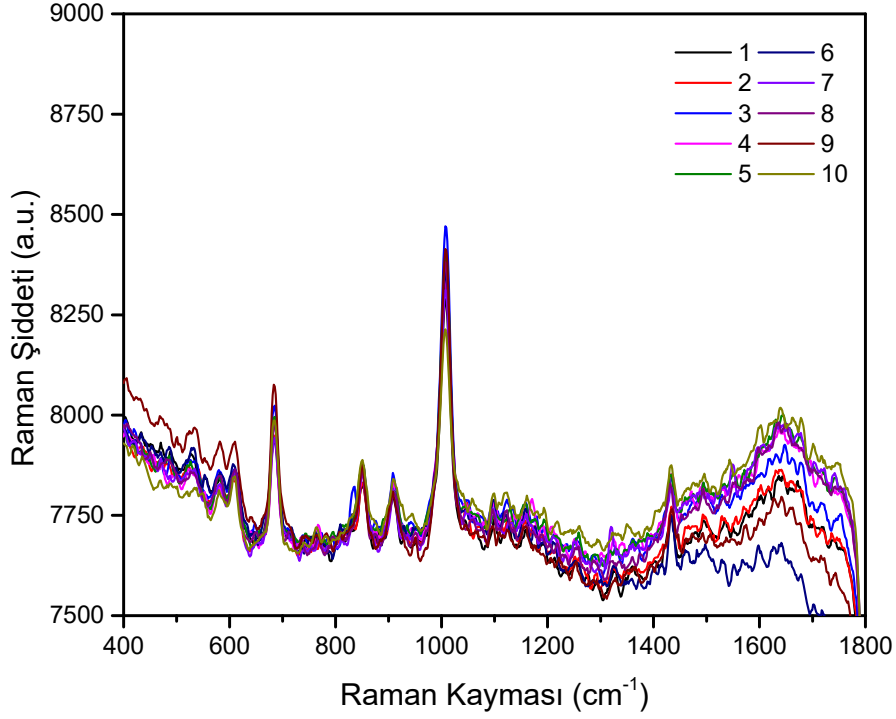


Şekil 4.31. 35 mg/ml üre içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları

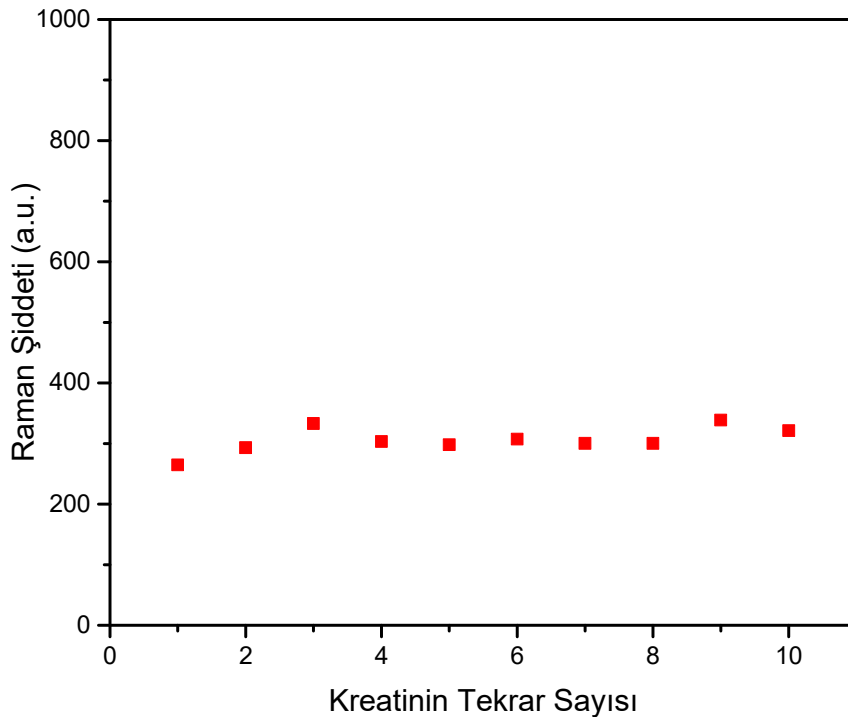


Şekil 4.32. 1004 cm^{-1} 'deki üre bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri

Kreatinine ait bant şiddet değeri 265 ve 339 arasında değişmiş, ortalaması 306 ± 21 ve bağlı standart sapması %6,9 olarak hesaplanmıştır.

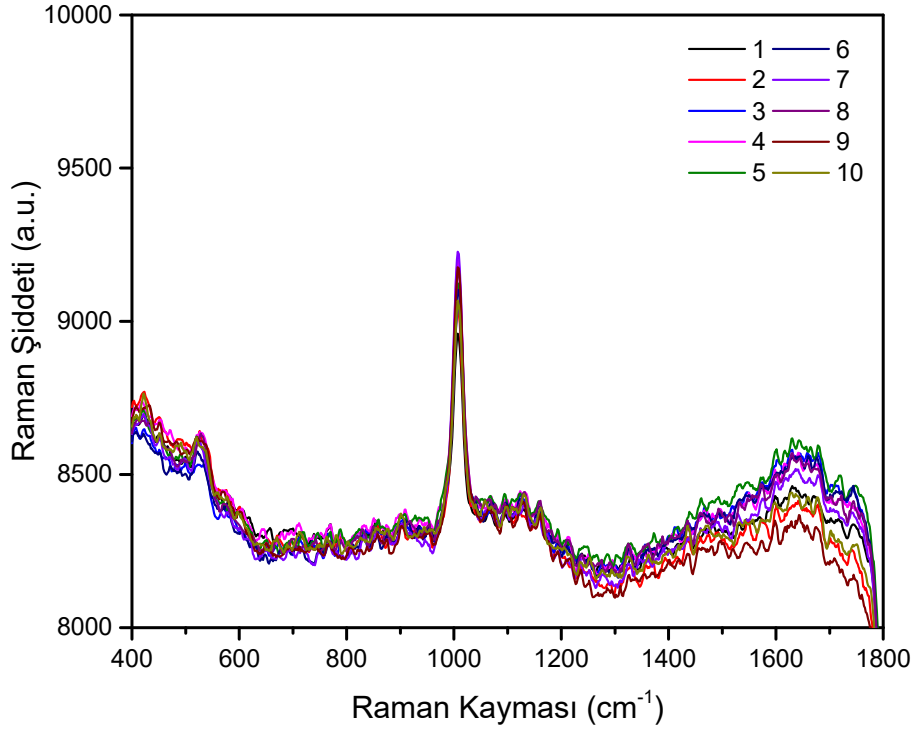


Şekil 4.33. 35 mg/ml kreatinin içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları

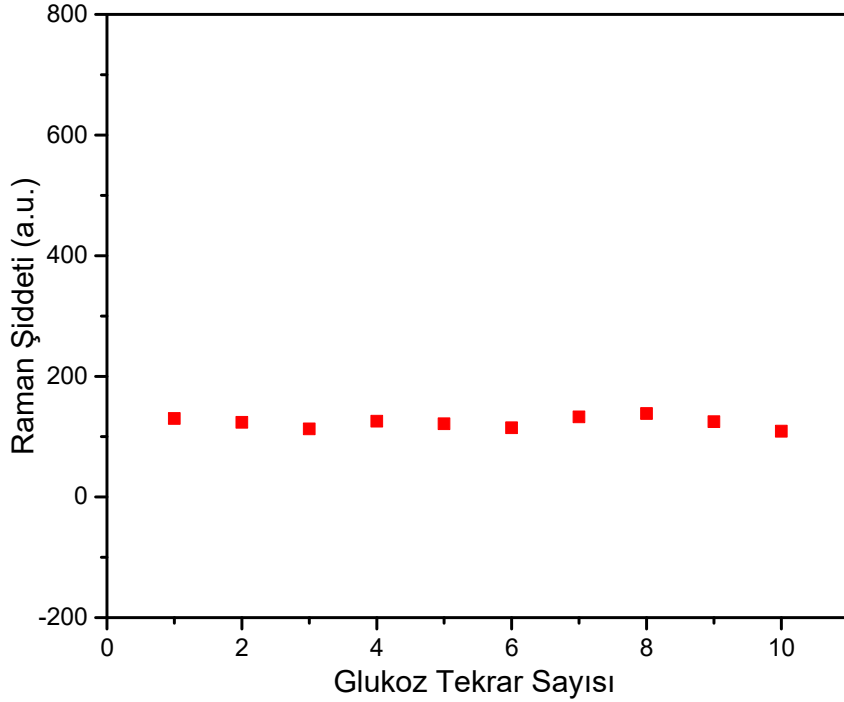


Şekil 4.34. 682 cm^{-1} 'deki kreatinin bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri

Glukozun bant şiddet değeri 109 ile 138 arasında değişmiş, ortalaması 123 ± 9 ve bağıl standart sapması %7,3 olarak hesaplanmıştır.

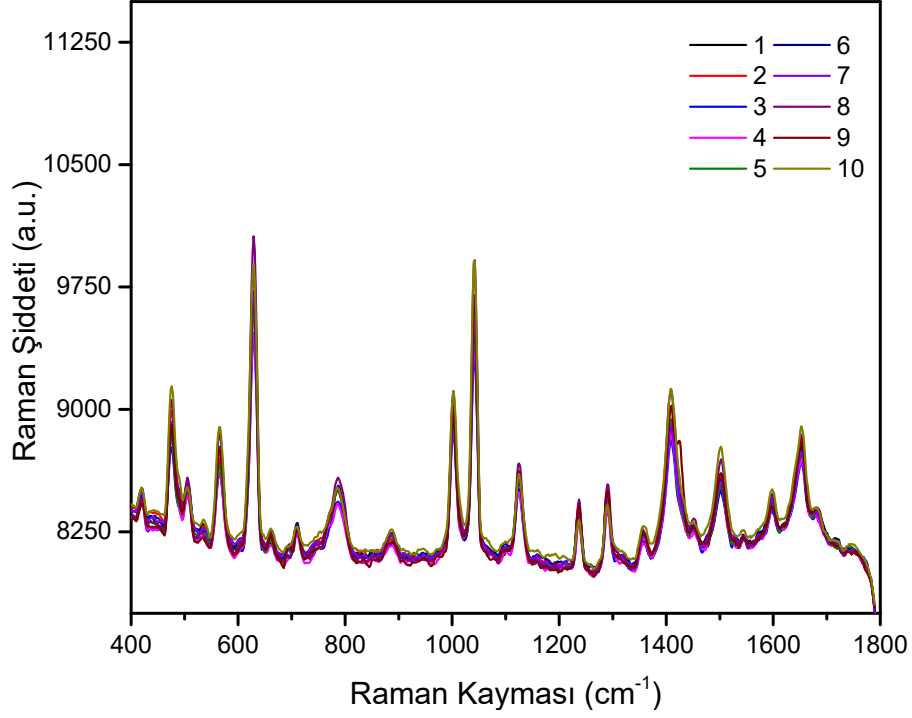


Şekil 4.35. 35 mg/ml glukoz içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları

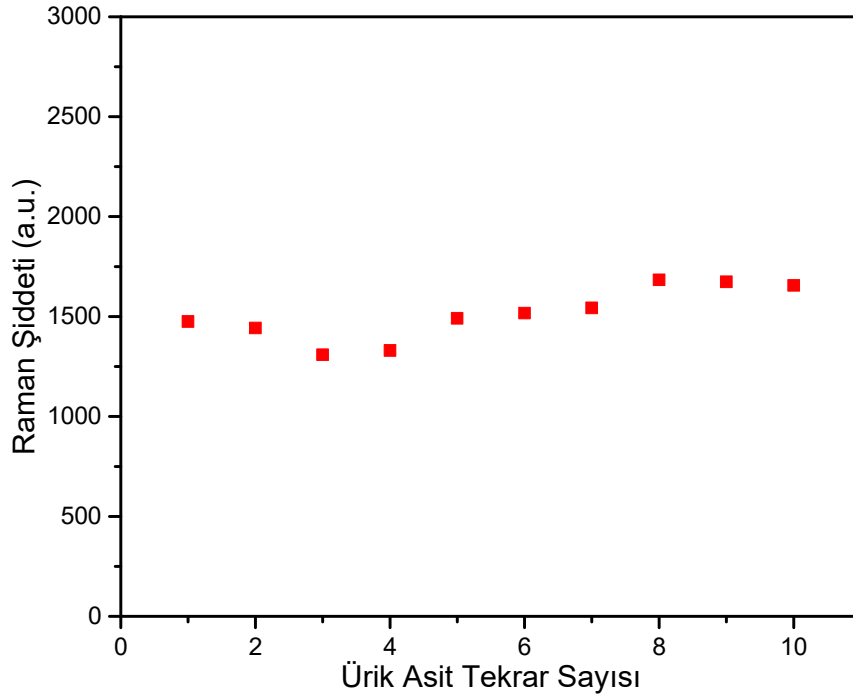


Şekil 4.36. 521 cm^{-1} 'deki glukoz bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değeri

Ürik asitin bant yükseklik değeri 1309 ile 1684 arasında değişmiş, ortalaması 1512 ± 132 ve bağıl standart sapması %8,7 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.37. 10 mg/ml ürik asit içeren sentetik idrar örneğinin 10 farklı noktasından alınan Raman spektrumları

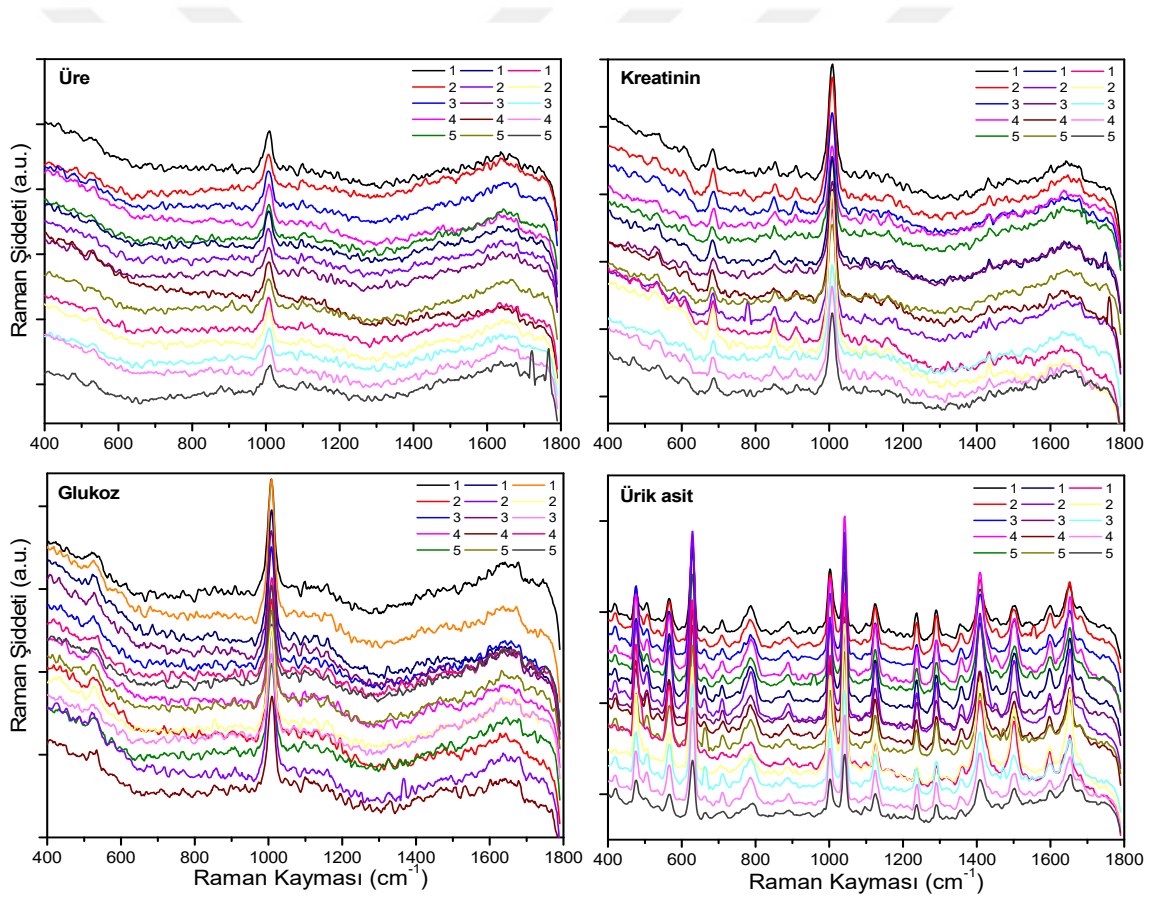


Şekil 4.38. 627 cm^{-1} 'deki ürik asit bandının 10 farklı ölçümdeki şiddet değerleri

Aynı örneğin farklı noktalarından arka arkaya alınan her Raman ölçümünde birbirine çok yakın sonuçlar alındığı bu testle gösterilmiştir. Hesaplanan bağıl standart sapma değerlerinden tekrarlanabilirlik kesinliğinin sırasıyla en yüksek ürede (%3,8) daha sonra kreatininde (%6,9), glukozda (%7,3) ve ürik asitte (%8,7) olduğu söylenebilir.

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik testi sonuçları

20 mg/ml üre, kreatinin, glukoz ve 5 mg/ml ürik asit içeren sentetik idrar karışımlarından gün içinde 5 kez olmak üzere toplam 3 günde alınan 15 Raman spektrası Şekil 4.39.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit örneklerinden gün içinde 5 bağımsız analiz ile toplam 3 günde alınan Raman spektrumları

Çizelge 4.1. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik ölçüm sonuçları

		1. Gün	2. Gün	3. Gün	3 Gün Toplam
Üre	Ort. ^a	273	251	237	254
	Min. ^b	255	223	220	220
	Max. ^c	295	271	254	295
	SD ^d	16	19	14	22
	RSD (%) ^e	5,8	7,5	6,0	8,5
Kreatinin	Ort.	145	145	137	142
	Min.	130	118	120	118
	Max.	161	157	174	174
	SD	12	17	22	16
	RSD (%)	8,3	11,5	16,3	11,3
Glukoz	Ort.	87	100	88	92
	Min.	80	96	78	78
	Max.	93	104	103	104
	SD	5	3	10	9
	RSD (%)	6,0	3,4	11,5	9,5
Ürik asit	Ort.	1219	1227	1294	1247
	Min.	1081	1011	1004	1004
	Max.	1480	1615	1634	1634
	SD	160	245	290	228
	RSD (%)	13,1	20,0	22,4	18,3

^aOrt: Gün içinde 5 bağımsız Raman analizi ile yapılan ölçümlerdeki bant şiddetlerinin ortalaması

^bMin: Elde edilen bant şiddetlerinin en düşük değeri

^cMax: Elde edilen bant şiddetlerinin en yüksek değeri

^dSD: Elde edilen bant şiddetlerinin ortalamaya göre standart sapma değeri

^eRSD (%): Bağlı standart sapma (%) = (Standart sapma/ortalama) × 100

Birinci, ikinci, üçüncü gün ve üç gün toplamda alınan ölçümlerden hesaplanan referans bantlarının yüksekliklerinin ortalama, minimum ve maksimum değerleri ile standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Ürik asit örneğinde beklemeden kaynaklanan çökelmeden ve çözeltinin yapısının bozulmasından dolayı RSD değerlerinin giderek arttığı düşünülmektedir [9]. Toplam 3 gündeki bağıl standart sapma değerlerinin üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit için sırasıyla %8,5, %11,3, %9,5 ve %18,3 olduğu görülmektedir. Bu RSD değerlerinin homojenite testinden elde edilen değerlerden daha yüksek çıkması beklenen bir durumdur.

Bu sonuçlar aynı örnekten farklı zamanlarda yapılan Raman ölçümlerinin yaklaşık olarak, üre için %92, kreatinin için %89, glukoz için %90 ve ürik asit için %82 kesinlikle tekrar edilebilirliğini göstermektedir.



5. TARTIŞMA

Ülkemizde 2010 yılının verilerine göre nüfusun ~%16'sında KBH bulunmaktadır. %5'inde ise beraberinde çok daha ciddi sosyal ve ekonomik problemler getiren böbrek yetersizliği görülmektedir. Bu sebeple son yıllarda büyük bir sağlık sorunu haline gelen kronik böbrek hastalığının erken tanısı kişiler ve devlet bazında büyük önem taşımaktadır.

Böbrek fonksiyonlarının ölçülmesinde rutin olarak idrar tahlili, kan tahlili, biyopsi ve görüntüleme yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlar arasında yaygın olarak serum veya idrar kreatinin düzeylerinden elde edilen GFR değeri kullanılmaktadır. Bu geleneksel metotların analiz sürelerinin uzun olması, özellikle biyopsi, görüntüleme ve kan tahlilinin hasta açısından rahatsız edici olması gibi sebeplerle araştırmacıların böbrek hastalıklarının tanısı için farklı yöntemler üzerine çalıştığı görülmektedir. Bunlar arasında idrar metabolitlerinin kantitatif analizine yönelik geliştirilen HPLC, kapiller elektroforez ve Raman spektroskopisi teknikleri bulunmaktadır.

İdrar analizi için Raman spektroskopisinin kullanıldığı çalışmaların çoğu sadece bir metaboliti tayin etmeyi amaçlamaktadır. Birden fazla idrar metabolitinin aynı anda tespitinin yapılabildiği sadece bir kaç çalışma mevcuttur. Bunlardan ilki Dou ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları, gerçek idrar içerisine dışardan eklenen glukoz, aseton, üre ve kreatinin kantitatif Raman analizleridir [6]. Bu metabolitlerin tespit limitlerini sırasıyla 41 mg/dl, 40 mg/dl, 4,9 mg/ml ve 1,5 mg/ml olarak bulmuşlardır. Konsantrasyona karşı pik şiddetlerini kullanarak dört metabolit için de doğrusal kalibrasyon eğrileri elde etmişlerdir. Daha sonra Premasiri ve arkadaşları 2001 yılında sentetik idrar içerisinde üre, ürik asit ve kreatinin tespitini altın kolloidlerin kullanıldığı YGRS tekniği ile gerçekleştirmişlerdir [9]. Ancak sadece kreatininin kantitatif analizi yapılmıştır. Pik alanlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinde tespit edilebilen minimum kreatinin konsantrasyonu 0,5 mg/dl bulunmuştur. Yakın zamanda Bispo ve arkadaşlarının 2013'de yaptıkları bir çalışma hasta idrarlarının kullanılması yönünden önem taşımaktadır [4]. Şeker ve hipertansiyon hastalıkları ile idrarda bulunan üre, kreatinin ve glukoz seviyeleri arasındaki ilişki RS yöntemi ile ortaya konmuştur. Bu çalışmada kantitatif analizden ziyade, temel bileşenler analizi (PCA) ile hasta ve sağlıklı gruplar arasında bir ayırım yapılması amaçlanmıştır.

Böbrek fonksiyonları hakkında en yararlı bilgiyi vermesi sebebiyle idrar kreatinini diğer metabolitlere göre Raman ile daha çok çalışılmıştır. Örneğin McMurdy ve Berger 2003 yılında farklı hasta gruplarından aldıkları idrarda sadece kreatinini çalışmışlardır [8]. Ayrıca bu çalışma değiştirilmemiş hasta idrar örneklerinin Raman ile analizine ilk örnektir. Ölçümler 830 nm diyod lazer ve 200 mW güç kullanarak yapılmıştır. Raman spektroskopisi sonucuna HLA analizi uygulanarak tespit edilebilen kreatininin tahmini minimum konsantrasyonu 4,9 mg/dl olarak bulunmuştur. 2012 yılındaki bir diğer çalışmada herhangi bir sentetik idrar ya da gerçek idrar kullanılmadan, gümüş kolloidler ile yapılan YGRS sonucunda kreatinin tespit limiti 10 mg/dl olarak bulunmuştur [55]. Aynı çalışmada 11 örnekten alınan kreatinine ait 1424 cm^{-1} dalga boyundaki Raman bandının şiddetleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinde R^2 değeri 0,9547 olarak hesaplanmıştır.

2007 yılındaki bir çalışmada Park ve arkadaşları, düşük çözünürlüklü RS ile 10 kat sulandırılmış ve içerisine 0-8 mg/dl aralığında glukoz eklemesi yapılmış idrarı analiz etmişlerdir. Anormal ve normal idrar örneklerini glukoz konsantrasyonuna göre %92 doğrulukla sınıflandırabilmişlerdir [10].

2007 yılındaki bir diğer çalışmada, sağlıklı kişilerden alınan idrar örneklerindeki ürik asit, gümüş kolloidler kullanıldığı YGRS yöntemi ile tespit edilebilmiştir [138]. Bu çalışmada kantitatif analiz yapılmadan fizyolojik şartlardaki ürik asitin tespiti amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında sentetik idrar hazırlanarak içerisine azalan miktarlarda üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit ayrı ayrı eklenmiştir. Hastalardan alınacak idrar örneklerinin ilk aşamada kullanılması kişisel farklılıkların çok geniş olması sebebiyle uygun görülmemiştir. Yukarıda bahsi geçen çoğu çalışmada YGRS tekniği kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise herhangi bir nanopartikül kullanmadan sadece RS ile 45 sn gibi kısa bir sürede dört idrar metabolitinin hassas bir şekilde analizi gerçekleştirilmiştir. Tespit sınırı üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit için sırasıyla 30 mg/dl, 35 mg/dl, 27 mg/dl ve 14 mg/dl olarak hesaplanmıştır. Bunlar normal RS ile yapılan diğer çalışmalardaki sonuçlarla birbirine yakın değerlerdir. Literatürde YGRS analizlerindeki tespit sınırları daha düşük olsa da YGRS spektrumlarının tekrarlanabilirliğinin düşük olması [139], örnek hazırlama aşaması ve yüksek maliyet gerektirmesi gibi sebeplerle normal RS'ye kıyasla dezavantajlı olduğu düşünülmektedir.

Üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit metabolitlerinin sağlıklı bir kişinin idrarında bulunması gereken normal aralıkları farklı kaynaklarda değişebilmektedir. Örneğin Dou ve arkadaşlarına göre glukoz, üre ve kreatin için normal fizyolojik aralıklar sırasıyla < 30 mg/dl, < 20 mg/dl ve < 10 mg/dl'dir. 40 mg/dl'nin üzerindeki idrar glukoz konsantrasyonu anormal olarak düşünülmektedir [10]. Premasiri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yapay idrar solüsyonunun içerisindeki üre, kreatinin ve ürik asit miktarları sırasıyla 1639 mg/dl, 104 mg/dl ve 34 mg/dl olarak verilmiş olup bu değerlerin sağlıklı bir insan idrarındaki ile yaklaşık aynı olduğu rapor edilmiştir [9]. Yine aynı çalışmada YGRS kullanılmadan sadece RS ile fizyolojik kreatinin konsantrasyonunun tespit edilemeyeceği belirtilmiştir. Sağlıklı bir kişinin idrarındaki kreatinin konsantrasyonunun $50-300$ mg/dl arasında değiştiğini rapor eden bir araştırma da mevcuttur [8]. Bizim çalışmamızda kullanılan sentetik idrar tarifine göre 49 mg/ml üre ve $2,8$ mg/ml kreatinin bulunmaktadır [129]. Ürik asitin idrardaki normal seviyesi kaynaklarda $\sim 0,4$ mM olarak geçmektedir [3]. Farklı bir kaynakta gümüş nanopartikül kullanılmadan RS ile idrarda normal miktarda bulunan ürik asitten Raman sinyalinin elde edilemeyeceği belirtilmektedir [138]. Bununla beraber bazı araştırmacılar idrar metabolitlerinin kesin konsantrasyonlarının (mg/dl) klinikte kullanımını, örnekten örneğe su dilüsyon miktarında olabilecek değişimler sebebiyle kullanışlı görmemektedir [8]. Bu sebeple adı geçen idrar metabolitlerinin belirtilen normal konsantrasyon aralıkları, yukarıda örneklendirildiği üzere çeşitli kaynaklarda farklılaşabilmektedir.

Kalibrasyon eğrisi oluşturulmasında kullanılan konsantrasyon aralıkları tüm bu çalışmalar göz önüne alınarak, fizyolojik miktarın üst sınırından başlayıp çok anormal şartlardaki seviyeye kadar belirlenmiştir. Her bir metabolit için kalibrasyon grafikleri hem bant intensite değerleri hem de bant alanları kullanılarak 15 veya 16 farklı konsantrasyon ile oluşturulmuştur. Bu bantların seçimi referans spektrumlarında en yüksek pikin gözlendiği dalga boyu kullanılarak yapılmıştır. Literatürde bu metabolitler için farklı referans piklerinin kullanıldığı gözlemlense de üre, kreatinin ve ürik asit için seçilen referans bantları birçok çalışma ile uyum göstermektedir [4, 6]. Glukoz için ise bazı kaynaklarda $1124-1130$ cm^{-1} 'deki bant referans alınırken bu çalışmada en güçlü elde edilen 521 cm^{-1} 'deki bantın kullanılması uygun görülmüştür. Bu metabolitlerin ayrı ayrı tespitine yönelik çalışmalardan bazıları yukarıda açıklanmıştır. Ancak bu dört metabolitin birden RS ile analizine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında üreyi, kreatinini, glukozu ve ürik asiti aynı anda içeren sentetik idrar analizi hem tek spektrum toplanması yolu hem de Raman

haritalama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğu yapılan homojenite ve tekrarlanabilirlik deneyleri ile desteklenmiştir.

Böbrek hastalıklarının tanısı adına Raman spektroskopisi ile yapılan bu çalışma klasik yöntemlerle kıyaslandığında; idrar örneklerinin kullanılması sebebiyle tahribatsız olması, numunenin ön işlem gerektirmemesi, analiz süresinin çok kısa olması ve hastalık belirteci olan birden fazla metaboliti aynı anda tayin edebilmesi gibi birçok avantajlara sahiptir. İdrardaki üre, kreatinin, glukoz ve ürik asitin anormal düzeyleri böbrek hastalıklarının tanısı ve ilerleyişi hakkında geniş bilgi vermesi sebebiyle RS'nin güncel metotlara alternatif olabileceği gösterilmiştir. Bir çok avantajına rağmen RS cihazının nispeten pahalı olması ve uzmanlık gerektirmesinden dolayı kantitatif analizde yaygın olarak kullanılmadığı görülmektedir. Uygun lazerlerin ve taşınabilir Raman cihazlarının geliştirilmesi ile bu problemlerin ortadan kalkacağı düşünülmektedir (Bkz. Resim 2.2.).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında kronik böbrek hastalıklarının tanısı için tahribatsız, kolay, hassas ve hızlı bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla idrardaki potansiyel hastalık biyobelirteçlerinden olan üre, kreatinin, glukoz ve ürik asitin konfokal Raman spektroskopisi ile tespiti gerçekleştirilmiştir. Üre ve kreatinin hem sağlıklı hem de sağlıklı kişilerin idrarında, glukoz ve ürik asit de hastalarla beraber sağlıklı kişilerde de eser miktarda görüldüğü için, idrardaki bu biyobelirteçlerin tespiti ile beraber konsantrasyonlarının bilinmesi de çok önemlidir.

Tüm analizlerde kullanılacak optimum cihaz parametrelerini belirlemek amacıyla, distile sudaki üre çözeltisinden gelen Raman bandının şiddetine göre optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun sonucunda lazer ışınının dalga boyu 785 nm, lazer-örnek etkileşim süresi 15 sn ve lazerin tekrar sayısı 3 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 532 nm ve 785 nm lazer kaynakları kreatinin, glukoz ve ürik asit için de denenmiş, 532 nm’de görülen floresan girişiminden dolayı 785 nm’nin kullanımı uygun görülmüştür. Üzerine numunenin damlatılacağı alüminyum folyodan aynı şartlar altında Raman’da ölçüm alınmış ve buradan analizi etkileyecek hiç bir sinyalin gelmediği teyit edilmiştir. Metabolitlerin içine ekleneceği sentetik idrar protokole göre hazırlanmış ve elde edilen Raman spektrumunun gerçek idrar ile idrar negatif kontrolden alınan spektrumlara genel hatlarıyla çok benzer olduğu görülmüştür. Raman referans spektrumlarını oluşturmak için 75 mg/ml üre, 75 mg/ml kreatinin, 75 mg/ml glukoz ve 25 mg/ml ürik asitin distile sudaki çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen spektrumlarda üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit için sırasıyla 1004 cm^{-1} , 682 cm^{-1} , 521 cm^{-1} ve 627 cm^{-1} dalga boylarındaki bantlar en güçlü sinyali verdikleri için referans bantları olarak belirlenmiştir. Yani bu dalga boyundaki bantlar belirtilen metabolitlere özgü olup o maddenin ortamda var olduğu durumlarda gözlenmektedir. Üre için 2,5 ile 75 mg/ml arasında 16 örnek, kreatinin için 2,5 ile 70 mg/ml arasında 15 örnek, glukoz için 1,75 ile 70 mg/ml arasında 16 örnek ve ürik asit için 0,25 ile 24 mg/ml arasında 15 sentetik idrar örneği ile ölçümler yapılmıştır. Konsantrasyona karşı her metabolitin referans bandının hem yükseklikleri hem de alanları ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Şiddet ve alanlardan elde edilen korelasyon katsayıları sırasıyla üre için 0,949; 0,952; kreatinin için 0,935; 0,937; glukoz için 0,958; 0,910 ve ürik asit için 0,988; 0,987 olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar metabolit konsantrasyonu ile alınan referans bantlarının büyüklüğü arasında doğrusal bir ilişki olduğunu, artan konsantrasyonla beraber pik şiddetinin ve alanının da arttığını göstermektedir.

49 mg/ml üre, 25 mg/ml kreatinin, 25 mg/ml glukoz ve 2,5 mg/ml ürik asitin hepsini içeren sentetik idrar örneği Raman'da hem tekli spektrum ile hem de haritalama yöntemi ile analiz edilmiştir. Her metabolite ait referans bantlarının eldesiyle eş zamanlı tespiti yapılabilirliği gösterilmiştir. Ayrıca Raman haritalama yöntemi ile 3 boyutlu tarama yapılarak sentetik idrar içerisindeki maddelerin dağılımı görüntülenmiş ve bu alanlardan yüzlerce kez alınan ölçümle oluşturulan ortalama spektrumlar gösterilmiştir. Literatürde üre, kreatinin, glukoz ve ürik asitin aynı anda tespiti yapıldığı bir Raman çalışması bulunmaması ise bu araştırmanın önemini göstermektedir.

Yöntemin geçerliliği kalibrasyon eğrilerinden elde edilen doğrusallığın yanında hassasiyet (LOD ve LOQ) ve kesinlik (homojenite ve tekrarlanabilirlik testleri) değerleri hesaplanarak da gösterilmiştir. Gözlenebilirlik sınırı olarak da bilinen tespit sınırı üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit için sırasıyla 30 mg/dl, 35 mg/dl, 27 mg/dl ve 14 mg/dl, tayin sınırı ise 89 mg/dl, 106 mg/dl, 81 mg/dl ve 43 mg/dl olarak bulunmuştur. Homojenite testinde her metabolit için seçilen birer örnekte 10 farklı yüzeyden ölçümler alınmıştır. Üreye ait bant şiddetlerinin ortalaması 593 ± 23 ve bağıl standart sapması (RSD) %3,8, kreatinin bant şiddeti ortalaması 306 ± 21 ve RSD %6,9, glukoz bant şiddeti ortalaması 123 ± 9 ve RSD %7,3, ürik asit bant şiddeti ortalaması 1512 ± 132 ve RSD %8,7 olarak hesaplanmıştır. Yine her madde için seçilen birer örnekten her gün 5 tekrarlı olacak şekilde 3 günde yapılan Raman ölçümleri ile bant intensitelerinin tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Hem gün içindeki 5 bağımsız analizden hem de 3 günde yapılan toplam 15 analizden ortalama bant şiddetleri, SD ve RSD değerleri hesaplanmıştır. Ürenin %92, kreatininin %89, glukozun %90 ve ürik asitin %82 kesinlikle tekrar edilebilirliğinin olduğu bulunmuştur. Bu verilerden aynı konsantrasyondan alınan Raman bant şiddetlerinin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bahsi geçen idrar metabolitlerinin ayrı ayrı tespiti, farklı teknikler kullanılarak yapılabilmesine rağmen, bir kaç metabolitin birden tespiti günümüzde mümkün olmamaktadır. Bu tez çalışmasında; konfokal Raman spektroskopisinin ileri teknolojisi sayesinde idrarda bulunan üre, kreatinin, glukoz ve ürik asit metabolitlerinin analizleri ile beraber eş zamanlı tespiti 45 saniye gibi kısa bir sürede yüksek hassasiyet ve kesinlikle

gerçekleştirilebilmiştir. Böbrek rahatsızlıklarının yanında KBH oluşturma riski yüksek diyabet, hipertansiyon, KVH ve üriner taş gibi birçok hastalık durumunda idrardaki bu bileşenlerin seviyesi değiştiği için analizleri büyük önem taşımaktadır. Mevcut yöntemlere nazaran RS analizinin ön işlem gerektirmemesi, laboratuvar gereksinimlerini azaltması, birden fazla bileşeni tek analizle tespit edebilmesi, tahribatsız, hızlı ve hassas olması gibi birçok avantajları bulunmaktadır. Ancak Raman sinyalinin zayıf olması sebebiyle çok daha düşük konsantrasyonların tespiti için YGRS uygulanabilir. Ayrıca bu çalışma, hasta ve sağlıklı kişilerden alınan idrar örneklerine RS ile beraber kemometrik yöntemlerin uygulanmasıyla karşılaştırmalı analiz yapılarak geliştirilebilir. İleride taşınabilir bir Raman tanı cihazı ile klinik alanda uygulamaya geçilebilir. Böylece hastanelerde böbrek hastalıklarıyla beraber diğer birçok hastalığın daha hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde tanısı yapılabilir. İdrarda veya diğer vücut sıvılarında bulunabilen potansiyel hastalık biyobelirteçlerinin hızlı tespiti, erken ve uygun bir tedaviyi mümkün kılabilmekle beraber hastalığın ilerlemesiyle oluşabilecek sosyal ve ekonomik problemleri de en aza indirebilecektir. Hastalar ve doktorlar açısından sağlayacağı bütün bu kolaylıklar düşünüldüğünde üzerinde çalışılmaya değer ve gelecek vaat eden bir analiz metodu olduğu görülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M. W., Hogg, R. J., Perrone, R. D., Lau, J., and Eknoyan, G. (2003). National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Annals of Internal Medicine*, 139(2), 137-147.
2. Shi, H., Ma, Y., and Ma, Y. (1995). A Simple and Fast Method to Determine and Quantify Urinary Creatinine. *Analytica Chimica Acta*, 312(1), 79-83.
3. Zhao, L., Blackburn, J., and Brosseau, C. L. (2014). Quantitative detection of uric acid by electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy using a multilayered Au/Ag substrate. *Analytical Chemistry*, 87(1), 441-447.
4. Bispo, J. A., de Sousa Vieira, E. E., Silveira, L., Jr., and Fernandes, A. B. (2013). Correlating the amount of urea, creatinine, and glucose in urine from patients with diabetes mellitus and hypertension with the risk of developing renal lesions by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Biomedical Optics*, 18(8), 87004.
5. Shapiro, A., Gofrit, O. N., Pizov, G., Cohen, J. K., and Maier, J. (2011). Raman molecular imaging: a novel spectroscopic technique for diagnosis of bladder cancer in urine specimens. *European Urology*, 59(1), 106-112.
6. Dou, X., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Doi, S., and Ozaki, Y. (1996). Quantitative analysis of metabolites in urine using a highly precise, compact near-infrared Raman spectrometer. *Vibrational Spectroscopy*, 13(1), 83-89.
7. Jia, L., Chen, X., and Wang, X. (1999). Simultaneous Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Urine by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22(16), 2433-2442.
8. McMurdy, J. W., and Berger, A. J. (2003). Raman Spectroscopy-Based Creatinine Measurement in Urine Samples from a Multipatient Population. *Applied Spectroscopy*, 57(5), 522-525.
9. Premasiri, W. R., Clarke, R. H., and Womble, M. E. (2001). Urine Analysis by Laser Raman Spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 28(4), 330-334.
10. Park, C., Kim, K., Choi, J., and Park, K. (2007). Classification of glucose concentration in diluted urine using the low-resolution Raman spectroscopy and kernel optimization methods. *Physiological Measurement*, 28(5), 583-593.
11. Wang, H., Malvadkar, N., Koytek, S., Bylander, J., Reeves, W. B., and Demirel, M. C. (2010). Quantitative analysis of creatinine in urine by metalized nanostructured parylene. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2), 027004.
12. Reyes-Goddard, J. M., Barr, H., and Stone, N. (2005). Photodiagnosis using Raman and surface enhanced Raman scattering of bodily fluids. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), 223-233.

13. McNichols, R. J., and Cote, G. L. (2000). Optical glucose sensing in biological fluids: an overview. *Journal of Biomedical Optics*, 5(1), 5-16.
14. Levey, A. S., and Coresh, J. (2012). Chronic Kidney Disease. *Lancet*, 379, 165-180.
15. Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culleton, B., Hamm, L. L., McCullough, P. A., Kasiske, B. L., Kelepouris, E., and Klag, M. J. (2003). Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease a statement from the American Heart Association Councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. *Circulation*, 108(17), 2154-2169.
16. Levey, A. S., Eckardt, K. U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., Zeeuw, D. D., Hostetter, T. H., Lameire, N., and Eknoyan, G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International*, 67(6), 2089-2100.
17. Suleymanlar, G., Utas, C., Arinsoy, T., Ates, K., Altun, B., Altıparmak, M. R., Ecdar, T., Yilmaz, M. E., Camsari, T., Basci, A., Odabas, A. R., and Serdengeçti, K. (2011). A population-based survey of Chronic RENal Disease In Turkey-the CREDIT study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(6), 1862-1871.
18. Mader, S. S. (2004). *Human Biology*. New York: McGraw-Hill.
19. Maton, A., Roshan, L., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson S., Warner, M. Q., LaHart, D. and Wright J. D. (1993). *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice Hall. ISBN 0-13-981176-1.
20. Cotran, R. S., Kumar, V., Fausto, N., Robbins, S. L., and Abbas, A. K. (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, ISBN 0-7216-0187-1.
21. National Institutes of Health. (2010). US Renal Data System, USRDS 2010 Annual data report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*.
22. Serdengeçti K., Süleymanlar G., and Altıparmak M. (2009). Registry of the Nephrology Dialysis and Transplantation in Turkey (Registry-2008). *Turkish Society of Nephrology*, İstanbul.
23. Erek, E., Süleymanlar, G., and Serdengeçti, K. (2002). Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(12), 2087-2093.
24. Tanrıverdi, M. (2010). Kronik Böbrek Yetmezliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2010(2), 27-32.
25. İnternet: Chronic Kidney Disease Diagnosis. http://www.emedicinehealth.com/chronic_kidney_disease/page5_em.htm#chronic_kidney_disease_diagnosis. Son Erişim Tarihi: 21.09.2016.
26. Lindeman, R. D., Tobin, J., and Shock, N. W. (1985). Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *Journal of the American Geriatrics Society*, 33(4), 278-285.

27. Rowe, J. W., Andres, R., Tobin, J. D., Norris, A. H., and Shock, N. W. (1976). The effect of age on creatinine clearance in men: a cross-sectional and longitudinal study. *Journal of Gerontology*, 31(2), 155-163.
28. Smith, H. W. (1951) *The kidney: structure and function in health and disease*. New York: Oxford University Press.
29. Davies, D. F., and Shock, N. W. (1950). Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *Journal of Clinical Investigation*, 29(5), 496.
30. Ejerblad, E., Fored, C. M., Lindblad, P., Fryzek, J., McLaughlin, J. K., and Nyrén, O. (2006). Obesity and risk for chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(6), 1695-1702.
31. Remuzzi, G., Ruggenenti, P., and Perico, N. (2002). Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Annals of Internal Medicine*, 136(8), 604-615.
32. Coresh, J., Wei, G. L., McQuillan, G., Brancati, F. L., Levey, A. S., Jones, C., and Klag, M. J. (2001). Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Archives of Internal Medicine*, 161(9), 1207-1216.
33. Obrador, G. T., Ruthazer, R., Arora, P., Kausz, A. T., and Pereira, B. J. (1999). Prevalence of and factors associated with suboptimal care before initiation of dialysis in the United States. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(8), 1793-1800.
34. McClellan, W. M., Knight, D. F., Karp, H., and Brown, W. W. (1997). Early detection and treatment of renal disease in hospitalized diabetic and hypertensive patients: important differences between practice and published guidelines. *American Journal of Kidney Diseases*, 29(3), 368-375.
35. Hsu, C. Y., and Chertow, G. M. (2000). Chronic renal confusion: insufficiency, failure, dysfunction, or disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 36(2), 415-418.
36. İnternet: Chronic kidney disease. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-kidney-disease/symptoms-causes/dxc-20207466>. Son Erişim Tarihi: 22.09.2016.
37. Süleymanlar, G., Altıparmak, M., Seyahi, N., ve Trabulus, S. (2012). Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon. Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi 2011 Yılı Rapor Özeti. *Türk Nefroloji Derneği Yayınları*, İstanbul.
38. Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., and Cartmell, E. (2015). The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(17), 1827-1879.
39. İnternet: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1176. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1176>. Son Erişim Tarihi: 22.09.2016.

40. Eggenstein, C., Borchardt, M., Diekmann, C., Gründig, B., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., and Spener, F. (1999). A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(1), 33-41.
41. Luo, Y. C., and Do, J. S. (2004). Urea biosensor based on PANi (urease)-Nafion®/Au composite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(1), 15-23.
42. Taylor, A., and Vadgama, P. (1992). Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of urea. *Annals Of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry in Medicine*, 29(3), 245-264.
43. Marescau, B., De Deyn, P. P., Holvoet, J., Possemiers, I., Nagels, G., Saxena, V., and Mahler, C. (1995). Guanidino compounds in serum and urine of cirrhotic patients. *Metabolism*, 44(5), 584-588.
44. Brusilow, S. W. (1984). Arginine, an indispensable amino acid for patients with inborn errors of urea synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, 74(6), 2144.
45. Aronson, D., Mittleman, M. A., and Burger, A. J. (2004). Elevated blood urea nitrogen level as a predictor of mortality in patients admitted for decompensated heart failure. *The American Journal of Medicine*, 116(7), 466-473.
46. Umesawa, M., Yamagishi, K., Sawachi, S., Ikeda, A., Noda, H., Ikehara, S., Cui, R., Sakurai, S., Tanigawa, T., and Iso, H. (2010). Urea nitrogen concentrations in spot urine, estimated protein intake and blood pressure levels in a Japanese general population. *American Journal of Hypertension*, 23(8), 852-858.
47. Liu, L., Mo, H., Wei, S., and Raftery, D. (2012). Quantitative analysis of urea in human urine and serum by 1 H nuclear magnetic resonance. *The Analyst*, 137(3), 595-600.
48. Watford, M. (2003). The urea cycle: teaching intermediary metabolism in a physiological setting. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31(5), 289-297.
49. Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., and Uhler, M. D. (1999). *Basic Neurochemistry* (Sixth Edition). Philadelphia: Lippincott-Raven.
50. İnternet: Amino Acid Metabolism. <http://slideplayer.com/slide/8652342/>. Son Erişim Tarihi: 22.09.2016.
51. İnternet: Creatinine. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=588. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/588>. Son Erişim Tarihi: 22.09.2016.
52. Taylor, E. H. (1989). *Clinical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons. pp. 4, 58-62.
53. Allen, P. J. (2012). Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(5), 1442-1462.

54. Panasyuk-Delaney, T., Mirsky, V. M., and Wolfbeis, O. S. (2002). Capacitive creatinine sensor based on a photografted molecularly imprinted polymer. *Electroanalysis*, 14(3), 221-224.
55. Wang, Y., Chen, J., Wu, Y., Chen, Y., Pan, J., Lei, J., Chen, Y., Sun, L., Feng, S., and Chen, R. (2012, March). *Surface-enhanced Raman spectroscopy of creatinine in silver colloid*. Paper presented at the Photonics and Optoelectronics Meetings 2011 (pp. 83290K-83290K). International Society for Optics and Photonics.
56. Liotta, E., Gottardo, R., Bonizzato, L., Pascali, J. P., Bertaso, A., and Tagliaro, F. (2009). Rapid and direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 409(1-2), 52-55.
57. İnternet: Creatinine. <http://emedicine.medscape.com/article/2054342-overview>. Son Erişim Tarihi: 22.09.2016.
58. McPherson, R. A., and Pincus, M. R. (2016). *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods* (23rd Edition). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.
59. Alula, M. T., and Yang, J. (2014). Photochemical decoration of magnetic composites with silver nanostructures for determination of creatinine in urine by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, 130, 55-62.
60. Inker L. A., Fan L., and Levey, A. S. (2015). *Comprehensive Clinical Nephrology* (5th Edition). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, Chapter 3.
61. The Columbia Encyclopedia. (2015). *Glucose*. Columbia University Press (6th Edition).
62. Ferraris, R. P. (2001). Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochemical Journal*, 360(2), 265-276.
63. McPhee, S. J., Papadakis, M. A., and Tierney, L. M. (2010). *Current medical diagnosis & treatment 2010*. New York: McGraw-Hill Medical.
64. Estela, C. (2011). Blood Glucose Levels. *Undergraduate Journal of Mathematical Modeling: One+ Two*, 3(2), 12.
65. Assal, J., and Groop, L. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *World Health Organization*, 1-65.
66. Rose, B. D., and Rennke, H. G. (1994). *Renal pathophysiology: the essentials*. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.
67. Schumann, G., Schweitzer, S., and Henry, J. (1991). *Examination of urine in clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 404-408.
68. Weast, R. C. (Ed.). (1981). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (62nd Edition). CRC Press.
69. Waring, W., Webb, D., and Maxwell, S. (2000). Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease. *Qjm*, 93(11), 707-713.

70. Angstadt, C. N. (1997). Purine and Pyrimidine Metabolism: Purine Catabolism, *NetBiochem*.
71. Harmonisation of Reference Intervals (PDF). (2011). Pathology Harmony (UK).
72. Fischbach, F. T., and Dunning, M. B. (2009). *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests* (8th Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
73. Vitart, V., Rudan, I., Hayward, C., Gray, N. K., Floyd, J., Palmer, C. N., Knott, S. A., Kolcic, I., Polasek, O., and Graessler, J. (2008). SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nature Genetics*, 40(4), 437-442.
74. Yan, S.L., Lin, P.Z., and Hsiao, M.W. (1999). Separation of urea, uric acid, creatine, and creatinine by micellar electrokinetic capillary chromatography with sodium cholate. *Journal of Chromatographic Science*, 37(2), 45-50.
75. Emmerson, B. T. (1996). The management of gout. *New England Journal of Medicine*, 334(7), 445-451.
76. Lucas, B. (1999). Medicine in the news. *Patient Care*, 15, 15-21.
77. Torun, M., Yardım, S., Simsek, B., and Burgaz, S. (1998). Serum uric acid levels in cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 23(1), 25-29.
78. Kodati, V. R., Tu, A. T., and Turumin, J. L. (1990). Raman spectroscopic identification of uric-acid-type kidney stone. *Applied Spectroscopy*, 44(7), 1134-1136.
79. Munoz, J. A., Lopez-Mesas, M., and Valiente, M. (2010). Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 81(1-2), 392-397.
80. Bircan, Z., Kervancioğlu, M., Katar, S., Onur, A., and Onur, H. (2000). The etiology of renal failure in south-east Anatolia. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 14(1), 87-88.
81. Smith, E., and Dent, G. (2013). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons.
82. Sivam, A., Sun-Waterhouse, D., Perera, C., and Waterhouse, G. (2013). Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Research International*, 50(2), 574-585.
83. Guven, B. (2011). *Gıda Uygulamalarına Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 82.
84. Skoog, D. A., Holler, J. F., and Nieman, T. A. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*. America: Saunders Collage Publishing.
85. Demir A., Genc Oztoprak B., Gulecen T., Akman E., Gunes M., Kacar E., and Mutlu N. (2011, 11-15 Eylül). *Development of time and space resolved LIBS technique and*

- application in medical research*. Paper presented at the EMSLIBS 2011, 6th EuroMediterranean Symposium on Laser Induced Breakdown Spectroscopy, İzmir.
86. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., and Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman spectroscopy* (Second Edition). Amsterdam, Boston: Academic Press.
 87. Raman, C. V. (1992). *Molecular Diffraction of Light*. Calcutta University Press, Calcutta.
 88. Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S. (1999). Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. *Chemical Reviews*, 99(10), 2957-2976.
 89. Biswas, A., Wang, T., and Biris, A. S. (2010). Single metal nanoparticle spectroscopy: optical characterization of individual nanosystems for biomedical applications. *Nanoscale*, 2(9), 1560-1572.
 90. Raman Spectroscopy Basics, Princeton Instruments (PDF), Application Notes.
 91. Parker, S. F. (1994). A review of the theory of Fourier-transform Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 50(11), 1841-1856.
 92. İnternet: Elektromanyetik dalga tayfi. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Elektromanyetik_dalga_tayfi%C4%B1.png
Son Erişim Tarihi: 24.09.2016.
 93. Lambert, P. J., Whitman, A. G., Dyson, O. F., and Akula, S. M. (2006). Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology Journal*, 3(1), 1.
 94. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., Kılıç, E., Köseoğlu, F., ve Yılmaz, H. (2000). *Enstrümantal analiz ilkeleri*. Ankara: Bilim Yayıncılık.
 95. Schrader, B., and Moore, D. (1997). Nomenclature, symbols, units, and their usage in spectrochemical analysis XVIII. Laser-based molecular spectrometry for chemical analysis-Raman scattering processes (IUPAC Recommendations 1997). *Pure and Applied Chemistry*, 69(7), 1451-1468.
 96. Efremov, E. V., Ariese, F., and Gooijer, C. (2008). Achievements in resonance Raman spectroscopy: Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 119-134.
 97. Yıldız, A., Genç, Ö., ve Bektaş, S. (1997). *Enstrümantal Analiz Yöntemleri* (2. Baskı). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
 98. Kneipp, K., Kneipp, H., Corio, P., Brown, S., Shafer, K., Motz, J., Perelman, L., Hanlon, E., Marucci, A., and Dresselhaus, G. (2000). Surface-enhanced and normal Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy of single-walled carbon nanotubes. *Physical Review Letters*, 84(15), 3470.
 99. Popp, J., Kiefer, W. (2006). Raman scattering, fundamentals. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.

100. Confocal Raman Microscopy General Overview, Princeton Instruments (PDF), Application Notes.
101. Chang, R., and Furtak, T. (1985). Plenum: New York, 1982.(b) Moskovits, M. *Reviews of Modern Physics*, 57, 783.
102. Xu, X., Li, H., Hasan, D., Ruoff, R. S., Wang, A. X., and Fan, D. (2013). Near-field enhanced plasmonic-magnetic bifunctional nanotubes for single cell bioanalysis. *Advanced Functional Materials*, 23(35), 4332-4338.
103. Blackie, E. J., Ru, E. C. L., and Etchegoin, P. G. (2009). Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 131(40), 14466-14472.
104. Le Ru, E. C., Meyer, M., and Etchegoin, P. G. (2006). Proof of single-molecule sensitivity in surface enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(4), 1944-1948.
105. Fleischmann, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2), 163-166.
106. Jeanmaire, D. L., and Van Duyne, R. P. (1977). Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84(1), 1-20.
107. Moskovits, M. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 783-826.
108. Otto, A., Mrozek, I., Grabhorn, H., and Akemann, W. (1992). Surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 4(5), 1143.
109. Kukushkin, V., Van'kov, A. B., and Kukushkin, I. V. (2013). Long-range manifestation of surface-enhanced Raman scattering. *JETP Letters*, 98(2), 64-69.
110. Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Ringe, E., and Van Duyne, R. P. (2012). SERS: materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1), 16-25.
111. Garrell, R. L. (1989). Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 61(6), 401A-411A.
112. Kallaway, C., Almond, L. M., Barr, H., Wood, J., Hutchings, J., Kendall, C., and Stone, N. (2013). Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3), 207-219.
113. Cao, Y. C., Jin, R., and Mirkin, C. A. (2002). Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 297(5586), 1536-1540.
114. Drago, R. S., (1977). *Physical Methods in Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders.
115. Chao, R., Khanna, R., and Lippincott, E. (1975). Theoretical and experimental resonance Raman intensities for the manganate ion. *Journal of Raman Spectroscopy*, 3(2-3), 121-131.

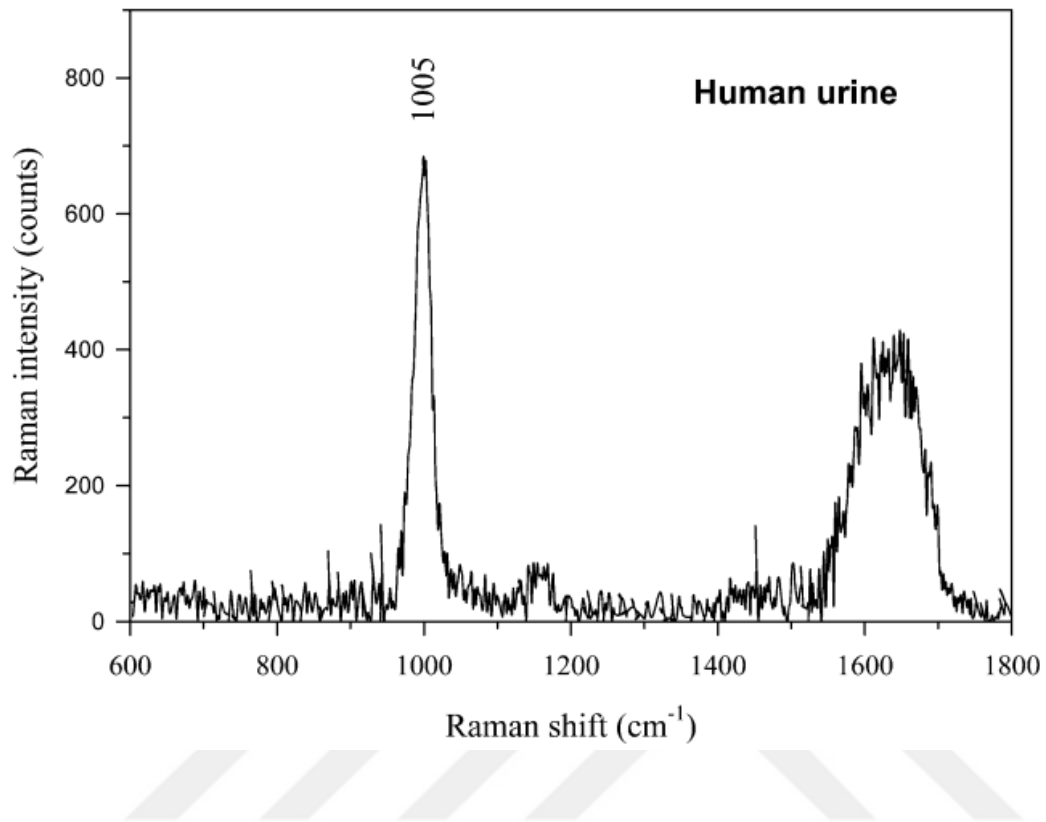
116. Hu, S., Smith, K. M., and Spiro, T. G. (1996). Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 118(50), 12638-12646.
117. Faulds, K., Smith, W. E., and Graham, D. (2005). DNA detection by surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS). *The Analyst*, 130(8), 1125-1131.
118. Xie, C., Chen, D., and Li, Y. Q. (2005). Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers. *Optics Letters*, 30(14), 1800-1802.
119. Tolles, W. M., Nibler, J., McDonald, J., and Harvey, A. (1977). A review of the theory and application of coherent anti-Stokes Raman spectroscopy (CARS). *Applied Spectroscopy*, 31(4), 253-271.
120. Katz, O., Natan, A., Rosenwaks, S., and Silberberg, Y. (2008). Shaped femtosecond pulses for remote chemical detection. *Optics & Photonics News*, 19, 47-47.
121. Grasselli, J. G., and Bulkin, B. J. (1991). *Analytical Raman Spectroscopy*. New York: Wiley.
122. Carey, P. (2012). *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Elsevier.
123. Hudson, S. D., and Chumanov, G. (2009). Bioanalytical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 679-686.
124. Theophanides, T. (Ed.). (2012). *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Molecules: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute held at Athens, Greece, August 22–31, 1978 (Vol. 43)*. Springer Science & Business Media.
125. Efrima, S., and Bronk, B. (1998). Silver colloids impregnating or coating bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(31), 5947-5950.
126. Zapata, F., de la Ossa, M. Á. F., and García-Ruiz, C. (2015). Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 64, 53-63.
127. Guimarães, A. E., Pacheco, M. T. T., Silveira Jr, L., Barsottini, D., Duarte, J., Villaverde, A. B., and Zângaro, R. A. (2006). Near infrared raman spectroscopy (NIRS): A technique for doping control. *Journal of Spectroscopy*, 20(4), 185-194.
128. Visser, B. J., Vries, S. G., Bache, E. B., Meerveld-Gerrits, J., Kroon, D., Boersma, J., Agnandji, S. T., Vugt, M., and Grobusch, M. P. (2016). The diagnostic accuracy of the hand-held Raman spectrometer for the identification of anti-malarial drugs. *Malaria Journal*, 15(1), 1.
129. Lee, S. Y., Son, E., Kang, J. Y., Lee, H. S., Shin, M. K., Nam, H. S., Kim, S. Y., Jang, Y. M., and Rhee, G. S. (2013). Development of a Quantitative Analytical Method for Determining the Concentration of Human Urinary Paraben by LC-MS/MS. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(4), 1131-1136.
130. Gardner, P., Bertino, M., Weimer, R., and Hazelrigg, E. (2013). Analysis of lipsticks using Raman spectroscopy. *Forensic Science International*, 232(1), 67-72.

131. Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, 1.
132. ISO/TS 13530 (2009). Water quality- Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis.
133. Cui, L., Butler, H. J., Martin-Hirsch, P. L., and Martin, F. L. (2016). Aluminium foil as a potential substrate for ATR-FTIR, transfection FTIR or Raman spectrochemical analysis of biological specimens. *Analytical Methods*, 8(3), 481-487.
134. Keuleers, R., Desseyne, H., Rousseau, B., and Van Alsenoy, C. (1999). Vibrational analysis of urea. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(24), 4621-4630.
135. Saatkamp, C. J., de Almeida, M. L., Bispo, J. A. M., Pinheiro, A. L. B., Fernandes, A. B., and Silveira, L. (2016). Quantifying creatinine and urea in human urine through Raman spectroscopy aiming at diagnosis of kidney disease. *Journal of Biomedical Optics*, 21(3), 037001-037001.
136. Vikram, K., Mishra, S., Srivastava, S., and Singh, R. K. (2012). Low temperature Raman and DFT study of creatinine. *Journal of Molecular Structure*, 1012, 141-150.
137. Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Glucksberg, M. R., and Van Duyne, R. P. (2003). Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 125(2), 588-593.
138. Feng, S., Chen, W., Li, Y., Chen, G., Huang, Z., Liao, X., Xie, Z., and Chen, R. (2007, November). *Surface-enhanced Raman spectroscopy of urine by an ingenious near-infrared Raman spectrometer*. Paper presented at the Photonics Asia 2007 (pp. 682628-682628). International Society for Optics and Photonics.
139. Huh, Y. S., Chung, A. J., and Erickson, D. (2009). Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis. *Microfluidics and nanofluidics*, 6(3), 285-297.



EKLER

EK-1. 785 nm’de alınan insan idrarına ait Raman spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Kahveci, Emine Feride
Uyruđu : T. C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.04.1985, Osmaniye
Medeni hali : Evli
Telefon : (+90) 544 778 9982
Faks : -
e-mail : eferideonal@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.	Devam ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Bakırköy Anadolu İHL	2002

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİ GELECEKTİR..

