



**ZİNPİR-1 LİGANDI İLE FONKSİYONLAŞTIRILMIŞ Fe_3O_4 -
 $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ NANOKOMPOZİTLERİNİ KULLANARAK ORAL
PREKANSER VE ORAL KANSER HASTALARININ
TÜKÜRÜK ÇİNKO SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ
İÇİN YENİ BİR SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEMİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Elmas POLATDEMİR

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

Doktora Tezi – 2019

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZİNPİR-1 LİGANDI İLE FONKSİYONLAŞTIRILMIŞ
Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ NANOKOMPOZİTLERİNİ
KULLANARAK ORAL PREKANSER VE ORAL KANSER
HASTALARININ TÜKÜRÜK ÇİNKO SEVİYELERİNİN
BELİRLENMESİ İÇİN YENİ BİR
SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEMİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Elmas POLATDEMİR

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU**

**ERZURUM
2019**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**ZİNPİR-1 LİGANDI İLE FONKSİYONLAŞTIRILMIŞ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ NANOKOMPOZİTLERİNİ KULLANARAK ORAL
PREKANSER ve ORAL KANSER HASTALARININ TÜKÜRÜK
ÇİNKO SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN YENİ BİR
SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ**

Elmas POLATDEMİR

Tez Savunma Tarihi : 24.07.2019

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU (Atatürk Üni.) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehtap UYSAL (Erzincan Binali Yıldırım Üni.) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. F. Zehra KÜÇÜKBAY (İnönü Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL (Atatürk Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü 

**Doktora Tezi
ERZURUM-2019**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ.....	XVII
GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizması	4
2.2. Oral Kanserler.....	4
2.2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom.....	5
2.2.2. Oral Prekanserler	6
2.2.3. Oral Kanserlerin Erken Teşhisinde ve Kesin Tanısında Kullanılan Yöntemler	8
2.3. Çinko.....	9
2.4. Tükürük.....	11
2.5. Nanoteknoloji.....	12
2.5.1. Nanopartiküller	12
2.5.1.1. Nanopartikül Sentezi.....	13
2.5.2. Manyetik Nanopartiküller	13
2.5.2.1. Demir Oksit Manyetik Nanopartikülleri.....	14
2.5.2.2. Demir Oksit Manyetik Nanopartiküllerinin Silika ile Kaplanması	15
2.5.2.3. Demir Oksit Manyetik Nanopartiküllerinin Yüzey Modifikasyonu.....	15
2.6. Zinpir-1 Bileşiği.....	16
2.6.1. Mannik Reaksiyonunun Mekanizması.....	16

2.7. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi.....	17
2.7.1. Lüminesans, Floresans ve Fosforesans	17
2.7.2. Floresans Şiddetine Etki Eden Faktörler	18
2.7.2.1. Floresans Şiddetine Madde Yapısının Etkisi	18
2.7.2.2. Floresans Şiddetine Çözücü, Sıcaklık ve pH Etkisi.....	18
2.7.2.3. Floresans Şiddetine Çözünmüş Oksijen ve Derişimin Etkisi	19
2.7.3. Spektrofluorometre Cihazı.....	19
2.8. X-Işınları Kırınımı (XRD) Spektroskopisi	20
2.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometresi	21
2.10. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	22
2.11. ICP-MS (İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi)	22
2.12. Literatür Özetleri.....	23
2.12.1. Nanopartikül ve Nanokompozit Sentezi için Geliştirilen Yöntemler	23
2.12.2. Zn ²⁺ Analizinde Atomik Absorpsiyon Temelli Geliştirilen Analitik Yöntemler ve Uygulamaları	27
2.12.3. Zn ²⁺ Analizinde Kompleks ve Sensör Oluşumu Esasına Dayalı Moleküler Absorpsiyon Temelli Geliştirilen Analitik Yöntemler ve Uygulamaları	34
2.13. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	49
8. Örneklerin Kararlılığı, Stabilite (Stability).	50
3. MATERYAL VE METOT.....	51
3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	51
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	51
3.1.2. Analiz ve Görüntüleme Cihazları	51
3.2. Deneylerde Kullanılan Analiz ve Görüntüleme Yöntemlerinin Şartları	52

3.3. 9-(o-Karboksifenil) -2,7-dikloro -4,5-bis [bis(2-piridilmetil)-aminometil] -6-hidroksi-3-ksepton (Zinpir-1) Sentez Prosedürü.....	54
3.3.1. Zinpir-1'in Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama	55
3.4. Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerinin Sentezi.....	55
3.4.1. Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama	56
3.5. Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartikül Yüzeyinin Silika ile Kaplanma (Fe ₃ O ₄ -SiO ₂) ve Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ Manyetik Nanopartikülünün Amin Sonlu Grup ile Yüzey Modifikasyonu (Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂) Prosedürü	57
3.5.1. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ ve Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ Manyetik Nanopartiküllerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama	58
3.6. Zinpir-1 ile Modifiye Edilmiş Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ Nanokompozitinin Sentezi	58
3.6.1. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Analizlerinde	59
3.7. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozite Zn ²⁺ Yükleme Prosedürü.....	59
3.7.1. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -Zn(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama	59
3.8. Yapay Tükürük Çözeltilisinin Hazırlanması ve Yapay Tükürükten Zn ²⁺ 'nin Manyetik Olarak Ayrılma Prosedürü	60
3.9. Zn ²⁺ Yüklenen Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Spektroflorometrik Analizinde Kullanılan Stok, Standart, Kalite Kontrol ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	61
3.10. Zn ²⁺ ile Yüklenen Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Oluşumunda Zamanın Etkisi.....	62
3.11. Metal İyon Seçicilik Prosedürü.....	62

3.12. Spektroflorometri Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu	63
3.12.1. Özgünlük (Belirleyicilik) / Seçicilik.....	63
3.12.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	63
3.12.3. Doğruluk/Keskinlik	64
3.12.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ))	65
3.12.5. Geri Kazanım.....	66
3.13. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerden Tükürük Örneklerinin Toplanma Prosedürü	66
3.14. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerin Tükürük Örneklerinden Zn ²⁺ 'nin Manyetik Olarak Ayrılma Prosedürü.....	67
3.15. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerin Tükürük Örneklerinden Manyetik Ayrım ile Elde Edilen Zn ²⁺ Derişim Değerlerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	68
4. BULGULAR.....	69
4.1. Zinpir-1 Bileşiğinin Sentezi ve Yapısal Tanımlaması.....	69
4.2. Fe ₃ O ₄ Manyetik Nanopartiküllerinin Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları.....	72
4.3. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ Manyetik Nanopartikülünün Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları .	75
4.4. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitin Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları	80
4.5. Zn ²⁺ Yüklenen Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) (Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -Zn(Zinpir-1)) Nanokompozitin Oluşumu ve Yapısal Tanımlanması	83
4.6. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti ile Zn ²⁺ 'nin Belirlenmesine Yönelik Geliştirilen Spektroflorometri Yönteminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi	86

4.6.1.	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompoziti	Kullanılarak	Spektrofluorometri Yöntemi ile Zn^{2+} 'nin Belirlenmesinde Floresans Şiddeti Üzerine	Tampon Cinsi, Çözücü Oranı ve pH Etkisi.....	87
4.6.2.	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompoziti	Kullanılarak	Spektrofluorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Uyarma (λ_{uy}) ve Emisyon (λ_{em})	Dalga Boylarının Belirlenmesi.....	94
4.6.3.	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompoziti	Kullanılarak	Spektrofluorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Floresans Şiddeti Üzerine	Zamanın Etkisi	95
4.6.4.	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompozitinin	Metal İyon Seçiciliği			96
4.7.	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompoziti	Kullanılarak	Spektrofluorometri Yöntemi ile Zn^{2+} 'nin Belirlenmesine Yönelik Geliştirilen	Spektrofluorometri Yönteminin Geçerlilik Testleri.....	98
4.7.1.	Özgünlük (Belirleyicilik) / Seçicilik.....						98
4.7.2.	Doğrusallık ve Çalışma Aralığı						101
4.7.3.	Doğruluk/ Kesinlik						103
4.7.4.	Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (Miktar Tayin					Limiti) (LOQ).....	105
4.7.5.	Geri Kazanım						106
4.8.	Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerde Tükürük Zn^{2+} 'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	Manyetik	Nanokompoziti	Kullanılarak	Spektrofluorometri	Yöntemi ile Belirlenmesi	107
5. TARTIŞMA.....							113
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....							143
KAYNAKLAR							145

EKLER	166
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	166
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	167
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	168
EK-4. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU	169



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın, belirlenmesinde ve yürütülmesinde beni yönlendiren, desteğini, yakın ilgisini ve değerli bilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam süresince bilgi, görüş ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU başta olmak üzere, çalışmalarım sırasında emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Önder METİN'e, Sayın Doç. Dr. Arzu TATAR'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'a, Sayın Farrokh LAFZİ'ye ve tüm değerli hocalarıma, bu çalışmayı 214Z153 proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a, hayatımın her aşamasında her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli aileme, her zaman sabırla ve koşulsuz yanımda olan değerli eşime ve biricik oğluma teşekkür ederim.

Elmas POLATDEMİR

ÖZET

Zinpir-1 Ligandı ile Fonksiyonlaştırılmış Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ Nanokompozitlerini Kullanarak Oral Prekanser ve Oral Kanser Hastalarının Tükürük Çinko Seviyelerinin Belirlenmesi İçin Yeni Bir Spektroflorometrik Yöntemin Geliştirilmesi

Amaç: Zn²⁺ iyonuna duyarlı Zinpir-1 ligandı ile fonksiyonlaştırılmış manyetik ve floresans özelliğe sahip Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanokompozit oluşumuna dayalı yeni bir spektroflorometri yönteminin geliştirilmesi, valide edilmesi ve geliştirilen yöntem ile oral prekanser ve oral kanser hastalarının tükürük çinko seviyesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot: Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompoziti sırasıyla Zinpir-1 bileşiğinin, Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin, Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ amin sonlu silika kaplı manyetik nanopartiküllerinin sentezi ve daha sonra Zn²⁺ iyonuna duyarlı Zinpir-1 ligandının Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülüne kovalent bağ ile immobilizasyonu sonucu elde edildi. Sentezlenen bileşiklerin yapısı ve kimyasal bileşimi TEM, XRD ve FT-IR yöntemleri ile belirlendi. 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren Tris-HCl (pH 7.2) tampon çözeltisindeki Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitine Zn²⁺ yüklenmesi yapıldı. Spektroflorometri yönteminde eksitasyon ve emisyon maksimumları sırasıyla 490 nm ve 530 nm olarak belirlendi. Floresans şiddeti üzerine zamanın ve diğer metal iyonlarının etkisi incelenerek yöntem optimize edildi. Zn²⁺, tükürük örneklerinden Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompoziti şeklinde manyetik olarak ayrıldı.

Bulgular: Sentezlenen kırmızı-kahverengi Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin hem manyetik hem de floresans özellik gösterdiği belirlendi. Nanokompozite Zn²⁺ yüklenmesi ile floresans şiddetinin arttığı tespit edildi. Zn²⁺ ve Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin etkileşim süresi 20 dakika olarak belirlendi. Hem standart hem de yapay tükürük çözeltileri için 20 ile 160 ng/mL derişim aralığında kalibrasyon eğrileri çizildi. Geliştirilen yöntemin geçerlilik testleri yapıldı. Standart ve yapay tükürük çözeltilerinde yapılan analizlerde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5.04 ile 5.89 ng/mL ve 15.3 ile 17.8 ng/mL olarak tespit edildi. Tükürükte bulunan diğer metal iyonlarından kaynaklanan bir girişim etkisi gözlenmedi. Önerilen yöntem ile altı oral prekanser, altı oral kanser ve altı sağlıklı gönüllüye ait tükürük örneklerinde Zn²⁺ analizi gerçekleştirildi.

Sonuç: Her biri altı kişiden oluşan bağımsız üç grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis tek yönlü istatistiksel analiz yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı gruptan, sırasıyla oral prekanser ve oral kanser gruplarına doğru gidildikçe tükürük Zn²⁺ derişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (p=0.0005). Zn²⁺ derişiminin oral prekanser ve oral kanser tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompoziti, oral kanser ve oral prekanser, spektroflorometri, tükürük, Zn²⁺.

ABSTRACT

Development of A New Spectrofluorometric Method for The Detection of Salivary Zinc Levels in Oral Precancer and Oral Cancer Patients Using Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ Nanocomposites Functionalized with Zinpyr-1 Ligand

Aim: It is aimed to develop and validate a new spectrofluorometry method for determining and comparing the salivary zinc level in oral precancer and oral cancer patients based on the formation of the magnetic and fluorescent features of Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanocomposite functionalized with Zn²⁺ ion-sensitive Zinpyr-1 ligand.

Material and Methods: Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpyr-1) nanocomposite was obtained by the synthesis of Zinpyr-1 compound, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles, Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ amine-terminated silica-coated magnetic nanoparticles, and then the immobilization of Zn²⁺ ion-sensitive Zinpyr-1 ligand were successively completed by the covalent bonding to Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanoparticle. The structure and chemical composition of the synthesized compounds were determined by the TEM, XRD, and FT-IR methods. Zn²⁺ loading was performed on Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpyr-1) nanocomposite in Tris-HCl (pH 7.2) buffer solution containing 100 mM KCl and 50 μ M EDTA. In the spectrofluorometry method, the excitation and emission maximum were determined to be 490 nm and 530 nm, respectively. The effect of time and other metal ions on fluorescence intensity was investigated and the method was optimized. Zn²⁺ was magnetically separated from the saliva samples as Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn (Zinpyr-1) nanocomposite.

Results: It was determined that the synthesized red-brown Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpyr-1) nanocomposite exhibits both magnetic and fluorescence properties. Zn²⁺ loading on the nanocomposite increased the fluorescence intensity. The interaction time of Zn²⁺ and Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpyr-1) nanocomposite was determined to be 20 minutes. For both standard and artificial saliva solutions, calibration curves were plotted in a concentration range of 20 to 160 ng/mL. Validity tests of the developed method were performed. In the analysis of standard and artificial saliva solutions, LOD and LOQ values were determined to be 5.04 and 5.89 ng/mL and 15.3 and 17.8 ng/mL, respectively. No interference effect from other metal ions in the saliva was observed. The Zn²⁺ analysis was performed on six oral precancer patients, six oral cancer patients, and six healthy volunteers.

Conclusion: The Kruskal-Wallis one-way statistical analysis method was used to compare the three independent groups, each including six individuals. According to the results obtained, a statistically significant decrease in salivary Zn²⁺ concentration was detected, from the healthy group towards the oral precancer and oral cancer groups, respectively ($p=0.0005$). It was concluded that Zn²⁺ concentration can be used as a biomarker in the diagnosis of oral precancer and oral cancer.

Keywords: Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanocomposite, Oral cancer and oral precancer, Spectrofluorometry, Saliva, Zn²⁺.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

8-AQ	: 8-aminokuinolin
AAS	: Atomik absorpsiyon spektroskopisi
APTES	: 3-aminopropiltrietoksilan
ATR	: Attenuated total reflectance
CAAQ	: 8-kloroasetil aminokuinolin
DAYTAM	: Doğu anadolu yüksek teknoloji uygulama ve araştırma merkezi
DCC	: N, N'- disikloheksilkarbodiimid
DIEA	: N,N-diizopropiletilamin
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DOX	: Doksorubisin
DPA	: Di-(2-pikolil) amin
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
DTH	: 3,5-di-tert-butyl-2-hidroksi benzaldehit
EDC	: 1-ethyl-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDTA	: 2,2',2'',2'''- (Etan-1,2-diyl dinitrilo) tetra asetik asit
FDA	: Food and drug administration
FFIC	: Adamantan modifiyeli floresan / siklodekstrin ile modifiye edilmiş Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ inklüzyon kompleksi
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi (Fourier transform infrared)
HBTU	: N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uranyum hekzafluorofosfat
HEPES	: 4- (2-hidroksietil) -1-piperazin etansülfonik asit
HMQP	: 2- (hidroksimetil) -4-metil-6 - ((kinolinil-8-imino) metil) fenol

HOBt	: 1-Hidroksi benzotriazol
HPLC/MS	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi kütle spektrofotometre (High performance liquid chromatography mass spectrometry)
HPV	: Human papilloma virüs
ICH	: The international conference on harmonization
ICP-MS	: İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi (Inductively coupled plasma-mass spectrometer)
LOD	: Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ	: Tayin alt sınırı (Limit of quantification)
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme (Magnetic resonance imaging)
NHS	: N-hidroksisüksinimid
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
OE	: Oral eritroplaki
OL	: Oral lökoplaki
OLP	: Oral liken planus
OSHK	: Oral skuamöz hücreli karsinom
OSMF	: Oral submuköz fibrozis
PET	: Foto-kaynaklı elektron aktarımı (Photo-induced electron transfer)
PİPES	: Piperazin- N-N'-bis (2-etansülfonik asit)
QTEPA	: N- (kuinolin-8-il) -2- [3- (trietoksisilil) propilamino] asetamit
R6G	: Rhodamin 6G
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscope)
TEOS	: Tetraetoksisilan
THF	: Tetrahidrofuran

- XRD** : X-ışınları kırınımı (X-ray diffraction)
- Zinpir-1** : 9-(o-Karboksifenil)-2,7-dikloro-4,5-bis[bis(2-piridilmetil)-aminometil]-6-hidroksi-3-ksenton
- ZnAF-1F** : 5- [2- [bis (piridin-2-ilmetil) amino] etilamino] -2- (2,7-difloro-3-hidroksi-6-oksoksanten-9-il) benzoik asit
- ZnAF-2F** : 6- {2- [Bis (2-piridilmetil) amino] etilamino} -2 ' , 7 ' diflorofloresin



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Zinpir-1'in molekül yapısı.....	16
Şekil 2.2. Fotolüminesans ölçümü için cihazın şematik gösterimi.....	20
Şekil 3.1. Zinpir-1 bileşiğinin sentez reaksiyonu	55
Şekil 3.2. Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan özel reaktör sisteminin temsili bir fotoğrafı	56
Şekil 3.3. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ nanopartiküllerinin temsili yapısı	57
Şekil 3.4. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin temsili reaksiyonu	58
Şekil 3.5. Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -Zn(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin temsili reaksiyonu	59
Şekil 4.1. Mannik reaksiyonu	69
Şekil 4.2. Zinpir-1 bileşiği.....	70
Şekil 4.3. Zinpir-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	70
Şekil 4.4. Zinpir-1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	71
Şekil 4.5. Zinpir-1 bileşiğine ait FT-IR spektrumu	71
Şekil 4.6. Zinpir-1 bileşiğinin kütle (MS) spektrumu	72
Şekil 4.7. Kolloidal Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerine ait farklı büyütmelelerde alınmış TEM görüntüleri ve TEM görüntülerinden elde edilmiş parçacık boyutu dağılım histogramı	74
Şekil 4.8. Sentezlenen Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartikülüne ait XRD deseni	75
Şekil 4.9. Silika kaplanmış (2.0 mL TEOS ile) ve yüzeyi APTES (0.5 mL) ile fonksiyonlaştırılmış Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküllerine (Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂) ait farklı büyütmelelerde alınmış TEM görüntüleri	78

Şekil 4.10. Silika kaplanmış (3.0 mL TEOS) ve yüzeyi APTES (8.0 mL) ile fonksiyonlaştırılmış Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri	79
Şekil 4.11. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülüne ait (a) FT-IR spektrumu	80
Şekil 4.12. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin renk (A) manyetik (B) ve floresans (C) özellikleri.....	81
Şekil 4.13. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitine ait (b) FT-IR spektrumu	82
Şekil 4.14. 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3, pH 7.2) tampon çözeltisi içerisinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti (A) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompoziti (B).....	83
Şekil 4.15. Fe elementine (A) ve Zn elementine ait (B) ICP-MS kalibrasyon eğrileri ..	84
Şekil 4.16. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitine ait FT-IR spektrumu.....	86
Şekil 4.17. Zinpir-1 bileşiğinin pH değişimine bağlı protonasyon dengesi	90
Şekil 4.18. Protonlanmış ve Zn^{2+} bağlı Zinpir-1 kompleksinin kademeli değişimini gösteren kimyasal denge	91
Şekil 4.19. Zn^{2+} ve Zinpir-1 1:1 oranında karıştırıldığında floresans değişimini gösteren pH titrasyon verileri (Zn^{2+} içeren türler düz çizgilerle, Zn^{2+} içermeyenler ise kesikli çizgilerle gösterilir)	91
Şekil 4.20. 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3, pH 7.2) tampon çözeltisi içerisinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti (A) ve Zn^{2+} yüklenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti ile $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ oluşumu (B).....	94

Şekil 4.21. 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 80 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin floresans spektrumları.....	95
Şekil 4.22. 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 80 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin floresans şiddeti üzerine zamanın etkisi (λ_{uy} :490 nm ve λ_{em} :530 nm).....	96
Şekil 4.23. Zn^{2+} 'nin tayininde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti oluşumuna dayalı spektrofotometri yöntemi ile girişim etkisi araştırılan metaller.....	98
Şekil 4.24. 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 0-160 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin emisyon spektrumları.....	99
Şekil 4.25. 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinin emisyon spektrumu.....	100
Şekil 4.26. Yapay tükürük çözeltisi içerisinde 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 0-160 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin emisyon spektrumları	101
Şekil 4.27. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti kullanılarak spektrofotometri yöntemi ile belirlenen Zn^{2+} 'nin standart çözeltilerde (A) ve yapay tükürük çözeltilerinde (B) elde edilen kalibrasyon eğrileri	103
Şekil 4.28. Sağlıklı gönüllü kişilerden UM'nin tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin emisyon spektrumu.....	108

Şekil 4.29. Oral prekanserli hastalardan CÜ'nün tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ (Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon spektrumu..... 109

Şekil 4.30. Oral kanserli hastalardan ZA'nın tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ (Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon spektrumu..... 109

Şekil 4.31. Sağlıklı gönüllülerin (6) ve oral prekanserli (6) ve oral kanserli (6) hastaların $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti kullanılarak spektrofotometri yöntemi ile elde edilen tükürük Zn^{2+} derişimlerinin sütun grafikleri..... 111

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. HPLC/MS Yöntem Şartları.....	52
Tablo 3.2. Spektroflorometre Yöntem Şartları	54
Tablo 3.3. Çalışmaya Alınan Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllü Kişilerin Özellikleri.....	67
Tablo 4.1. Fe^{3+} ve Zn^{2+} İyonlarına Ait Kalibrasyon Eğrilerinin İstatistiksel Analiz Değerleri.....	84
Tablo 4.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ Nanokompozitlerinin ICP-MS Analiz Sonuçları	85
Tablo 4.3. Zinpir-1 Bileşiğinden Proton ve Zn^{2+} 'nin Ayırma Denge Sabitleri	89
Tablo 4.4. Zn^{2+} 'nin Floresans Şiddetine Çözücü Oranı ve pH Etkisi (80 ng/mL).....	93
Tablo 4.5. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Kalibrasyon Eğrilerinin İstatistiksel Analiz Değerleri	102
Tablo 4.6. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Değerleri	105
Tablo 4.7. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	105
Tablo 4.8. Yapay Tükürük İçerisine Katım Yapılan ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Geri Kazanım Değerleri.....	107

Tablo 4.9. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-}$ (Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofluorometri Yöntemi ile Belirlenen Tükürük Zn^{2+} Derişimleri.....	110
Tablo 4.10. Sağlıklı Gönüllülerden (6) ve Oral Prekanserli (6) ve Oral Kanserli (6) Hastalardan Elde Edilen Tükürük Zn^{2+} Derişimlerinin İstatistiksel Analiz Değerleri (Kruskal Wallis Test).....	112



GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada ve ülkemizde ciddi boyutlarda halk sağlığını tehdit eden, ölümcül sonuçlara yol açan, tehlikeli ve yaygın bir hastalıktır. Baş-boyun bölgesi kanserlerinden biri olan oral kanserler ağız ve boğaz bölgesini kapsayan alanda görülen kanserler olarak tanımlanır ve dünya çapında görülen baş-boyun kanserleri arasında önemli morbidite ve mortalite oranı ile ikinci sıradadır. Oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK), ağız ve orofarenksin deri ve örtücü mukozalarının dış dokusunda meydana gelen ve en sık görülen bir oral kanser türüdür. Oral kansere dönüşme riski taşıyan oral mukozanın prekanser lezyonları oral lökoplaki (OL), oral eritroplaki (OE), oral submuköz fibrozis (OSMF) ve oral liken planustur (OLP). OLP, oral mukozada sıkça rastlanılan iltihabi bir hastalıktır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi oral prekanser bir lezyonun zamanında tanınarak erken teşhisin konulması ve tedavi edilmesi oral kansere dönüşümü engelleyebilir. OSHK lezyonları klinik özellikleri yetersiz, küçük ve semptomsuz lezyonlardır ve bu lezyonlar ancak invaziv bir teknik olan ve gözlemciler arası değişkenliğin yüksek olduğu biyopsi ve histopatolojik muayene ile teşhis edilebilmektedir. Bu yüzden oral kanserler, bu lezyonların geç fark edilmesi ve tanının zor konulmasından dolayı hastalığın ileri evrelerinde teşhis edilebilmektedir. Günümüzde, teknolojik gelişmeler sayesinde biyolojik sıvılarından yeni biyobelirteçler tanınabilir ve hastalık ve sağlık değişiklikleri izlenebilir. Oral kanserlerin tanısında da kullanılabilecek gerçek klinik değeri olan yeni biyobelirteçlere ihtiyacın olduğu aşıkardır ve bundan dolayı oral kanser araştırmalarında yeni biyobelirteç keşfine yönelik çalışmalara ilgi artmaktadır.

Bioelementler, yaşam maddelerinin elementel işlevsel birimleridir ve vücuttaki birçok süreçte önemli görevleri vardır. Bioelementolojik yaklaşımın geliştirilmesi ile hastalıkların teşhis ve tedavilerinin tanımlanması sonucu insanların sağlık durumları

belirlenebilir. Çinko, organizmaların yaşamsal fonksiyonları için gerekli bir biyoelement olup bu önemli özelliklerini oldukça dar bir derişim aralığında göstermektedir. Çinkonun düşük veya yüksek derişimlerinde spesifik biyokimyasal değışikliklere bağı olarak büyüme/gelişme geriliğı, nöropsikiyatrik, kardiyovasküler ve ağız sağılığını etkileyen çeşitli hastalıklar, hatta kanser vakaları görölmektedir. Bu nedenle biyolojik örneklerde çinko analizi, belirtilen hastalıkların gelişimi, etiolojisi ve tanısında önemli yardımcı bir faktör olabilir. Plazma, tam kan, serum, idrar, saç ve tükürük çinko düzeylerinin yeterli hassasiyete sahip bir analitik yöntem ile tayin edilmesi çinkonun organizmadaki durumu hakkında bilgi verir. Sistemik dolaşımdaki çinko dahil pek çok molekülü ihtiva etmesi yönüyle oldukça büyük bir sıvı kaynağı olan tükürüğün oral kanser ile anatomik olarak yakınlığı, girişimsel olmaması ve kan veya idrara göre düşük enfeksiyon riskine sahip olması ve en önemlisi kanserlerin gelişimi ile çinko seviyesinin değışmesi nedeniyle tükürük çinko seviyesinin oral kanserlerin erken tanısı için oldukça önemli bir biyobelirteç olabileceğı düşünölmektedir.

Nanoteknoloji, günümüzde dünyada hızla gelişen bir bilim dalı olup birçok bilimsel alanda kullanım alanı bulmaktadır. Nanoteknoloji ve bilimdeki gelişmelere bağı olarak, çevre, gıda, jeolojik ve biyolojik örneklerdeki ultra eser düzeyde bulunan elementlerin tayin edilebilmeleri ve bununla birlikte bu tekniklere uygun yeni tayin yöntemlerinin geliştirilmesi, analitik kimyadaki en son araştırma konuları arasında yer almaktadır. Son yıllarda, nanomateryallerin yüzeylerinin istenilen analitlerin analizine yönelik fonksiyonel hale getirilmesi ve biyolojik sistemlerde uygulanması dikkat çekici konular arasındadır.

Literatürde, biyolojik sıvılarda çinko analizine yönelik atomik spektroskopi temeline dayanan farklı analitik yöntemler, çeşitli organik maddeler ile kompleks oluşumuna dayalı spektrofluorometrik ve nanokompozit oluşumuna dayanan floresans

görüntüleme çalışmaları bulunmaktadır. Atomik spektroskopi temeline dayanan yöntemler güvenilir ve duyarlıdır. Fakat örnek hazırlama yönünden zaman alıcıdır, kullanımı uzmanlık gerektirir, her zaman analize hazır değildir ve oldukça pahalıdır. Mevcut spektrofotometrik ve floresans görüntüleme yöntemlerinin bazılarında çeşitli yaşam hücrelerinde floresans mikroskop resimleri alınarak görüntüleme yapılmış, bazılarında ise biyolojik matrikse uygulanamamıştır. Ayrıca bu yöntemlerin genellikle seçiciliği düşüktür. Tükürükte uygulanmasına yönelik bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Günümüzde spesifik bileşikler ile üstün ve istenen özelliklerde farklı matrikslere ve takviye elemanlarına sahip kompozitlerin geliştirilmesine olan ilgi gün geçtikçe artmakta ve analitik yöntem uygulamaları giderek daha değerli olmaktadır.

Çalışmamızda, ilk olarak tükürükte Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik Zn^{2+} iyonuna duyarlı 9-(o-Karboksifenil)-2,7-dikloro-4,5-bis[bis(2-piridilmetil)-aminometil]-6-hidroksi-3-ksepton (Zinpir-1) bileşiğinin, Fe_3O_4 ve $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanopartiküllerinin ve $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitlerinin sentezi; ikinci olarak ise Zn^{2+} 'ye duyarlı Zinpir-1 ligandı ile fonksiyonlaştırılmış manyetik ve floresans özelliğe sahip $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanokompozit oluşumuna dayalı yeni bir spektrofotometri yönteminin geliştirilmesi, valide edilmesi ve geliştirilen yöntem ile oral prekanser ve oral kanser hastalarının tükürük çinko seviyesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizması

Kanser, yeni gelişme, yeni büyüme anlamında olup kötü huylu hastalıklar grubudur. Kanser insidansı ve mortalite dünya çapında hızla artmaktadır. GLOBOCAN'ın 2018 yılındaki verilerine göre dünyada tahmini 18.1 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 17.0 milyon) ve 9.6 milyon kanser kaynaklı ölüm (melanom dışı cilt kanseri hariç 9.5 milyon) gerçekleşeceği bildirilmiştir.¹

Hücreler, büyümeyi başlatan ve büyümeyi durduran mekanizmalar tarafından denetlenerek gerektiğinde çoğalırlar. Genetik olarak kodlanmış bir olay olan programlanmış hücre ölümü; yani apoptozis, bozulduğu zaman kanseri de içeren dejeneratif, gelişimsel veya enflamatuvar hastalıklar meydana gelebilir. Kanser hemen hemen her organda görülmektedir. Kanser hücrelerinin hareket kabiliyetlerinin artması sonucunda ise bulunduğu bölgeden diğer bölgelere invazyon ve metastaz meydana gelmektedir.^{2,3}

2.2. Oral Kanserler

Baş-boyun bölgesi kanserlerinden biri olan oral kanserler, ağız ve boğaz bölgesini kapsayan (ağız boşluğu, alt ve üst dudaklar, dil, yanak ve yanak içi, alt ve üst çene alveoler mukozası, damak, gırtlak ve bademcikler) alanda görülen kanserler olarak tanımlanır.^{4,5} Dünya genelinde her yıl 419.000'den fazla oral ve farinks kanseri teşhis edilmekte olup bu kanserler 240.000'den fazla ölüme yol açmaktadır. GLOBOCAN'ın 2018 yılındaki verilerinde, dudak kanseri ve oral kanserin dünyada 354.864 (tüm kanser vakalarının %2'si) yeni kişide görüldüğü ve 177.384 (tüm ölümle sonuçlanan kanser vakalarının %1.9'u) kişinin ise bu kanserden öldüğü belirtilmiştir. GLOBOCAN'ın en son verilerine göre ise; 2012 yılında Türkiye'de 1910 yeni oral kanser vakası teşhis edildiği ve oral kanser kaynaklı 792 ölüm meydana geldiği bildirilmiştir.^{1,6} Oral kanserler

batı ülkelerinde daha nadir görülmekte olup, bu kanserin mortalite oranı ve görülme insidansı modern tıp hizmetlerine rağmen azaltılamamıştır. Erkeklerde daha çok görülen oral kanserler ileri yaş ile ilişkilidir. Ancak oral kanserin gençlerde oluşma eğilimi gün geçtikçe artmaktadır.^{7,8}

Oral kanserler, kırmızı lezyonlar, kırmızı ve beyaz varyasyonlar, sertleşmemiş şişlik veya inatçı ülserasyon, ağrı ya da disestezi, dişlerde hareketlilik, lenf nodu büyümesi, yutkunamama ve kilo kaybı gibi semptomlar şeklinde kendini gösterir. Oral kanserlerin en önemli risk faktörü sigara ve alkol tüketimidir. Buna ilaveten, human papilloma virüs (HPV), diyet, kronik aktinik, plummer-vinson sendromu, fankoni anemisi, pozitif aile öyküsü, immünsüpresyon ve human immuno deficiency virüsü de oral kanserlerin risk faktörleri arasındadır.⁹⁻¹² Erken tanıda oral kanser hastalarının 5 yıllık hayatta kalma oranı %90 olmasına rağmen birçok oral kansere ileri evrelerde tanı konulmasından dolayı hayatta kalma oranı %20 civarına geriler. Bu tüm kanser olgularında görülen en kötü prognozudur ve bu nedenle oral kanserleri önlemek için erken tanıya yönelik yapılan çalışmalar daha çok önem kazanmaktadır.¹³

Oral kanserler malignitenin türüne göre; epidermoid karsinomlar, tükürük bezi karsinomları, lenfomalar, sarkomlar, metastatik tümörler, melanomlar ve multipl miyelom olarak gruplara ayrılır. Skuamöz hücreli karsinom tipik bir epidermoid karsinomdur.¹⁴

2.2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom

OSHK; oral kaviteden köken alan kanserli tümörlerin büyük bir bölümünü oluşturur. Metastazın olup olmaması, lezyon büyüklüğü, tümörün diferansiyasyon derecesi, infiltrasyon ve lokalizasyon hastalığın prognozunu belirler. OSHK, çok katlı yassı epitelden köken alır ve oral kanserlerde en sık görülen türdür. Her 10 vakanın 9'unda OSHK'ya rastlanılabildiği ve insidansının günümüzde 40'lı yaşlara kadar indiği

bildirilmektedir. Alkol ve tütün kullanımının kadınlara oranla daha fazla olması nedeniyle erkekler daha yüksek oranda etkilenirler. Oral kanserlerin etiyolojisine göre, kanser görülme sıklığı ülkelerin gelişmişlik düzeylerinin azlığı ile ilişkilidir.

Karsinoma cuniculatum, verrüköz, iç hücreli, bazal hücreli, adenoskuamöz, papiller skuamöz hücreli, akantolitik skuamöz hücreli ve HPV pozitif orofaringeal karsinoma OSHK'nın varyantlarıdır.^{10,13,15,16}

OSHK dilin dorsal ve lateral sınırları, ağız tabanı, bukkal mukoza, gingiva, sert damak, dudak ve orofarenkste sıklıkla görülür.¹⁵ Lezyonlar kırmızı, beyaz veya kırmızı beyaz renktedir ve alanı milimeterden santimetreye kadar farklılık gösterir. Histopatolojik olarak invaziv adalar ve kordlar ile "inci" formundaki keratinize alanlar şeklinde görülür. İnvazyon; membranın bozulmasına, dokuların ekstansiyonuna ve bağ dokusu reaksiyonuna yol açar. Anjiolenfatik ve prinöral invazyon malignite işaretleridir.¹⁶

OSHK'nın epitelial markırları olan sitokeratinin tanı paternleri; keratinizasyon derecesi, kanser transformasyonda oluşan değişiklik ve metastaz ihtimaline göre farklılık gösterir. Lenfatik sisteme infiltre olan OSHK'nın metastazı çoğunlukla submandibular ve servikal lenf nodlarıdır. Potansiyel olarak oral kanser hastalığı olanlar multidisipliner olarak değerlendirilmelidir. Cerrahi ve radyoloji, oral kanser hastalığı olanlar için başlıca tedavi seçenekleri olmakla birlikte; metastaz varlığında kemoterapi de uygulanabilir.^{13,17}

2.2.2. Oral Prekanserler

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) prekanserleri/premaligni, kanser gelişme olasılığı normal özellikteki eş dokuya göre fazla olan morfolojik olarak değişmiş doku olarak tanımlamaktadır.¹⁶ OL, OSMF, OE ve OLP lezyonlar, çok yüksek kanser dönüşme hızına sahip olan en yaygın oral prekanserlerdir. Bu lezyonların yanı sıra, aktinik şelit, kseroderma pigmentozum, fanconi anemi gibi bazı muhtelif kalıtsal hastalıklar,

diskeratozis konjenita, tütün ile ilişkili lezyonlar, kronik hiperplastik kandidiazis, diskoid lupus eritematosus ve tersiyer sifiliz gibi hastalıklar ve immün yetmezlik oral karsinom için diğer potansiyel rahatsızlıklardır.¹⁸⁻²⁰

Belirtilen prekanser lezyonların etiyolojisi, birçok etiyolojik çalışmalara rağmen tam olarak bilinmemektedir. Coğrafi özelliklere göre değişebilen bazı etiyolojik faktörler olmakla birlikte, en fazla bildirilen muhtemel faktörler tütün ve alkollü içki içilmesi, güneş ışınları ve areca nut ihtiva eden betel çiğnemesidir.

Oral prekanser lezyonlarda erken tanı çok önemlidir ve hayat kurtarıcı olabilir, çünkü geç dönemlerde, ciddi displaziye ve hatta karsinom in situ ve/veya skuamöz hücreli karsinoma ilerleyebilir.¹⁹

Oral Lökoplaki (OL): Klinik ya da patolojik olarak herhangi bir hastalığa ait olmayan oral mukozadaki beyaz-gri plaklardır. Oral mukozada en sık görülen prekanser lezyondur. İleri yaşlarda ve erkeklerde daha sık görülür. OL için risk faktörlerinin sigara, alkol, tütün çiğneme, kötü ağız hijyeni olduğu söylenebilir. OL'nin kanser dönüşümüne uğramasını önleyecek bir tedavi yoktur.²¹

Oral Eritroplaki (OE): OL'lerin kırmızı renkli eşdeğeri olarak kabul edilip, OL'lerle birlikte veya tek başlarına görülebilirler. Kanserleşme olasılığı çok yüksek olan bu lezyonlar, çoğunlukla orta yaş ve üzerindeki bireylerde gelişir. Etiyolojik faktörleri sigara-tütün kullanımı ve alkol şeklinde sıralanabilir. Oldukça yüksek kanser dönüşüm potansiyeli nedeniyle OE'ler tedavi edilmelidir.^{22,23}

Oral Submuköz Fibrozis (OSMF): OSMF genellikle Hindistan'da görülen bir prekanser olduğu için prekanser lezyonlar arasında insidansı daha alt sıralarda yer almaktadır. Etiyolojik faktörlere bakılacak olursa; OSMF'nin gelişimi genellikle betel cevizi kullanımına dayalıdır.²⁴

Oral Liken Planus (OLP): Müköz membranları ve deriyi etkileyen ve mukokütanoz bir lezyon olan OLP, epitelyal bazal hücrelere hasar veren ve sık görülebilen iltihabi bir hastalıktır. Kronik olan bu hastalığa oral mukozada sıkça rastlanılmakla birlikte bu prekanser lezyon çoğunlukla 40 yaş üstü bireylerde (40-70 yaşlar arası) görülmektedir. Lezyonların çoğunluğu bilateral veya multibildir. Retiküler, eroziv, büllöz, papüler, hipertrofik ve ülseratif gibi formlar görülebilir ve klinik olarak heterojen görünümündedirler.

Kesin etiyojisi bilinmemektedir. Ancak lezyonun ortaya çıkmasını emosyonel stresin etkilediği belirtilmektedir. Hastalığın patogeneğinde genetik ve çevresel faktörler, ilaçlar ve yaşam tarzı etkili olmaktadır. Lezyonlar asemptomatiktir ve hasta yanma hissinden şikayetçi olabilir.

Retiküler ve diğer asemptomatik OLP hastaları tedavi olmadan izlenebilir. Ancak herhangi bir belirti ve/veya potansiyel kanser riski varsa, lezyonlar tedavi edilmelidir.

OLP için hem topikal hem de sistemik tedavi yöntemleri bildirilmiştir. Yüksek görülme sıklığı nedeniyle kanser değişim habercisi olarak önemli bir yere sahiptir. 10 yıl sonrasında hastaların % 1-4'ünde kanser gelişiminin olduğu tahmin edilmektedir.^{19,25-28}

2.2.3. Oral Kanserlerin Erken Teşhisinde ve Kesin Tanısında Kullanılan Yöntemler

Dış hekimleri veya kulak burun boğaz uzmanları, oral kanserleri ilk olarak; hasta hikayesini ve görsel (inspeksiyon), ekstraoral ve intraoral lezyon muayenesini göz önünde bulundurarak teşhis ederler. Toluidin mavisi, oral fırça biyopsisi (OralCDx), ışık tabanlı teşhis sistemleri, kemilüminesans (ViziLite Plus; Microlux / DL, Orascoptic-DK),

doku floresans görüntü (VELscope), doku floresans spektroskopisi, DNA analizi, lazer yakalama mikrodiseksiyonu ve tükürük biyobelirteçleri diğer teşhis yöntemleridir.

Şüpheli lezyonların kesin tanısında; biyopsi ve histopatolojik olarak değerlendirmek erken dönem kanser teşhisinde çok önemli olmakla birlikte invaziv bir tekniktir ve kitle taraması yapmak mümkün değildir. Gerekli olan durumlarda dental panoramik tomografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi bazı yardımcı görüntüleme yöntemleri kullanılmalıdır.

Günümüzde oral kanserlerin erken teşhisinde kan biyobelirteçleri olarak; serum carcinoembryonic antijen, skuamöz hücre karsinomu bağlantılı antijen, apoptosis inhibitörü, cytokeratin fragments, Annexin A1 ve metal iyonlarının kullanılabileceği, tükürük biyobelirteçleri olarak ise; inorganik bileşikler, peptit veya proteinler, DNA, mRNA veya microRNA, metabolomiks ile belirlenen metabolitlerin kullanılabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur.²⁹⁻³³

2.3. Çinko

Çinko on üç biyoelementten biridir ve canlı organizmada oldukça az miktarlarda bulunduğu için "eser element" olarak adlandırılır. İnsanlarda en fazla bulunan ikinci eser element olan çinko, erime noktası düşük, kırılgan, açık gri renkte ve periyodik tablonun II B grubunda bulunan bir metaldir. Çinko biyolojik sistemlerde oksidasyon veya redüksiyona uğramadığı gibi yalnızca 2+ değerlikli olarak bulunur.³⁴ Tüm organlarda, dokularda ve vücut sıvılarında bulunan çinko; iskelet kasında ve kemikte ~ %85, deri ve karaciğerde ~ %11 ve diğer dokularda ~ % 2-3 oranında bulunur. Esansiyel biyoelementlerden biri olan çinko birçok metabolik olayda yer alır. Bunlar: **Gen ekspresyonu**; gen ekspresyonlarının kontrolünü çinko parmak proteinleri (zinc-finger) gerçekleştirir. **DNA ve RNA sentezi**; DNA sentezinde çinko, hücre siklusunun G1 II. fazında gereklidir. RNA içindeki ribonükleozidlerin polimerizasyon reaksiyonunun

katalizinde intrinsek çinko görev alır. **Enzimatik kataliz;** çinko varlığında aktive olan birçok enzim sistemi vardır. **Hormonların depolanması ve salınımı;** çinko, büyüme hormonunun yapılması olayında gereklidir. Çinko eksikliği, dolaylı yoldan büyüme ve gelişmede rol alan testosteron, tiroid hormonları, insülin ve D vitamininin sentezinde etkindir ve bu nedenle üreme organları ve gelişmedeki gerilik çinko eksikliğinden kaynaklanan belirtilerdir.^{34,35} **Nörotransmisyon, hafıza (davranış ve öğrenme performansı), görme;** maternal çinko eksikliğinde, filamentöz bir protein olan nestin düzeyinin azalması sonucunda nöroanatomik ve davranışsal anomaliler meydana gelmektedir.³⁶ Mental fonksiyonlarda ve öğrenme yeteneğinde görülen azalmanın diyetle alınan çinkonun yetersizliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir.³⁷ **Üreme;** erkeklerdeki spermatogenesis ile seks karakterlerinin gelişimi ve dişilerdeki tüm üreme süreci çinko eksikliğinde olumsuz olarak etkilenmektedir.^{38,39} **Yara iyileşmesi;** çinkonun kollajen metabolizması ile ilgili bazı basamaklarda önemli rolü olduğu bilinmektedir. **Hücre sel bağışıklık ve immün İşlev;** hücre aracılı immün sistemdeki normal fonksiyonlar timulin hormonu varlığında gerçekleşir ve bu hormonun aktivitesi için çinko gereklidir.⁴⁰ **Koku ve tad alma;** çinko tuzlu tadın fark edilmesini sağlar.

Çinko eksikliğinde, kanser, büyüme-gelişme geriliği (cücelik), hipogonadizm, hepatosplenomegali, kardiyovasküler hastalıklar, parakeratoz, alopesi, konjenital anomaliler, intrauterin büyüme geriliği, yara iyileşmesinde gecikme, koku-tat duyusunda bozukluk, enfeksiyonlara karşı duyarlılık, nörofizyolojik performansta bozulma gibi klinik bulgular ortaya çıkar.³⁵ Çinko eksikliği, gelişme çağındaki çocuklarda ve gebelik ve laktasyon dönemindeki annelerde oldukça önemlidir. Çinko eksikliğinde bebekte gelişme geriliği, gebelik zehirlenmesi, yapısal bozukluklar, erken veya geç doğum ve doğum sonrası bebekte görülen azalmış bağışıklık gibi sorunlar ortaya çıkabilir.⁴¹ 1-10 yaş arası çocuklarda 10 mg, yetişkin erkeklerde 15 mg, kadınlarda 12 mg ve infantlar için

3-5 mg günlük çinko alımı önerilmektedir. Bağırsak mukozasında metallothionein çinkoyu bağlayarak aşırı çinko emilimini engellemektedir.⁴²

2.4. Tükürük

Tükürük sublingual (~%5), parotis ve submandibuler (~%90) gibi büyük tükürük bezleri ve ağız mukozasında bulunan minör tükürük bezlerinden (~%5) salgılanan kompleks bir sekresyondur. Tükürüğün yaklaşık %1'lik kısmını birtakım organik ve inorganik komponentlerin yanı sıra lökosit ve lenfosit gibi kan hücreleri, deskuame epitelyum hücreleri, mikroorganizmalar ve besin artıkları oluştururken, yaklaşık %99'luk kısmı sudur. Günlük yaklaşık 1-1.5 L tükürük salgılanır.⁴³ Farinks, burun boşluğu ve ağız mukozasından gelen sıvılar, tükürüğe eklenerek ağız içi sıvısını oluşturur. pH'sı 6.7-7.4 olan tükürük; renksiz, transparan, tatsız ve hipotonik bir sıvıdır.⁴⁴

Tkrğ oluşturan organik maddeler; lipid, amino asit, üre, ürik asit, glikoz, amonyak, kolesterol ve proteinler olup en önemlileri pityalin (amilaz), maltaz, üre ve ürik asittir. Sodyum, potasyum, kalsiyum, klor, tampon özellikteki sülfatlar ve bikarbonatların yanı sıra tiyosiyonat, demir, iyot, magnezyum, kobalt, molibden, flor, brom, krom, kurşun, kalay ve çinko tükürükte bulunan inorganik maddelerdir. Hastalıklar, ilaçlar, beslenme, hormonlar, yaş, tükürüğün akış hızı ve uyarımı gibi faktörler tükürük içeriğini etkiler.⁴⁵

Tükürüğün; lubrikasyon, dişlerin çürükten korunması, antimikrobiyal etki, ağız mukozasının bütünlüğünün korunması, fonasyonun kolaylaştırılması, çiğneme ve yutmanın sağlanması, nötralizasyon ve tamponlama, tat alma ve yara iyileşmesine yardımcı olma, dilüsyon ve temizleme, remineralizasyon, beslenme ve konuşma gibi birçok önemli görevi vardır.⁴³

2.5. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, 1-100 nanometre boyutlarda işleme, ölçüm, tasarım ve düzenleme gibi birçok çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, maddeye atom ve molekül seviyesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak yeni özellikler kazandırmayı amaçlayan, yeni ve hızla gelişen bir bilim dalı ve teknoloji alanıdır. Nanoteknoloji, fizikçi Richard Feynman tarafından ilk olarak 1959 yılında ortaya çıkarılmış ve küçük boyutlarda birtakım cihazlar ve malzemeler üretilmiştir.⁴⁶

Nanometre boyutundaki yapıların imalatı, analizi ve fiziksel özelliklerinin anlaşılması, nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi, farklı ve üstün kimyasal, mekanik ve elektrik gibi özelliklerde materyal ve sistemler geliştirilerek daha dayanıklı, hafif ve hızlı yapıların daha az enerji ve malzeme ile elde edilmesi nanoteknolojinin günümüzdeki amaçları arasındadır.⁴⁷

2.5.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller; nanotüpler, nanokristaller, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler nanoboyutlu olarak tanımlanan farklı sınıflarda yapılardır. Nanopartiküller 100 nm ve altında boyutları olan tozlar olarak tanımlanır.⁴⁸ Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, prizma, küp, iğne, küre ve çubuk gibi farklı morfolojilere sahip yapılardır. Oluştukları makromoleküller sentetik veya doğal kaynaklıdır.⁴⁹ Kuantum boyut etkileri, yüksek yüzey/hacim oranı, elektronik yapısının boyut bağımlılığı ve yüzey atomlarının benzersiz karakterleri günümüzde nanopartikülleri cazip hale getirmektedir.⁴⁸

Bu özelliklerden yararlanılarak yüksek aktiviteli katalizörler, yüzey aktif maddeler, süperiletkenler, ilaç taşıyıcılar, aşınmaya karşı katkılar ve özel teşhis aletleri gibi çok sayıda ürün elde edilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin bu üstün özellikleri, sensörler, nanomakineler, yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri ve nanotaşıyıcılar

gibi minyatürleştirilmiş aygıtların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Günümüzde istenilen özelliklerdeki nanopartiküller sandviç, çekirdek-kabuk ve katkılı gibi birçok farklı morfolojide hazırlanabilir.⁴⁸

Nano materyaller; nano-kompozitler (killer, silika jel, aktif alumina), karbon bazlı nano-materyaller (karbon nanotüp, fulleren) ve metal bazlı nano-materyaller (nano-gümüş, nano-altın, TiO₂, metal oksitler) olarak sınıflandırılmaktadır.⁵⁰

2.5.1.1. Nanopartikül Sentezi

Nanopartiküllerin sentezi biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere üç ayrı yöntem ile gerçekleştirilebilir. Günümüzde nanopartiküllerin sentezinde birlikte çöktürme, hidrotermal sentez, mikroemulsiyon, sanokimyasal sentez, elektrokimyasal biriktirme ve termal bozulma (parçalanma) kimyasal yöntemleri kullanılmakta olup en fazla termal parçalanma yöntemi tercih edilmektedir.⁵¹

Termal Parçalanma Yöntemi: Yüksek kaynama noktalı organik çözücülerin kullanıldığı organik bazlı bu yöntemde, demir-oleat kompleksleri oleik asit varlığında kaynatılır. Kompleksin termal olarak parçalandığı anda açığa çıkan demir oksijen varlığında manyetite dönüşür. Oluşan manyetitin çok fazla büyümemesinin sebebi ortamdaki surfektandır.⁵² Yüksek sıcaklıkta gerçekleşen bu parçalanma ve oksidasyon sonucunda elde edilen demir oksit nanopartiküller büyük oranda eş boyutludur.⁵⁰ Sıcaklık ve kaynama süresi 5-22 nm aralığında değişen partikül boyutunu belirler. Elde edilen demir oksit nanokristaller hekzan ve kloroform gibi organik çözücülerde iyi bir şekilde dispers olurlar.⁵²

2.5.2. Manyetik Nanopartiküller

Geniş bir kullanım alanı olan manyetik nanopartiküller nano boyuttan mikron boyutuna kadar elde edilebilir. Manyetik alanın uygulanması manyetik nanopartiküllerin istenilen yönde hareket ettirilebilmelerini sağlar ve bu da pek çok uygulamada avantaj

sağlamaktadır. İlaç sektörü, biyoteknoloji ve manyetik kayıt cihazları manyetik nanopartiküllerin uygulama alanları olarak belirtilebilir. Biyoteknolojide; proteinleri veya diğer biyomolekülleri yakalamak amacıyla manyetik ayırma yöntemi kullanılır. Bu işlemde, parçacıkların manyetik alanın etkisiyle anında mıknatıslanması ve manyetik alan kaldırıldığı anda hemen dispers olabilmesinin nedeni kullanılan parçacıkların süperparamanyetik özellikte olmasıdır. İlaç sektöründe ise ilaç taşıyıcısı olarak kullanılırlar.

Demir oksitler, toz metalleri, Fe ve Co, spinel yapıda ferrimagnetler, $MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ ve $CoFe_2O_4$ şeklinde farklı kompozisyonlarda oluşturulan manyetik nanopartiküller vardır.⁵² Metal oksit nanopartiküllerin toksik özellikleri araştırılmış ve demir oksitler dışında diğer nanopartiküllerin toksik etkilere sahip olup DNA hasarına neden oldukları belirlenmiştir.⁵³ Demir oksit en çok kullanılan manyetik özellikte bir nanopartiküldür.

2.5.2.1. Demir Oksit Manyetik Nanopartikülleri

Demir oksitler; 40 yıla yakın bir süredir *in vitro* tanı çalışmaları için kullanılan nano boyuttaki partiküllerdir.⁵² Fe_xO (vustit), Fe_3O_4 (manyetit), γ - Fe_2O_3 (maghemit) ve α - Fe_2O_3 (hematit) farklı manyetik özellikler gösteren demir oksitlerdir. En çok kullanılan demir oksitler ise Fe_3O_4 ve γ - Fe_2O_3 'dür. Aynı fiziksel özelliklere sahip olmakla birlikte manyetitin mıknatıslık özelliği maghemite göre daha yüksektir.⁵¹

Keşfedilen ilk manyetik özelliğe sahip yapı olan manyetitteki Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının molar oranı 2:1'dir.^{51,52} Manyetit oda sıcaklığında Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasında gerçekleşen elektron geçiş özelliğinden dolayı yarı metalik olarak adlandırılır.⁵² Çekirdek-kabuk yapısındaki nano taneciklerin, özgül yüzey alanının yüksek olması ve aşırı ince boyuta sahip olmasına bağlı olarak Fe^0 çekirdeği kolayca oksitlenir. Nanopartiküllerin, tanecik büyüklüğünün oksitlenme üzerindeki etkisinden dolayı,⁵³

çeşitli polimer ya da organik malzemelerle modifikasyonu ile oksitlenme önlenmiştir. Monomerik stabilizatörler (karboksilat, fosfat, sülfat), inorganik malzemeler (silika) ve polimerler (dekstran, polietilen glikol, kitosan) gibi fonksiyonel gruplar nanopartiküllere modifiye edilmektedirler.

2.5.2.2. Demir Oksit Manyetik Nanopartiküllerinin Silika ile Kaplanması

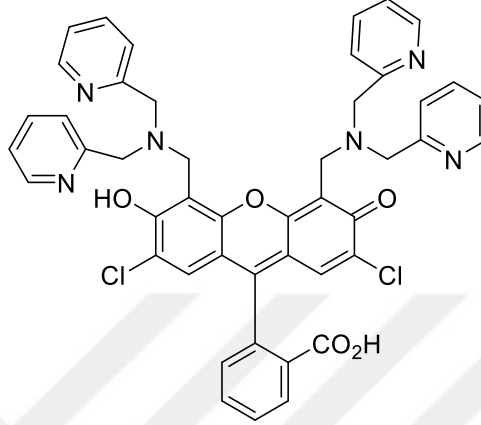
Silika, partikül kararlılığını arttırmasının yanı sıra partikül içi etkileşimlerin ve kümeleşmenin önüne geçmesi yönüyle de demir oksit manyetik nanopartiküllerinin kaplanmasında en fazla kullanılan reaktiftir. Biyolojik olarak uyumlu olan silika hidrofilik özellik gösterir. Boyutu kontrol edilebilen silika kaplanmış partiküller ligandlara kolayca bağlanabilir. Silika kaplamada; demir oksit nanopartiküllerinin hidroksil grupları ile silikada bulunan metoksi gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan Si-O bağı farklı moleküllerle modifikasyona olanak verir.^{50,51} Etanol içerisinde tetraetoksisilan'ın (TEOS) hidroliz ve polikondenzasyonu ile gerçekleşen Stöber yöntemi en çok kullanılan kaplama yöntemlerindendir. Bu yöntemle elde edilen parçacıklar elektrostatik olarak stabilize edilen, küresel ve monodispers özelliktedir.⁵⁴

2.5.2.3. Demir Oksit Manyetik Nanopartiküllerinin Yüzey Modifikasyonu

Demir oksit nanopartiküllerinin yüzeyine modifiye edilen yüzey aktif maddeler amfifilik özellikte olup yağda ve suda dağılabilen yapıların elde edilmesine olanak sağlar. Biyolojik uyumluluğu olup yüzeye fonksiyonel grupların bağlanmasını sağlayan silan, yüzey modifikasyonunda oldukça sık kullanılır. Ayrıca yüzeye modifiye edilen fonksiyonel gruplar biyomoleküller, metaller ve polimerler ile kolay bir şekilde etkileşimi sağlar. 3-aminopropiltrietoksilan (APTES) ve paminofenil trimetoksi silan gibi reaktifler ise amino ve kükürt gruplarının yüzeye bağlanmasını sağlar.⁵⁵

2.6. Zinpir-1 Bileşiğı

Zinpir-1, 9-(o-Karboksifenil)-2,7-dikloro-4,5-bis[bis(2-piridilmetil)-aminometil]-6-hidroksi-3-ksenton yapısında olup 823.72 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kapalı formülü ise C₄₆H₃₆Cl₂N₆O₅ şeklindedir (şekil 2.1).



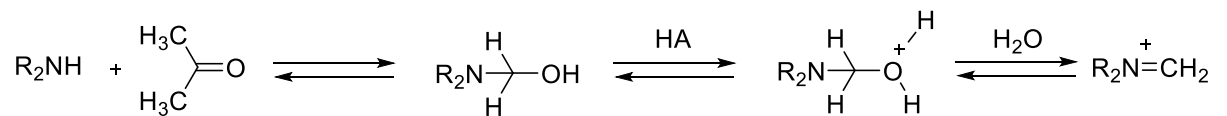
Şekil 2.1. Zinpir-1'in molekül yapısı

Zinpir-1, Zn²⁺ için yeni bir hücre tipi floresans sensördür. Bu ksenton bazlı kromofor, bire yakın bir kuantum verimine ($\Phi = 0.95$) ve 480 nm'yi aşan uyarma ve emisyon dalga boylarına sahiptir.⁵⁶ Zinpir-1 bileşiğı di-(2-pikolil) amin (DPA) ve 2',7'-diklorofluoresein (DCF) bileşiklerinin Mannik kondenzasyon tepkimesi ile sentezlenebilmektedir.

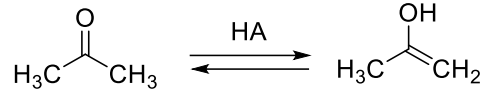
2.6.1. Mannik Reaksiyonunun Mekanizması

Mannik reaksiyonu, reaktifler ve uygulanan şartlara göre farklı mekanizmalar üzerinden oluşur. Nötr veya asidik ortamda meydana gelen tepkime mekanizması 3 basamaktan oluşur.⁵⁷

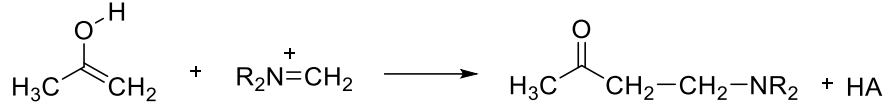
1. *Basamak*: İkincil aminin aldehitlerle reaksiyonundan yarı aminal oluşur. Yarı aminalin bir su molekülü kaybetmesiyle iminyum katyonu oluşur.



2. Basamak: Asetonun enolizasyonu



3. Basamak: Aktif hidrojen bileşiğinin enol şekli iminyum katyonuyla tepkimeye girerek bir β -amino karbonil bileşiği (Mannik Bazı) oluşturur.



2.7. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

2.7.1. Lüminesans, Floresans ve Fosforesans

Spektroskopi, ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalıdır. Işın uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji şeklidir. Atom, molekül veya iyonlar belirli enerji düzeylerinde bulunurlar. Bu şartlarda, ışının enerjisi ilgili atom, molekül veya iyonla aktarılır ve onu uyarılmış hal adı verilen daha yüksek enerjili hale geçirir. Bir atom veya iyon elektronunun uyarılmış, yani yüksek enerji seviyesinden daha düşük bir enerji seviyesine geçerken ısı oluşturmada yaydığı ışıma "lüminesans" denir. Atom ya da molekülün fotonları absorplaması ile gerçekleşen uyarılma sonucu gözlenen ışık emisyonuna "fotolüminesans" denir. Fotouyarılmış türlerde uyarılmış halden temel hale geçiş sırasında uyarılmış elektronun spini değişmiyorsa gerçekleşen fotolüminesans "floresans", spinde bir değişim gerçekleşiyorsa "fosforesans" olarak adlandırılır. Floresans emisyonu türler uyarılmış hale eriştikten sonra çok çabuk ($10^{-9} - 10^{-6}$ s) meydana gelirken fosforesans emisyonu çok daha yavaştır ($>10^{-4}$ s).

Verilen bir emisyon spektrumu, bir miktar enerjinin iç dönüşümlerde ya da ışımasız dönüşümlerle harcanması sebebiyle her zaman absorpsiyon spektrumlarından daha uzun dalga boyu veya daha düşük frekans bölgesinde meydana gelir. Emisyonunun absorpsiyona göre daha büyük dalga boylarına doğru kaymasına "Stokes Shift" denir.

2.7.2. Floresans Şiddetine Etki Eden Faktörler

Yayılan foton sayısının, absorblanan foton sayısına oranı o molekülün “fotoluminesans kuantum verimi (ϕ)” olarak tanımlanır. Floresans şiddeti, kuantum verimi ile değerlendirilir. Gelen ışının şiddetinin artması floresansı arttırdığı için emisyon dalga boyu her zaman uyarma dalga boyundan büyüktür. Lüminesans verimi, sistemler arası geçiş, iç dönüşüm, enerji aktarımı, bağ kopması ve ürün oluşması gibi olaylar nedeniyle azalabilir. Uyarılmış singlet molekülü ile temel haldeki molekülün enerjisi arasındaki fark ne kadar fazla ise, iç dönüşüm olasılığı o ölçüde azalır, uyarılmış triplet hallerinin enerjileri ne kadar farklı ise sistemler arası geçiş olasılığı o kadar azalır ve dolayısıyla floresans verimi artar.

2.7.2.1. Floresans Şiddetine Madde Yapısının Etkisi

Halkalı organik bir moleküldeki kuantum verimi, sübstituentlerin halkanın elektron yoğunluğunu arttırması ile artar. Molekülün bünyesinde ya da çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom molekülün floresans verimini azaltırken, fosforesansı arttırır. Moleküllerde rijiditenin ve halka sayısının artması, konjugasyon ve düzlemsellik genellikle floresans verimini arttırır.

2.7.2.2. Floresans Şiddetine Çözücü, Sıcaklık ve pH Etkisi

π ve π^* türü bir uyarılma ve emisyon olayında; uyarılmış molekülün, temel hale göre daha polar olduğu durumda, çözücünün polaritesinin artması ile temel ve uyarılmış enerji seviyeleri arasındaki enerji farkı azalır ve floresans dalga boyu artar. $n \rightarrow \pi^*$ türü bir uyarılma için ise durum tam tersidir ve çözücünün polaritesinin artması ile floresans dalga boyu azalır. Sıcaklık artışı uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığını arttıracığı için iç dönüşüm olasılığı artar ve floresans verimi azalır. Ortamın pH’sındaki değişimler, temel ve uyarılmış haldeki molekülleri etkiler. Örneğin asit veya baz grubu ihtiva eden

maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin floresans şiddetleri ve dalga boyları birbirinden farklıdır.

2.7.2.3. Floresans Şiddetine Çözünmüş Oksijen ve Derişimin Etkisi

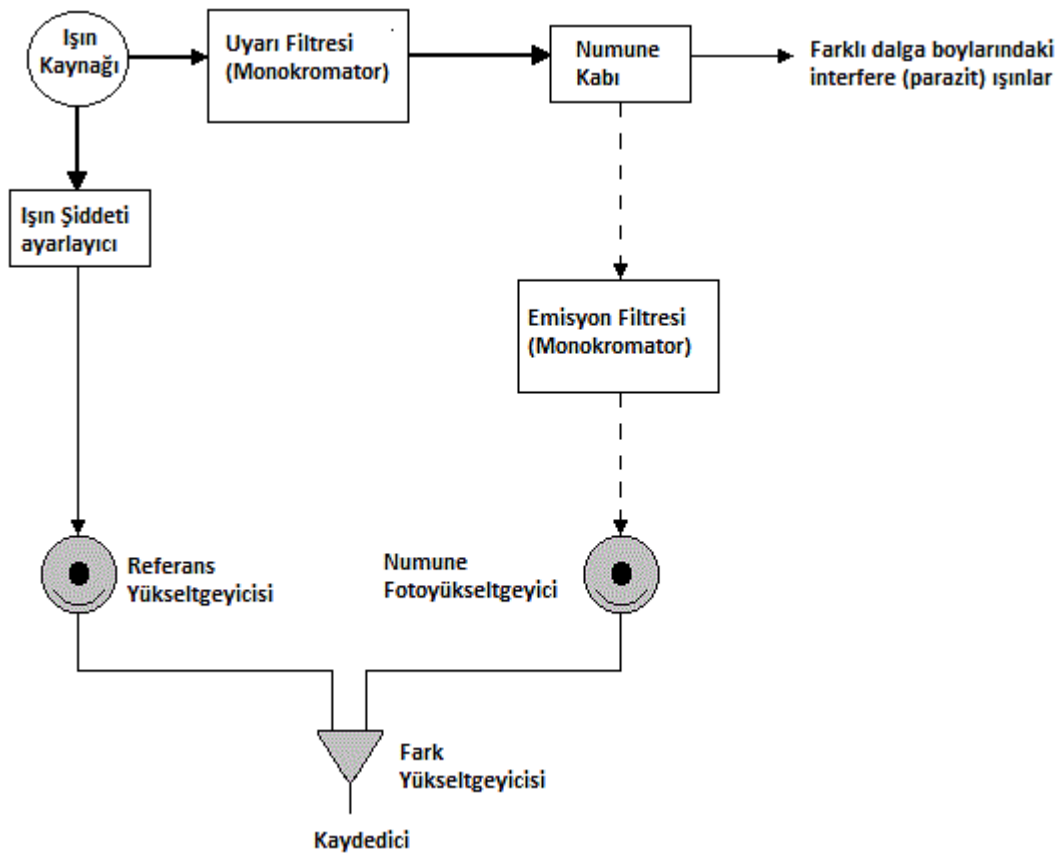
Çözücü ile hidrojen bağı yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışını absorplayabilecek bir başka madde, lüminesans verimini azaltır. Çözünmüş oksijen genellikle floresans şiddetini azaltır. Floresans şiddeti, maddenin derişimi ile orantılıdır. Fakat derişim çok fazla arttığı zaman floresans artışı derişimle orantılı olmaz ve hemen hemen sabit kalır.

2.7.3. Spektroflorometre Cihazı

Şekil 2.2’de çift ışın yollu bir spektroflorometre cihazı gösterilmektedir. Spektroflorometre cihazında lazerler, foto-diodlar, ksenon ark ve civa ark lambaları ışın kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kaynaktan gelen ışın ilk önce bir uyarılma filtresi ya da bir monokromatörden geçer. Monokromatörler paralel olarak gelen ışının, farklı açılarda ayarlanabilen bir kırınım ağı içerisinde sadece numuneyi uyarmada kullanılacak dalga boyundaki ışınlar şeklinde çıkmasını sağlarlar. Numune kabı olarak silindirik ve dikdörtgen prizması şeklindeki cam veya silisden yapılmış küvetler kullanılır. Floresans en iyi şekilde uyarma ışınına dik açıdan gözlenir; çünkü diğer açılarda hücre duvarları ve çözeltiden kaynaklanan saçılmalar oluşur ve bu da şiddet ölçümünde büyük hatalara neden olabilir. Yayılan ışın, floresansı ayıran ikinci bir monokromatör veya filtreden geçerek bir dedektöre ulaşır. Dedektörler, ışın enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren sistemlerdir. Floresans şiddetleri genellikle zayıftır. Bunların yüksek doğrulukta ölçülmesi için şiddetlendirilmesi gerekir. Bu amaç ile fotomultipliye tüpler dedektör olarak kullanılır. Ayrıca ışın kaynağından çıkan ve monokromatöre giden ışın demetine dik yönde bir referans ışın demeti ışın şiddeti ayarlayıcısına gelir ve ışının şiddeti yaklaşık

olarak floresans ışının şiddetine eşit olacak şekilde ayarlanır ve bu ışın detektöre gelir. Fark yükseltgeyici iki enerjinin farkını alır ve yükselterek kaydediciye gönderir.

Floresans ölçümlerinde, eksitasyon ışını belli bir dalga boyunda sabit tutulur ve emisyon monokromatörü spektrum taraması yapar. Eksitasyon dalga boyu ölçülürken ise, eksitasyon monokromatörü spektrum taraması yaparken, emisyon dalga boyu sabit tutulur. Floresans şiddeti absorpsiyon ile orantılı olduğundan, eksitasyon spektrumu, absorpsiyon spektrumu ile aynıdır.⁵⁸⁻⁶⁰



Şekil 2.2. Fotolüminesans ölçümü için cihazın şematik gösterimi

2.8. X-Işınları Kırınımı (XRD) Spektroskopisi

XRD, kristallerin atom düzlemleri arasındaki mesafe ve bu atomların geometrik düzeni ile ilgili bilginin elde edildiği ve kristal yapı tayininde sıkça kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem kristal bileşiklerin kalitatif tayini için uygun bir yöntemdir. XRD'nin çalışma prensibine göre; x-ışınları, bir kristal düzlemi üzerine gönderilmesi

sonucu kristalin atom düzlemlerine çarparak yansır ve bu olaya x-ışını kırınımı denir. Kırınım olayı, kristal yüzeyinin altındaki atom düzlemlerine x-ışınlarının ulaşması ile gerçekleşir.

X-ışını demeti bir kristal üzerine gönderildiği zaman kristalin atomlarından bütün yönlerde doğru olan saçılma esnasında yapıcı ve yıkıcı girişimler meydana gelir. Yapıcı girişim sadece Bragg denklemini sağlayan geliş açılarında oluşur.

$$n\lambda = 2 d \sin\theta \text{ (Bragg Denklemi)}$$

Burada gelen ve yansıyan ışınlarla düzlem arasındaki açı θ , düzlemler arası uzaklık d , yansıma mertebesi n ve gelen ışının dalgaboyu λ ile gösterilir.

Düzensiz yapıda (amorf) bir kristal düzlemine gelen x-ışını demeti herhangi bir açıyla çarparsa, kırınım gerçekleşmez. Kristal düzlemlerinden yansıyan x-ışınları arasındaki faz farkından dolayı ışınlar birbirlerini söndürür ve herhangi bir difraksiyon piki gözlenmez. XRD çalışmalarında, dalga boyu sabit olan X-ışınlarını elde etmek için kaynak olarak X-ışını tüpleri kullanılır.⁶¹

2.9. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometresi

Belirli dalga boyunda bir ışın moleküller üzerine düşürüldüğü zaman molekülün elektronik, dönme veya titreşim özelliklerinde değişimler meydana gelir. Titreşim ve dönme geçişlerinin elektronik geçişlere kıyasla daha düşük enerjili olmasından dolayı bu geçişlere neden olan ışınlar IR ışınlarıdır. İnfrared spektroskopisi titreşim ve dönme seviyelerindeki değişimleri inceler. IR spektrofotometreleri $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı veya $2.5\text{-}25\text{ }\mu\text{m}$ dalga boyu aralığındaki titreşim frekanslarını kaydeder. $700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında elde edilen spektrum parmak izi bölgesini oluşturur ve bu bölgede gözlenen titreşimler molekülün kendine has titreşimlerdir. Moleküldeki gruplara ait titreşimler ise $1200\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenir. IR ışını yakın IR ($12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), orta IR ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) ve uzak IR ($400\text{-}40\text{ cm}^{-1}$) bölgesi olmak üzere üçe ayrılır. Yapı analizi için

genellikle orta IR bölgesi kullanılır. Madde IR ışınını absorpladıkça gerilme ve eğilme titreşmesi olmak üzere iki tür moleküler titreşim gözlenir. İnfrared absorpsiyon spektroskopisi, çok yönlü olup yapısal analizde kullanılan hızlı ve ekonomik bir yöntemdir. Kristal yapı çalışmalarında, saflığı kontrol etmede ve iki madde arasındaki ilişkiyi belirlemede sıklıkla kullanılır. IR spektrumları her madde için karakteristiktir. IR'nin kullanım alanları; yapı tayini, kalitatif analiz, hidrojen bağının bulunması, atomlar arası bağ uzunluk ve açılarının belirlenmesi ve saflık kontrolü şeklinde sıralanabilir.⁶²

2.10. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu, malzemelerin mikro-yapısal incelenmesini kırınım ve görüntüleme tekniklerinin birlikte kullanılmasını ve aynı zamanda maddenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine ulaşılmasını sağlayan bir tekniktir. Yüksek ayırma gücüne sahip olan bu tekniğin üç boyutlu bir numuneden alınıp kırınım kökenli olan iki boyutlu görüntülerin yorumlama güçlüğü, ışın hasarı etkisinin numune özelliklerini değiştirmesi ve incelenecek numunenin katı malzeme olma ve elektron geçirgenliği olup 3mm çapında, 100 mm'den daha ince bir disk olarak hazırlanması gibi zorlukları bulunmaktadır.

TEM'de görüntü ve kırınım bilgisini elde etmenin temel prensibi, ortasında çok küçük bir delik bulunan numuneye paralel bir elektron demeti göndermek ve numuneden doğrudan geçen kırınım uğramamış ışınları ve numunenin belirli düzlemlerinden Bragg şartlarına uygun açılarda kırınım uğramış ışınları numunenin altında toplamak esasına dayanır.⁶³

2.11. ICP-MS (İndüktif olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi)

Birçok elementin katı ve sıvı örneklerinin kalitatif, kantitatif ya da yarı-kantitatif olarak ölçülmesine olanak sağlayan ICP-MS, örneklerin yüksek sıcaklıktaki bir plazma ortamına çoğunlukla argon, gönderilmesi sonucu atomların iyonlaştırılıp moleküler

bağların kırıldığı bir analitik tekniktir.⁶⁴ Bir iyonlaştırıcı kaynağı, dedektör ve kütle spektrometresinden meydana gelen ICP-MS cihazı ayrı ayrı iki üniteden oluşan diğer kütle spektrometri cihazlarının aksine tek bir cihazdan oluşur. ICP-MS cihazında gerçekleştirilen ölçümler kütle/yük (m/z) oranına dayanır. Sıvı halde verilen numune, yaklaşık 8000-10000 K sıcaklıktaki plazma ortamına bir enjektör vasıtası ile ulaşır. Madde plazma ortamındaki bu yüksek sıcaklığın etkisi ile atomlaşmaya uğrar. Atomun son yörüngesinden elektron koparılması sonucu tek pozitif yüklü hale gelir. Oluşan pozitif yüklü iyonlar farklı kütle/yük oranlarına göre bir kütle filtresi yardımı ile ayrıştırılıp dedektöre gönderilir. Dedektör, gelen iyonları sayar ve sonucu saniyede sayılan sinyal cinsinden verir. ICP-MS ile yapılan kantitatif analizde birçok elementin ölçüm sınırı ppb ve daha alt düzeydedir.⁶⁵

2.12. Literatür Özetleri

2.12.1. Nanopartikül ve Nanokompozit Sentezi için Geliştirilen Yöntemler

Zhang ve ark.⁶⁶ -NH₂ fonksiyonel kabuk yapısına sahip monodispers ve küresel Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Çalışmada, FeCl₃.6H₂O, NaOAc ve Na₃Cit bileşiklerinden çıkılarak Fe₃O₄ nanopartikülleri elde edilmiş ve bir sol-jel prosesi kullanılarak TEOS'un 3-Aminopropil trimetoksisilan (APTMS) ile birlikte kondenzasyonu sonucu Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülleri hazırlanmıştır. Yüzeyi fonksiyonlaştırılmış nanopartiküllerin morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), TEM ve XRD yöntemleri ile belirlenmiştir. Fe₃O₄ çekirdek yüzeyinin SiO₂ ve NH₂ ile kaplandığı FT-IR yöntemi ile de gösterilmiştir. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartiküllerinin termal stabilitesi termo-gravimetrik analiz (TGA) ile yüzeyindeki amino miktarı ise CHN element analizi ile belirlenmiştir. Sentezlenen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ manyetik nanopartiküllerin, süperparamanyetik davranışa, düzgün çekirdek-kabuk yapısına (~200

nm çapında), nispeten büyük BET yüzey alanına ($\sim 138 \text{ m}^2/\text{g}$) ve yüksek katılımlı aminofonksiyonelliğe (~ 2.90 ağırlıkça %) sahip olduğu bildirilmiştir.

Shokouhimehr ve ark.⁶⁷ alkollerin herhangi bir baz kullanılmadan sulu ortamda oksidasyonunu sağlamak amacı ile manyetik bir çekirdek-kabuk Pd nanokatalizörü sentezlemişlerdir. Bu amaç ile $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve sodyum oleattan çıkılarak demir-oleat kompleksi elde edilmiştir. Demir-oleat kompleksi ve oleik asitin 300°C 'deki reaksiyonu sonucu sentezlenen Fe_3O_4 nanopartikülleri, igepal®CO-520 içeren sikloheksan içinde dispers edilmiş ve sonrasında bu çözeltiye sulu NH_3 ve TEOS eklenmiştir. Oluşturulan çözeltinin oda sıcaklığında 7 saat şiddetli bir şekilde karıştırılması ile silika kaplı Fe_3O_4 nanopartikülleri elde edilmiştir. Silika kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerinin TEM ve HRTEM görüntüleri ile düzgün çekirdek-kabuk yapısına ($\sim 15 \text{ nm}$ 'lik bir kalınlığa) sahip olduğu gösterilmiştir.

Chang ve ark.⁶⁸ 2,4-diklorofenolü indirgemek amacı ile yüzeyi yaban turbu peroksidadı ile fonksiyonlaştırılmış manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Çalışmada, ultrasonik titreşim ortamında birlikte çöktürme yöntemi ile Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenmiş ve sonra NH_3 ve TEOS'un hidroliz ve kondenzasyonu ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyi silika ile kaplanmıştır. Silika kaplı Fe_3O_4 nanopartikülleri daha sonra APTES ile muamele edilerek nanopartikülün yüzeyi amino ile fonksiyonlaştırılmıştır. Yüzeyi amino ile fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülleri SEM, TEM ve XRD yöntemleri ile tanımlanmış ve yaklaşık 10 nm çekirdek çapına ve ortalama 195 nm silika-kabuk kalınlığına sahip olduğu ve ortalama 400 nm bir çapa sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca belirtilen nanopartikülün IR spektrumu da alınmış ve 558 cm^{-1} 'deki Fe-O titreşim bandı ile parçacıklardaki Fe_3O_4 'ün varlığı, 1089 cm^{-1} 'deki Si-O-Si antisimetrik gerilme titreşim bandı ile parçacıklardaki SiO_2 'nin varlığı ve 1630 cm^{-1} 'deki titreşim bandı ile de N-H bağının varlığı gösterilmiştir.

Daha sonra yaban turbu peroksidazı, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin üzerine çapraz bağlayıcı bir ajan olarak glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiş ve bir enzim katalizörü olarak yaban turbu peroksidazı ile immobilize edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin 2,4-diklorofenolü indirgemek amacı ile H_2O_2 'yi aktive etmek için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Chen ve ark.⁶⁹ yüzeyi bir antikanser ajan olan doksorubisin (DOX) ile fonksiyonlaştırılmış manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Nanopartiküllerin DOX ile konjugasyonunda, manyetik nanopartiküllere modifiye edilen spacer kolunun ucundaki aktif -COOH fonksiyonel grubu, N-hidroksisüksinimid (NHS) varlığında 1-ethyl-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ile aktive edilerek serbest DOX·HCl içeren çözelti eklenmiş ve DOX moleküllerinin nanopartikülde bulunan -NH_2 fonksiyonel grubu ile reaksiyona girmesi sonucu nanopartiküllerin yüzeyinin DOX ile konjuge edilmesi sağlanmıştır. Sentezlenen spacer kolu ve ilacın amidasyon yoluyla nanopartiküllerle konjugasyonu SEM, TEM ve FT-IR yöntemleri ile belirlenmiştir.

Oliveira ve ark.⁷⁰ yüzeyi hidrofobik ve antikanser ilaçlar için taşıyıcı görevi yapabilen curcumin yüklü amino ve folat ile fonksiyonlaştırılmış $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ve $\text{SiO}_2\text{-FO}$ nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Çalışmada sol-jel yaklaşımı kullanılmış olup curcumin yüklü silika nanopartikülleri (CCM/ $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$), TEOS'un amonyakla katalizlenmesi sonucu hidrolizi ve daha sonra APTES ile reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Hedefleyici ligand olarak folat ise nanopartikül yüzeyine, folik asidin karboksil gruplarının NHS varlığında EDC ile aktive edilmesinin ardından amit bağı oluşumu vasıtasıyla bağlanmıştır. Oluşturulan nanopartiküllerin prostat kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve normal hücre hattı ile karşılaştırılmıştır.

Liu ve ark.⁷¹ amino-silan ile modifiye edilmiş süperparamanyetik silika nanosferlerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla manyetit nanopartikülleri Fe^{2+} ve Fe^{3+} 'ün NH_4OH ile birlikte çöktürülmesi ile hazırlanmış ve daha sonra iyi dağılmış manyetik silika nanosferleri oluşturmak için manyetit nanopartiküllerinin yüzeyi silika ile kaplanmıştır. Kürelerin büyüklüğü SiO_2 ile Fe_3O_4 arasındaki oran değiştirilerek kontrol edilmiş, amino-silan, manyetik silika nanosferlerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmış ve glutaraldehid ile aktive edilmiştir. Manyetik silika nanosferlerin morfolojisi ve manyetik özellikleri TEM ve titreşimli numune manyetometresi ile incelenmiş, nanosferlerin ortalama büyüklüğünün 100-200 nm arasında olduğu ve süperparamanyetik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Zhang ve ark.⁷² Pb^{2+} için bir adsorban olduğu belirtilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin oluşumuna dayalı bir kinetik yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla monodispers ve küresel $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerini, bir sol-jel işlemini kullanarak TEOS'un APTMS ile birlikte kondenzasyonu yoluyla sentezlemişlerdir. Optimum koşullar altında sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ manyetik nanopartiküllerinin üniform çekirdek kabuk yapısı (~200 nm çapında), nispeten yüksek amino işlevselliğine sahip yükleme (~5.45 wt%), dış mıknatıs ile kolay geri kazanım ve Pb^{2+} 'nin etkili şekilde uzaklaştırılması ($q_m = 243.9 \text{ mg/g}$, 25°C) gibi özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Adsorpsiyonun etkili olduğunu, adsorpsiyon için daha yüksek bir sıcaklığın daha uygun olduğunu ve bu bağlamda $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ manyetik nanopartiküllerinin Pb^{2+} uzaklaştırılması için potansiyel bir adsorban olabileceğini belirtmişlerdir.

Wang ve ark.⁷³ bu çalışmada sulu ortamdaki ağır metallerin uzaklaştırılması için yeni bir adsorban olan amino-fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ çekirdek-kabuk manyetik nanopartikülünün sentezine dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla sentezlenen amino-fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanoadsorbanının, metal iyonlarının yüzey amino

grupları tarafından kompleksleştirilmesinden dolayı sulu ortamdaki Cu^{2+} , Pb^{2+} ve Cd^{2+} iyonlarına karşı yüksek adsorpsiyon afinitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Metal yüklü $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin, manyetik ayırma ile sulu çözeltiden kolayca geri kazanılabilir ve asit muamelesi ile kolayca rejenere edilebilir olduğunu belirtmişlerdir.

Mali ve ark.⁷⁴ β -BtO substitüe γ -amino asitlerin sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla bağlama reaktifi olarak çözelti ve katı faz peptid sentezi sırasında serbest karboksilik asitlerin aktivasyonu için N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uranyum hekzaflorofosfat (HBTU) ve peptid sentezi sırasında rasemizasyonun azaltılmasında önemli bir rol oynayan 1-hidroksi benzotriazol (HOBt) kullanılmıştır. N-korumalı E-vinylogous amino asiti (1.6 mmol), azot gazı altında susuz dimetilformamid (DMF) içerisinde çözülmüş ve çözeltiye HBTU (1.6 mmol) ve HOBt (3.2 mmol) bağlama reaktifleri eklenmiştir. Elde edilen reaksiyon karışımı 0°C 'ye soğutulmuş ve karışıma DIEA (N,N-diizopropiletilamin) (3.2 mmol) ilave edilmiştir. Daha sonra bileşikler 12 saat boyunca karıştırılan reaksiyon ortamından etil asetat (3x20 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen β -BtO substitüe γ -amino asitlerin %70-%85 verim ile elde edildiği bildirilmiştir.

2.12.2. Zn^{2+} Analizinde Atomik Absorpsiyon Temelli Geliştirilen Analitik Yöntemler ve Uygulamaları

Mathur ve ark.⁷⁵ insan tükürük, uyarılmış tükürük, tam kan ve plazmada Zn^{2+} ve plazmada Cu^{2+} seviyelerinin belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Ortalama Zn^{2+} derişimi tükürükte 0.478 ppm ($n = 136$), uyarılmış tükürükte 0.046 ppm ($n = 36$), tam kanda 6.41 ppm ($n = 145$) ve plazmada 0.87 ppm ($n = 145$) olarak tespit edilmiştir. Plazma Cu^{2+} derişiminin Zn^{2+} derişimine oranının subklinik Zn^{2+} eksikliğinin belirlenmesi için uygun bir parametre olduğu belirtilmiştir.

Greger ve ark.⁷⁶ insan tükürük ve tükürük süpernatantında Zn^{2+} , protein ve Zn^{2+} /protein oranının belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmaya, metabolik çalışmadan 8 ve beslenme anketi çalışmasından 59 bayan dahil edilmiştir. Tükürük ve tükürük süpernatantı 5 gün $-20^{\circ}C$ 'de depolandığında Zn^{2+} derişiminde (125.5 ± 7.5 ng/mL ve 124.6 ± 7.7 ng/mL) anlamlı bir değışmenin olmadığı bildirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen kişilerin tükürük ve tükürük süpernatantında ortalama Zn^{2+} derişimleri sırasıyla 173 ± 94 ng/mL ve 30.5 ± 14.8 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Günlük çinko alımı azaltıldığında tükürük süpernatantındaki Zn^{2+} derişiminin anlamlı derecede düştüğü ($p < 0.05$) bildirilmiştir. Tükürük ($r = 0.460$, $p < 0.001$) ve tükürük süpernatantında ($r = 0.486$, $p < 0.001$) çinko ile protein seviyeleri arasında korelasyon olduğu fakat her iki tip tükürük örneğindeki Zn^{2+} seviyeleri ile serum veya saç Zn^{2+} seviyeleri arasında korelasyonun olmadığı belirtilmiştir.

Bales ve ark.⁷⁷ insan tükürük, uyarılmış tükürük, plazma ve saçta eser elementleri belirlemek amacı ile bir AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmaya dahil edilen toplam 278 sağlıklı kişi, genç (18-29 yaş), orta yaş (30-64 yaş) ve yaşlılar (65-93 yaş) şeklinde gruplandırılmıştır. Çalışmada, Zn^{2+} derişiminin tükürük ve uyarılmış tükürük süpernatantında yaşa bağlı arttığı ($p < 0.05$), tükürük tortusunda ve plazmada yaşla birlikte değışmediği ve saçta ise yaşa bağlı azaldığı ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Tükürük ve uyarılmış tükürükte tüm grubun ortalama Zn^{2+} derişimi sırasıyla 0.61 nmol/L ve 0.89 nmol/L olarak belirlenmiş ve plazmada erkeklerin kadınlara göre ($p < 0.05$) daha yüksek Zn^{2+} derişimine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tükürükteki Zn^{2+} derişiminin plazma ve saçta bulunan Zn^{2+} derişimleri ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Watanabe ve ark.⁷⁸ insan tükürüğünde Zn, Mn ve Cu elementlerini ve metalloproteinazları (MMP) belirlemek amacıyla AAS ve ELISA yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmaya, tat alma bozukluğu olan 20 hasta ve 35 sağlıklı gönüllü dahil

edilmiştir. Zn^{2+} derişiminin hasta tükürüğünde (47.22 ± 17.1 ppb) sağlıklı gönüllülere (79.8 ± 42.6 ppb) göre önemli derecede düşük ($p < 0.001$) olduğu bildirilmiş ve tükürük Zn^{2+} derişiminin farklılığının tat alma bozukluğu hastalığı ile yakından ilgili olabileceği belirtilmiştir.

Zahir ve ark.⁷⁹ insan tükürüğünde bulunan inorganik ve eser elementleri belirlemek amacı ile çok yönlü ve çift ışınlı AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmaya, yetimhanede yaşayan 30 çocuk dahil edilmiş ve diş çürüklerine göre gruplandırılmıştır. Çalışmada, Zn^{2+} derişiminin çürük sayısına bağlı olarak azaldığı ($p < 0.005$) tespit edilmiştir.

Burguera-Pascu ve ark.⁸⁰ insan tükürüğünde Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik bir elektrotermal AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde on-line bir seyretlme yapılmış ve yöntemin $8.0\text{--}120.0$ $\mu\text{g/L}$ derişim aralığında lineer ve 3 BSS değeri ile kesin olduğu belirtilmiştir. Yöntemde, tükürükte gözlenebilme sınırı (LOD) 0.35 $\mu\text{g/L}$ ve ortalama geri kazanım $\%97.8 \pm 1.3$ olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile yaşları 20-51 yaş arasında (ortalama 30.50 ± 9.14 yaş) değişen 15 erkek ve 29 bayan olmak üzere toplam 44 sağlıklı gönüllüden toplanan tükürük örnekleri analiz edilmiş ve ortalama Zn^{2+} derişimi 55 ± 17 $\mu\text{g/L}$ olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Zn^{2+} derişiminin erkeklerde kadınlara göre istatistiksel olarak yüksek ($p = 0.006$) olduğu belirtilmiştir.

Dural ve ark.⁸¹ baş ve boyun radyoterapisinin tükürük eser elementlerine etkisinin araştırılması amacıyla tükürük eser elementlerini bir AAS yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmaya radyoterapi alan 22 nazofarenks ve 23 larenks karsinomalı hasta dahil edilmiş ve radyoterapinin öncesi, ortası ve sonrası olmak üzere üç aşamasında tükürük örnekleri toplanmıştır. Tükürük örneklerinde Al, Fe, Pb, Se, Zn, Cu ve Ni elementleri analiz edilmiştir. Nazofarinks ve karsinomu olan hastaların tükürüklerinde Zn^{2+} derişimlerinin radyoterapi öncesi sırayla ortalama 611.3 $\mu\text{g/L}$ ve 613 $\mu\text{g/L}$ olduğu, bu değerlerin

radıyoterapi süresince ortalama 642.7 µg/L ve 655.7 µg/L'ye yükseldiği ve radıyoterapi sonrasında ise ortalama 631.8 µg/L ve 646.9 µg/L'ye düştüğu bildirilmiştir. Benzer ilişkilerin analizi yapılan diğer eser elementler için de söz konusu olduğu belirtilmiştir.

Menegário ve ark.⁸² insan tükürüğünde eser elementleri belirlemek amacıyla bir ICP-MS yöntemi geliştirmişlerdir. 0.4 mL tükürük örneğine 0.1 mL derişik nitrik asit eklenmiş ve su ile hacmi 2 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra elde edilen çözeltiye 135Ba, 112Cd, 65Cu, 206Pb and 66Zn izotopları eklenerek karıştırmış ve ICP-MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları 135Ba / 138Ba, 112Cd / 114Cd, 65Cu / 63Cu, 206Pb / 208Pb ve 66Zn / 68Zn izotop oranlarına göre değerlendirilmiştir. Yöntemin LOD değeri Zn²⁺ için 0.59 µg/L olarak tespit edilmiş ve insan tükürüğündeki çinko derişiminin 46.0 µg/L-230 µg/L arasında olduğu gösterilmiştir.

Kim ve ark.⁸³ sigara içen ve içmeyenler arasındaki tükürük eser elementlerinin (Mg, Al, Mn, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd, Tl ve Pb) seviyelerini belirlemek amacı ile bir ICP-MS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya 10 sigara içen (27.4±3.4 yaş) ve 30 içmeyen erkek (26.5±4.1 yaş) dahil edilmiş ve sigara tüketim miktarlarına göre gruplara ayrılmıştır. Yöntemin 3.0 µg/L derişim hassasiyetinde olduğu belirtilmiş ve sigara içme durumu ile Zn²⁺ derişimi arasında bir kolerasyon tespit edilememiştir.

Khozeimeh ve ark.⁸⁴ sağlıklı gönüllüler ile akut ve iyileşme evresindeki Rekürren Herpes Labialis hastalarında Zn²⁺ düzeylerinin karşılaştırılması amacı ile bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Bu retrospektif vaka-kontrol çalışmasının 40 Rekürren Herpes Labialis hastası ve 40 sağlıklı olmak üzere 80 birey üzerinde yapıldığı belirtilmiştir. Tükürük örnekleri Rekürren Herpes Labialis hastalarından (akut fazda ve lezyonların iyileşmesinden sonra (ortalama 21 gün sonra)) ve sağlıklı gönüllülerden alınmıştır. Akut ve iyileşme evresinde vaka grubundaki tükürük Zn²⁺ derişimi sırasıyla 160.8 ng/mL ve 205.7 ng/mL olarak tespit edilmiş ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu (p<0.05)

belirtilmiştir. Ayrıca Zn^{2+} derişiminin sağlıklı (317.5 ng/mL) ile hasta grubu arasında da anlamlı derecede farklı olduğu ($p<0.05$) belirtilmiştir.

Monica ve ark.⁸⁵ Andhra Pradesh Hindistan kırsal alanlarında 12 yaşındaki çocuklarda, diş çürüğü ile içme suyunda bulunan eser elementler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacı ile bir ICP-MS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmada 12 yaşında 451 çocuk diş çürüğü açısından incelenmiş ve içme suyundaki Zn^{2+} derişimi ile diş çürüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın ($p<0.05$) olduğu rapor edilmiştir.

Bhandary ve ark.⁸⁶ tükürükte Zn ve Cu elementlerinin derişimi ile diş çürüğü aktivitesi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacı ile bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışma, 15 düşük ve 15 yüksek çürük aktivitesi olan toplam 30 kişinin tükürük örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Düşük ve yüksek çürük aktivitesi olan tükürük örneklerinde sırasıyla ortalama Zn^{2+} derişimleri 118.1867 $\mu\text{g/dL}$ ve 60.4267 $\mu\text{g/dL}$ olarak tespit edilmiş ve iki grup arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p=0.005$) bildirilmiştir.

Hussein ve ark.⁸⁷ Malezya Shah Alam'da farklı etnik kökenden gelen çocukların tükürüğünde Cu, Zn, Mn ve Fe elementlerinin derişimi ile diş çürüğü arasındaki ilişkisiyi değerlendirmek amacı ile bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya toplam 120 çocuk dahil edilmiş ve çocuklar erkek ile bayan, yaş, bölge ve çürük ile çürük olmayan şeklinde gruplandırılmıştır. Ortalama Zn^{2+} derişimi, erkeklerde 0.11 ± 0.09 ppm, kızlarda 0.12 ± 0.08 ppm; 8,10 ve 12 yaşındaki çocuklarda sırasıyla 0.09 ± 0.07 ppm, 0.16 ± 0.11 ppm ve 0.09 ± 0.05 ppm; Malezyalı, Hintli ve Çinli çocuklarda sırasıyla 0.13 ± 0.06 ppm, 0.11 ± 0.12 ppm ve 0.09 ± 0.05 ppm; çürüğü olan ve olmayan çocuklarda ise 0.13 ± 0.10 ppm ve 0.09 ± 0.05 ppm olarak belirlenmiştir.

Li ve ark.⁸⁸ suda Zn^{2+} 'yi belirlemek amacıyla Zn^{2+} 'nin malahit yeşili yüklü mikrokristalin trifenilmetana adsorbsiyonuna dayalı bir alevli AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Optimum koşullar altında, malahit yeşili yüklü mikrokristalli

trifenilmetan yüzeyinde Zn^{2+} 'nin adsorbe edildiği belirtilmiştir. Yöntemin LOD değeri 0.05 µg/L ve % BSS değeri % 1.0-3.1 olarak tespit edilmiştir. Yüzde geri kazanım ise % 96.5-105 aralığında belirlenmiştir.

Al-Rawi ve ark.⁸⁹ histolojik olarak OSHK tanısı alan hasta tükürüğünde Zn, Cu, Fe, Mn, Co, Ni, Cr, Cd ve Mg elementlerinin analizine yönelik bir AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmaya 50 OSHK hastası dahil edilmiş ve tümörün cerrahi eksizyonundan bir gün önce (preoperatif) ve cerrahinin bir gün sonrası (postoperatif) tükürük örnekleri toplanmıştır. Ortalama Zn^{2+} derişimi sağlıklı gönüllü ve OSHK hastalarının preoperatif ve postoperatif tükürüğünde sırasıyla 0.19 ± 0.04 ppm, 0.31 ± 0.05 ppm ve 0.16 ± 0.2 ppm olarak tespit edilmiştir. Zn^{2+} derişimi bakımından istatistiksel olarak preoperatif hasta ve sağlıklı gönüllü tükürük örnekleri arasında fark bulunurken ($p < 0.05$) postoperatif hasta ve sağlıklı gönüllü tükürük örnekleri arasında fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

Khanna ve ark.⁹⁰ oral kavitede prekanser ve kanser lezyonlara sahip hasta serumlarında Cu, Zn, Se ve Mo elementlerinin analizine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmada, oral kavitede 30 OSMF'li ve 30 OSHK'lı hastanın serumunda Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{2+} ve Mo^{2+} derişimleri tespit edilmiş ve yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 30 sağlıklı gönüllüden elde edilen derişimler ile karşılaştırılmıştır. Serumda Zn^{2+} derişiminin OSMF ve OSHK'lı hastalarda sağlıklı gönüllülere göre yükseldiğini ve fakat farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir.

Shetty ve ark.⁹¹ histolojik olarak OL, OSMF ve OSHK tanısı alan hasta serumlarında Cu, Zn ve Fe elementlerinin analizine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Sağlıklı gönüllü ile OSMF, OL ve OSHK hasta gruplarında serum Zn^{2+} derişimleri sırasıyla 162.07 ± 2.91 µg/dL, 147.73 ± 2.86 µg/dL, 155.78 ± 2.03 µg/dL ve 110.11 ± 2.83 µg/dL olarak tespit edilmiştir. Tüm hasta grupları sağlıklı grup ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak serum Zn^{2+} derişiminin anlamlı bir şekilde azaldığı ($p=0.001$) ve Cu/Zn derişim oranının anlamlı bir şekilde arttığı belirtilmiştir.

Ayinampudi ve ark.⁹² oral kavitede prekanser ve kanser lezyonlara sahip hasta tükürüğünde Cu ve Zn elementlerinin analizine yönelik bir ICP-MS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmada, oral kavitede 5 OSMF'li, 5 OL'li, 5 OLP'li ve 10 OSHK'lı hastanın tükürüğünde Cu^{2+} ve Zn^{2+} derişimleri tespit edilmiş ve yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 6 sağlıklı gönüllüden elde edilen derişimler ile karşılaştırılmıştır. Cu/Zn oranının sağlıklı gönüllü gruba göre prekanser ve kanser grupta azaldığı bildirilmiştir. Sağlıklı gönüllü, prekanser ve kanser gruplarında ortalama Zn^{2+} derişimi sırasıyla 175.62 ± 37.20 ppb, 284.26 ± 124.64 ppb ve 411.30 ± 152.24 ppb olarak tespit edilmiş ve gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p < 0.05$) bildirilmiştir.

Shetty ve ark.⁹³ oral kavitede kanser lezyonlara sahip hasta tükürüğünde Zn^{2+} derişimini AAS yöntemi ile glutasyon ve süperoksit dismutaz seviyelerini ise [5, 5-Ditiyobis (2 nitrobenzoik asit)] ve nitroblue tetrazolyum yöntemleri ile belirlemişlerdir. Çalışmaya 65 sağlıklı gönüllü, 115 potansiyel oral kanser ve 50 OSHK'lı hasta dahil edilmiştir. Sağlıklı gönüllü, potansiyel oral kanser ve OSHK'lı hastalarda serum Zn^{2+} derişimi sırasıyla 161.05 ± 17.81 $\mu\text{g/dL}$, 147.66 ± 12.86 $\mu\text{g/dL}$ ve 103.23 ± 9.11 $\mu\text{g/dL}$ olarak ($p < 0.001$); tükürük Zn^{2+} derişimi ise sırasıyla 36.59 ± 4.19 $\mu\text{g/dL}$, 22.25 ± 5.32 $\mu\text{g/dL}$ ve 16.97 ± 5.36 $\mu\text{g/dL}$ ($p < 0.001$) olarak tespit edilmiştir.

Shetty ve ark.⁹⁴ OL, OSHK ve OSMF'li hasta tükürüklerinde Cu, Zn ve Fe elementlerinin derişimlerinin belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya her hasta grubundan 50 kişi ve 50 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Sağlıklı gönüllü, OSMF, OL ve OSHK hasta gruplarında ortalama tükürük Zn^{2+} derişimi sırasıyla 35.78 ± 3.97 $\mu\text{g/dL}$, 24.67 ± 4.86 $\mu\text{g/dL}$, 27.33 ± 3.05 $\mu\text{g/dL}$ ve 15.23 ± 2.93 $\mu\text{g/dL}$ olarak belirlenmiştir. Tükürük Zn^{2+} derişiminin her üç hasta grubunda sağlıklı gruba göre

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p=0.001$) ve OL ve OSMF grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) belirtilmiştir.

Baloch ve ark.⁹⁵ oral kanser hasta serumunda Cu, Fe, Mg ve Zn elementlerinin derişimlerinin belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya toplam 60 kişi dahil edilmiş ve oral kanser (OK) oluşumu ve gutkha alım (GA) öyküsüne göre üç gruba ayrılmıştır. (1. Grup: OK ($n=20$), 2. Grup: GA ($n=20$) ve 3. Grup: GA olmayan ($n=20$)). En yüksek serum Zn^{2+} derişimi 2. grupta gözlenmiş ve sırasıyla 3. ve 1. gruba doğru azalmıştır. GA'nın Zn^{2+} derişimini arttırdığı bildirilmiştir.

Kanneppady ve ark.⁹⁶ OL hasta tükürüğünde Zn^{2+} derişiminin belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya klinik olarak tanı konmuş ve histopatolojik olarak doğrulanmış 25 OL'lı hasta ve yaş ve cinsiyete göre eşleşen 25 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Sağlıklı gönüllü ve OL'li hasta tükürük örneklerinde Zn^{2+} derişimi sırasıyla $146.76 \pm 29.18 \mu\text{g/dL}$ ve $116.96 \pm 38.73 \mu\text{g/dL}$ olarak tespit edilmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p=0.003$) bildirilmiştir.

Okade ve ark.⁹⁷ OSMF hasta tükürüğünde Cu, Zn, Fe ve Mn eser elementlerinin belirlenmesine yönelik bir AAS yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya hastanede tanı konulmuş 30 OSMF'li hasta ve 30 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Tükürük Zn^{2+} derişiminin sağlıklı gönüllü gruba ($0.10 \pm 0.29 \text{ ppm}$) göre OSMF'li hasta ($0.10 \pm 0.21 \text{ ppm}$) grubunda azaldığı ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) bildirilmiştir.

2.12.3. Zn^{2+} Analizinde Kompleks ve Sensör Oluşumu Esasına Dayalı Moleküler Absorpsiyon Temelli Geliştirilen Analitik Yöntemler ve Uygulamaları

Burdette ve ark.⁵⁶ Zn^{2+} için seçici iki yeni floresan maddeyi (Zinpir-1 ve Zinpir-2) sentezleyip karakterize etmişlerdir. Zinpir-1'i ve Zinpir-2'yi sentezlemek için sırasıyla Mannik reaksiyonu ve 4', 5'-floresein dikarboksaldehitin kullanıldığı çok basamaklı bir sentez prosedürü uygulanmıştır. Zinpir-1, DPA ve paraformaldehitin, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)

karışımında hazırlanan 2',7'-dikloro floresein çözeltisine eklenmesi, 24 saat reaksiyon sonucu elde edilen somon-pembe renkli bir ürünün -25°C'de çöktürülmesi ve buzla soğutulmuş suyla yıkanması sonucu sentez edilmiştir. Her iki Zinpir sensörünün, görünür bölge dalga boyunda (~500 nm) uyarma ve emisyon gösterdiği, Zn^{2+} için <1 nM çözünürlük sabitine (K_{d1}), 1'e yakın kuantum verimine ($\Phi \sim 0.9$) ve hücre geçirgenliğine sahip olduğu ve intraselüler uygulamalar için uygun olduğu bildirilmiştir. Zn^{2+} ve Zinpir-1 bileşiğinin kompleks oluşum oranının 2:1 olduğu belirtilmiş ve X-ışını kristal yapısı ile aydınlatılmıştır. Zn^{2+} 'nin fizyolojik koşullar altında belirtilen sensörlere bağlanması ile sensörlerin floresansında artış gözlenmiştir. 25 μM Zn^{2+} varlığında ortamda tampon çözelti (pH 7'de (50 mM Piperazin- N-N'-bis (2-etansülfonik asit) (PİPES), 100 mM KCl, 50 μM 2,2',2'',2'''- (Etan-1,2-diyl dinitrilo) tetra asetik asit (EDTA))) kullanıldığında Zinpir-1 ve Zinpir-2 ile oluşan komplekslerin kuantum verimlerinin sırasıyla 0.38'ten 0.87'ye ve 0.25'ten 0.92'ye yükseldiği bildirilmiştir. Zinpir-1'in uyarma maksimumunun Zn^{2+} ile kompleks oluşturması sonrasında 515 nm'den 507 nm'ye, Zinpir-2' nin ise 498 nm'den 490 nm'ye kaydığı gösterilmiştir. Absorpsiyon dalga boyundaki hafif hipokromik kaymanın, donör grubunun (fenol) Zn^{2+} 'ye koordinasyonunun göstergesi olduğu belirtilmiştir. Kompleksler ile elde edilen floresans cevabının Zn^{2+} için seçici olduğu ve yüksek derişimdeki Ca^{2+} ve Mg^{2+} (5 mM) varlığında floresansın değişmediği bildirilmiştir. Ayrıca Cos-7 hücrelerinde Zinpir-1 ve Zinpir-2 floresan maddeleri kullanılarak 0.1 nM'dan daha düşük Zn^{2+} derişimlerinin belirlenebildiği gösterilmiştir.

Hirano ve ark.¹⁸ Zn^{2+} için yeni floresans problemleri olan 5- [2- [bis (piridin-2-ilmetil) amino] etilamino] -2- (2,7-difloro-3-hidroksi-6-oksoksanten-9-il) benzoik asit (ZnAF-1F) ve 6- {2- [Bis (2-piridilmetil) amino] etilamino} -2', 7' diflorofloresini (ZnAF-2F) geliştirip hücresel uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. 0-1 μM derişim aralığında değişen Zn^{2+} varlığında pH 7.4'te 100 mM 4- (2-hidroksietil) -1-piperazin etansülfonik

asit (HEPES) ($I= 0.1$ (NaNO₃)) tamponu içerisinde 1 μ M ZnAF-2F, 492 nm dalga boyunda uyarılarak emisyon spektrumları alınmıştır. Zn²⁺ varlığında ZnAF-1F ve ZnAF-2F'in floresans şiddetlerinin sırasıyla 69 ve 60 kat arttığı, oluşan komplekslerin oluşum sabitlerinin belirlendiği ve Zn²⁺'nin nM seviyede analiz edilebileceği belirtilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin hücrelere uygulanabilmesi için, ZnAF-2F diasetil türevini (DA) sentezlemişler ve bu şekilde hücre kültüründe Zn²⁺'nin değişimlerini floresans mikroskobu ile belirlediklerini bildirmişlerdir.

Henary ve ark.⁹⁸ uyarılmış hal intramoleküler proton transferinin inhibisyonuna dayalı Zn²⁺ için seçici rasyometrik floresans sensörleri geliştirmişlerdir. Çalışmada, uyarılmış hal intramoleküler proton transferine dayalı 2- (2'-benzensülfonamidofenil) benzimidazol türevi bileşiklerinin Zn²⁺ ile indüklenmiş inhibisyonu araştırılmıştır. Nötral ortamda Zn²⁺'nin yokluğunda, floroforların proton-transfer tatomerinden daha fazla stokes kaymasına sahip bir emisyonu sahip olması için uyarılmış hal intramoleküler proton transferine tabi olduğu belirtilmiş ve Zn²⁺ koordinasyonunun uyarılmış hal intramoleküler proton transfer sürecini inhibe ettiği ve floresans emisyonunun maksimumunda önemli bir hipokromik kayma sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca paramanyetik metal katyonlarının (Cu²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ ve Mn²⁺) floresansı söndürdüğü, mM derişimdeki Ca²⁺ ve Mg²⁺'nin ise floresansı değiştirmedeği belirtilmiştir. Bu bağlamda, sentezlenen problemlerin fizyolojik koşullar altında mM-pM derişim aralığında serbest Zn²⁺ belirlenmesine yönelik olduğu bildirilmiştir.

Sarkar ve ark.⁹⁹ Zn²⁺'nin belirlenmesi için yüzeyi silika ile fonksiyonlaştırılmış 4-metil-2,6-diformil fenol'den oluşan bir schiff baz ligandı sentezlemişler ve canlı hücrelerde Zn²⁺'nin belirlenmesinde uygulamışlardır. Bu amaç ile 2D-hekzagonal mezogözenekli silika materyali olarak APTES kullanılmış ve bir dialdehit floresan kromofor olan, 4-metil-2,6-diformil fenol ile kaplanmıştır. 430 nm'de uyarılan Si-MCM-

41 tipi Schiff baz ligandının 530 nm dalga boyunda maksimum emisyonu sağıp olduğu gösterilmiştir. Bu liganda Zn^{2+} (5 μM -1.4 mM) ilavesi ile floresans şiddetinin arttığı, emisyon piklerinin 500 nm dalga boyuna kaydığı ve floresans kuantum veriminin ise 0.128'den 0.314'e yükseldiğı gösterilmiştir. Zn^{2+} için LOD değerinin 6.54 $\mu g/L$ olduğu bildirilmiştir. Sentezlenen kemosensör, pirition (2-mercaptopiridin N-oksit) varlığında floresans mikroskobu ile hücre kültüründe (A375 ve HeLa hücreleri) Zn^{2+} 'nin hücre içi derişiminin belirlenmesinde uygulanmış ve ekstraselüler Zn^{2+} derişiminin artması ile floresans şiddetinin arttığı belirtilmiştir.

Li ve ark.¹⁰⁰ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için schiff bazına dayanan bir kemosensör (2-((2-hidroksinaftalen-1-il)metilenamino)-3-(1H-indol-3-il)propanoikasıit) sentezlemişler ve canlı hücrelerde Zn^{2+} 'nin belirlenmesinde uygulamışlardır. Schiff bazın fizyolojik koşullar altında (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 408 nm dalga boyunda uyarıldığında 458 nm dalga boyunda çok zayıf bir emisyon gösterdiğini, Zn^{2+} 'nin ilavesi ile emisyonunda büyük bir artış sağılandığını (100 μM Zn^{2+} 'de ~ 200 kat artış) ve emisyon piklerinin 434 nm dalga boyuna kaydığını belirtmişlerdir. Sentezlenen kemosensör, floresans mikroskobu ile hücre kültüründe (B16 ve F10 hücreleri) Zn^{2+} 'nin hücre içi derişiminin belirlenmesinde uygulanmış ve bu sensörün düşük bir kuantum verimine sağıp olmasına rağmen görünür emisyon sergilediğı bildirilmiştir.

Chen ve ark.¹⁰¹ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için 7-hidroksikuinolinin yapısına dayalı bir floresans prob (7-MOQ) sentezlemişler ve canlı hücrelerde uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Bu amaç ile 7-MOQ bileşiğı sentezlenmiş ve bileşiğın HEPES tamponunda (25 mM HEPES, 0.1 M NaClO₄, 5% (h/h) dimetil sülfoksit (DMSO), pH 7.4, $I=0.1$) 320 nm dalga boyunda uyarıldığında 393 nm dalga boyunda çok zayıf bir emisyon gösterdiğini, Zn^{2+} 'nin ilavesi ile 7-MOQ'un foto-kaynaklı elektron aktarımı (PET) yolunun bloke olduğunu ve dolayısıyla emisyonunda büyük bir artış sağılandığını

belirtmişlerdir. Job's plot yöntemi kullanılarak Zn^{2+} 'nin 7-MOQ ligandına 0.117 nM oluşum sabiti ile 1:1 oranında bağlandığı tespit edilmiştir. Sentezlenen floresans probun canlı hücrelerde uygulanması için yeterli hassasiyete sahip olduğu ve sadece Zn^{2+} ve Cd^{2+} için seçicilik gösterdiği bildirilmiştir.

Zhou ve ark.¹⁰² 8-aminokuinoline (8-AQ) dayalı bir floresans Zn^{2+} sensörü 2-(hidroksimetil) -4-metil-6-((kinolinil-8-imino)metil) fenolü (HMQP) sentezlemişlerdir. Sentezlenen sensörün Tris-HCl (50 mM, pH 7.54), tetrahidrofuran (THF)-H₂O (9:1, h/h) içinde yüksek seçiciliğe, hassas floresans artışına ve Zn^{2+} ile kuvvetli bağlanma kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Zn^{2+} 'nin MQP ligandına 1:2 oranında bağlandığı tespit edilmiş ve bu oran XRD yöntemi ile doğrulanmıştır. 455 nm'de uyarılan HMQP'nin 515 nm dalga boyunda maksimum emisyonu sahip olduğu gösterilmiştir. Bu liganda Zn^{2+} ilavesi ile floresans şiddetinin arttığı, emisyon piklerinin 565 nm dalga boyuna kaydığı ve floresans kuantum veriminin 0.006'dan 0.045'e yükseldiği gösterilmiştir. Diğer metal iyonları ile belirtilen kırmızıya kaymanın gözlenmediği belirtilmiş ve dolayısıyla Zn^{2+} için spesifik bir prob olduğu söylenmiştir.

You ve ark.¹⁰³ Zn^{2+} için duyarlı bir floresans indikatör olan Zinpir-1'in floresans dinamik aralığını geliştirmek için Zn^{2+} 'nin Mn^{2+} ile yer değiştirme yaklaşımını kullanmışlardır. Mn^{2+} ilavesinin Zinpir-1'in floresans şiddetini azalttığı ve kuantum verimini 0.17'den 0.0067'e düşürdüğü belirtilmiştir. Job's plot ve mol oranı yöntemi kullanılarak [Zinpir-1- Mn_2] kompleksinde stokiometrik oranın 1:2 olduğu tespit edilmiştir. [Zinpir-1- Mn_2] kompleksi için 1. ve 2. oluşum sabitleri 0.55 μ M ve 2.2 μ M olarak bulunmuş ve bu sabitlerin [Zinpir-1- Zn_2] kompleks oluşum sabitlerine göre 10^{10} ve 10^3 kat daha büyük olduğu belirlenmiştir. $ZnCl_2$ 'ün [Zinpir-1- Mn_2] kompleks çözeltisine eklenmesi ile kompleks içerisindeki Mn^{2+} ile Zn^{2+} yer değiştirmiş ([Zinpir-1- Zn_2] ve emisyon şiddetinde artış ($\Phi_{Zn} = 0.71$) gözlenmiştir. Bu bağlamda Zinpir-1'in

Zn^{2+} için floresans dinamik aralığının 25 kat arttığı belirlenmiştir. [Zinpir-1-Mn₂] kompleksi hücre kültüründe (HeLa hücreleri) eksojen Zn^{2+} 'yi ($ZnCl_2$ /sodyum piriton, 1:1, 50 μ M) görüntülemek için kullanılmış ve bu kompleksin (10 μ M) hücre geçirgenliğine sahip olduğu ve toksik olmadığı belirtilmiştir.

Pal ve ark.¹⁰⁴ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için yüzeyi mezogözenekli silika (MCM-41) ile fonksiyonlaştırılmış N-(kuinolin-8-il)-2-[3-(trietoksisilil) propilamino] asetamit (QTEPA) floresans Zn^{2+} sensörünü sentezlemişlerdir. Tris-HCl (pH 7.22) sulu tampon çözeltisi içinde hazırlanan bu sensöre 1 μ M Zn^{2+} eklenmesi ile emisyonunun 3 kat arttığı, yaklaşık 55 nm'lik bir kırmızı kayma ile emisyon dalga boyunun 468 nm olduğu ve kuantum veriminin 0.032'den 0.106'ya yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca diğer metal iyonlarının varlığının bu sensörün duyarlılığı ve seçiciliği üzerinde gözlemlenebilir bir etkiye sahip olmadığı ve 0.1 μ M derişime kadar Zn^{2+} 'nin tayin edildiği gösterilmiştir.

Liu ve ark.¹⁰⁵ Zn^{2+} 'ye duyarlı polimer bazlı çift floresans kemosenörlerin oluşumuna dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu kemosenörlerin sadece sulu ortamda çalıştığı ve Zn^{2+} ve sıcaklığa duyarlı olduğu belirtilmiştir. 20°C'de, floresans olmayan kemosenörün (PEG-b-P- (MEO2MA-ko-ZQMA)) suda moleküler olarak çözündüğü, bu kemosenöre Zn^{2+} bağlandığında floresans özellik gösterdiği ve diğer metal iyonları varlığında Zn^{2+} ile seçici olarak bağlanabildiği bildirilmiştir. İn vitro floresans görüntüleme çalışmalarında ise, misellerin canlı hücrelere etkili bir şekilde girebildiği ve Zn^{2+} 'ye duyarlı cevap verdiği belirtilmiştir.

Dong ve ark.¹⁰⁶ MRI ve floresans algılama sağlayan bir çift modlu görüntüleme Gd-Zpy probu sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Gd-Zpy probunun, parlak yeşil bir emisyonu sahip olduğu ve sulu çözeltide Zn^{2+} bağlandığında floresans özellik gösterdiği belirtilmiştir. Sentezlenen probun canlı hücrelerde hücre içi Zn^{2+} seviyesinin lüminesans görüntülenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Helal ve ark.¹⁰⁷ Zn^{2+} 'nin floresans kemosensörleri ile kompleks oluşturmaya esasına dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu bağlamda rasyometrik bir floresans kemosensörü sentezlenmiş ve Zn^{2+} ile kompleks oluşturmaya sağlanmıştır. Oluşan bileşiğin floresans davranışı incelenmiş ve kemosensörün Zn^{2+} ile kompleksleşmesinin ardından kemosensörün emisyon dalga boyunun 140 nm kırmızı bölgeye kaydığı tespit edilmiştir.

Ashokkumar ve ark.¹⁰⁸ rasyometrik bir Zn^{2+} probu oluşum esasına dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla florofor olarak akridinyona ve reseptör olarak N,N-bis(2 piridilmetil) amine (BPA) sahip çift emisyonlu bir rasyometrik Zn^{2+} probu sentezlemişlerdir. Bu floresans probun emisyonunda, Zn^{2+} varlığıyla şarj transfer emisyonunun sönümlenmesi sonucu 15 katlık bir emisyon artışı gözlemlendiğini ve iki emisyon pikindeki şiddet değişikliklerinin, PET sinyalizasyon mekanizması ile Zn^{2+} 'nin rasyometrik olarak belirlenmesini sağladığını belirtmişlerdir.

Frederickson ve ark.¹⁰⁹ beyinde histokimyasal olarak reaktif olan Zn^{2+} 'nin görüntülenmesine yönelik Zn^{2+} 'nin florofor 6-metoksi-8-p-toluensülfonamido-kinolin (TSQ) bileşiği ile kompleks oluşturmaya esasına dayalı bir floresans görüntüleme yöntemi geliştirmişler ve bu yöntemin diğer dokulara da uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Huston ve ark.¹¹⁰ Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik Zn^{2+} 'nin 10-bis(2,5-dimetil-2,5-diazahezil) antrasen ile şelat oluşumu esasına dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Asetonitril ortamında pH 10'da belirtilen ligandın emisyonunun Zn^{2+} ile şelat oluşturmaya sonrası 1000 kat arttırdığı gösterilmiştir. Daha sonra belirtilen antrasen sistemi makrosiklik sisteme genişletilmiş ve iki proton eklenen bu ligandların pH 12'de Zn^{2+} ile 0-20 μ M derişim aralığında floresans özellik gösterdiği ancak biyolojik pH için uygun olmadığı belirtilmiştir.

Hirano ve ark.¹¹¹ Zn^{2+} 'yi belirlemek amacıyla Zn^{2+} 'nin floresein ve dört metil grubuna dört azot ekleyerek makrosiklik tetraamin oluşum esasına dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu bağlamda sentezlenen floresans problemlerin Zn^{2+} ilavesiyle yüksek kuantum verimine sahip olduğu, emisyon şiddetinin 26 kat arttığı, diğer metallere karşı duyarsız olduğu ve pH 7'de aktif olduğu belirtilmiştir.

Zhang ve ark.¹¹² Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik Zn^{2+} 'nin iki farklı 9-antrildiamin ligandı ile kompleks oluşum esasına dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Zn^{2+} ile N, N'-bis (antirilmetil) -propilen diaminin (BAPDA) ve N, N'-bis (antirilmetil) -etilen diamin (BAEDA) liganlarının kompleksleri oluşturulmuştur. Zn-BAPDA kompleksinin güçlü emisyon gösterdiği fakat eser miktarda su ile belirgin şekilde sönümlendiği ve bu yüzden daha az uygulanabilir potansiyel gösterdiği belirtilmiştir. Zn-BAEDA kompleksinin ise HEPES tamponunda (pH7.5, 100 mM, H_2O/THF :1/1 h/h)) emisyon gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca BAEDA ligandının diğer ağır metal iyonlarına göre Zn^{2+} 'ye daha seçici olduğunu ve Zn^{2+} için potansiyel bir floresans sensör olabileceğini belirtmişlerdir.

Walkup ve ark.¹¹³ Zn^{2+} için seçici bir sensör olan Zinpir-1 bileşiğinin sentezini gerçekleştirmiş ve Zn^{2+} ile kompleks oluşumuna dayalı spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla Zinpir-1 bileşiği DPA ve 2',7'-dikloro floresein (DCF) bileşiklerinden çıkılarak CH_3CN/H_2O (1:1, h/h) ortamında bir Mannik reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Zinpir-1 bileşiğinin Zn^{2+} ile etkileşimi sonucu 0.89 kuantum verimi ile kompleks oluşturulmuş ve PIPES tamponunda (50 nM PIPES, 100 mM KCl ve 100 mM KOH) pH 7'de Zn^{2+} varlığında floresans şiddetinin arttığı bildirilmiştir.

Woodroffe ve ark.¹¹⁴ Zn^{2+} için seçici zinpir ailesinden membran geçirgen ve membran geçirmez özellikteki sensörlerini sentezlemişler ve Zn^{2+} görüntülenmesi için in vivo hücrelere uygulamışlardır. Bu amaçla floroseinin 5 veya 6 pozisyonunda bir

karboksilik asit veya etil ester işlevselliği içeren Zinpir-1 sensörlerinin Mannik kondenzasyon tepkimesi ile sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Yüklü Zinpir-1 türlerinin (6-CO₂-) membran geçirmez özellikte olduğu, nötr Zinpir-1'in (5/6-CO₂Et) geçirgenliğinin ise ana sensör ile benzer olduğu bildirilmiştir.

Xu ve ark.¹¹⁵ Zn²⁺'nin belirlenmesine yönelik, naftalimid florofor (ZTRS) ile yeni bir amit içeren reseptörün oluşumuna dayalı spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. ZTRS'ye, Zn²⁺ eklenmesi ile floresans şiddeti artmış (22 kat) ve emisyonu 483 nm dalga boyundan 514 nm dalga boyuna (kırmızı kayma) kaymıştır. ZTRS/Cd²⁺ kompleksinin emisyonunun 483'ten 446 nm'ye bir mavi kayma göstermesi nedeniyle, ZTRS'nin sırasıyla yeşil ve mavi floresans ile in vitro ve in vivo Zn²⁺ ve Cd²⁺'yi ayırt edebileceği bildirilmiştir. ZTRS'nin ayrıca, Fe iyonları varlığında hücre içi Zn²⁺'yi görüntülemek için ve yaşayan zebra balığı embriyolarının gelişimi sırasında Zn²⁺'yi tespit etmek için kullanıldığını belirtmişlerdir.

Hendrickson ve ark.¹¹⁶ Zn²⁺ ve diğer iki değerlikli metal iyonlarının florofor 2-metil-8- (toluen-p-sülfonamid) -6-kinolil oksiasetik asit (H₂L) ile kompleksleştirilmesi esasına dayalı potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. İki değerlikli metal iyonlarının (M²⁺) H₂L ile kompleksleşmesi %50 etanol-su içinde (298.2 K ve I=0.10 mol/L (NaClO₄)) gerçekleştirilmiştir. Potansiyometrik ve spektrofotometrik çalışmada, [ML] ve [ML₂]²⁻ komplekslerinin log (β₁/L/mol) ve log (β₂/L²/mol) değerleriyle karakterize olduğu gösterilmiş ve bu değerlerin sırasıyla 8.12±0.20 ve 17.06±0.11 olduğu belirtilmiştir.

Balpande ve ark.¹¹⁷ Hintli oral kanser (OSHK) ve prekanser (OL ve OSMF) hastalarının serumlarında Fe, Cu ve Zn elementlerinin seviyeleri ve Cu/Zn oranının belirlenmesine yönelik bir kolorimetrik yöntem kullanmışlardır. OSMF (78.90±9.07 µg/dL) ve OSHK (59.03±9.52 µg/dL) hasta serum örneklerinde ortalama serum Zn²⁺

derişiminin sağlıklı gönüllü (96.30±4.62 µg/dL) ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede (p<0.01) azaldığı, OL (91.96±7.85 µg/dL) ile sağlıklı gönüllü karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın (p=0.2) gözlenmediğı ve OL, OSMF ve OSHK arasındaki karşılaştırmada ise anlamlı bir farkın (p<0.01) olduğı bildirilmiştir.

Nayak ve ark.¹¹⁸ areka cevzinin kullanıldığı Hindistan, Güney Karnataka ve Kuzey Kerala kıyı bölgesinde yaşayan insanların doku ve serum örneklerinde eser elementlerin seviyesini belirlemek için bir vaka-kontrol çalışmasını kolorimetri yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaya 20 OSMF'li ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Ortalama serum Zn²⁺ derişiminin OSMF'li grupta 0.92±0.18 µg/mL olarak bulunduğı, sağlıklı gönüllüler ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak fark göstermediğı bildirilmiştir.

Shettar ve ark.¹¹⁹ OSMF'de klinik ve histolojik bulguları ilişkilendirmek amacıyla OSMF'li hastaların serumunda Zn ve Cu elementlerinin derişimini ve Cu/Zn oranını belirlemek için yarı otomatik bir kalorimetrik yöntem kullanmışlardır. Çalışmaya, 30 OSMF'li hasta ve 30 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. OSMF'li hastalar için hem klinik hem histopatolojik olarak gruplanan Khanna ve Andrade izlenmiştir. Ortalama serum Zn²⁺ derişimi sağlıklı gönüllü ve OSMF'li hastalarda sırasıyla 119.97±8.55 µg/dL ve 107.13±5.04 µg/dL olarak tespit edilmiştir. Ortalama serum Zn²⁺ derişiminin OSMF'li hastalarda sağlıklı gönüllülere göre anlamlı şekilde azaldığı (p<0.001) ve OSMF hastalarında klinik ve histolojik derecelendirmeler arasında ortalama serum Zn²⁺ derişiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğı bildirilmiştir.

Kode ve ark.¹²⁰ OSMF'li hasta serum ve tükürüklerinde eser element seviyelerinin belirlenmesine yönelik AAS ve diferansiyel pulslu anodik sıyırma voltametrisi yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmaya toplam 75 kişi dahil edilmiş ve OSMF'li ve gutkha alım (GA) öyküsüne göre üç gruba ayrılmıştır. (1. Grup: OSMF+GA, 2. Grup:

GA ve 3. Grup: GA olmayan (n=20)). 1., 2. ve 3. gruplarda ortalama serum Zn^{2+} derişimleri sırasıyla 1.79 $\mu g/mL$, 1.000 $\mu g/mL$ ve 1.2228 $\mu g/mL$; ortalama tükürük Zn^{2+} derişimleri sırasıyla 0.4472 $\mu g/mL$, 0.3821 $\mu g/mL$ ve 0.2740 $\mu g/mL$ olarak tespit edilmiştir.

Baharvand ve ark.¹²¹ oral kanserli hasta serumlarında Fe, Cu ve Zn elementlerinin belirlenmesine yönelik bir kolorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmaya oral kanserli 60 konsekütif hasta ile yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 66 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Zn^{2+} derişimleri 5-Brom-PAPS (2- (5-Bromo-2-piridilazo) -5- [N-n-propil-N-(3-sülfopropil) amino] fenol) ile kolorimetrik olarak analiz edilmiştir. Ortalama serum Zn^{2+} derişimi sağlıklı gönüllü ve oral kanserli hastalarda sırasıyla 64.57 ± 31.54 mg/dL ve 113.51 ± 52.30 mg/dL olarak tespit edilmiş ve Fe, Cu ve Zn element derişimlerinin kanserli hastalarda sağlıklı gönüllülere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir ($p < 0.001$).

Joseph¹²² OSMF'li hasta doku ve serumunda Cu/Zn oranını bir spektrofotometrik yöntem ile belirlemiştir. OSMF'li yaş ve cinsiyet koordinasyonlu 25 kişi üzerinde bir vaka-kontrol çalışması yapılmış ve 25 sağlıklı gönüllü ile karşılaştırılmıştır. OSMF hastalarında kontrollerle karşılaştırıldığında ortalama serum Cu^{2+} derişimleri artmış ve Zn^{2+} derişimleri azalmıştır. Ortalama Zn^{2+} serum derişimleri OSMF'li hastalarda 84.35 ± 14.54 $\mu g/dL$, sağlıklı gönüllülerde ise 98.54 ± 14.65 $\mu g/dL$ olarak tespit edilmiştir.

Adnan ve ark.¹²³ su örneklerinde Zn^{2+} derişiminin belirlenmesine yönelik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla piridin grubu içeren yeni bir benzenyl türevini sentezlemiş ve Zn^{2+} için floresans kemosensör olarak kullanmışlardır. Kemosensör N- (2 - [(4-Dimetilamino-benziliden) -amino] -etil)-N'-piridin-2-ilmetilen-etan-1,2-diamini (A), p-dimetilaminobenzaldehid, dietilentriamin ve o-piridinkarboaldehitin kondenzasyonu ile sentezlenmiştir. Kemosensörün geniş bir pH

aralığında Zn^{2+} 'ye karşı yüksek seçicilik ve hassaslık sergilediği, Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} ve Ni^{2+} 'nin emisyonu değiştirmedeği bildirilmiştir. Kemosensörün Zn^{2+} için tayin alt sınırının (LOQ) 3.5×10^{-5} M olduğu tespit edilmiştir. Sensör A'nın, pH 7.0'de (CH_3OH/H_2O , 9:1 (h/h), 10 mM Tris- HNO_3) Zn^{2+} için iyi bir floresans algılama kabiliyeti sergilediği ve analite doğrusal tepki ($R^2=0.99$) verdiği bildirilmiştir.

Wang ve ark.¹²⁴ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için floresans Zn^{2+} sensörü oluşumuna dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yüzeyi 3,5-di-tert-butyl-2-hidroksi benzaldehit (DTH) ile fonksiyonlaştırılmış manyetik $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerinin sentezinde; $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ bileşiklerinden yola çıkılarak manyetit nanopartikülleri elde edilmiş ve daha sonra bu nanopartiküller Stöber yöntemi ile ince bir silika tabakasıyla kaplanmıştır ($Fe_3O_4-SiO_2$). APTES'in DTH ile reaksiyonu sonucu elde edilen DTH-APTES bileşiği bu nanopartiküller ile reaksiyona sokulmuş ve DTH- $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartikülleri elde edilmiştir. 397 nm'de uyarılan DTH- $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartikülünün etanolde düşük kuantum verimiyle ($\Phi=0.0042$) 452 nm dalga boyunda emisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nanopartiküle Zn^{2+} (0-30 μM) yüklenmesi ile floresans şiddetinin kademeli olarak arttığı, emisyon maksimumunun 452'den 470 nm'ye kaydığı ve kuantum veriminin ($\Phi=0.11$, 26 kat) arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu sensörün Zn^{2+} seçiliğini Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} metal iyonlarının etkilemediği fakat Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} ve Hg^{2+} metal iyonlarının etkilediği bildirilmiştir.

Xu ve ark.¹²⁵ Zn^{2+} 'nin uzaklaştırılması ve belirlenmesi için spektrofotometrik ve AAS'ye dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla bir sol-jel işlemi ile 8-kloroasetil aminokuinolini (CAAQ) sentezlemişler ve $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmasını gerçekleştirmişlerdir ($Fe_3O_4-SiO_2-CAAQ$). $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ bileşiklerinden çıkarak Fe_3O_4 nanopartikülleri ve daha sonra trisodyum sitrat ile sitratla fonksiyonlaştırılmış Fe_3O_4 nanopartikülleri elde edilmiştir. Çekirdek-kabuk

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülleri sentezlenmiştir. K_2CO_3 katalizörü varlığında 8-kloroasetil aminokuinolin fonksiyonlu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülleri ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$) elde edilmiştir. Zn^{2+} 'nin asetonitril solüsyonuna eklenmesi ile anlamlı floresans artışının yanı sıra gözle görülebilir renk değişikliğinin meydana geldiğini belirtmişlerdir. Fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin yüksek doygunluktaki mıknatıslanmasının (24.7 emu/g) metal iyonlarının sulu çözeltiden ayrılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$ ile muamelesinden önce ve sonra Zn^{2+} iyonlarının değişimini izlemek amacıyla AAS kullanmışlar ve geri kazanımda %92.37'ye ulaşabildiğini bildirmişlerdir. $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ 'de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$ nanopartiküllerin Zn^{2+} 'ye duyarlılığı UV-Vis spektrumu ile araştırılmıştır. Zn^{2+} ilavesiyle, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$ nanopartiküllerinin yaklaşık 374 ve 301 nm'de iki belirgin absorpsiyon piki sergilediğini ve absorpsiyon şiddetinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ} + \text{Zn}^{2+}$ kompleksinin oluşumuna dayalı olarak Zn^{2+} derişiminin artırılmasıyla kademeli olarak arttığını, diğer metal iyonlarının (Ag^+ , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} ve Fe^{3+}) ise gözle görülebilir floresans değişimine neden olmadığını belirtmişlerdir.

Xu ve ark.¹²⁶ Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} için bir kolorimetrik floresans nanosensör olan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-QTEPA}$ 'nın sentezine dayalı bir spektrofotometri ve AAS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu amaç ile manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerini hazırlayıp N-(kuinolin-8-il) -2- (3-trietoksisilil-propilamino) -asetamit (QTEPA) ile "grafting from" yöntemini kullanarak fonksiyonlaştırmışlardır. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-QTEPA}$ 'nın 365 nm UV ışığı altında aydınlatılan Cd^{2+} (dodermblue), Zn^{2+} (deepskyblue) ve Cu^{2+} (domates kırmızısı) için farklı floresans tepkileri verip, Ag^+ , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} ve Fe^{3+} iyonları için ise gözle görülebilir değişim göstermediğini bildirmişlerdir. Gözle algılanan floresans değişikliklerinin, bu üç katyonun kalitatif analizi için kullanılabileceğini ve UV-vis spektrumundan elde edilen sonuçlara göre, çok fonksiyonlu nanopartiküllerin Cd^{2+} ve

Zn^{2+} için floresans artışı ve Cu^{2+} için floresans sönümleme sergilediğini bildirmişlerdir. Atomik absorpsiyon spektrumlarını kullanarak ağır metal iyonları için $Fe_3O_4-SiO_2$ -QTEPA'nın uzaklaştırma etkinliğini göstermişlerdir. Adsorpsiyon deneylerinin sonucuna göre nanomateriyalin, Cd^{2+} (%95.29), Zn^{2+} (%92.37) ve Cu^{2+} (%91.06) yönünden yüksek adsorpsiyon verimliliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Gu ve ark.¹²⁷ Hg^{2+} ve Zn^{2+} için geri dönüşümlü bir floresans sensörü olan Rhodamin 6G'nin (R6G) 8-AQ ile birlikte $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerine modifiye edilmesine dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. R6G türevi ve 8-AQ türevini, suda çözünür $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerine kovalent etkileşim yoluyla konjüge etmişlerdir. R6G'nin APTES ile reaksiyonu sonunda $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartikülleri ve QIOEt eklemişler ve R6G/8-AQ ile fonksiyonlaştırılmış $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerini elde etmişlerdir. R6G/8-AQ ile fonksiyonlaştırılmış $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerinin (0.4 mg/mL) 0.05 M HEPES tamponunun (pH 7.0) sulu çözeltisinde 548 ve 480 nm'de floresans emisyon bantları gösterdiğini belirtmişlerdir. Hg^{2+} ve Zn^{2+} ile koordine edildiğinde 548 nm'deki emisyon şiddetinin Hg^{2+} ile arttığını, 480 nm'deki emisyon şiddetinin ise Zn^{2+} ile arttığını belirtmişlerdir. Zn^{2+} için 3.3×10^{-9} - 3.9×10^{-8} M aralığında floresans şiddeti ile metal iyonu derişimleri arasında yaklaşık lineer ilişkiler bulunduğunu ve Zn^{2+} için LOD değerinin 3.0×10^{-9} M olduğunu bildirmişlerdir. R6G/8-AQ ile fonksiyonlaştırılmış $Fe_3O_4-SiO_2$ nanopartiküllerin, incelenen diğer yaygın metal iyonlara kıyasla Hg^{2+} ve Zn^{2+} 'ye karşı iyi seçicilik gösterdiğini ve bir mıknatıs kullanarak tavin edilen numunelerden geri kazanılabildiğini belirtmişlerdir.

Li ve ark.¹²⁸ Zn^{2+} için yeni bir floresans kemosensör olan β -CD/AD (adamantan) oluşumuna dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Zn^{2+} 'nin floresans titrasyonu, CH_3CN-H_2O (1/4, h/h) ile tampon içindeki Adamantan modifiyeli floresan / siklodekstrin ile modifiye edilmiş $Fe_3O_4-SiO_2$ inklüzyon kompleks (FFIC) manyetik

nanopartiküllerin (Tris-HCl, pH 7.1) 0.1 g/L çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uyarma dalga boyunun 390 nm, emisyon dalga boyunun ise 485 nm olduğunu belirtmişlerdir. Zn^{2+} 'ye karşı spesifik bir yeşil floresans artış sağlayabilen Adamantan modifikasyonlu floresein/siklodekstrin ile modifiye edilmiş $Fe_3O_4-SiO_2$ manyetik nanopartiküllerinin 4.5×10^{-7} mol/L LOD değerine sahip olduğu ve 2.5×10^{-7} mol/L- 62.5×10^{-7} mol/L derişim aralığında doğrusal olduğu ($R^2=0.9966$) bildirilmiştir. Florofor parçasındaki spirolaktam halkasının, Zn^{2+} 'nin girmesi ile açık olduğu, kompleksteki Zn^{2+} çıkarıldığı taktirde ise yeniden eski haline dönebildiği ve ayrıca bir gram FFIC manyetik nanopartiküllerin 6.1 mg Zn^{2+} adsorbe edebildiği belirtilmiştir. FFIC manyetik nanopartiküllerin, manyetizma ve tekrarlanabilirliklerinden dolayı sulu çözeltilerinde iyi bir yeniden kullanılabilirlik ve geri dönüştürülebilirlik sergilediğini bildirmişlerdir.

Rastogi ve ark.¹²⁹ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için yeni bir floresans nanosensör olan silika nanopartiküller üzerine kaplanmış QTEPA türevinin oluşumuna dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu işlevselleştirilmiş Si nanopartiküllerini Tris-HCl tamponu (pH 7.22) ortamında, Zn^{2+} 'nin maya hücresi (*Saccharomyces cerevisiae*) süspansiyonunda ve musluk suyunda spesifik olarak belirlenmesi için kullanmışlardır. Nanosensör, Tris-HCl tamponunda (pH 7.22) 1 μM Zn^{2+} iyonunun varlığında 330 ± 5 nm dalga boyu ile yaklaşık 2.8 kat floresans emisyon artışı ve yaklaşık 55 nm kırmızı-kayma göstermiştir. Diğer metal iyonlarının varlığının, nanosensörün duyarlılığı ve seçiciliği üzerinde gözle görülür bir etkisi olmamış ve Zn^{2+} iyonları seçici olarak submikromolar algılama ile 0.1 μM limitine kadar tespit edilmiştir. Sensör, maya hücresi ortamında Zn^{2+} 'nin belirlenmesinde iyi bir uygulanabilirlik, musluk suyu örneklerinde ise floresans şiddetinde artış göstermiştir.

Sun ve ark.¹³⁰ Zn^{2+} 'nin belirlenmesi, adsorpsiyonu ve uzaklaştırılması için bir çekirdek-kabuk manyetik fibröz silika sensör probu ($AQ-Fe_3O_4-SiO_2-KCC-1$)

geliştirmişlerdir. Çekirdek süperparamanyetik Fe₃O₄ nanodottan, kabuk ise fibröz silika moleküler elek KCC-1'den oluşturulmuş ve bir kinolin türevi prob ile kaplanmıştır. Bu fonksiyonel materyalin Zn²⁺ iyonlarının varlığında floresans şiddetinde artış sağladığını ve sulu çözelti içindeki rakip metal iyonları varlığında Zn²⁺ için yüksek seçicilik sergilediğini belirtmişlerdir. AQ-Fe₃O₄-SiO₂-KCC-1 – Zn²⁺ komplekslerinin bağlanma oranını Job plot yönteminden 1:1 olarak belirlemiş, bağlanma sabitini ise 1.08x10⁻⁷ M LOD değeri ile 1.85x10⁵ M olarak hesaplamışlardır. AQ-Fe₃O₄-SiO₂-KCC-1 üzerindeki Zn²⁺ adsorpsiyon işlemi Langmuir izoterm denklemi ile tanımlanmış ve denge adsorpsiyon kapasitesi 157.2327 mg/g olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre çok işlevli manyetik fibröz silika sensör malzemelerinin Zn²⁺'nin toksikolojik ve çevresel alanlarda basit tespiti ve verimli şekilde uzaklaştırılması için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Xu ve ark.¹³¹ fonksiyonlaştırılmış Fe₃O₄-SiO₂ nanopartiküllerinin Cd²⁺, Zn²⁺ ve Cu²⁺ ile adsorpsiyonunu ve bu iyonlara karşı eşzamanlı floresans tepkisini incelemek amacıyla bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu bağlamda (QTEPA) ile fonksiyonlaştırılmış Fe₃O₄-SiO₂ nanopartiküllerinin, 365 nm UV ışığı altında aydınlatılan Cd²⁺ (doderblue), Zn²⁺ (deepskyblue) ve Cu²⁺ (domates kırmızısı) için farklı floresans tepkileri sergilerken aynı deney koşulları altında Ag⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺ ve Fe³⁺ için görünür bir değişiklik göstermediğini, UV-vis spektrumları sonuçlarına göre ise, bu çok işlevli nanokompozitlerin Cd²⁺ ve Zn²⁺ için floresans artışı ve Cu²⁺ için floresans sönümleme gösterdiğini belirtmişlerdir. Adsorpsiyon deneyleri sonucunda ise, nanokompozitin Cd²⁺ (%95.29), Zn²⁺ (%92.37) ve Cu²⁺ (%91.06) iyonlarına karşı yüksek adsorpsiyon etkinliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.13. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Yöntem problemleri, geçerlilik testlerinin tamamını yapmakla minimize edilebilir.

Geçerlilik testi, bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür.

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgeleri ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Yöntem geçerlilik testleri için kurallar oluşturan grupların bazıları; ICH (The international Conference on Harmonization), GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice), FDA (Food and Drug Administration) ve USP Farmakope XXIV'dir. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler;

1. Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity)
2. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)
3. Doğruluk (Accuracy)
4. Kesinlik (Precision); Tekrarlanabilirlik (Repeatability), Arakesinlik (Intermediate Precision) ve Yenilenebilirlik (Reproducibility)
5. Duyarlılık Limiti (Sensitivity); LOD ve LOQ
6. Geri kazanım (Recovery)
7. Sağlamlık /Dayanıklılık (Robustness/ Ruggedness)
8. Örneklerin Kararlılığı, Stabilitate (Stability).¹³²

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Dipikolilamin ($\geq\%97$), paraformaldehit, 2, 7 DCF, PIPES ($\geq\%99.9$), Tris-HCl, EDTA, HOBt ($\geq\%97$), HBTU ($\geq\%98$), DIEA ($\geq\%98$), demir(III) asetilasetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$ (%97), benzil eter (%99), oleyilamin (%70), sikloheksan, Igepal-Co-520, MnCl_2 , ZnCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CrCl_2 , CoCl_2 , MoCl_2 , FeCl_2 , NiCl_2 , AgCl , SnCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 , TiCl_4 , AlCl_3 , KCl, NaCl, NH_4OH , KOH, KH_2PO_4 , sodyum azid, D-(+)-glukoz, üre, α -amilaz, lizozim, H_3PO_4 , TEOS, APTES, asetonitril, etanol, metanol, hekzan, DMSO, THF, DMF, kloroform, aseton ve kullanılan diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Milli-Q saflıkta su kullanıldı.

Biyolojik matriks olarak kullanılan insan tükürük örneği Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalına başvuran sağlıklı kişi, oral prekanser ve oral kanser hastalarından elde edildi.

3.1.2. Analiz ve Görüntüleme Cihazları

Floresans ölçümleri için, Xenon deşarjlı lamba, Monk-Gillieson tipi monokromatör (λ :200-800 nm) ve Vestel model bilgisayar içeren Perkin Elmer LS 45 marka spektrofotometre cihazı kullanıldı.

Yüzey analizlerinde, 120 kV güç hızlandırma ile çalışan FEI Technai G² Spirit BiO(TWIN) marka TEM cihazı, yüksek çözünürlüklü TEM analizleri için 200 kV güçte çalışan JEOL-2100F marka TEM cihazı ve X-ışınları kırınımı desenleri analizi için Cu-K α ışınması yapan ($\lambda=1.54059 \text{ \AA}$) ve çalışma voltajı 35 kV olan Pan Analytical Empyrean XRD cihazı kullanıldı.

Yapı karakterizasyonu için Bruker Avance DPX 400 MHz marka Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) (^1H -NMR ve ^{13}C -NMR) spektroskopi cihazı, Attenuated

Total Reflectance (ATR) modülü ile Bruker Vertex 80V marka FT-IR cihazı ve Agilent MSD içeren Agilent 1200 Series HPLC marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrofotometre (HPLC/MS) cihazı kullanıldı.

Metal miktar tayini için Agilent 7800 ICP-MS kullanıldı. Cihaz için kullanılan argon gazı %99.999 saflığa sahiptir.

pH ölçümleri, laboratuvar oda koşullarında (22-25°C), standart tamponlar (Fixanal, Riedel-deHaen, Almanya) ile kalibre edilmiş Ohaus Starter 3000 marka pH metre ile yapıldı. Çalışmada kullanılan diğer cihazlar ise sırasıyla santrifüj (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 8, 16000 rpm), terazi (Metler Toledo Ad 104-5), karıştırıcı vorteks (IKA), etüv (Mettler) ve ultrasonik banyo (Elma LC30) cihazlarıdır. Ayrıca istenilen hacimlerde çözücü ve çözelti aktarımı için Eppendorf Research serisi 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL otomatik pipetler kullanıldı.

3.2. Deneylerde Kullanılan Analiz ve Görüntüleme Yöntemlerinin Şartları

HPLC/MS Yöntem Şartları: Sentez edilen Zinpir-1 bileşiğinin karakterizasyonu için kullanılan HPLC/MS'in yöntem şartları Tablo 3.1'de verildi. Bu çalışmada yapılan analizler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. HPLC/MS Yöntem Şartları

Yöntem Şartları	
MS Azot Gazı Akış Hızı	11L/dak
MS Azot Gazı Sıcaklığı	300°C
MS Charging Voltaj	2000 V
LC Kolon Akış Hızı	0.2 mL/dak.
LC Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS parametreleri	SCAN ve negatif iyon modunda atmosfer basıncında elektrosprey iyonlaşma (API-ES)
Bulunan m/z değeri	823.3

NMR Yöntem Şartları: Sentez edilen Zinpir-1 bileşiğinin karakterizasyonunu belirlemek için alınan ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları sırasıyla 400 MHz ve 100

MHz’de ölçüldü. Her iki durumda da döndürme frekansı 4.5 kHz, tekrarlama süresi 1 s idi ve sinyaller 500-1000 kez toplandı. Çekirdeğin kimyasal kayması SiMe₄ iç standart örnekleri kullanılarak ölçüldü. Bu çalışmada yapılan analizler Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesinde gerçekleştirildi.

TEM Yöntem Şartları: Sentez edilen Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartiküllerinin TEM görüntülerini elde etmek için kullanılan TEM cihazının yöntem şartları sırasıyla; 80-200 kV ayırma gücü, 0.19 nm nokta, 50X-1.500.000X büyütme, 20-200 nm TEM spot size, 0.5-25 nm EDS spot size, ± 20 derece tilt, X, Y: 2 mm, Z: ± 0.1 nm shift parametreleridir. Bu çalışmada yapılan TEM görüntüleme analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi laboratuvarında yapıldı.

FT-IR Yöntem Şartları: Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülü ve Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin FT-IR analizleri Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Her bir örnek için 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 4 cm⁻¹ çözünürlükle 128 tarama kaydedildi. Toz örneklerin ATR spektrumları ZnSe kristali üzerinde mikrometre-kontrollü sıkıştırma elemanı kullanılarak alındı.

XRD Yöntem Şartları: Fe₃O₄ nanopartikülünün kristalografik özellikleri hakkında bilgi edinmek için $\lambda = 1.5405 \text{ Å}$ (0.154 nm) dalga boyuna sahip Cu-K α kaynaklı XRD cihazı ile ölçümler yapıldı. $2\theta=10-90^\circ$ aralığında 4 derece/dakika tarama hızında difraktogramlar elde edildi. Bu çalışmada yapılan analizler, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Analitik Kimya laboratuvarında yapıldı.

ICP-MS Yöntem Şartları: Sentez edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin, Zn²⁺ yükleme kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan ICP-MS yönteminde plazma ortamı argon gazı (yüksek saflıkta) ile oluşturuldu. Metan ve helyum reaksiyon gazları olarak kullanıldı. Cihaz parametreleri olarak, 1.40 L/dk auxiliary gaz ve

18 L/dk plazma gaz akış hızı seçildi. Bu çalışma, DAYTAM laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

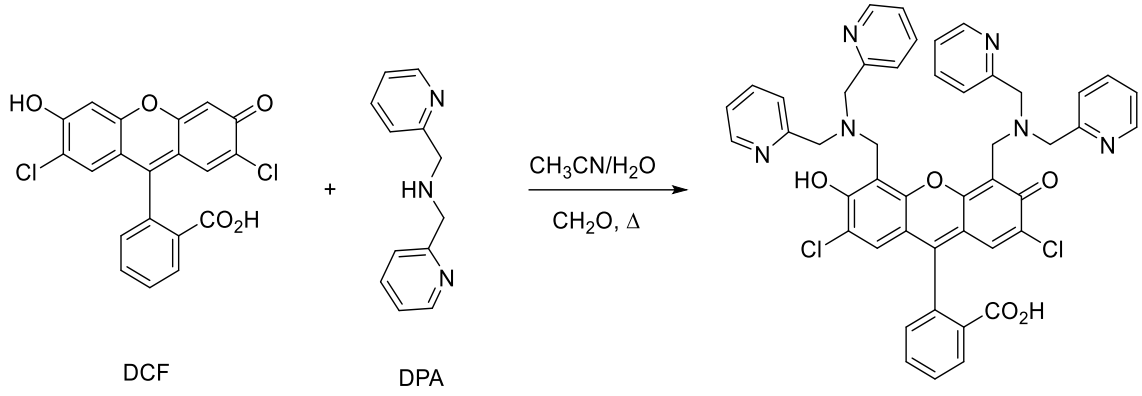
Spektroflorometre Yöntem Şartları: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ -(Zinpir-1) nanokompozitleri ile sağlıklı gönüllüler, oral prekanser ve oral kanser hastalarının tükürük örneklerinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) ile muamelesi sonucu oluşan ve manyetik olarak ayrılan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ -(Zinpir-1) nanokompozit çözeltilerinin spektrofotometrik yöntem şartları Tablo 3.2’de verildi. Bu çalışmada yapılan analizler Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Merkezi laboratuvarında yapıldı.

Tablo 3.2. Spektroflorometre Yöntem Şartları

Yöntem Şartları	Emisyon
Start Lamba (nm)	496
Stop Lamba (nm)	688
Tarama Hızı	Fast
Uyarma Monokromatörün Slit Aralığı	3.0
Emisyon Monokromatörün Slit Aralığı	3.0
Referans Dalgaboyu (nm)	490 (Uyarma)
Hassasiyet	High

3.3. 9-(o-Karboksifenil) -2,7-dikloro -4,5-bis [bis(2-piridilmetil)-aminometil] -6-hidroksi-3-ksenton (Zinpir-1) Sentez Prosedürü

Zinpir-1 bileşiği Mannik kondenzasyon tepkimesi ile sentezlendi. Bu amaç ile DPA (0.3 g, 1.50 mmol) üzerine paraformaldehit (0.045 g, 1.50 mmol) ve 4 mL asetonitril ilave edilerek 30 dakika kaynatıldı. Diğer bir balonda 2, 7 DCF (0.2 g, 0.5 mmol) 6 mL asetonitril-su (1:1) çözücüsü içinde süspansiyon haline getirildikten sonra, bu karışım dipikolilamin-paraformaldehit çözeltisine 30 dakika içinde kısım kısım ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı (Şekil 3.1) 4 saat kaynatıldı. İnce tabaka kromatografi yöntemi ile reaksiyonun bittiği tespit edildikten sonra asetonitril rotavapor ile reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Oluşan pembe renkteki katı çökelti süzülerek soğuk su ile birkaç kez yıkandı ve etanol ile kristalize edilerek oda koşullarında kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.1. Zinpir-1 bileşiğinin sentez reaksiyonu

3.3.1. Zinpir-1'in Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama

¹H- NMR ve ¹³C- NMR: 10 mg toz Zinpir-1 bileşiği tartıldı ve 1 mL DMSO-d₆ içerisinde çözülerek hazırlandı.

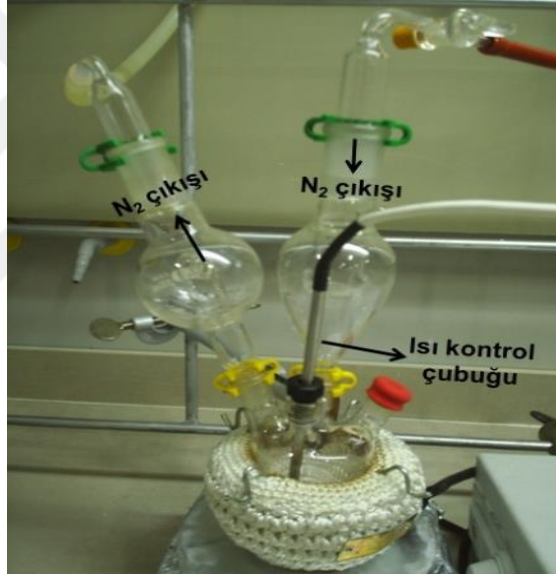
HPLC-MS: 10 mg Zinpir-1 bileşiği tartıldı, 100 mL'lik balon jojeye koyuldu. Bir miktar metanol ile çözülüp 100 mL'ye metanol ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti metanol ile seyreltilerek 10 µg/mL derişimde çözeltisi hazırlandı.

FT-IR: 10 mg toz örnek Zinpir-1 bileşiği tartıldı ve ZnSe kristalinin üzerine yerleştirildi.

3.4. Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerinin Sentezi

Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin sentezi, ısı kontrolünün yapılabildiği ve inert gaz atmosferinde (N₂ veya Ar gazı) çalışmaya olanak sağlayan 4 boyunlu özel tasarım bir cam reaktör sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Örnek bir Fe₃O₄ manyetik nanopartikül sentezinde; azot gazı akışı altında başlangıç kompleksi Fe(acac)₃, 15 mL benzil eter ve 15 mL oleyilamin karışımı içerisinde 1000 rpm'de manyetik karıştırılma ile 4 boyunlu reaktör içerisinde iyice çözüldü. Daha sonra elde edilen açık kırmızı renkte karışımın sıcaklığı 120°C'ye çıkarıldı ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilerek reaktör ortamındaki nemin giderilmesi sağlandı. Bu aşama sonrasında karışımın renginin koyu kırmızı renge dönüştüğü gözlemlendi. Daha sonra karışımın sıcaklığı kontrollü bir şekilde

(18-20°C/dk) 295°C'ye yükseltilerek bu sıcaklıkta 1 saat bekletildi. Bu aşamada karışımın koyu kırmızı renginin koyu kahverengi renge dönüştüğünün gözlenmesi Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin oluştuğunun göstergesidir. Son olarak karışım 40-50°C sıcaklığa ulaşana kadar soğutuldu ve 50 mL'lik 2 farklı santrifüj tüpüne ayrılarak üzerlerine 40 mL etanol ilavesi sonrasında 8500 rpm'de 12 dakika santrifüj yapılarak Fe_3O_4 manyetik nanopartikül karışımdan ayrıldı. Santrifüj tüplerinin iç çeperine yapışmış olan manyetik nanopartiküller hekzan ilavesi ile yeniden dispers edildi ve santrifüj işlemi 40 mL etanol ilavesiyle tekrarlandı. Ayrılan manyetik nanopartiküller hekzan içerisinde dispers edilerek bir sonraki aşama için muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan özel reaktör sisteminin temsili bir fotoğrafı

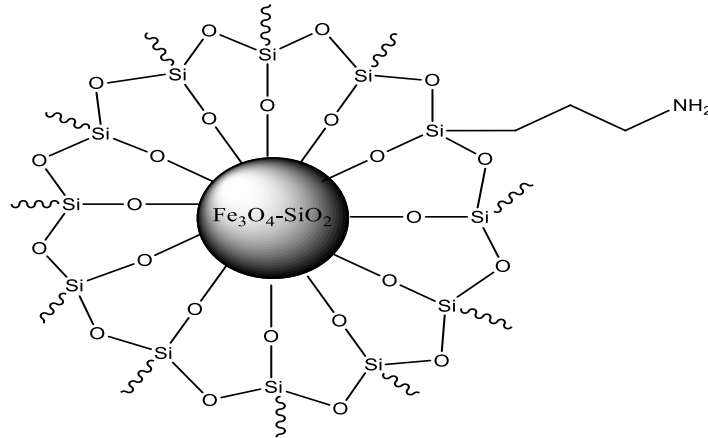
3.4.1. Fe_3O_4 Manyetik Nanopartiküllerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama

TEM: Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin seyreltik hekzan dispersiyonu oluşturuldu. Bu dispers çözeltiden bir damla alındı ve amorf karbon ile kaplanmış bakır TEM ızgaralara deposit edildi.

XRD: 10 mg Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri tartıldı ve numune tutucuya yerleştirildi.

3.5. Fe_3O_4 Manyetik Nanopartikül Yüzeyinin Silika ile Kaplanma ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ Manyetik Nanopartikülünün Amin Sonlu Grup ile Yüzey Modifikasyonu ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) Prosedürü

Basit gravimetrik yöntem ile yoğunluğu belirlenen Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin hekzan dispersiyonundan 500 mg manyetik nanopartikül olacak şekilde alındı ve 100 mL sikloheksan içerisinde çözüldü. Elde edilen karışım içerisinde 7 g Igepal-Co-520 ilave edildi ve karıştırıldı. Daha sonra 2 mL NH_4OH çözeltisi eklendi ve hemen akabinde hızlı bir şekilde silika kaynağı olarak kullanılan 3 mL TEOS karışımına eklendi. Elde edilen karışım şiddetli bir şekilde 7 saat karıştırıldı. Belirtilen süre sonunda karışım içerisinde 8.0 mL APTES eklendi ve 3 saat daha şiddetli bir şekilde karıştırılarak, silika kaplı Fe_3O_4 manyetik nanopartikülün yüzeyi amin sonlu APTES molekülleri ile fonksiyonlaştırıldı. Bu reaksiyonun sonunda elde edilen manyetik nanopartiküllerinin temsili yapısı Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin temsili yapısı

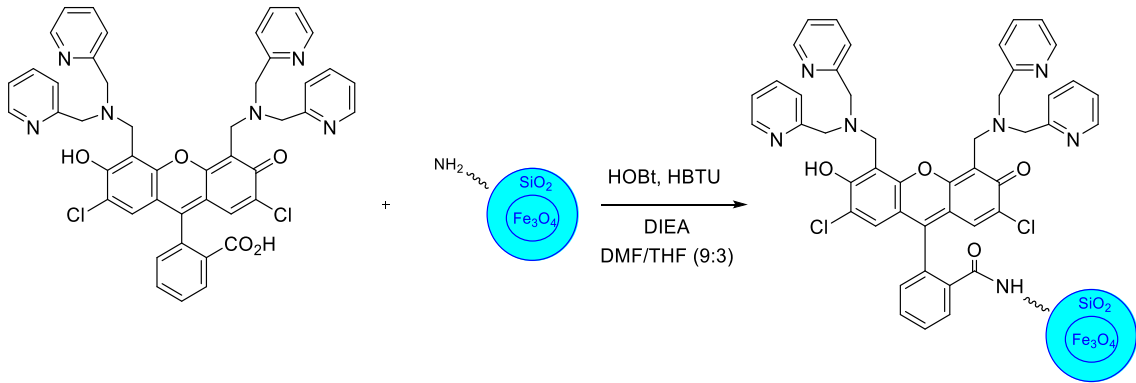
3.5.1. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ Manyetik Nanopartiküllerinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama

TEM: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ manyetik nanopartikülleri için ayrı ayrı seyreltik hekzan dispersiyonu oluşturuldu. Bu dispers çözeltilerden birer damla alındı ve amorf karbon ile kaplanmış bakır TEM ızgaralara deposit edildi.

FT-IR: 10'ar mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülleri tartıldı ve ZnSe kristalinin üzerine yerleştirildi.

3.6. Zinpir-1 ile Modifiye Edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ Nanokompozitinin Sentezi

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin sentezi için, HOBt (100.39 mg, 0.655 mmol), HBTU (248.62 mg, 0.655 mmol), Zinpir-1 (450 mg, 0.546 mmol) ve DIEA'nın (0.380 mL, 2.19 mmol) susuz THF (9mL) içerisindeki çözeltisine susuz DMF (3 mL) içerisinde dispers edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülünün (100 mg) süspansiyonu ilave edildi. Reaksiyon karışımı 80°C sıcaklıkta 48 saat kaynatıldı. Manyetik olarak ayırımı yapılan ürün kloroform ile 3 kez yıkandı ve 8500 rpm'de (10 dakika $\times$ 3) santrifüj yapıldı. Elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompoziti oda sıcaklığında kurutuldu. Şekil 3.4'te $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin temsili reaksiyonu gösterilmektedir.



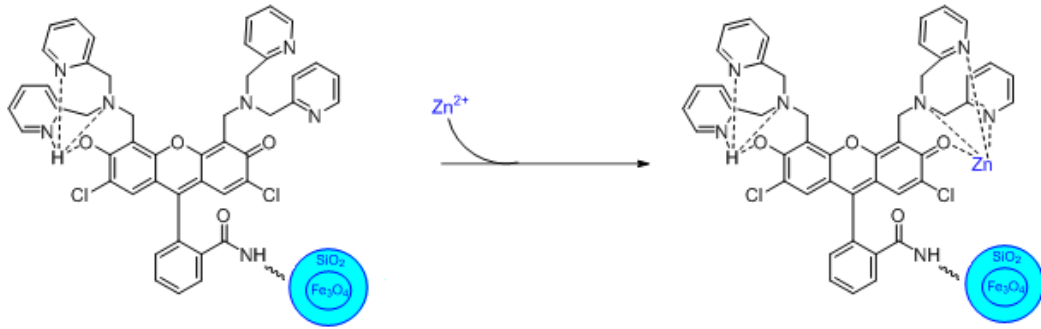
Şekil 3.4. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin temsili reaksiyonu

3.6.1. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama

FT-IR: 10 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompoziti tartıldı ve ZnSe kristalinin üzerine yerleştirildi.

3.7. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitine Zn²⁺ Yükleme Prosedürü

Metal derişimi nanokompozitteki Zinpir-1 derişimi ile stokiyometrik olarak 1:1 olacak şekilde 12.81 mg ZnCl₂, 20 mL 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3, 100 mM KCl, 50µM EDTA, pH 7.2) tampon çözeltisinde çözöldü. 30 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) ligandı ilave edildi. 20 dakika oda koşullarında bekletildi. Manyetik olarak ayrılan ürün 3 kez deiyonize su ile yıkandı. 8500 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra asetonla yıkanıp oda koşullarında kurumaya bırakıldı. Şekil 3.5’te Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin temsili reaksiyonu gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin temsili reaksiyonu

3.7.1. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Analizlerinde Kullanılan Yöntemlerde Örnek Hazırlama

ICP-MS: Ticari olarak satın alınan 10 ppm ICP-MS standart Fe ve Zn çözeltisinden %2’lik HNO₃ çözeltisi ile uygun seyreltmeler yapılarak Fe ve Zn elementlerinin derişimi 1-1000 ppb aralığında olacak şekilde standart çalışma çözeltileri

hazırlandı. Fe içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) ve Fe ve Zn içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ -(Zinpir-1) nanokompozitlerinden 1'er mg örnek alındı ve 10'ar mL %2'lik HNO_3 çözeltisinde çözülerek örnek çözeltileri hazırlandı.

FT-IR: 10'ar mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ -(Zinpir-1) nanokompozitleri tartıldı ve ZnSe kristalinin üzerine yerleştirildi.

3.8. Yapay Tükürük Çözeltisinin Hazırlanması ve Yapay Tükürükten Zn^{2+} nin Manyetik Olarak Ayrılma Prosedürü

Yapay tükürük çözeltisi için $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (185 mg), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (150 mg), KH_2PO_4 (420 mg), sodyum azid (2.0 mg), D-(+)-glukoz (100 mg), KCl (475 mg), NaCl (700 mg), üre (45 mg), α -amilaz (100.0 U), lizozim (750.0 U), H_3PO_4 (4 U) tartıldı ve 900 mL distile su içerisinde çözüldü. Çözeltiye KOH eklenerek pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacmi 1 L'ye tamamlandı.

Deney tüpüne 1 mL hazırlanan yapay tükürük örneği koyuldu. Yapay tükürük üzerine uygun derişimlerde 10 μL ZnCl_2 çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım 0.1 mL 1 M HCl çözeltisi ile asitlendirilip 1 dakika vortekslendi ve daha sonra 0.1 mL 1 M NaOH eklendi ve yine 1 dakika vortekslenerek çözelti nötralleştirildi. Çözeltiye daha sonra 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (pH 7.2) tamponu içerisinde hazırlanan 3 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin dispers çözeltisi eklendi ve Zn^{2+} iyonları ile etkileşimi sağlamak amaçlı 20 dakika oda koşullarında bekletildi. Daha sonra elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ -(Zinpir-1) nanokompozitleri bir magnet yardımı ile tutularak süpernatant uzaklaştırıldı ve belirtilen tampon çözeltisi içerisinde derişimi 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı.

3.9. Zn^{2+} Yüklenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Spektrofluorometrik Analizinde Kullanılan Stok, Standart, Kalite Kontrol ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

0.01 M Tris-HCl Tampon Çözeltisi (pH 7.2): DMSO ile Milli-Q saflıkta H_2O 2:3 (h/h) oranında karıştırıldı. Daha sonra 157.6 mg Tris-HCl, 744 mg KCl ve 1.86 mg EDTA tartıldı ve 100 mL'lik balon jofeye aktarıldı. Yaklaşık 90 mL DMSO- H_2O çözücü karışımı ilave edilerek balon jofedeki maddelerin çözünmesi sağlandı. Çözeltinin pH'ı pH metre kullanılarak 0.1 M NaOH çözeltisi ile 7.2'ye ayarlandı. Hacim 100 mL'ye DMSO- H_2O çözücü karışımı ile tamamlanarak pH 7.2'de 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl tampon çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti her analiz öncesi taze olarak hazırlandı.

1mg/3mL $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) Nanokompozit Çözeltisi: 1 mg $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (pH 7.2) tampon çözeltisinde ultrasonik banyoda çözülerek 1mg/3mL çözeltisi hazırlandı.

$ZnCl_2$ 'ün Stok, Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltileri: 100 μ g/mL $ZnCl_2$ çözeltisini hazırlamak için 10 mg $ZnCl_2$ tartıldı ve 100 mL'lik balon jofeye koyuldu. Bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra 100 mL'ye su ile tamamlandı. Vorteks ile 1 dk karıştırıldı. $ZnCl_2$ 'ün 100 μ g/mL derişimde hazırlanan standart stok çözeltisi, su ile seyreltilerek final derişimi 20-160 ng/mL Zn^{2+} olacak şekilde standart çalışma çözeltileri ve 40, 80 ve 120 ng/mL Zn^{2+} olacak şekilde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.8'de verilen manyetik ayırma yöntemiyle tükürükten Zn^{2+} 'nin ayrımı yapılarak yine final derişimleri 20-160 ng/mL Zn^{2+} olacak şekilde standart çalışma çözeltileri ve 40, 80 ve 120 μ g/mL olacak şekilde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ti^{4+} ve Al^{3+} **Metal İyonlarının Stok ve Çalışma Çözeltileri:** Herbir metalin 1 mg/mL stok çözeltilerini hazırlamak için $MnCl_2$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CrCl_2$, $CoCl_2$, $MoCl_2$, $FeCl_2$, $NiCl_2$, $AgCl$, $SnCl_2$, $CuCl_2$, $HgCl_2$, $TiCl_4$, $AlCl_3$, KCl ve $NaCl$ tuzlarının her birinden 10 mg tartıldı ve 10 mL'lik balon jöjelere koyuldu. Bir miktar deiyonize suda çözülüp hacimleri 10 mL'ye tamamlanarak 1 mg/mL derişimdeki metal iyonlarının ara stok çözeltileri elde edildi. Bölüm 3.8'de verilen manyetik ayırma yöntemiyle tükürükten her bir metalin ayırımı yapılarak final derişimleri 160 $\mu g/mL$ olacak şekilde çalışma çözeltileri hazırlandı.

3.10. Zn^{2+} ile Yüklenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitin Oluşumunda Zamanın Etkisi

Zn^{2+} yüklemesi ile $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitini oluşturmak üzere gerçekleştirilen reaksiyonun dengeye gelmesi ve kararlılık sürelerinin belirlenmesi amacıyla $ZnCl_2$ 'ün 10 $\mu g/mL$ derişimde hazırlanan standart stok çözeltisi, su ile seyreltilerek final derişimi 80 ng/mL Zn^{2+} olacak şekilde standart çözelti hazırlandı.

3.11. Metal İyon Seçicilik Prosedürü

Zn^{2+} iyonuna karşı $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin seçiciliğini araştırmak için Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ti^{4+} ve Al^{3+} metal iyonları ile çalışıldı. Bunun için klorürlü bileşiklerinden elde edilen bu metal iyonlarının her birinin sulu stok çözeltileri Bölüm 3.9'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Yapay tükürük içerisine final derişimi 160 ng/mL olacak şekilde 5 μL stok metal çözeltilerinden eklendi. Daha sonra 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (pH 7.2) tamponu içerisinde hazırlanan 1mg/3mL $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozit çözeltileri ile Bölüm 3.8'de belirtildiği şekilde etkileştirildi ve manyetik ayırımı yapıldı.

3.12. Spektroflorometri Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu

3.12.1. Özgünlük (Belirleyicilik) / Seçicilik

FDA rehberine göre, örnek içinde bütün komponentlerin varlığında analitin cevabını doğru bir şekilde ölçmek özgünlük/seçicilik parametresinin tanımı olarak verilirken, ICH rehberine göre, özgünlük tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem olarak tanımlanırken, seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem şeklinde tanımlanır.

Zn^{2+} yüklenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin hazırlandığı tampon çözelti (100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren pH 7.2, 0.01 M Tris-HCl) ve yapay tükürük çözeltilerinin $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin floresans şiddeti üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin olup olmadığı saptandı. Bu uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücünün emisyon pikinin $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon pikinden farklı dalga boyunda olduğu görüldü. Ayrıca tüm aşamalarda oluşturulan bileşik ve nanoyapıların NMR, TEM, XRD, FT-IR ve ICP-MS yöntemleri kullanılarak karakterizasyonu yapıldı.

3.12.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlendiği ve bunun için en düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözeltilerin hazırlandığı işleme doğrusallık denir. Bu doğrusal aralık belirlendikten sonra çözelti derişimlerine karşı ölçülen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı kalibrasyon eğrisinin analizi ile elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsü iken çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği analit derişim genişliği şeklinde tanımlanır.

Bölüm 3.9’da belirtildiği şekilde hazırlanan 1mg/3mL $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozit çözeltisi üzerine final derişimi 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140

ve 160 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} eklenerek standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Yapay tükürük içerisinde Bölüm 3.8’de belirtildiği gibi elde edilen 8 farklı derişimde (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160 ng/mL) Zn^{2+} tükürük çalışma çözeltileri hazırlandı. En uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında floresans şiddetleri kaydedildi. Zn^{2+} derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı.

3.12.3. Doğruluk/Kesinlik

Bağıl ya da mutlak hata ile ifade edilen doğruluk, deneysel olarak belirlenmiş değerin, gerçek veya kabul edilebilir değere olan yakınlığı olarak tanımlanır. Yöntemin doğruluğu; bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analiz sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması, sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırılması ve hedef derişim üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılması olmak üzere üç yolla gösterilebilir.

Kesinlik, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Bağıl standart sapma (%BSS) veya varyasyon katsayısı ile verilir. Kesinlik üç basamakta ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability): Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Güniçi kesinlik olarak da adlandırılır.

Ara kesinlik (Intermediate precision): Aynı çalışma şartlarında laboratuvarlar arasındaki farkların (gün değişikliği, analizci değişikliği, cihaz değişikliği gibi) kesinlik değerlerinin göstergesidir. Günlerarası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır.

Yenilenebilirlik (Reproducibility): Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu).

Bölüm 3.9’da belirtildiği şekilde hazırlanan 1mg/3mL Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozit çözeltisi üzerine kalibrasyon eğrisinde Zn²⁺’nin yüksek orta ve düşük derişimlerini temsil eden final derişimi 40, 80 ve 120 ng/mL olacak şekilde Zn²⁺ eklenerek standart kalite kontrol çözeltileri ve yine aynı derişimlerde Bölüm 3.8’de belirtildiği gibi yapay tükürükten manyetik ayırma ile elde edilen kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 3 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 3 kez) emisyon spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi ve değişim katsayıları hesaplandı. Doğruluk bağıl hata ile (BH), [BH=(bulunan-eklenen/eklenen)x100] ve kesinlik ise % bağıl standart sapma (% BSS) [% BSS= standart sapma/ortalama x100] ile verildi.

3.12.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ))

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür. Duyarlılık iki basamak olarak düşünölmektedir.

LOD: Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı, bir numunede incelenen maddenin belirlenebilen en düşük tayin miktarıdır. Tipik olarak LOD pik boyunun güröltü yüksekliğine oranının 3 olduğu veya % BSS değerinin %20’den küçük olduğu derişimdir. Ayrıca LOD= 3.3 σ /S formölü ile hesaplanabilir. Burada σ , kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması ve S ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

LOQ: Bir analitik yöntemin tayin alt sınırı analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimidir. Tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin güröltü yüksekliğine oranının 10 olduğu veya % BSS değerinin %10’dan küçük olduğu derişimdir. Ayrıca LOQ= 10 σ /S formölü ile hesaplanabilir.

LOD ve LOQ değerleri Bölüm 3.12.2’de belirtildiği gibi standart ve yapay tükürükten manyetik ayırma ile elde edilen Zn^{2+} için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$LOD= 3.3 \sigma/S \text{ ve } LOQ=10 \sigma/S$$

3.12.5. Geri Kazanım

Kimyasal analizlerde gerçek değerin ölçülmesi, uygulanan yöntemle bağlı olarak değişiklik gösterir. Deneysel işlemler sırasında bazı nedenlerle oluşan kayıp miktar oranının ve belirsizliğinin hesaplanması gerekir. Yöntemin kayıp miktarı, geri kazanım oranı olarak tanımlanır. Analiz sonucunda elde edilen değerin gerçek değere oranı geri kazanımı verir.

Zn^{2+} ’nin kalibrasyon standart çözeltileri yapay tükürük içerisine eklendi, karıştırıldı ve sırasıyla Bölüm 3.8’de verilen yöntem ile elde edildi. Elde edilen çözeltilerin emisyon spektrumu alındı. Aynı zamanda standart çözeltilerin de emisyon spektrumu alındı. Geri kazanım $[(\text{bulunan/eklenen}) \times 100]$ formülü ile hesaplandı.

3.13. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerden Tükürük Örneklerinin Toplanma Prosedürü

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalına tedavi amacıyla başvuran, yaşları 31 ile 71 arasında değişen altısı bayan onikisi erkek 12 hasta (6 oral prekanser ve 6 oral kanser) ve 6 sağlıklı olmak üzere toplam 18 gönüllü çalışmamıza dahil edildi (Tablo 3.3.). OLP tanısı almış ve alınan biyopsi sonucuna bağlı olarak oral kanser tanısı almış OSHK’lı hastalar ile iletişime geçilerek “bilgilendirilmiş onay formu” ile bilgilendirilip onay alındıktan sonra tükürük örnekleri toplandı. Sistemik hastalık, uzun süreli ilaç alımı, geçmiş kanser hikayesi veya antioksidan ilaç öyküsü olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmada günlük varyasyonların ve diğer rahatsızlık faktörlerinin tükürük kompozisyonu üzerindeki

etkisini en aza indirmek için gönüllülerin uyarılmamış tükürük örnekleri sabah saatlerinde toplandı. Gönüllüler, örnekler toplanmadan en az bir saat önce yiyip içmeyi bıraktı. Tükürük örnekleri toplanmadan hemen önce ağız içi deiyonize su ile durulanıp daha sonra 2 dakika içerisinde ağız boşluğundan tek kullanımlık damlalık pastör pipet ile toplandı. 6 oral prekanser hastası, 6 oral kanser hastası ve 6 sağlıklı gönüllü bireyden alınan tükürük örnekleri dereceli plastik viallere aktarıldı ve analiz zamanına kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.3. Çalışmaya Alınan Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllü Kişilerin Özellikleri

Gönüllü	İsim	Cinsiyet	Yaş
Sağlıklı	AP	E	39
	KM	E	61
	UM	E	31
	NA	E	70
	EP	K	34
	GG	K	43
Oral Prekanserli	EG	E	35
	AŞ	E	31
	YÇ	E	59
	CÜ	E	32
	NT	K	43
	YŞ	K	55
Oral Kanserli	ZA	E	71
	İT	E	47
	YÖ	E	44
	NB	K	66
	ND	K	56
	HS	E	36

E:Erkek, K:Kadın

3.14. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerin Tükürük Örneklerinden Zn^{2+} ’nin Manyetik Olarak Ayrılma Prosedürü

6 sağlıklı, 6 oral prekanserli ve 6 oral kanserli gönüllüden toplanan ve analiz zamanına kadar -80°C’de saklanan tüm tükürük örnekleri ölçüm öncesinde oda sıcaklığına getirildi ve homojen örnekler elde etmek için 1 dk vortekslendi. Daha sonra

deney tüpüne 1 mL hazırlanan tükürük örneği koyuldu ve 0.1 mL 1 M HCl çözeltisi eklendikten sonra 1 dakika vortekslenerek asitlendirildi. Bu karışıma 0.1 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve yine 1 dakika vortekslenerek çözelti nötrleştirildi. Çözeltiye daha sonra 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (pH 7.2) tamponu içerisinde hazırlanan 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitin dispers çözeltisi eklendi ve Zn²⁺ iyonları ile etkileşimi sağlamak amaçlı 20 dakika oda koşullarında bekletildi. Daha sonra elde edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitleri bir magnet yardımı ile tutularak süpernatant uzaklaştırıldı ve belirtilen tampon çözelti içerisinde derişimi 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı.

3.15. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerin Tükürük Örneklerinden Manyetik Ayrım ile Elde Edilen Zn²⁺ Derişim Değerlerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

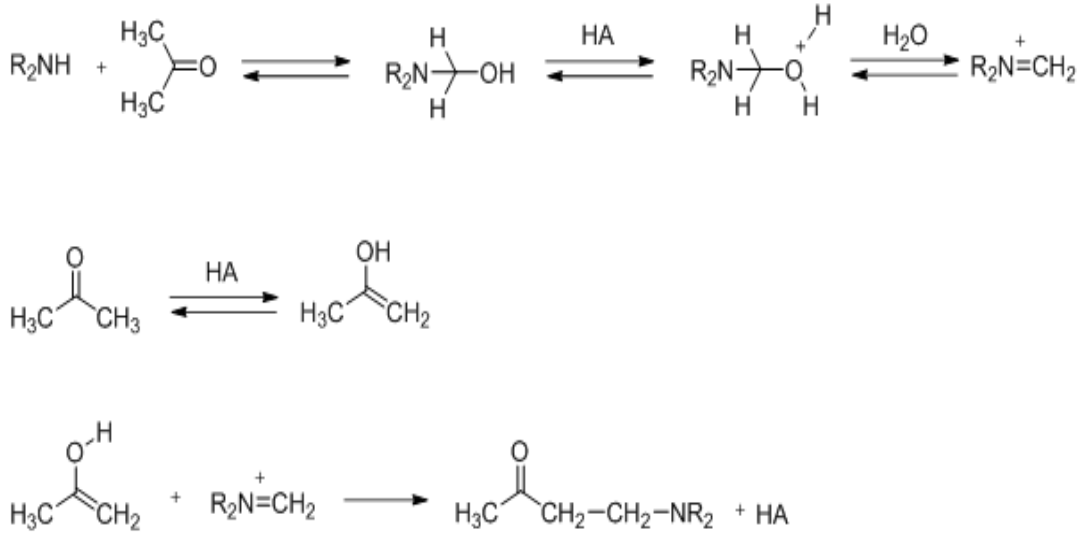
İkiden fazla örnek için parametrik olmayan denemelerden biri olan Kruskal-Wallis denemesi, üç veya daha fazla farklı örneğin ortanca değerlerinin kıyaslanmasında kullanılır. Analizde veri değerleri sıralı hale getirilir, sıra toplamaları grup büyüklüğüne bölünerek sıra ortalamaları hesaplanır ve bu ortalamalar karşılaştırılır. Belirli bir kareler toplamını elde etme olasılığı ki-kare istatistiği kullanılarak belirlenebilir.¹³³

Sağlıklı, oral prekanserli ve oral kanserli gönüllülerin oluşturduğu bu üç çalışma grubu arasındaki, tükürük örneklerinden manyetik ayırım ile elde edilen Zn²⁺ derişim değerlerindeki farklılığının anlamlılık düzeyini ortaya koymak için tek yönlü ANOVA analizinin non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis tek yönlü analizi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Zinpir-1 Bileşiğinin Sentezi ve Yapısal Tanımlaması

Mannik kondenzasyon reaksiyonu, reaktifler ve uygulanan şartlara göre farklı mekanizmalar üzerinden oluşur. Nötr veya asidik ortamda meydana gelen tepkime mekanizması 3 basamaktan oluşur.⁵⁷ Birinci basamakta, ikincil aminin aldehitlerle reaksiyonundan yarı amina oluşur. Yarı aminalin bir su molekülü kaybetmesiyle iminyum katyonu oluşur. İkinci basamakta, asetonun enolizasyonu gerçekleşir. Üçüncü basamakta ise Mannik bazı oluşur (Şekil 4.1). Bu bağlamda, çalışmamızda Zinpir-1 bileşiği nötr ortamda Mannik kondenzasyon tepkimesi ile Bölüm 3.3'te belirtildiği gibi Şekil 3.1'de gösterilen reaksiyon ile sentezlendi.



Şekil 4.1. Mannik reaksiyonu

Reaksiyon sonunda %94 verim ile 0.384 g somon-pembe renğinde katı Zinpir-1 bileşiği (Şekil 4.2) elde edildi. Zinpir-1 bileşiği metanol, su ve etanolde çözünmezken DMSO, diklorometan ve kloroformda çözünmektedir.

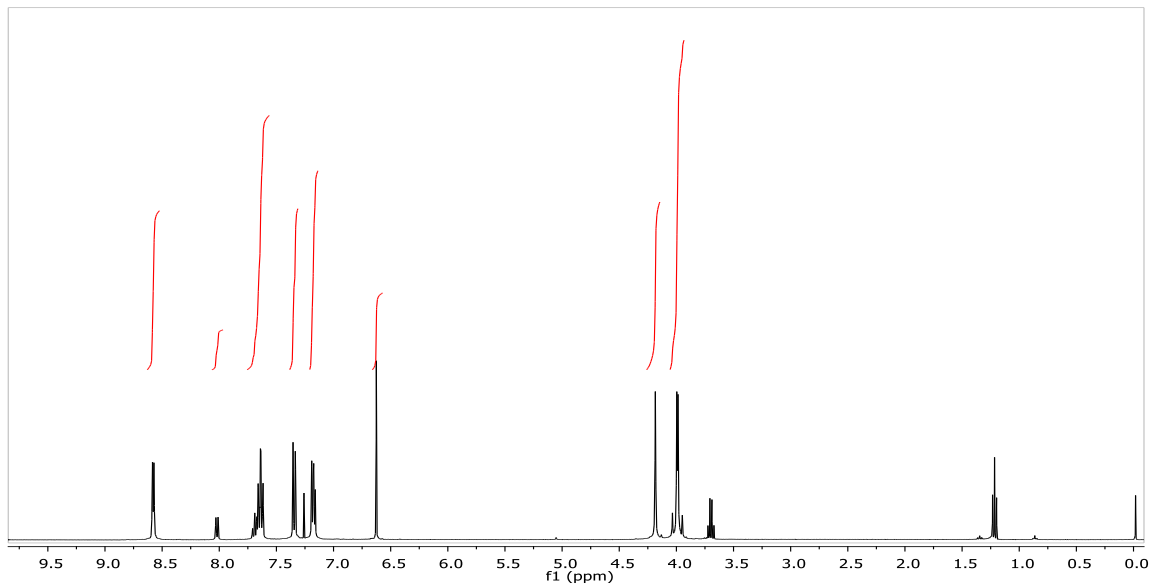


Şekil 4.2. Zinpir-1 bileşiği

Sentezlenen Zinpir-1 bileşiğinin yapısı, TLC, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR, FT-IR ve HPLC/MS yöntemleri ile aydınlatıldı. Buna göre;

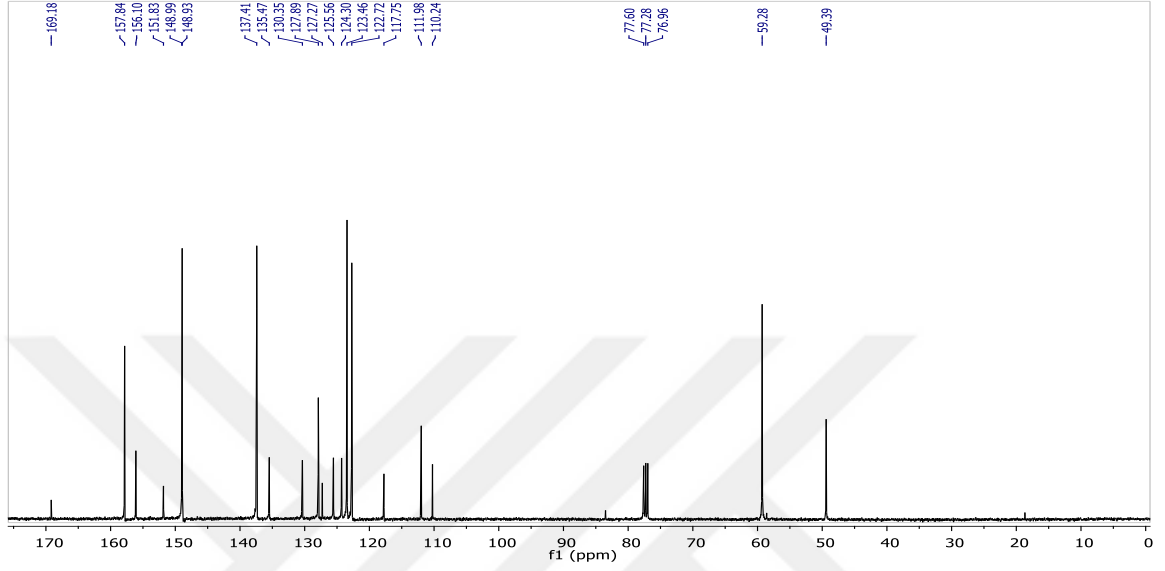
TLC: R_f, 0.14 (silika), 1:1 CH₃OH:CH₂Cl₂

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.69-8.49 (m, 4H), 8.09 – 7.93 (m, 1H), 7.74–7.55 (m, 6H), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 7.22 – 7.13 (m, 5H), 6.63 (s, 2H), 4.18 (s, 4H), 4.02 (d, AB sisteminin A kısmı, J = 15.2 Hz, 4H), 3.97 (d, AB sisteminin B kısmı, J = 15.2 Hz, 4H) (Şekil 4.3).



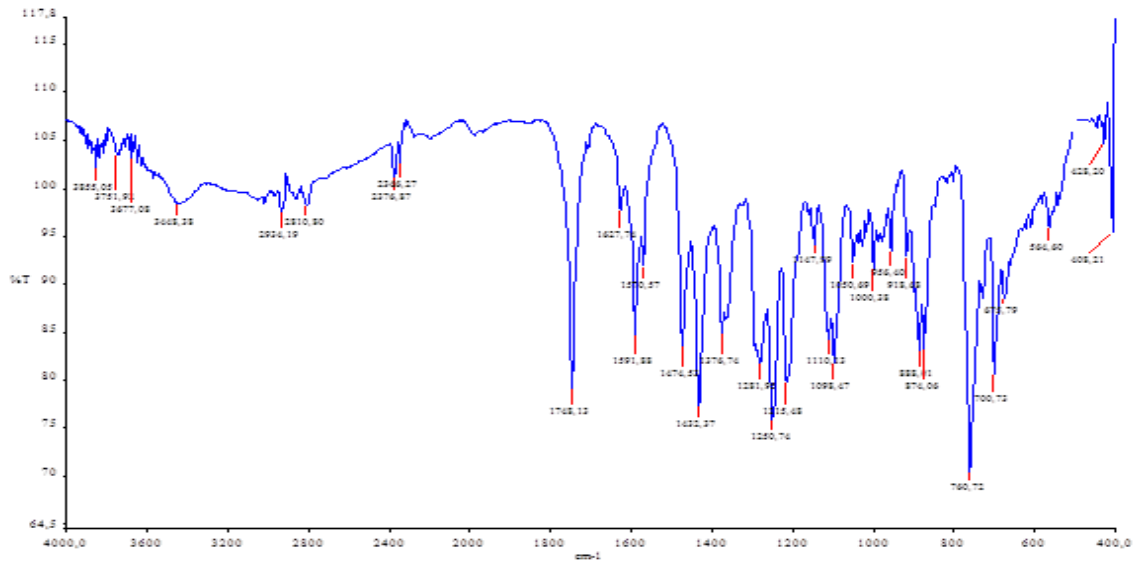
Şekil 4.3. Zinpir-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 169.18, 157.84, 156.10, 151.83, 148.99, 148.93, 137.41, 135.47, 130.35, 127.89, 127.27, 125.56, 124.30, 123.46, 122.72, 117.75, 111.98, 110.24, 59.28, 49.39 (Şekil 4.4).



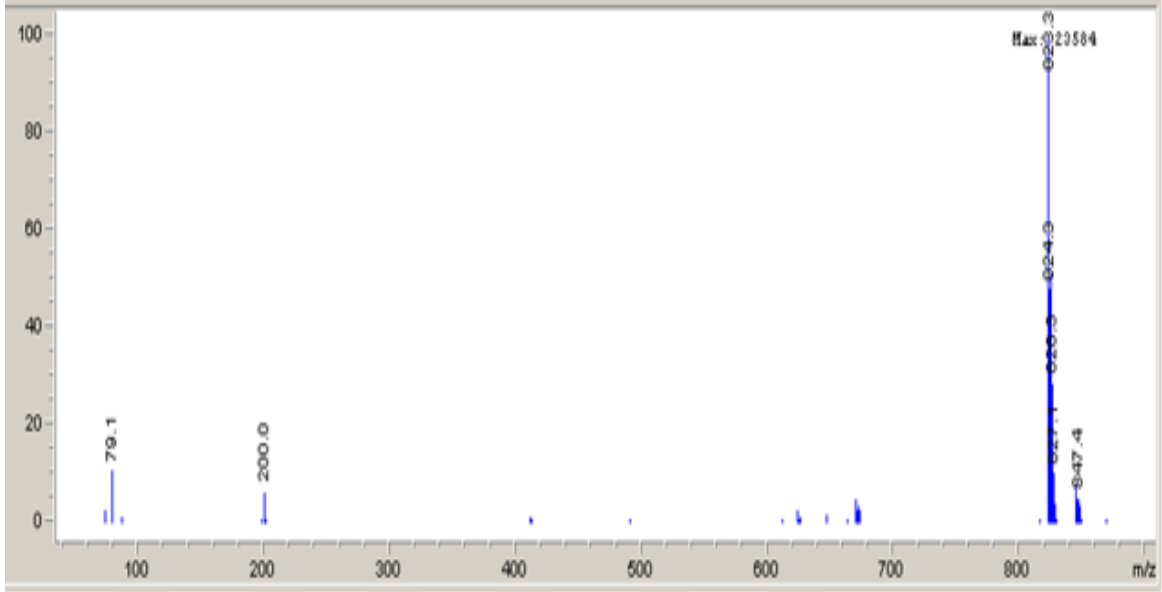
Şekil 4.4. Zinpir-1 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1}): Zinpir-1 FT-IR spektrumuna göre; 3448 (OH-gerilme titreşimi), 1748 ($\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimi), 1591 ($\text{C}=\text{N}$ gerilme titreşimi), 1475 (aromatik $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşimi), 1432 (alifatik $\text{C}-\text{H}$ eğilme titreşimi), 1250 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilme titreşimi), 760 ($\text{C}-\text{Cl}$ gerilme titreşimi) (Şekil 4.5) pikleri gözlemlendi.



Şekil 4.5. Zinpir-1 bileşiğine ait FT-IR spektrumu

HPLC/MS (+APCI): MH⁺, 823.2202; bulunan, 823.3 (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Zinpir-1 bileşiğinin kütle (MS) spektrumu

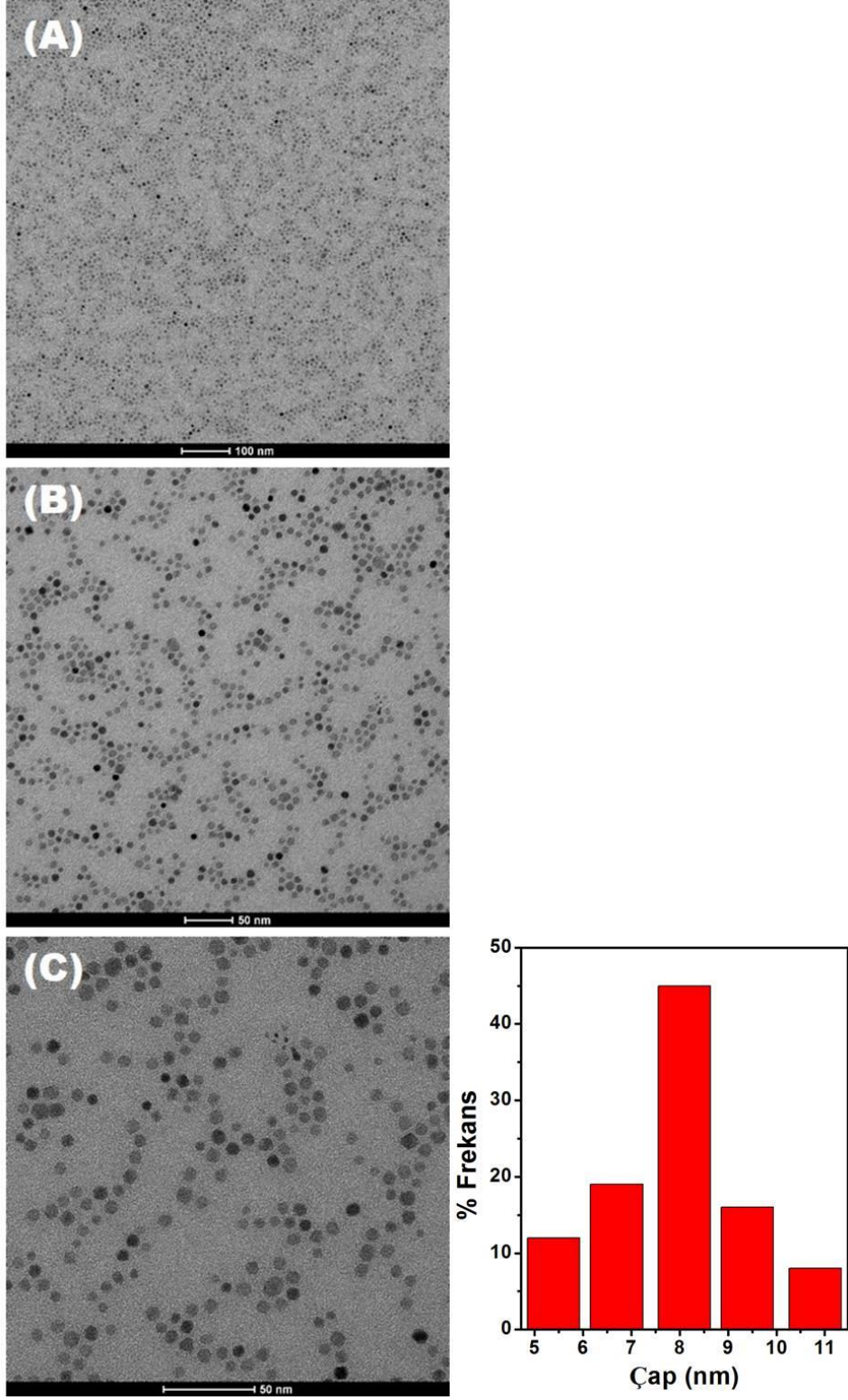
4.2. Fe₃O₄ Manyetik Nanopartiküllerinin Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları

Bugüne kadar Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sentezi için birçok fiziksel ve kimyasal yöntem geliştirilmiştir. Ancak hazırlanan Fe₃O₄ nanopartiküllerinin parçacık boyutu kontrolü, manyetik özellikleri ve yüzeyinin silika ile homojen olarak kaplanması düşünüldüğünde en uygun yöntem; organik çözücü içerisinde başlangıç metal komplekslerinin sürfaktant(lar) varlığında ısı bozunması veya indirgenmesi yöntemidir.¹³⁴ Bu yöntem ile morfoloji kontrollü çok yüksek kalitede Fe₃O₄ nanopartikülleri sentezlenebilmektedir.

Bu bağlamda çalışmamızda Murray ve ark.¹³⁴ tarafından önerilen metal komplekslerinin sürfaktant(lar) varlığında ısı bozunması veya indirgenmesi yöntemi kullanıldı. Fe₃O₄ manyetik nanopartikülleri, Bölüm 3.4'te belirtildiği gibi Fe(acac)₃ bileşiğinin oleyilamin içerisinde yüksek sıcaklıklarda bozundurulması ile hazırlandı. Reçetede yüzey aktif madde (sürfaktant) olarak kullanılan oleyilamin hem Fe₃O₄

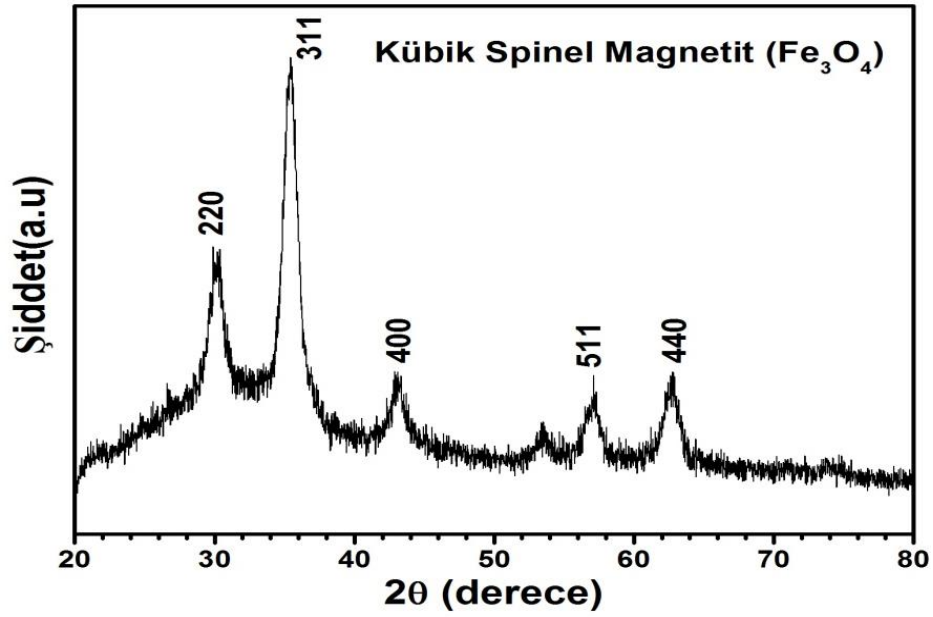
manyetik nanopartiküllerinin çekirdeklenmesini sağladı hem de çözücü olarak kullanıldı. Sentezlenen nanopartikülün yapısı TEM ve XRD yöntemleri ile aydınlatıldı.

TEM: Sentezlenen kolloidal Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri Şekil 4.7’de verilmektedir. TEM görüntülerinden, en az 100 tane parçacığın sayılması ile elde edilen parçacık dağılım histogramından (Şekil 4.7) Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin ortalama 6-10 nm arasında değişen parçacık boyutlarına sahip oldukları ve ortalama parçacık boyutunun 7.8 nm olduğu belirlendi. Ayrıca TEM görüntülerinden sentezlenen Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin oldukça homojen bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğu ve herhangi bir büyük parçacık oluşumunun (çökelme) olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.7. Kolloidal Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine ait farklı büyütmelede alınmış TEM görüntüleri ve TEM görüntülerinden elde edilmiş parçacık boyutu dağılım histogramı

XRD: Sentezlenen koloidal Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine ait X-ışını kırınım desenleri Şekil 4.8’de verilmektedir. Koloidal Fe_3O_4 ’ün XRD spektrumundaki karakteristik pikler standart Fe_3O_4 (kübik spinel faz) ile uyumludur. XRD deseninde $2\theta = 30.2^\circ, 35.6^\circ, 43.2^\circ, 57.3^\circ$ ve 62.9° ’da görülen pikler sırasıyla yapının (220), (311), (400), (422), (511) ve (440) yansımalarına aittir.^{125,135}



Şekil 4.8. Sentezlenen Fe_3O_4 manyetik nanopartikülüne ait XRD deseni

4.3. Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 Manyetik Nanopartikülünün Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları

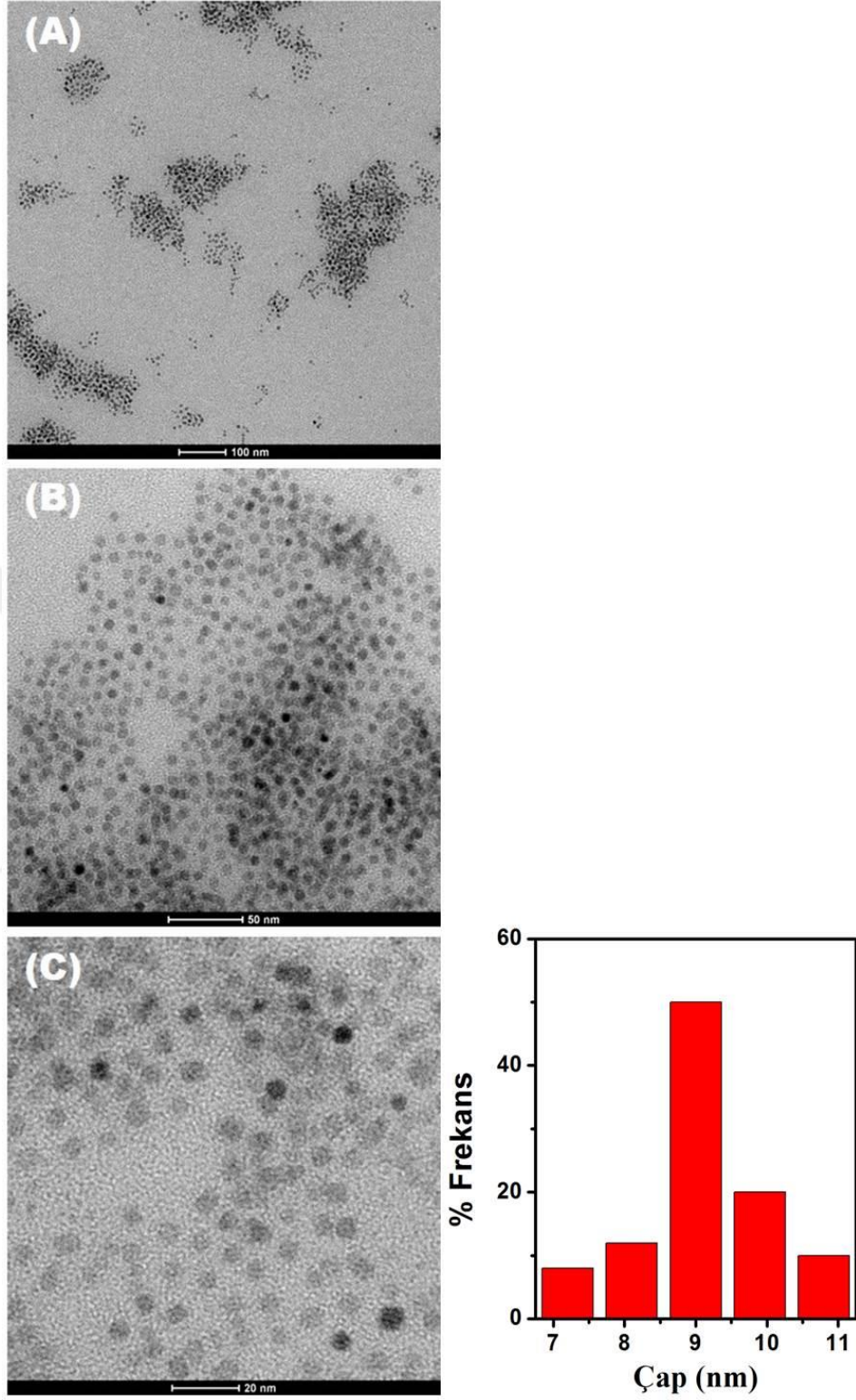
Fe_3O_4 nanopartikülleri çözelti içerisine geçer ve kararlılığı düşüktür. Bu durum Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kullanıldığı uygulamalarda istenmeyen durumların ortaya çıkmasına sebep olur. Bu sorunu ortadan kaldırmanın en etkin yöntemlerinden bir tanesi Fe_3O_4 nanopartiküllerinin silika (SiO_2) ile kaplanmasıdır. Silika kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerin (Fe_3O_4 - SiO_2) yüzeyi kimyasal olarak gerçekleşebilecek oksidasyona karşı karardır. Ayrıca Fe_3O_4 - SiO_2 yüzeyi çeşitli gruplar takılması yolu ile fonksiyonel hale getirilerek çok farklı uygulamalarda kullanılabilecek nanokompozitler hazırlanabilir.

Fe_3O_4 nanopartiküllerinin silika ile kaplanması için en yaygın kullanılan yöntem Stöber yöntemidir.¹³⁶ Bu yöntem etanol içerisinde TEOS'un hidrolizi ve polikondenzasyonu ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinde polimerleşmesi esasına dayanmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin yüzeyinin silika ile kaplanması ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin oluşturulması için Stöber ve Fink¹³⁶ tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülünün oluşturulması ile hem Fe^{3+} iyonunun çözeltiye geçmesi engellendi hem de matriks ortamından bir mıknatıs kullanılarak manyetik olarak ayrılabilmesi sağlandı. Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülünün yüzeyini fonksiyonlaştırmak ve Zinpir-1 bileşiği ile amit bağı oluşumunu sağlamak için Zhang ve ark.⁶⁶ tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde sol-jel prosesi kullanılarak TEOS ve APTES ile $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ sentezlenmektedir.

Bu bağlamda çalışmamızda, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinin silika ile kaplanması, elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 'nin amin sonlu grupla yüzey modifikasyonu ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) ve yapısal tanımlamaları için, sentezlenen koloidal Fe_3O_4 nanopartikülleri Bölüm 3.5'te detayları verilen reçete kullanılarak bazik ortamda TEOS ile etkileşime sokuldu ve TEOS'un hidroliz yolu ile yüzeylerinin silika ile kaplanması sağlandı. TEOS ile silika kaplaması iki farklı oranda gerçekleştirildi. 2 mL ile gerçekleştirilen TEOS kaplaması ile elde edilen silika kalınlığının ince olması nedeniyle, daha sonra 3 mL TEOS kullanılarak silika kaplaması gerçekleştirildi. Daha sonra silika ile kaplanan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) yüzeyi Zinpir-1 ligandının bağlanmasını sağlamak amacıyla APTES ile fonksiyonel hale getirildi. Yine bu aşamada Zn^{2+} 'nin florometrik olarak tayininde yaşanan sıkıntı nedeni ile ve daha fazla Zinpir-1 ligandını $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerine bağlamak amacıyla, başta kullanılan 0.5 mL APTES miktarı 4 ve 16 kat arttırılarak sırasıyla 2 ve 8 mL ye çıkarıldı. Zn^{2+} 'nin florometrik tayininde en iyi

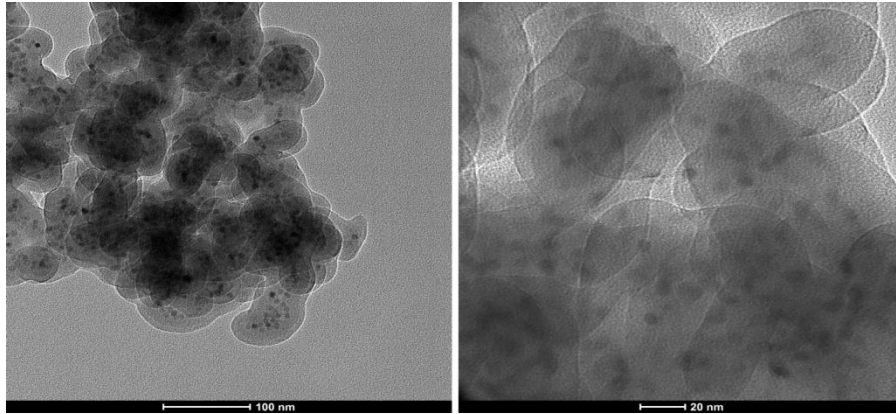
sonuçlar 8 mL APTES kullanımı ile elde edilen nanokompozit ile alındı. Elde edilen nanopartikülün temsili bir yapısı deneysel kısımda sunulan  ekil 3.3’de verilmektedir. Yüzeyi farklı miktarlarda TEOS (2 veya 3 mL) ve farklı miktarlarda APTES (0.5, 2 ve 8 mL) ile fonksiyonlaştırılan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) yapısı TEM ve FT-IR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı.

TEM: 2.0 mL TEOS ve 0.5 mL APTES kullanılarak hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülüne ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri  ekil 4.9’da verilmektedir. TEM görüntülerinden Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeylerinin silika ile kaplanması sonucu homojen parçacık boyutu dağılımlarında önemli bir değişim olmadığı ve ortalama parçacık boyutlarının 7.8 nm den 9 nm ye yükseldiği hesaplandı (Parçacık boyut histogramı,  ekil 4.9). Bu hesap sonucu Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinin 0.6 nm kalınlığında silika ile kaplandığı belirlendi.



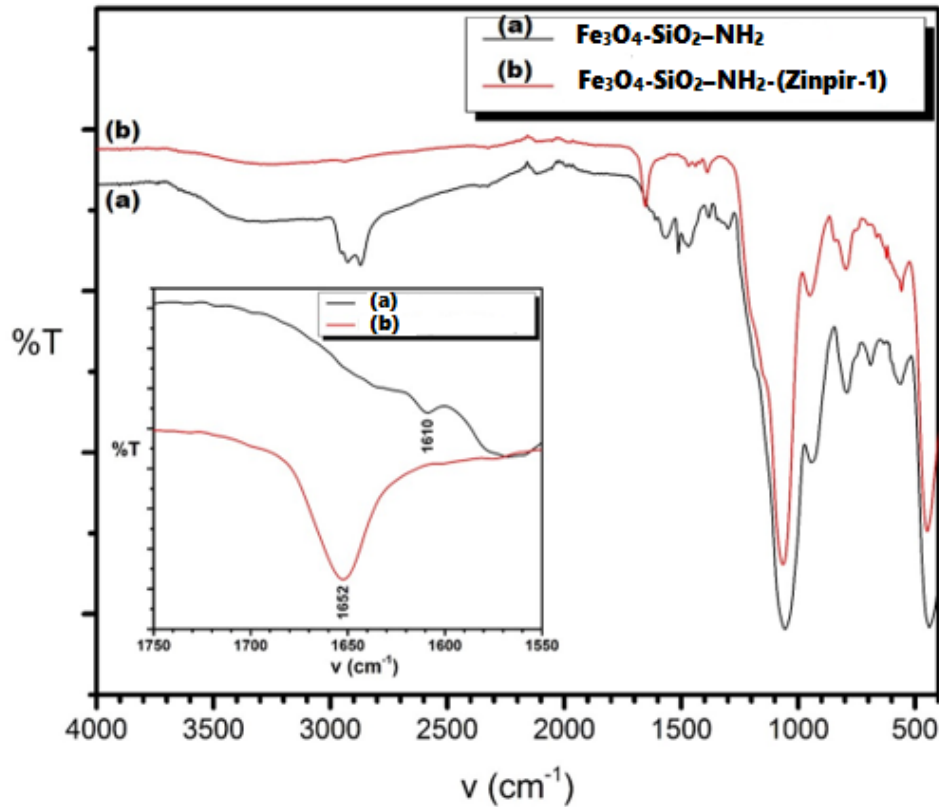
Şekil 4.9. Silika kaplanmış (2.0 mL TEOS ile) ve yüzeyi APTES (0.5 mL) ile fonksiyonlaştırılmış Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerine (Fe₃O₄-SiO₂-NH₂) ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri

Ancak bu kalınlık Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sulu çözeltide gerçekleştirilecek olan Zn^{2+} tayini deneylerinde stabilite sorunu oluşturabilecek olması ve yüzeye daha az miktarda APTES bağlanacak olması nedeniyle daha farklı kalınlıklarda silika ile kaplanması deneyleri de gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda 3.0 mL TEOS ve 8.0 mL APTES kullanılarak hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin daha fazla oranda Zinpir-1 ligandını bağladığı ve böylece daha fazla Zn^{2+} ile yüklenebildiği için daha iyi sensör özelliği gösterdiği belirlendi (Bölüm 3.5). Şekil 4.10'da 3.0 mL TEOS ve 8.0 mL APTES kullanılarak hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerine ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri sunulmuştur. TEM görüntülerinden TEOS miktarının artırılması ile Fe_3O_4 nanopartikülleri yüzeyinde oluşan silika tabakasının kalınlığının arttığı açıkça gözlenmektedir. Artan bu silika tabaka kalınlığına bağlı olarak yüzeye daha fazla APTES bağlandığı ve oluşan daha fazla serbest -NH_2 grupları ile daha fazla miktarda Zinpir-1 bağlandığı gözlemlendi (Bölüm 3.5).



Şekil 4.10. Silika kaplanmış (3.0 mL TEOS) ve yüzeyi APTES (8.0 mL) ile fonksiyonlaştırılmış Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) ait farklı büyütme ölçeklerinde alınmış TEM görüntüleri

FT-IR (ATR, cm^{-1}): $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ manyetik nanopartikülünün FT-IR spektrumuna göre; 3332 (N-H gerilim titreşimi), 1610 (serbest NH_2 gerilme titreşimi), 2969 ve 2857 (simetrik olmayan ve simetrik C-H gerilim titreşimi), 1456 (CH_3 eğilme titreşimi), 1390 (CH_2 eğilme titreşimi), 1379 (C-N gerilim titreşimi), 1512 (N-H deformasyon titreşimi), 1094 (Si-O-Si gerilme titreşimi) (Şekil 4.11 (a)) pikleri gözlemlendi.



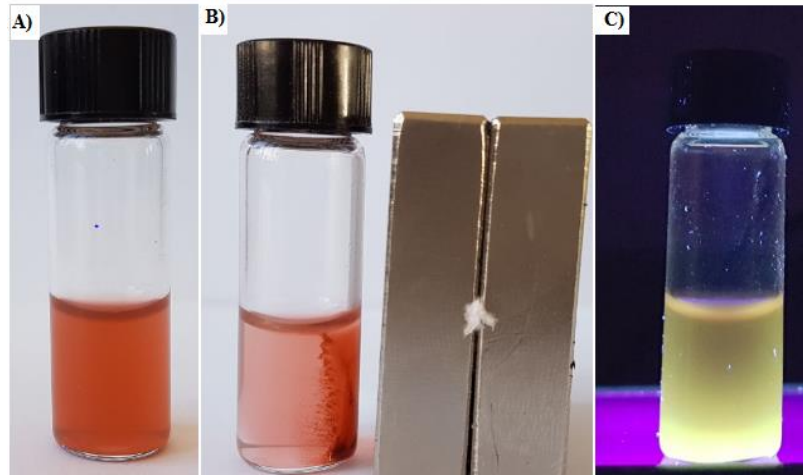
Şekil 4.11. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülüne ait (a) FT-IR spektrumu

4.4. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zincir-1)}$ Manyetik Nanokompozitinin Sentezi ve Yapısal Tanımlamaları

Oluşturulan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülü, amino fonksiyonel grubu içerdiği için güçlü metal kompleks yapabilme kapasitesine sahiptir fakat birden fazla metale ilgisi olduğu için seçiciliği düşüktür. Bu yüzden nanopartikülün belirli bir metale duyarlı olabilmesi için seçilen metal ile kompleks oluşturabilecek bir organik bileşiğin nano yapılandırılmış materyal yüzeyine modifikasyonunun sağlanması gerekir. Zincir

bileşikleri ile Zn^{2+} komplekslerinin yüksek kuantum verimi ile floresans özellik gösterdiği bilinmektedir.^{56,113} Bu yüzden çalışmamızda Zn^{2+} 'ye duyarlı bir nanokompozit elde edebilmek için $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanopartikülünde bulunan amin fonksiyonel grubu ile Zinpir-1 bileşiğinde bulunan karboksil fonksiyonel grubu arasında amit bağı oluşturmak amacı ile Mali ve ark.⁷⁴ tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Bu bağlamda, Bölüm 3.6'da belirtildiği gibi öncelikle Zinpir-1'in karboksil fonksiyonel grubu, HOBt ve HBTU bağlayıcı reaktifleri kullanılarak aktive edildi ve daha sonra ortama $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanopartikülü ilave edilerek nanopartikülde bulunan $-NH_2$ grubu ile kovalent bağlanma yoluyla amit bağının oluşması sağlandı. Sonuç olarak, Zn^{2+} 'ye seçici bir ligand olan Zinpir-1 bileşiğinin amin sonlu bir ligand ile yüzeyi fonksiyonlaştırılmış silika kaplı manyetik nanopartikülüne ($Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$) kovalent bağlanma yolu ile immobilizasyonu sonucu, manyetik olarak geri kazanılabilen, floresans özellik gösteren ve Zn^{2+} 'ye seçici $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ nanokompozitleri sentezlendi.

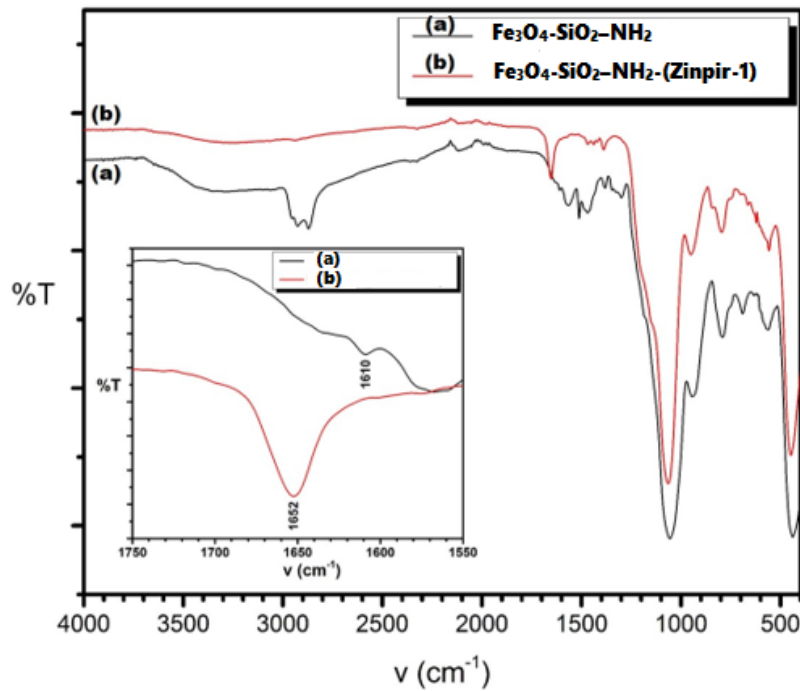
Sentezlenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ nanokompozitleri kahverengi-kırmızı renkte olup manyetik ve floresans özelliğe sahiptir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ manyetik nanokompozitinin renk (A) manyetik (B) ve floresans (C) özellikleri

Sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin yapısı FT-IR yöntemi ile aydınlatıldı. Nanokompozitteki maksimum Zinpir-1 miktarı nanopartiküle eklenen APTES miktarına göre hesaplandı. Tartılan nanokompozite göre 34.24 mmol APTES eklendiği için Zinpir-1 miktarı 34.24 katsayısı ile çarpılarak elde edildi fakat yine de bağlanan Zinpir-1 miktarı tam olarak bilinmemektedir.

FT-IR (ATR, cm^{-1}): $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin FT-IR spektrumuna göre; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülünde görülen 1610 (serbest NH_2 gerilme titreşimi) piki kaybolarak 1652'de (C=O-N gerilme titreşimi) amit karboniline ait yeni bir pikin ortaya çıktığı görülmektedir. Ayrıca 3332'deki (N-H gerilme titreşimi) piklerin kaybolduğu da görülmektedir. Serbest NH_2 gerilme titreşimine ait pikin kaybolması, amit karboniline ait yeni bir pikin ortaya çıkması ve 1094'de (Si-O-Si gerilme titreşimi) karakteristik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikül pikinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin IR spektrumunda görülmesi Zinpir-1 bileşiğinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülüne konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Şekil 4.13 (b)).

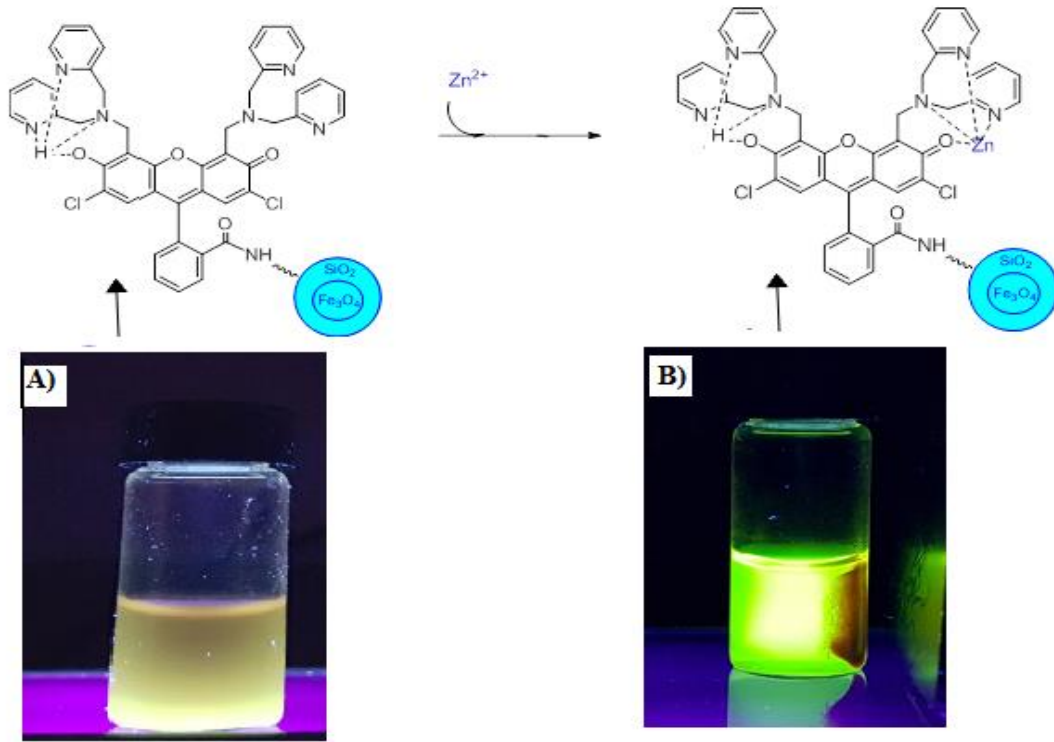


Şekil 4.13. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitine ait (b) FT-IR spektrumu

4.5. Zn^{2+} Yüklenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ ($Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn(Zinpir-1)$) 1)) Nanokompozitinin Oluşumu ve Yapısal Tanımlanması

Metal ile kompleks oluşturabilecek ligandların, nanopartiküle kovalent olarak immobilizasyonu yapıldıktan sonra ilgili metal yüklemesi yapılmaktadır.^{104,124-127} Bu bağlamda çalışmamızda, Bölüm 3.7’de belirtildiği gibi $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ nanokompozitine Zn^{2+} yüklemesi yapıldı ve elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn(Zinpir-1)$ nanokompozitinin yapısı ICP-MS ve FT-IR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı.

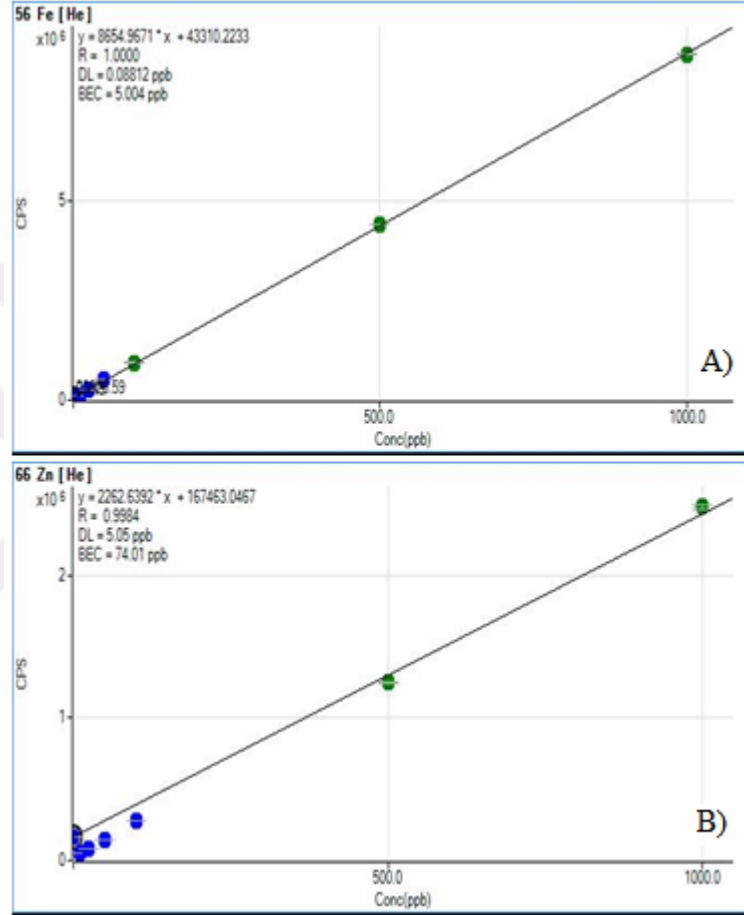
$Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile oluşan $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn(Zinpir-1)$ nanokompozitinin manyetik özelliği devam etmekle birlikte rengi sarıya boyanmakta ve floresans şiddeti de buna bağlı artmaktadır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3, pH 7.2) tampon çözeltisi içerisinde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ manyetik nanokompoziti (A) ve $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-(Zinpir-1)$ manyetik nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn(Zinpir-1)$ nanokompoziti (B)

ICP-MS: $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn(Zinpir-1)$ nanokompozitinde bulunan Fe^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının derişimlerini belirleyebilmek için öncelikle Bölüm 3.7.1’de belirtildiği gibi

derişim aralığı 1-1000 ppb olacak şekilde Fe^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının ayrı ayrı çalışma çözeltileri hazırlandı. Her bir iyon için elde edilen çalışma çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle standart kalibrasyon eğrileri elde edildi (şekil 4.15). Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı (Tablo 4.1).



şekil 4.15. Fe elementine (A) ve Zn elementine ait (B) ICP-MS kalibrasyon eğrileri

Tablo 4.1. Fe^{3+} ve Zn^{2+} İyonlarına Ait Kalibrasyon Eğrilerinin İstatistiksel Analiz Değerleri

Element	A (ppb)	LR	R
Fe^{3+}	1-1000	$Y=8654.9x+43310.2$	1.0000
Zn^{2+}	1-1000	$Y=2262.6x+167463.0$	0.9984

A: Çalışma aralığı, LR: Linear regresyon, R: Korelasyon katsayısı

Fe^{3+} içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ ve Fe^{3+} ve Zn^{2+} içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitlerinden Bölüm 3.7.1’de belirtildiği gibi 1’er mg örnek alınarak 10 mL %2’lik HNO_3 çözeltisinde çözüldü ve ICP-MS yöntemi ile analizi gerçekleştirildi. Elde edilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak belirtilen nanokompozitler içerisindeki Fe^{3+} ve Zn^{2+} ’nin derişimi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de verildi.

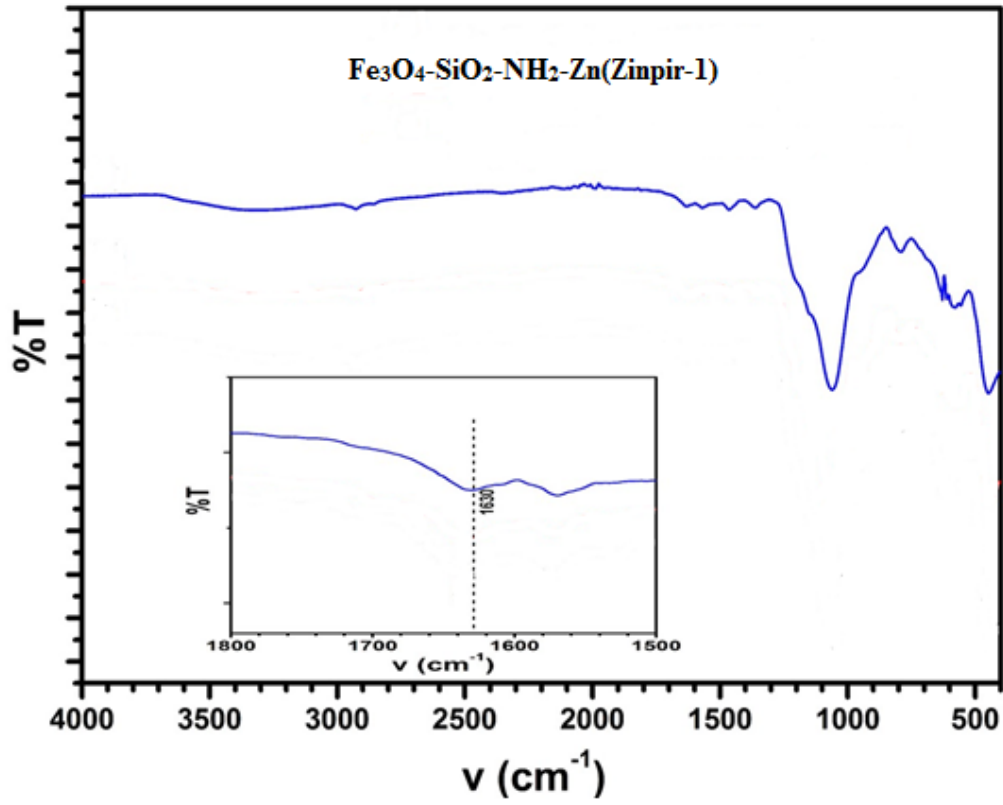
Tablo 4.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ Nanokompozitlerinin ICP-MS Analiz Sonuçları

Örnek	56 Fe [He]		66 Zn [He]	
	Derişim (ppb)	BSS	Derişim (ppb)	BSS
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$	29.4789	6.1431	0.0294	4.5101
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$	30.8546	8.9298	350.80	1.0532

BSS: Bağlı standart sapma

Tablo 4.2’de verilen ICP-MS sonuçlarından; Zinpir-1 ile fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanokompozitinin yapısında, çalışılan derişim aralığında (1-1000 ppb) detekte edilebilir miktarda Zn^{2+} iyonu bulunmazken Fe^{3+} iyonunun varlığı tespit edildi. Ancak Zn^{2+} yüklenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin ICP-MS analiz sonuçları, yapıya Zn elementinin girdiğini ve yapıda Fe elementinin de var olduğunu göstermektedir.

FT-IR: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinde görülen 1652 (C=O-N gerilme titreşimi) amit karboniline ait gerilme pikinin Zn^{2+} yüklenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinde 1630’a kaydığı gözlenmektedir (Şekil 4.16). Al-Awadi ve ark.¹³⁷ belirttiği gibi bandın düşük frekansa kayması, metal katyonları ile ligandda bulunan azot atomlarının koordine olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 4.16. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}(\text{Zinpir-1})$ nanokompozitine ait FT-IR spektrumu

4.6. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti ile Zn^{2+} 'nin Belirlenmesine Yönelik Geliştirilen Spektrofluorometri Yönteminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

Zn^{2+} 'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti kullanılarak belirlenmesi amacıyla geliştirilen spektrofluorometri yöntemi için; Zn^{2+} 'nin floresans şiddeti üzerine tampon cinsi, çözücü oranı ve pH etkisi, uyarma ve emisyon dalga boyları, floresans şiddeti üzerine zamanın etkisi ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin metal iyon seçiciliği gibi parametreler kullanılarak optimum koşullar belirlendi.

4.6.1. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofluorometri Yöntemi ile Zn²⁺'nin Belirlenmesinde Floresans Şiddeti Üzerine Tampon Cinsi, Çözücü Oranı ve pH Etkisi

Zn²⁺ yüklendiği zaman Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin en yüksek floresans şiddeti verebileceği çözücü ortamını belirlemek için; öncelikle Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin deiyonize su, etanol, metanol, kloroform, eter, hekzan ve aseton da 1mg/3mL derişimde çözeltileri hazırlandı. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin sulu ortam, metanol ve DMSO'da iyi bir şekilde dispers olduğu etanol, asetonitril, kloroform, eter, hekzan ve aseton gibi çözücülerde ise kısmen dispers olduğu gözlemlendi. Wong ve ark.¹³⁸ tarafından önerilen bir çalışmada Zinpir-1 bileşiminin metanol- deiyonize su ve DMSO- deiyonize suyun birlikte kullanıldığı karışım halindeki çözücü sisteminde daha iyi çözüldüğünü ve ortamın iyonik gücünün sabit kalmasını sağlamak amacıyla 100 mM KCl elektrolit çözeltisinin eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca Burdette ve ark.⁵⁶ çalışılan fizyolojik ortamın benzer olmasını sağlamak amacıyla 100 mM KCl elektrolit çözeltisi ve ortamdaki Zn²⁺ dışındaki diğer iyonları bertaraf etmek amacıyla 50 µM EDTA eklenmesi gerektiğini belirtmiştir.

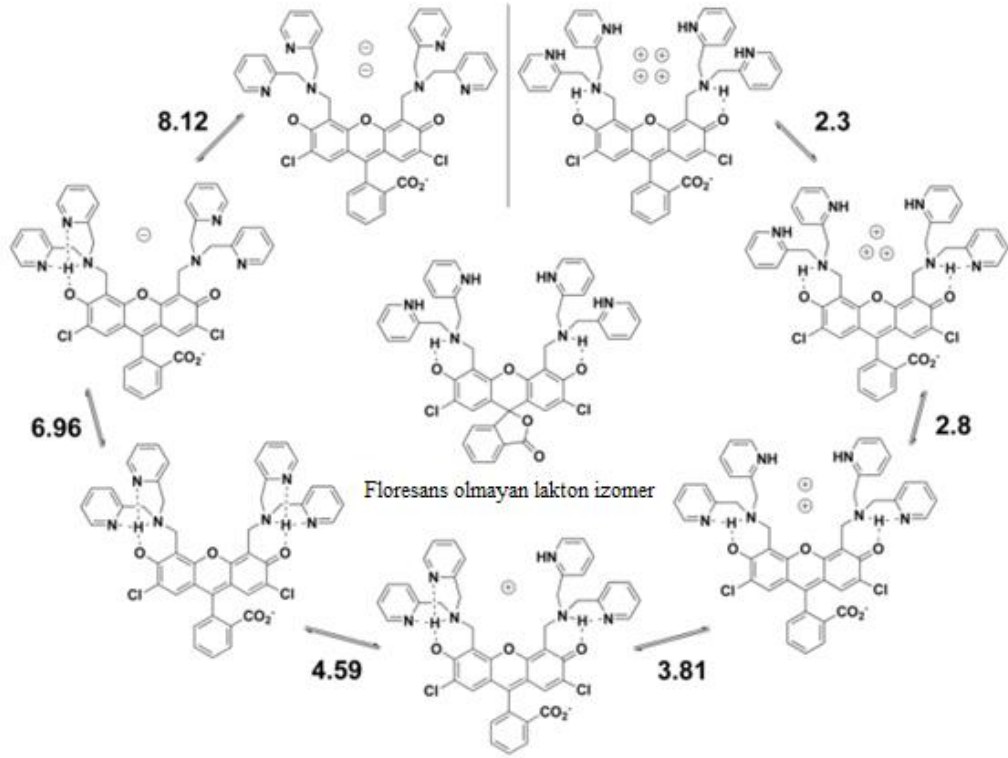
Bu bilgiler ışığında Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin dispers olduğu 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren deiyonize su, metanol ve DMSO'dan oluşan çözücü karışımları hazırlandı. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin en iyi dispers olduğu çözücü karışımı olarak 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren DMSO ve deiyonize su karışımı seçildi. En iyi çözücü karışımının oranını belirlemek amacı ile 1:4, 2:3 ve 4:1 h/h olmak üzere farklı oranlarda 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren DMSO-deiyonize su çözücü karışımları hazırlandı ve en iyi dispers olduğu çözücü karışım oranı 2:3 h/h olarak belirlendi.

Zinpir-1 üzerinde Zn^{2+} veya H^+ ile koordinasyon bileşiği oluşturan iki ayrı N_3O elektron verici atom seti ile dört heteroatomun koordinasyona katıldığı bildirilmiştir.¹³⁸ (Şekil 2.1). Bu gibi çok işlevli elektron veren birimlerdeki floresans etkileri genellikle bir bütün olarak ele alınır. Zinpir-1 sensör ailesinin Zn^{2+} veya H^+ bağlama özellikleri hakkında ayrıntılı bir moleküler resim, potansiyometrik titrasyon yapılarak ve absorpsiyon ve emisyon spektroskopisi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.¹³⁸ Bu çalışmada, Zinpir-1'in Zn^{2+} ile oluşturduğu kompleks bileşiğinin oluşum sabitleri, mevcut pKa değerleri ile Zn^{2+} ilave edildiği titrasyonlar ile belirlenmiştir. Fakat metal:ligand oranının 1:1'den büyük olduğu çözeltilerin bulanık olduğu ve deney sonuçlarının uygun olmadığı belirtilmiş ve K_{d1} değerini metal:ligand oranı 1:1 olacak şekilde Zn^{2+} içeren deneyler ile gerçekleştirmişlerdir. K_{d2} 'de yaklaştırılarak belirlenmiştir. Protonlanmış ve Zn^{2+} bağlı türlere ek olarak $(HLZn)^+$, $(H_2LZn)^{2+}$ ve $(H_3LZn)^{3+}$ karışık türleri de bilgisayar modelleme ile dahil edilmiştir. 25°C'de 100 mM KCl içeren HCl içerisinde hazırlanan Zinpir-1 çözeltisinin potansiyometrik titrasyonunda ligand veya ligand kompleksinden Zn^{2+} veya H^+ ayrılması Tablo 4.3 ve Şekil 4.17'de gösterilmektedir. Bileşiğin floresans artışı, her iki bağlama cepliğinin doluluk durumuna karşılık gelen ikinci protonun ve/veya Zn^{2+} 'nin bağlanması üzerine oluşur. İki ilave protonun ve/veya Zn^{2+} 'nin bağlanması sırasında ikinci bir artış meydana gelmektedir (Şekil 4.18). Zn^{2+} ve Zinpir-1 1:1 oranında karıştırıldığında floresans değişimini gösteren pH titrasyon verileri Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

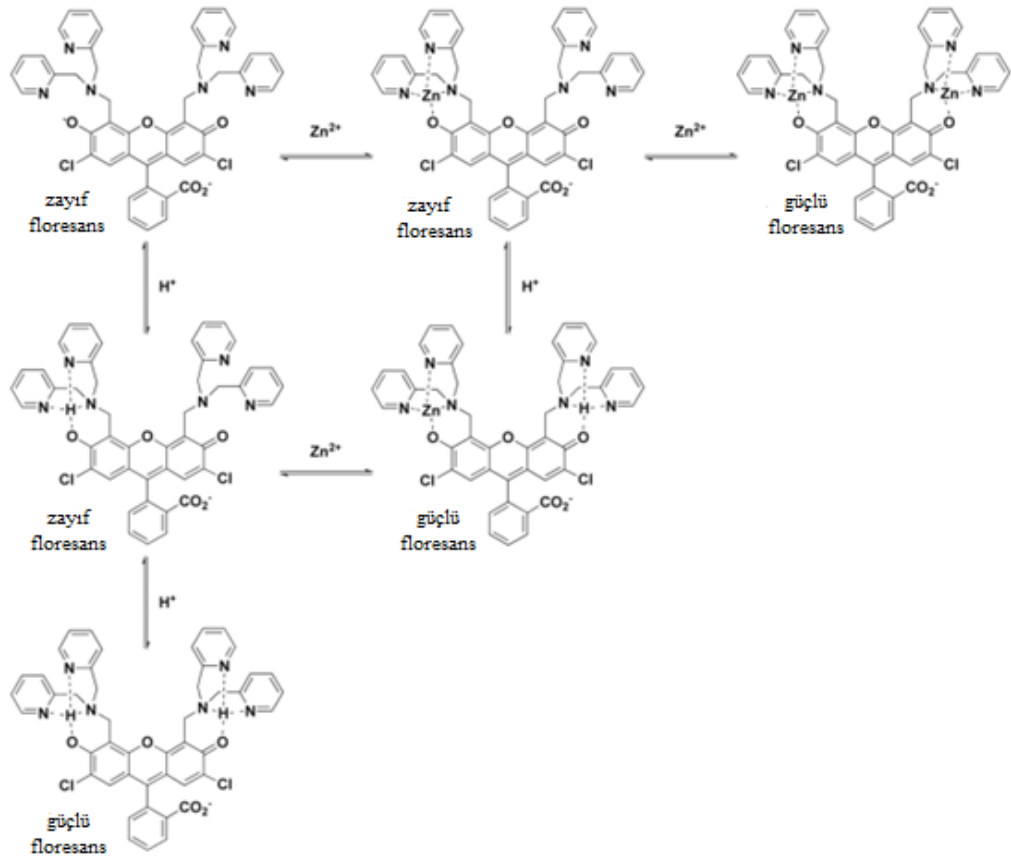
Tablo 4.3. Zinpir-1 Bileşiginden Proton ve Zn^{2+} 'nin Ayrışma Denge Sabitleri¹³⁸

Eşitlik	K (ayrışma denge sabitleri)
$\text{HL}^- \rightleftharpoons \text{L}^{2-} + \text{H}^+$	8.12 (2)
$\text{H}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{HL}^- + \text{H}^+$	6.96 (1)
$\text{H}_3\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L} + \text{H}^+$	4.59 (3)
$\text{H}_4\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^+ + \text{H}^+$	3.810 (9)
$\text{H}_5\text{L}^{3+} \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}^{2+} + \text{H}^+$	2.8 (3)
$\text{H}_6\text{L}^{4+} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}^{3+} + \text{H}^+$	2.3 (2)
$\text{LZn} \rightleftharpoons \text{L}^{2-} + \text{Zn}^{2+}$	13.4 (3)
$\text{HLZn}^+ \rightleftharpoons \text{LZn} + \text{H}^+$	6.57 (7)
$\text{H}_2\text{LZn}^{2+} \rightleftharpoons \text{HLZn}^+ + \text{H}^+$	4.02 (4)
$\text{H}_3\text{LZn}^{3+} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{LZn}^{2+} + \text{H}^+$	3.19 (9)
$\text{LZn}_2^{2+} \rightleftharpoons \text{LZn} + \text{Zn}^{2+}$	8.9 (3)

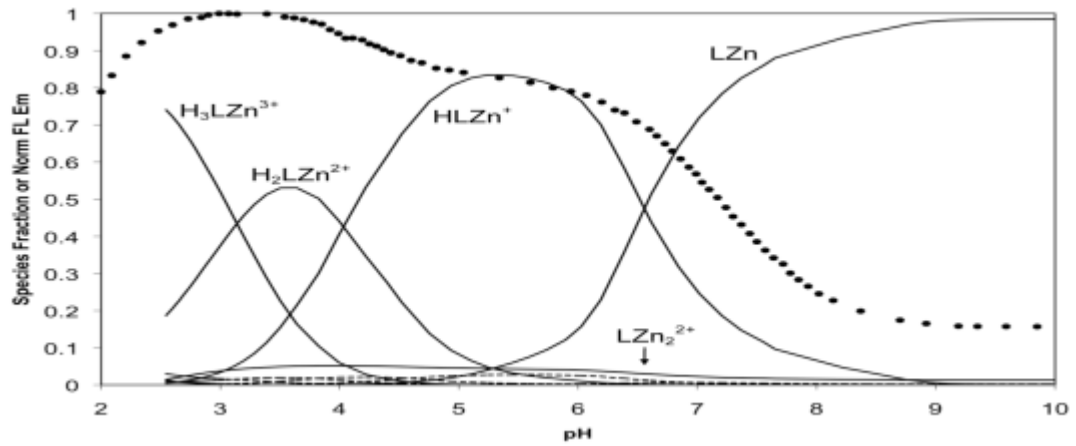
Parantez içindeki numaralar son anlamlı rakamın standart sapmasını gösterir.



Şekil 4.17. Zinpir-1 bileşiğinin pH değişimine bağlı protonasyon dengesi¹³⁸



Şekil 4.18. Protonlanmış ve Zn^{2+} bağlı Zinpir-1 kompleksinin kademeli değişimini gösteren kimyasal denge¹³⁸



Şekil 4.19. Zn^{2+} ve Zinpir-1 1:1 oranında karıştırıldığında floresans değişimini gösteren pH titrasyon verileri (Zn^{2+} içeren türler düz çizgilerle, Zn^{2+} içermeyenler ise kesikli çizgilerle gösterilir) ¹³⁸

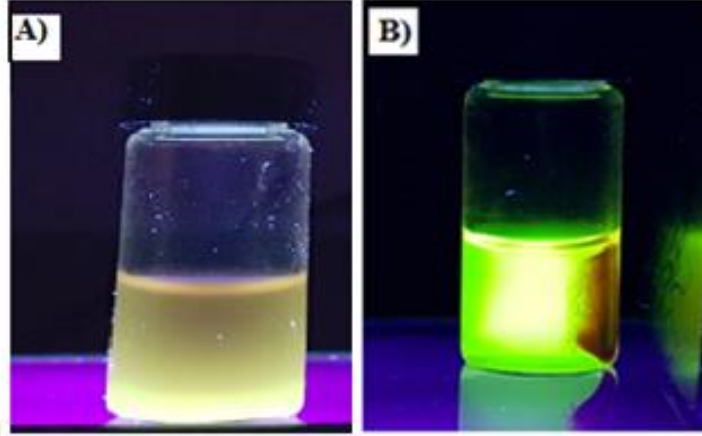
Bu bilgiler ışığında, Zn^{2+} 'nin Zinpir-1 bileşiği ile metal:ligand ekivalent miktarı 1:1 olacak şekilde kompleks oluşturacağı pH 6.96-8.2 aralığı çalışıldı. Bu amaç ile, 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren DMSO-deiyonize su (2:3, h/h) çözücü karışımında farklı pH'larda (pH 7, 7.1, 7.2, 7.4, 7.8 ve 8.2) ve farklı tampon maddeleri (PİPES ve Tris-HCl) kullanılarak tampon çözeltileri hazırlandı ve $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti bu tampon çözeltiler içerisinde dispers edildi. Bu çözeltiler çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları kaydedildi. Daha sonra $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti içeren tampon çözeltilere final derişimi 80 ng/mL olacak şekilde deiyonize suda hazırlanan Zn^{2+} eklendi ve yine çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları kaydedildi (Tablo 4.4). Elde edilen uyarma ve emisyon spektrumlarından yararlanılarak belirtilen tampon çözeltilerinde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile floresans şiddetinde artış sağlanmasına rağmen floresans şiddetindeki en iyi artışın 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/deiyonize su 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde gerçekleştiği belirlendi. 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/deiyonize su, 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisi kullanmamızın nedeni Zn^{2+} yüklendiği zaman seçilen uyarma dalga boyunda emisyon pikinde floresans şiddetinde en iyi artışın olmasıdır. (Tablo 4.4). Bundan sonraki tüm çalışmalarımız, bu tampon çözelti ortamında yapıldı.

Tablo 4.4. Zn^{2+} 'nin Floresans Şiddetine Çözücü Oranı ve pH Etkisi (80 ng/mL)

Tampon Çözelti	Çözücü Oranı (DMSO/Deiyonize Su) (h/h)	pH	Floresans Şiddeti	
			NK	Zn^{2+} Yüklenen NK
100 mM KCl ve 50 μ M EDTA İçeren 0.01 M Tris-HCl	1:4	7.0	9.197	11.403
		7.1	9.216	11.407
		7.2	9.364	11.814
		7.4	9.247	11.417
		7.8	8.968	10.950
		8.2	8.914	10.605
	2:3	7.0	9.401	12.217
		7.1	9.461	12.450
		7.2	9.497	12.890
		7.4	9.243	11.995
		7.8	8.968	11.002
		8.2	8.931	10.706
	4:1	7.0	9.260	11.385
		7.1	9.289	11.457
		7.2	9.293	11.717
		7.4	9.225	11.405
		7.8	8.998	10.850
		8.2	8.967	10.512
100 mM KCl ve 50 μ M EDTA İçeren 0.005 M PIPES	1:4	7.0	12.880	12.879
		7.1	12.972	12.963
		7.2	12.987	12.995
		7.4	12.957	12.960
		7.8	12.709	12.710
		8.2	12.507	12.505
	2:3	7.0	13.089	13.097
		7.1	13.100	13.117
		7.2	13.177	13.208
		7.4	13.103	13.117
		7.8	12.809	12.815
		8.2	12.788	12.791
	4:1	7.0	12.843	12.854
		7.1	12.887	12.892
		7.2	12.915	12.935
		7.4	12.806	12.810
		7.8	12.699	12.701
		8.2	12.497	12.503

NK: $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti

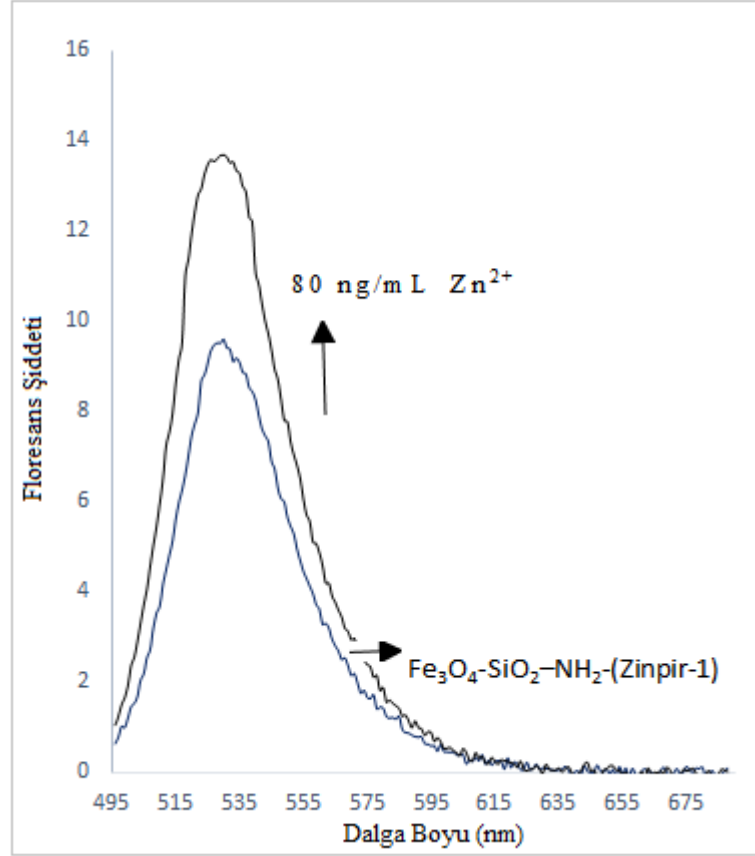
Bu şartlar altında yüklenen Zn^{2+} ile çözeltinin floresans şiddetinin arttığı renginin sarıya boyanması ile (Şekil 4.20) anlaşılmaktadır.



Şekil 4.20. 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3, pH 7.2) tampon çözeltisi içerisinde Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti (A) ve Zn^{2+} yüklenen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti ile Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) oluşumu (B)

4.6.2. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofluorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Uyarma (λ_{uy}) ve Emisyon (λ_{em}) Dalga Boylarının Belirlenmesi

100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde hazırlanan Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine (1mg/3mL) final derişimi 80 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} yüklenerek hazırlanan Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) çözeltisinin 200-600 nm dalga boyu aralığında eksitasyon ve 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon taraması yapıldı ve en uygun uyarma dalga boyunun 490 nm ve buna karşılık gelen uygun emisyon dalga boyunun 530 nm olduğu tespit edildi (Şekil 4.21).

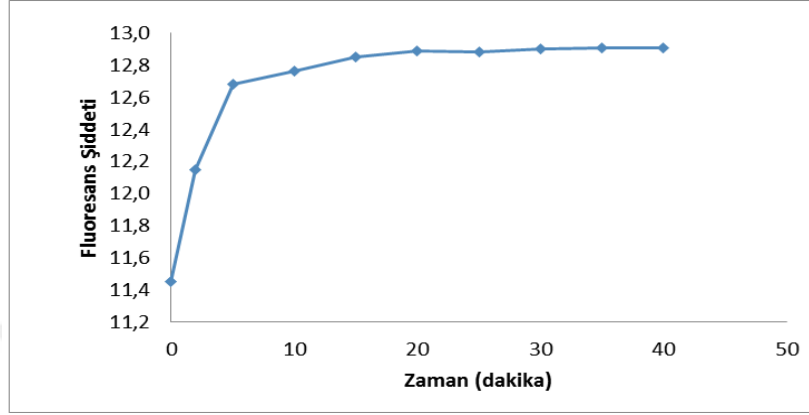


Şekil 4.21. 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 80 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin floresans spektrumları

4.6.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofotometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} 'nin Floresans Şiddeti Üzerine Zamanın Etkisi

100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine (1mg/3mL) final derişimi 80 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} yüklenerek $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ oluşturmak üzere gerçekleştirilen reaksiyonun meydana gelmesi için gereken süreyi belirlemek amacıyla $\lambda_{\text{uy}}:490 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{em}}:530 \text{ nm}$ dalga boylarında laboratuvar oda koşullarında 0., 5., 7.5., 10., 15., 20., 25., 30., 35. ve 40. dakikalarda floresans spektrumları alındı. Zn^{2+} belirlenmesinde kullanılan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-}$

NH₂-Zn(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin floresans şiddetinin 20. dakikaya kadar arttığı ve bu dakikadan sonra sabit kaldığı belirlendi (Şekil 4.22) ve bundan sonra Zn²⁺ tayini için yapılan tüm çalışmalarda bu süre göz önüne alındı.



Şekil 4.22. 1mg/3mL Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine 80 ng/mL Zn²⁺ yüklenmesi ile elde edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin floresans şiddeti üzerine zamanın etkisi (λ_{uy}:490 nm ve λ_{em}:530 nm)

4.6.4. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompozitinin Metal İyon Seçiciliği

Tükürükte Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ve Zn²⁺ metal katyonları bulunmaktadır. Bunlara ilaveten aşağıda belirtilen tedaviler sonrasında tükürüğe salınan metal katyonları Cr²⁺, Co²⁺, Mo²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺, Ag⁺, Sn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Ti⁴⁺ ve Al³⁺'dür. Bunlar;

Protetik tedavide (kuron-köprü (kaplama) ve metal destekli bölümlü ve tam protezler); protez malzemesi olarak metal alaşımlar kullanılır. Bunlar da altın alaşımlarının yanı sıra daha ekonomik olması açısından % 63-68 Cr²⁺, % 25-30 Co²⁺ ve eser miktarda Mo²⁺, Mn²⁺, C, Fe²⁺, Si²⁺ içeren Co-Cr alaşımları tercih edilmektedir. Diş protezi yapılan hastaların tükürüklerinde belirtilen iyonların belirlenmesine yönelik bir çalışmada tükürükten Co²⁺, Mo²⁺, C ve Fe²⁺'nin izole edilemediği ve sadece Cr²⁺ ve Mn²⁺'nin belirlenebildiği belirtilmiş ve uygulamadan 3 gün sonra protez hastalarının tükürük örneklerinde 0.0586 pg/mL Cr ve 0.0006 pg/mL Mn tespit edilmiştir.¹³⁹

Ortodontik tedavide; ortodontik dirsekler, bantlar ve teller için paslanmaz çelik kullanılır ve bu çelik de yaklaşık %18 Cr^{2+} ve %8 Ni^{2+} içerir. Ortodontik tedavi gören sabit ortodontik apareylere sahip hastaların tedavi süresince tükürük örneklerinde Ni^{2+} ve Cr^{2+} seviyelerine bakılmış ve tükürükte 0.53–1.53 ng/mL derişim aralığında Cr^{2+} ve 4.12-11.53 ng/mL derişim aralığında Ni^{2+} tespit edilmiştir.¹⁴⁰

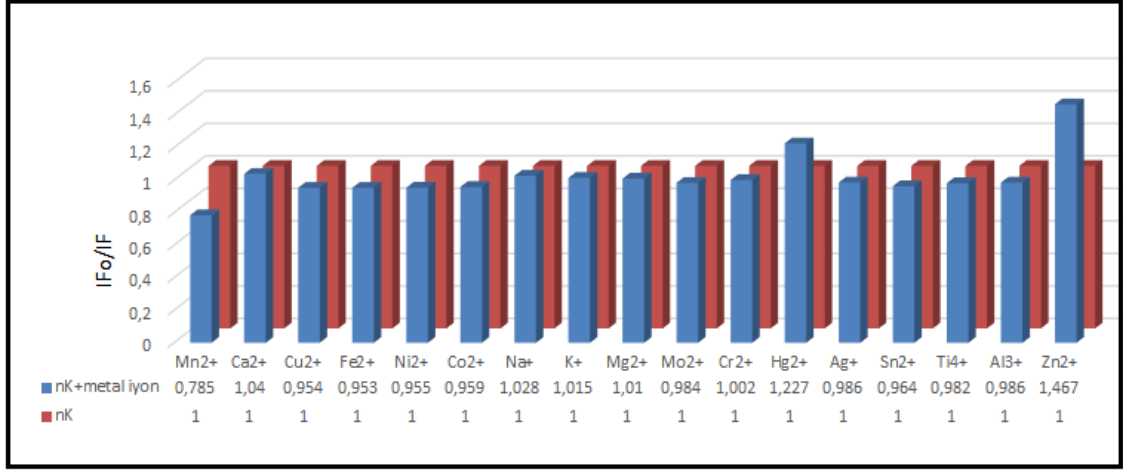
Diş çürüklerinin konservatif tedavisinde; dolgu materyali olarak amalgam, kompozit ve kompomer malzemeler kullanılır. Kompozit ve kompomer malzemeler metal içermez. Amalgam dolgular ise gümüş dolgular olarak tanımlanır. Amalgam; Ag^+ , Sn^{2+} ve Cu^{2+} alaşımının, Hg^{2+} ile karıştırılması ile elde edilir. Metal içeren malzemelerle restoratif tedavi gören hastaların tükürüklerinde kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda Ag^+ , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} tespit edilmiştir.¹⁴¹ Hg^{2+} toksik olduğu için günümüzde amalgam dolgular tercih edilmemektedir.

İmplant tedavisinde; paslanmaz çelik, Co-Cr alaşımı, Ti ve Ti alaşımları kullanılmaktadır. Yapay tükürük ortamında yapılan bir çalışmada belirtilen biyomateryallardan Ti^{4+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ve Al^{3+} 'ün salındığı belirtilmiştir.¹⁴²

Ayrıca tükürükte sigara içen kişilerde Al^{3+} iyonunun kontrol grubuna göre yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir.⁸³

Bu bilgiler ışığında; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitini kullanarak Zn^{2+} 'nin tayininde, tükürükte bulunan bazı metal iyonlarının (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mo^{2+} , Cr^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Sn^{2+} , Ti^{4+} ve Al^{3+}) girişim etkileri araştırıldı. Bu amaçla; girişim özelliği incelenen türlerin Bölüm 3.9'da belirtildiği gibi çözeltileri hazırlandı, oluşum sabitlerine bağlı olarak 490 nm uyarmada meydana gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans spektrumları alındı ve girişim etkisi, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin floresansını artıracak veya azaltacak yönde etki göstermesi ile belirlendi. %10'dan daha fazla bu etkiyi gösteren ilgili derişimdeki türün

girişim etkisi olduğu sonucuna varıldı. Buna göre, Şekil 4.23’de görüldüğü gibi Zn^{2+} tayininde, Mn^{2+} ve Hg^{2+} ’nin, Zn^{2+} ’nin en yüksek kalibrasyon derişiminin 100 katı derişimlerinde olumsuz etkileri gözlenirken diğer belirlenen metal iyonlarda gözlenmedi. $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin floresansını, Mn^{2+} azaltacak yönde Hg^{2+} ise artıracak yönde etki gösterdi. Protetik tedavi gören hastalarda gözlenen Mn^{2+} ’nin uygulamadan 3 gün sonra pg/mL seviyesine düşmesi ve diş çürüklerinin konservatif tedavisinde artık amalgam malzemenin tercih edilmemesi ve yine Hg^{2+} deşiminin zamanla pg/mL seviyesine azalması yönünden tükürükte $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitini kullanarak Zn^{2+} tayininin rahatlıkla yapılabileceği söylenebilir.



nK: $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompoziti

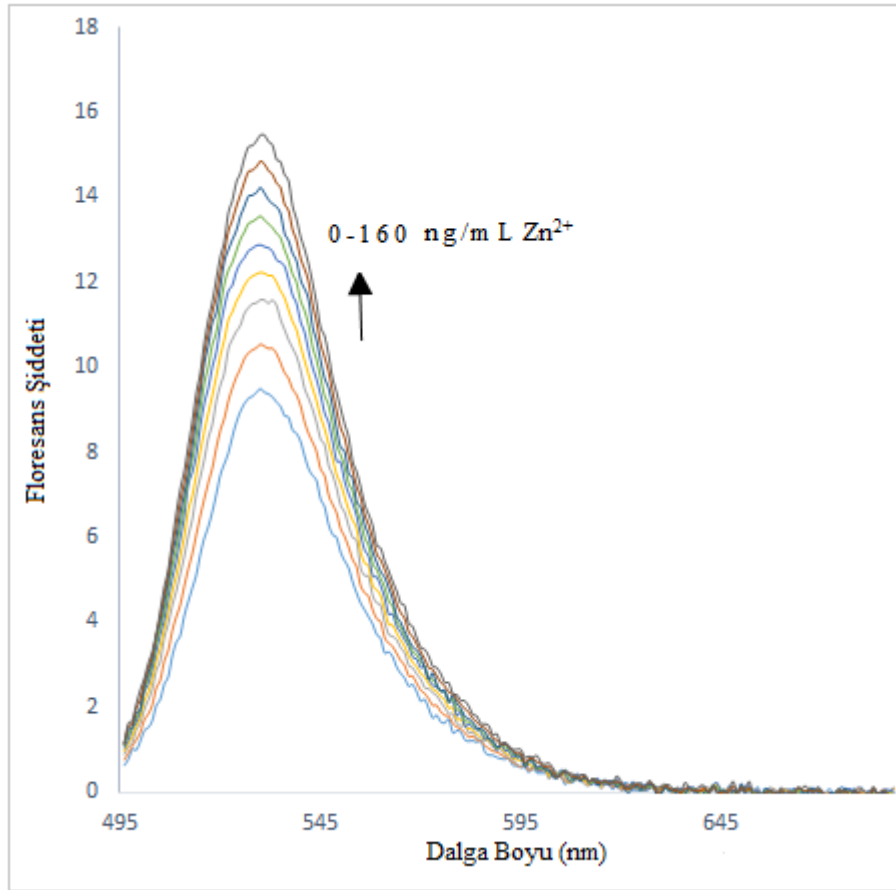
Şekil 4.23. Zn^{2+} ’nin tayininde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti oluşumuna dayalı spektrofotometri yöntemi ile girişim etkisi araştırılan metaller

4.7. $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofotometri Yöntemi ile Zn^{2+} ’nin Belirlenmesine Yönelik Geliştirilen Spektrofotometri Yönteminin Geçerlilik Testleri

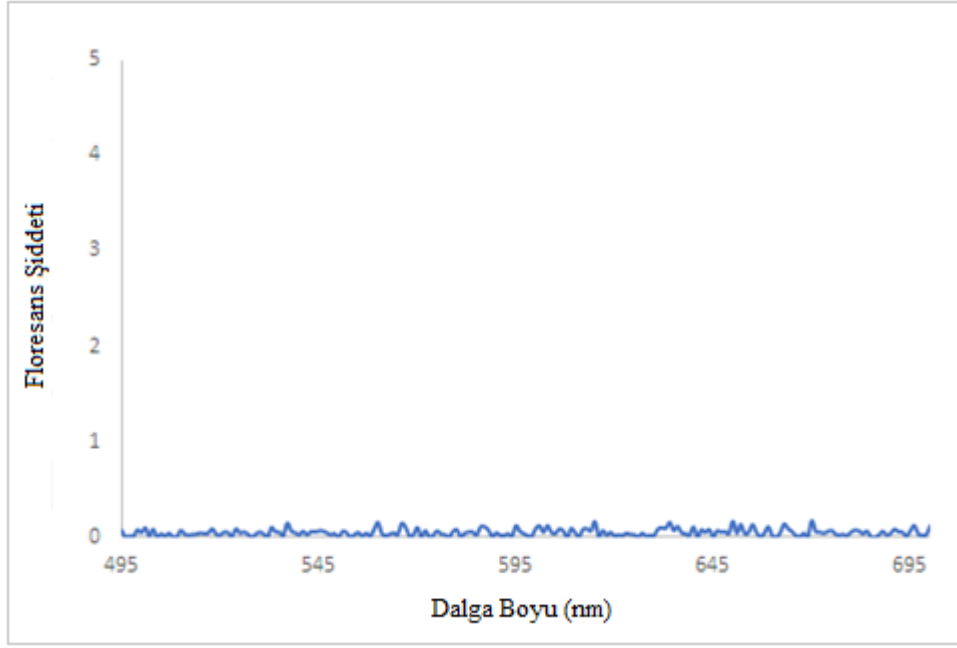
4.7.1. Özgünlük (Belirleyicilik) / Seçicilik

100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanan 1mg/3mL $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine 0-160 ng/mL final derişim aralığında Zn^{2+} yüklendi ve 20

dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi. 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunu kapsayacak şekilde 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon spektrumları alındı (Şekil 4.24). $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin 530 nm’de gözlenen emisyon piki Zn^{2+} yüklemesi ile derişime bağılı olarak artış gösterdi. Ayrıca 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris–HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinin 490 nm uyarma dalga boyunda 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon spektrumları alındı (Şekil 4.25) ve 530 nm’de çözücünden kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.

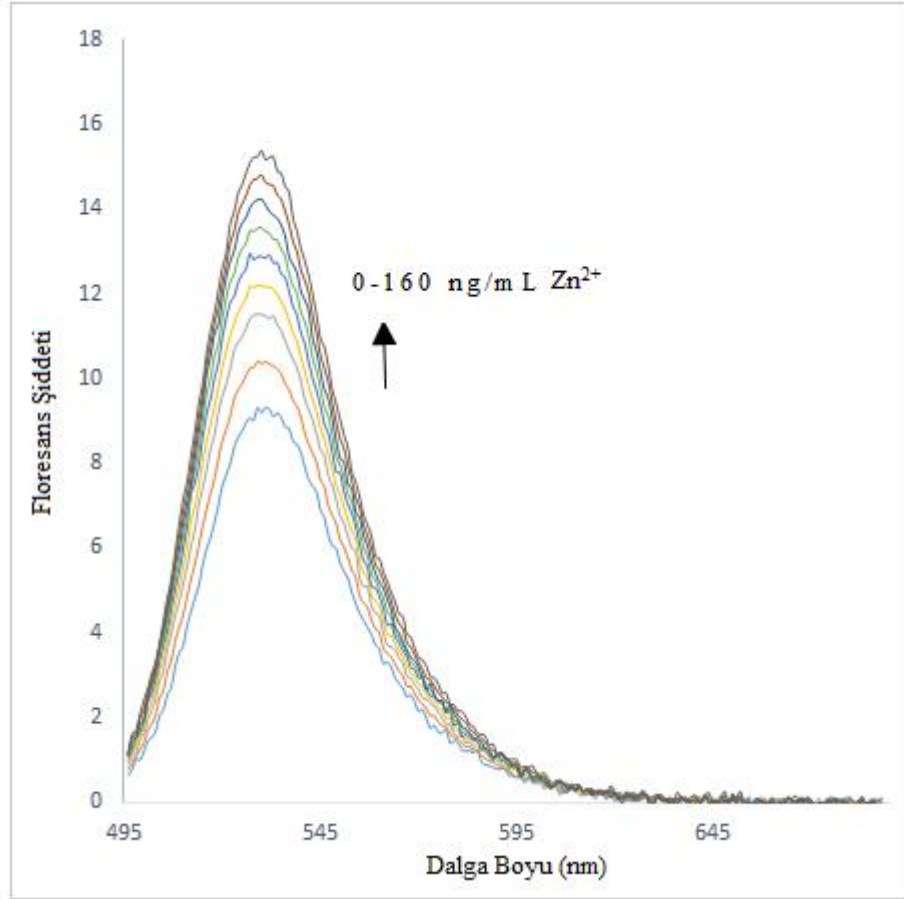


Şekil 4.24. 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine 0-160 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin emisyon spektrumları



Şekil 4.25. 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinin emisyon spektrumu

Bölüm 3.8’de belirtildiği gibi yapay tükürük çözeltisi hazırlandı ve 1 mL yapay tükürük çözeltisinin içerisine final derişim aralığı 0-160 ng/mL olacak şekilde Zn²⁺ spike edildi. Yine, Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde gerekli işlemler yapıldıktan sonra 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tamponu içerisinde 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti olacak şekilde hazırlanan dispers çözelti yapay tükürük çözeltisine eklendi, 20 dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi ve manyetik olarak çözelti ortamından ayrıldı. Daha sonra elde edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandıktan sonra 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunu kapsayacak şekilde 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon spektrumu alındı (Şekil 4.26). Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin 530 nm’de gözlenen emisyon piki Zn²⁺ yüklemesi ile derişime bağlı olarak artış gösterdi. Yapay tükürükten kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.



Şekil 4.26. Yapay tükürük çözeltisi içerisinde 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozite 0-160 ng/mL Zn^{2+} yüklenmesi ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin emisyon spektrumları

4.7.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

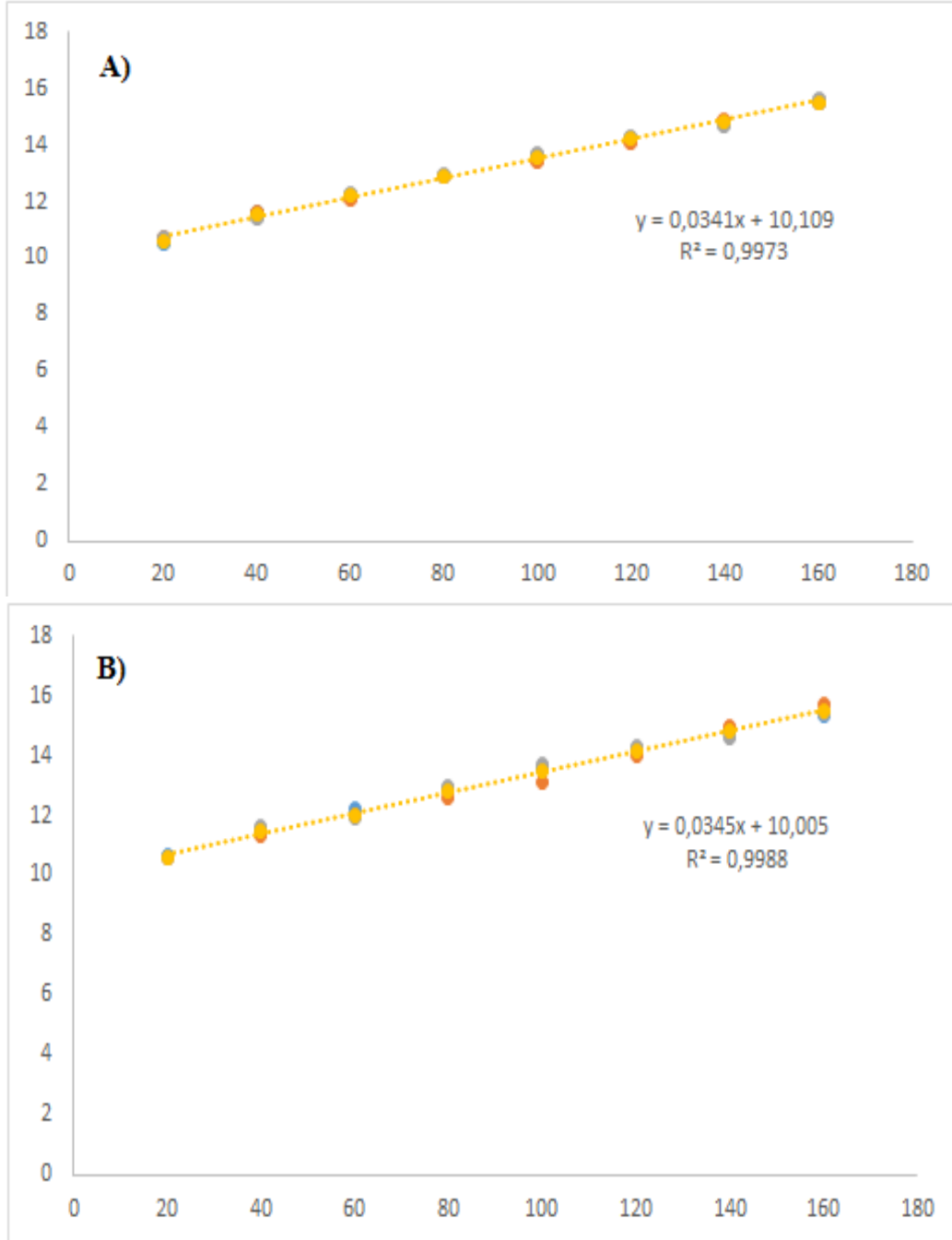
100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanan 1mg/3mL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozit çözeltisi üzerine final derişimi 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} yüklenerek standart çalışma çözeltileri hazırlandı. 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri kaydedildi. Zn^{2+} derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek standart ekleme yöntemi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.27A). Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı (Tablo 4.5).

1 mL yapay tükürük çözeltisinin içerisine final derişimi 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} spike edildi. Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde gerekli işlemler yapıldıktan sonra 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris–HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tamponu içerisinde 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti olacak şekilde hazırlanan dispers çözelti yapay tükürük çözeltisine eklendi, 20 dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi ve manyetik olarak çözelti ortamından ayrıldı. Daha sonra elde edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı ve sonra 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri kaydedildi. Yapay tükürük içerisinde elde edilen Zn^{2+} derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek standart ekleme yöntemi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.27 B). Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn^{2+} ’nin Kalibrasyon Eğrilerinin İstatistiksel Analiz Değerleri

Çözelti Türü	λ_{em}	ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
Standart	530	20-160	Y=0.0341x + 10.109	0.058	0.0007	0.9973
Yapay Tükürük	530	20-160	Y=0.0345x + 10.005	0.104	0.0015	0.9988

ÇA: Çalışma aralığı, a: 3 Kalibrasyon eğrisi, LR: Lineer regresyon, Sa: Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: Regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R²: Korelasyon katsayısı



Şekil 4.27. Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti kullanılarak spektrofotometri yöntemi ile belirlenen Zn²⁺'nin standart çözeltilerde (A) ve yapay tükürük çözeltilerinde (B) elde edilen kalibrasyon eğrileri

4.7.3. Doğruluk/ Kesinlik

100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanan 1mg/3mL Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozit çözeltisi üzerine final derişimi kalibrasyon eğrisinde yüksek orta

ve düşük derişimleri temsil eden 40, 80 ve 120 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} yüklenerek standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 3 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 3 kez) analizleri 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri kaydedilerek gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi ve değişim katsayıları hesaplandı (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

1 mL yapay tükürük çözeltisinin içerisine final derişimi kalibrasyon eğrisinde yüksek orta ve düşük derişimleri temsil eden 40, 80 ve 120 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} spike edildi. Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde gerekli işlemler yapıldıktan sonra 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tamponu içerisinde 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti olacak şekilde hazırlanan dispers çözelti yapay tükürük çözeltisine eklendi, 20 dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi ve manyetik olarak çözelti ortamından ayrıldı. Daha sonra manyetik olarak ayrılan Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı ve elde edilen çözeltilerin gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 3 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 3 kez) analizleri 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri kaydedilerek gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi ve değişim katsayıları hesaplandı (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.6. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn²⁺'nin Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik Değerleri

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Gün İçi		
		Ortalama±SS (ng/mL)	%BH	%BSS
Standart	40	40.38 ± 0.37	0.95	0.91
	80	80.32 ± 1.17	0.41	1.46
	120	120.7 ± 0.81	0.67	0.56
Yapay Tükürük	40	40.89 ± 1.01	2.22	2.47
	80	80.36± 1.37	0.45	1.70
	120	120.6 ± 1.88	0.50	1.55

SS: Standart sapma (n=3), BSS: Bağıl standart sapma (SS/ortalamax100), BH: Bağıl hata

Tablo 4.7. Standart ve Yapay Tükürük Çalışma Çözeltilerinde Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn²⁺'nin Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik Değerleri

Ortam	Eklenen (ng/mL)	Günler Arası		
		Ortalama±SS (ng/mL)	%BH	%BSS
Standart	40	40.36 ± 1.02	0.89	2.52
	80	80.70 ± 1.47	0.87	1.82
	120	120.9 ± 1.18	0.79	0.98
Yapay Tükürük	40	40.26 ± 0.96	0.65	2.38
	80	80.79 ± 1.20	1.00	1.48
	120	120.8 ± 1.46	0.71	1.21

SS: Standart sapma (n=3), BSS: Bağıl standart sapma (SS/ortalamax100), BH: Bağıl hata

4.7.4. Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (Miktar

Tayin Limiti) (LOQ)

Bölüm 3.12.4'te anlatıldığı gibi standart ve yapay tükürük çözeltilerinde Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti ile belirlenen Zn²⁺ için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Standart

çözeltilerde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5.04 ng/mL ile 15.3 ng/mL olarak tespit edilirken yapay tükürük çözeltilerinde ise LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5.89 ng/mL ile 17.8 ng/mL olarak tespit edildi.

4.7.5. Geri Kazanım

Yapay tükürükte doğruluğun bir ölçüsü olan geri kazanım çalışması yapıldı. Bu amaç için, öncelikle standart çözeltideki değerleri elde etmek amacıyla 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde hazırlanan 1mg/3mL Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine final derişimleri 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160 ng/mL olacak şekilde Zn²⁺ yüklenerek standart çözeltiler hazırlandı. Yine 1 mL yapay tükürük çözeltisinin içerisine final derişimleri 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 ve 160 ng/mL olacak şekilde Zn²⁺ spike edildi. Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde gerekli işlemler yapıldıktan sonra 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tamponu içerisinde 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti olacak şekilde hazırlanan dispers çözelti yapay tükürük çözeltisine eklendi, 20 dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi ve manyetik olarak çözelti ortamından ayrıldı. Daha sonra elde edilen Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-Zn(Zinpir-1) nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı. Hem standart hem de yapay tükürük ortamında hazırlanan çözeltilerin 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri kaydedildi. Yapay tükürük çözeltilerinin floresans şiddeti standart çözeltilerden elde edilen floresans şiddeti ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.8’de verildi.

Tablo 4.8. Yapay Tükürük İçerisine Katım Yapılan ve Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenen Zn²⁺'nin Geri Kazanım Değerleri

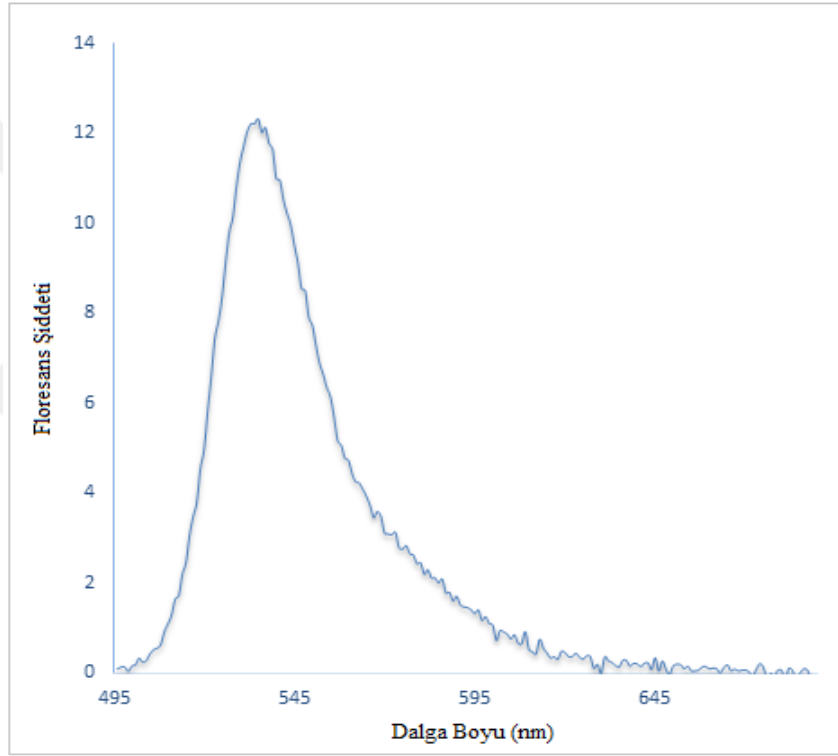
Eklenen Derişim (ng/mL)	Bulunan Derişim ±SS (ng/mL)	Geri Kazanım
20	20.02±1.23	100.08
40	39.57±1.29	98.93
60	59.21±0.86	98.68
80	79.60±1.57	99.50
100	99.61±2.84	99.61
120	119.90±1.52	99.92
140	139.36±1.50	99.54
160	160.08±1.21	100.05

SS: Standart sapma (n=3)

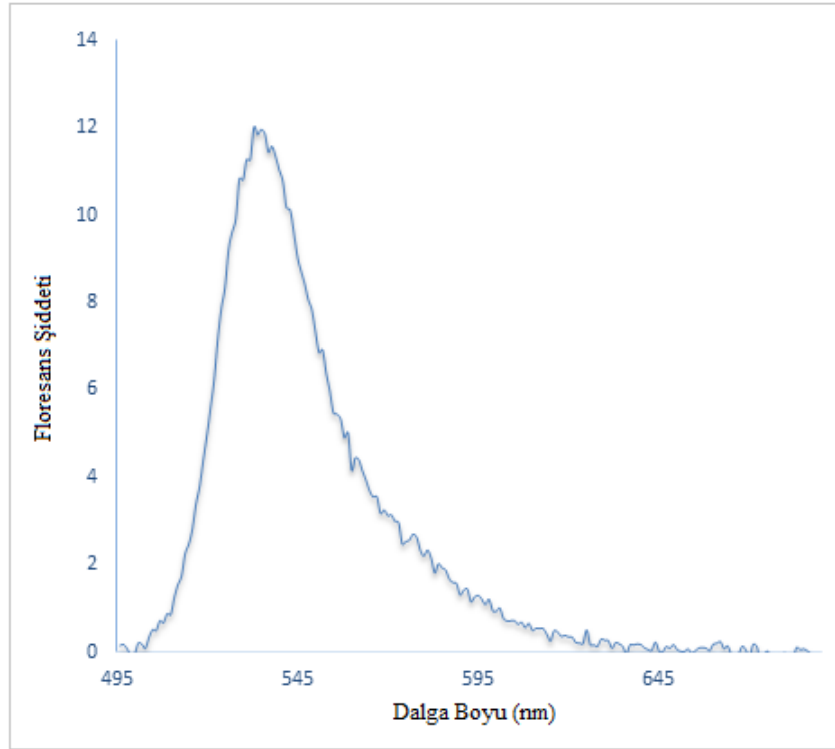
4.8. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerde Tükürük Zn²⁺'nin Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektroflorometri Yöntemi ile Belirlenmesi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan çalışma onayı alındıktan sonra (karar no: 07, tarih: 17.09.2015) Bölüm 3.13'te anlatılan örnek alma prosedürüne göre 6 sağlıklı gönüllü ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında 6 oral prekanser ve 6 oral kanser teşhisi konulmuş toplam 12 hasta çalışmaya alındı. Belirtilen sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanserli ve oral kanserli hastaların özellikleri Bölüm 3.13'te belirtildi. Alınan örnekler analiz edilene kadar -80°C'de muhafaza edildi. Daha sonra tükürük örnekleri laboratuvar oda koşullarında çözündürüldü ve Bölüm 3.14'te belirtildiği gibi her bir örnekten 1 mL tükürük örneği alındı, gerekli işlemler yapıldıktan sonra 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/H₂O 2:3 h/h, pH 7.2) tamponu içerisinde 3 mg Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) manyetik nanokompoziti olacak şekilde hazırlanan dispers çözelti yapay tükürük çözeltisine eklendi, 20 dakika laboratuvar oda koşullarında bekletildi ve

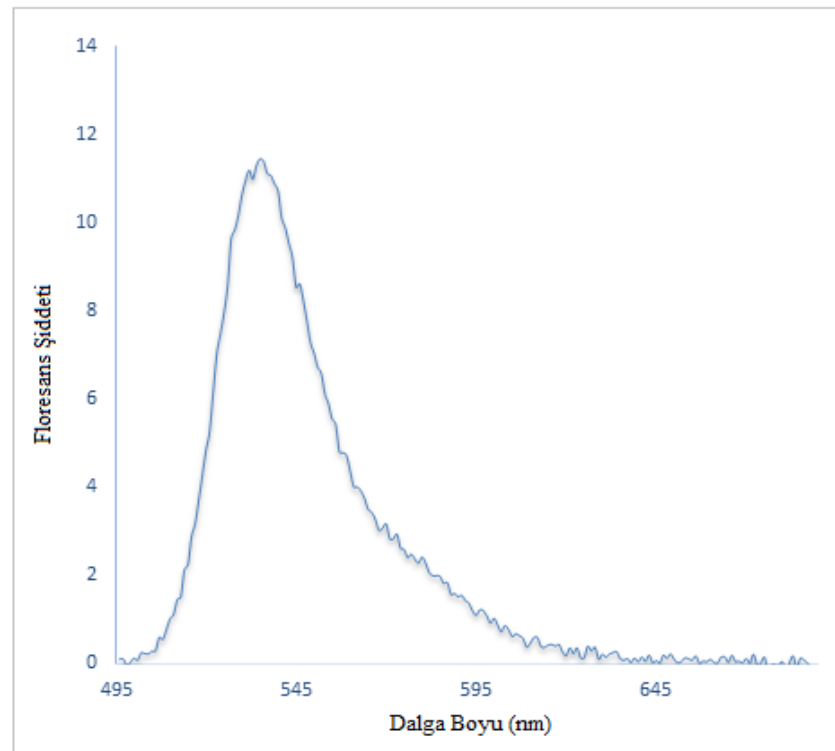
manyetik olarak çözelti ortamından ayrıldı. Daha sonra elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Bu tükürük çözeltilerinin 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunu kapsayacak şekilde 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon spektrumu alındı. Sağlıklı gönüllüde ve oral prekanserli ve oral kanserli hastalarda, Zn^{2+} analizi sonucu elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da verildi.



Şekil 4.28. Sağlıklı gönüllü kişilerden UM'nin tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon spektrumu



Şekil 4.29. Oral prekanserli hastalardan CÜ'nün tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ (Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon spektrumu



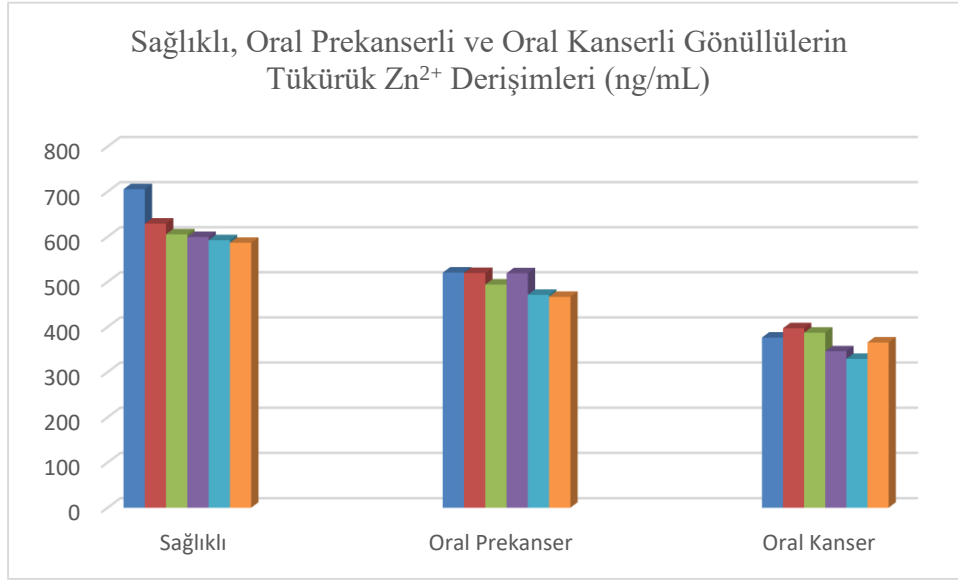
Şekil 4.30. Oral kanserli hastalardan ZA'nın tükürük örneğinde bulunan Zn^{2+} ile elde edilen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ (Zinpir-1) nanokompozitinin emisyon spektrumu

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin 530 nm’de gözlenen emisyon pikinde tükürükte bulunan Zn^{2+} derişimine bağı olarak floresans şiddetinde artış görüldü. Yapay tükürük içerisinde elde edilen Zn^{2+} derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek standart ekleme yöntemi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanserli ve oral kanserli hastaların hem tükürük örneklerinde bulunan Zn^{2+} derişimleri hem de seyreltme faktörü olan 9/1 oranı ile çarpılması sonucu elde edilen tükürükteki gerçek derişimleri bulundu. Elde edilen veriler Tablo 4.9 ve Şekil 4.31’de verildi.

Tablo 4.9. Sağlıklı, Oral Prekanserli ve Oral Kanserli Gönüllülerde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) Manyetik Nanokompoziti Kullanılarak Spektrofluorometri Yöntemi ile Belirlenen Tükürük Zn^{2+} Derişimleri

Gönüllü	İsim	Tükürük Zn^{2+} Derişimleri (ng/mL)	
		Bulunan	BulunanxSey fak (9/1)
Sağlıklı (4E,2K) (YO:46.33±15.66)	AP	78.38	705.39
	KM	69.91	629.22
	UM	67.28	605.48
	NA	66.61	599.48
	EP	65.83	592.43
	GG	65.19	586.70
Oral Prekanserli (4E,2K) (YO:43.33±11.50)	EG	57.86	520.70
	AŞ	57.74	519.65
	YÇ	54.90	494.09
	CÜ	57.68	519.13
	NT	52.38	471.39
	YŞ	51.88	466.96
Oral Kanserli (4E,2K) (YO:52.66±15.27)	ZA	41.86	376.70
	İT	44.14	397.30
	YÖ	43.04	387.39
	NB	38.46	346.17
	ND	36.58	329.22
	HS	40.64	365.74

E: Erkek, K: Kadın, YO: Yaş ortalaması, Sey fak: Seyreltme faktörü



Şekil 4.31. Sağlıklı gönüllülerin (6) ve oral prekanserli (6) ve oral kanserli (6) hastaların $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti kullanılarak spektrofotometri yöntemi ile elde edilen tükürük Zn^{2+} derişimlerinin sütun grafikleri

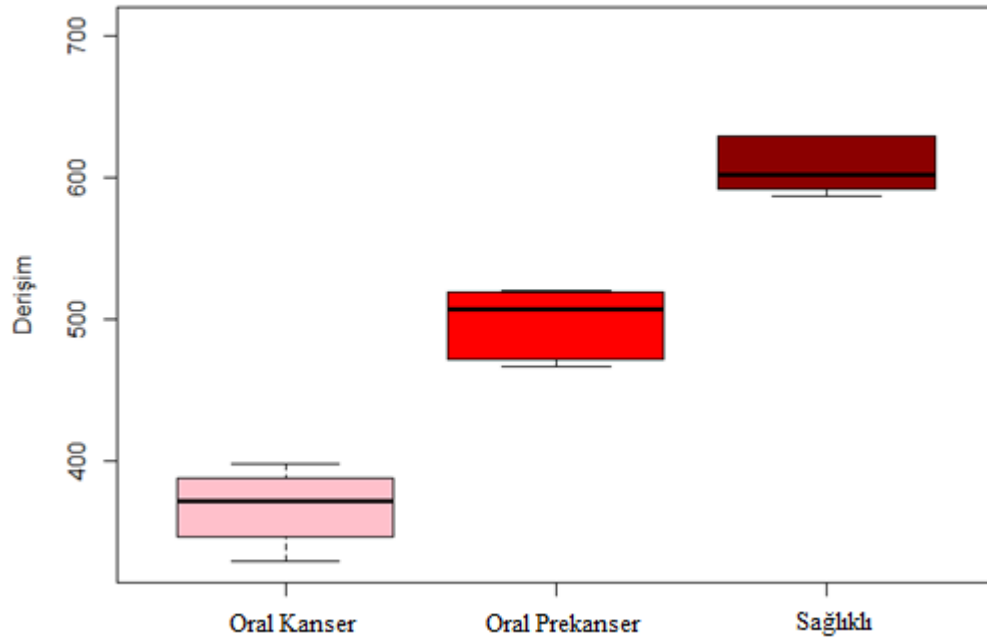
Sağlıklı gönüllülerin (6) ve oral prekanserli (6) ve oral kanserli (6) hastaların tükürük Zn^{2+} derişimleri arasındaki farklılığın anlamlılık düzeyini ortaya koymak amacıyla tek yönlü ANOVA analizinin non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis tek yönlü analizi veri setine uygulandı (Tablo 4.10). Elde edilen istatistiksel veriler ışığında; sağlıklı, oral prekanserli ve oral kanserli gönüllülerin tükürük Zn^{2+} derişimlerinde $p < 0.001$ seviyesinde anlamlı farklılığın olduğu ve sağlıklı gruptan, sırasıyla oral prekanser ve oral kanser gruplarına doğru gidildikçe ortalama tükürük Zn^{2+} derişimlerinde oldukça anlamlı derecede ($p = 0.0005$) bir azalma olduğu görülmektedir.

Tablo 4.10. Sağlıklı Gönüllülerden (6) ve Oral Prekanserli (6) ve Oral Kanserli (6) Hastalardan Elde Edilen Tükürük Zn^{2+} Derişimlerinin İstatistiksel Analiz Değerleri (Kruskal Wallis Test)

	Çalışma Grubu	n	Ortalama	Standart Sapma	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
1	Sağlıklı	6	619.77	44.45	586.70	594.2	602.5	623.3	705.4
2	Oral Prekanserli	6	498.64	24.96	467.01	477.1	506.6	519.5	520.7
3	Oral Kanserli	6	367.08	25.65	329.20	351.1	371.2	384.7	397.3

Kruskal Wallis Rank Sum Test		
Ki-Kare Değeri	Serbestlik Derecesi	P Değeri
15.158	2	0.0005111

n: Kişi sayısı, Q1: Alt çeyrek, Q3: Üst çeyrek, Min.:Minimum, Max.: Maksimum, Median:Ortanca



Şekil 4.32. Sağlıklı gönüllülerden (6) ve oral prekanserli (6) ve oral kanserli (6) hastalardan elde edilen tükürük Zn^{2+} derişimlerine ait kutu grafikler

5. TARTIŞMA

Kanser; hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmaların bazı etkenler tarafından bozulması nedeniyle atipik hücrelerin anormal miktarlarda çoğalması ve sağlıklı dokuların yerini alması sonucunda organizmanın fonksiyon göremez hale gelmesi olarak tanımlanır.¹⁴³ Hızlı nüfus artışı ve dünya nüfusunun yaşlanması ile birlikte kanserin insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır.¹ Dünyada teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde 100’den fazla kanser türü tespit edilmektedir.¹⁴⁴

Oral kanserler, alt ve üst dudakların üstünde, ağzın içinde, gırtlak, bademcikler veya tükürük bezlerinin arkasında meydana gelen kanser türleri olarak tanımlanır.^{145,146} Baş boyun bölgesinde görülen kanserler içerisinde oral kanserler ikinci sıradadır.¹⁴⁷ GLOBOCAN’ın 2018 yılındaki verilerine göre dünyada 354.864 yeni dudak ve oral kanser vakası, 2012 yılındaki verilerine göre ise Türkiye’de 1910 yeni oral kanser vakası teşhis edildiği bildirilmiştir. Bu verilere göre oral kanserden ölenlerin sayısı; dünyada 177.384 iken Türkiyede 792 olarak belirtilmiştir.¹ Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tedavilere rağmen her yıl 300.000’in üzerinde yeni vakanın bildirilmesi ve mortalite oranının yüksek olması bu kanser türünün ciddiyetini gözler önüne sermektedir.¹⁴⁵

Oral kanserler, malignitenin türüne göre gruplara ayrılır. Bunlardan bir tanesi epidermoid karsinomdur. OSHK bir epidermoid karsinom olup ağız ve orofarenksin deri ve örtücü mukozalarının dış dokusunda (çok katlı yassı epitel) görülen bir kanser türüdür. Görsel muayene, biyopsiyi takiben histopatoloji, ışık tabanlı çeşitli görüntüleme teşhis sistemleri ve DNA analizi oral kanser teşhisi için kullanılan çeşitli yöntemlerdir.³² Oral kanserlerin %90’ından fazlasını OSHK oluşturur. OSHK’nın görülme sıklığı yaş ile birlikte artmakta ve çoğunlukla 40 yaş üstü erkeklerde görülmektedir. Ancak son yıllarda gençlerde ve kadınlarda da görülme sıklığının artması artan sigara ve alkol tüketimi ile

ilişkilendirilmektedir. Oral kanserle ilişkili ölümlerin büyük bir kısmı 65 yaş ve üstü bireylerde görülmektedir. OSHK için tütün ve alkol kullanımı, kötü ağız hijyeni ve HPV'nin en önemli olası etiyolojik faktörler olduğu söylenebilir.¹⁴⁸ Oral kanserlerden görülme sıklığı en fazla olan OSHK türü olduğu için çalışmamızda bu oral kanser türü seçildi.

Kanser gelişme olasılığı normal özellikteki eş dokuya göre fazla olan morfolojik olarak değişmiş doku prekanser olarak tanımlanır. Oral kanserlerde görülen en yaygın oral prekanser lezyonlarlar OE, OL, OSMF ve OLP'dir.¹⁰

OLP, mukokütanoz bir lezyon olup oral mukozada sıkça rastlanılan iltihabi bir hastalıktır. Genellikle 40 yaş üstü bireylerde görülür. Kesin etiyolojisi bilinmemekle birlikte emosyonel stresin lezyonun ortaya çıkmasında etkin olduğu belirtilmektedir. Asemptomatik olan bu lezyonlar klinik olarak heterojen görünümde olup retiküler, eroziv, büllöz, papüler, hipertrofik ve ülseratif gibi formlarda görülebirlirler. Retiküler ve diğer asemptomatik OLP hastaları tedavi olmadan izlenebilirken herhangi bir belirti ve/veya potansiyel kanser riskinin olduğu durumlarda lezyonlar tedavi edilmelidir. OLP için hem topikal hem de sistemik tedavi yöntemleri bildirilmiştir. OLP, yüksek görülme sıklığı nedeniyle kansere dönüşüm habercisi olarak önemli bir yere sahiptir. Hastalığın 10 yıl sonrasında hastaların % 1-4'ünde kanser gelişiminin olduğu tahmin edilmektedir.^{19,25-28} OLP en sık görülen oral prekanser lezyonlardan biri olduğu için çalışmamızda bu oral prekanser türü seçildi.

Kanser hastalıklarında, tümörün vücuttaki yaygınlığı tedaviye alınan cevap ile doğru orantılıdır. Bu nedenle kanserli hücrelerin bulunduğu alandan vücudun diğer alanlarına yayılmadan önce erken teşhisi ve bu şekilde hastalığın önüne geçilmesi kanser tedavilerinde başarıya ulaşmayı sağlar. Günümüzde elde edilen verilere göre, erken teşhis edilip tedavisine başlanan kanser vakalarında yüksek oranda iyileşme görülmektedir. Bu

oran OSHK'da benzerdir.¹³

Erken teşhis başarılı tedavi şansını arttırdığı için, oral kanserlerde prekanser lezyonların olabildiğince erken teşhis edilmesi önemlidir. Prekanser bir lezyonun tanınarak zamanında tedavi edilmesi kanser transformasyon gelişimini engelleyebilir.²⁰ Geç kalındığı takdirde ciddi boyutta displaziye ilerleyebilir. Ayrıca prekanserin karsinom in situ'ye ve/veya OSHK'ya dönüşme riski vardır. Bu nedenle erken teşhis önemlidir ve hayat kurtarıcı olabilir.¹⁹

Son yıllarda, erken tanı ve tedavi imkanlarındaki artışa rağmen oral kanser tanısında % 60-70 oranında geç kalınmaktadır.¹⁸ Erken teşhis edilemeyen olgularda tedavi sonrasında düzeltilemeyen yüz ve ağız deformiteleri, fonksiyon kaybı ve hatta ölümler meydana gelebilir.¹⁵ Popülasyonun tamamında oral kanser taraması yapmak maliyet açısından oldukça külfetlidir. Ayrıca diş hekimleri, oral kanserlerin teşhisinden sorumlu olmalarına rağmen, farklı ülkelerde yapılan çalışmalara göre oral kanserin önlenmesi ve erken teşhisi için gerekli olan prosedürleri düzenli olarak uygulamamaktadırlar. Türkiyede'de yapılan ve oral kanserin önlenmesi ve erken teşhisi konusunda diş hekimlerinin farkındalığını araştıran bir anket çalışmasında elde edilen verilere göre diş hekimlerinin 40 yaş üzerindeki hastalarına ağız kanseri muayenesi yapma oranının oldukça düşük olduğu belirtilmiştir.^{18,145,149-151} İstatistik verilerine göre erken tanıda %90 olan 5 yıllık hayatta kalma oranı, birçok oral kanser için ileri evrelerde tanı konulmasından dolayı %20 civarına geriler.¹³ Bu bağlamda, oral kanserler için en kötü prognoz olan bu durumdan dolayı, erken teşhis ve önlem için yapılan çalışmaların önemi artmaktadır.

OSHK lezyonları, alanı milimetreden santimetreye kadar değişebilen ve başlangıçta genellikle küçük ve semptomsuz olan lezyonlardır. Klinik özelliklerin yetersiz olması; tanıda biyopsi ve histopatolojik muayeneyi önemli kılmaktadır.¹⁶ Şüpheli

lezyonların biyopsisi ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi, erken dönem kanser tespitinde çok önemli olmakla birlikte invaziv bir tekniktir ve kitle taraması yapmak mümkün değildir. Bununla birlikte geniş veya multiple lezyonlarda, diagnostik hataları önlemek amacıyla gözlemcilerin lezyonun en karakteristik bölgesini hedeflemesi zorunludur. Bilhassa ilerlemiş displazilerdeki gözlemciler arası değişkenliğin yüksek olduğu söylenebilir.^{29,32} Ayrıca, dental panoramik tomografi, bilgisayarlı tomografi ve MRI gibi bazı yardımcı görüntüleme yöntemleri tanı için kullanılabilir. Oral prekanser lezyonlarının tespisi için kullanılan yardımcı tanı yöntemlerinde de spesifite değerlerinde tutarsız sonuçlar bulunduğu ve bu yöntem ve sistemlerin gerçek sensitivite ve spesifite değerlerini belirlemek amacıyla kontrollü klinik çalışmaların daha fazla yapılması gerektiği bildirilmiştir.²⁹

Son zamanlarda, ışığa dayalı tespit sistemlerinin duyarlılığı ve özgünlüğü arttırdığı iddia edilmesine rağmen kontrollü çalışmalar uygulamada bunun böyle olmadığını göstermiştir. Mehrotra ve Gupta³² ışık bazlı taramaya yardımcı sistemlerin, lezyonun biyolojik yapısını belirlemek için değil, geleneksel bir oral muayene ile göz ardı edilebilecek oral lezyonları tanımlamak için yalnızca klinik muayeneye yardımcı olarak kullanılmaları gerektiğini belirtmiştir.³²

Biyobelirteç biyolojik sıvılarda ve dokularda normal ya da anormal bir süreci belirten moleküllere verilen addır. Oral kanserler için kullanılan çok sayıda kan ve tükürük biyobelirteçleri vardır. Tükürük biyobelirteçleri inorganik bileşikler, peptit veya proteinler, DNA, mRNA veya microRNA, metabolomiks metabolitleri ve çeşitli kimyasal ve enzim aktivite bileşikleri olarak sıralanabilir.³³ Tükürükteki inorganik biyobelirteçler biyoelementlerdir.

Biyoelementler, ekzojen (primer) veya biyojen (ikincil) kökenli organik bileşikler ile atomlar, iyonlar ve nanopartiküller gibi kimyasal elementlerin biyolojik olarak aktif

bir kompleksini oluşturan yaşam maddelerinin elementel işlevsel birimleridir.¹⁵² Vücuttaki birçok süreçte önemli görevleri vardır. Bunlar, enzimlerin kofaktörü olması, yapı elementleri olması, hormonal fonksiyonlarda yer alması ve vücudun stabilizerlerini sağlaması şeklinde sıralanabilir. Bununla birlikte, vücut sıvıları ve hücrelerde katyon-anyon dengesinin sağlanması, sinir impulslarının iletimi, kasların kasılması ve vücut sıvılarının hareketinin düzenlenmesi gibi görevleri de vardır. Biyoelementlerin vücuttaki eksikliğinde stabilizasyonun bozulması nedeniyle, vücuttaki yapıların ve bunların fonksiyonlarının, yük özelliklerinin ve allosterik konfigürasyonun değişmesi gözlenir.¹⁵³ Ayrıca biyoelementlerin eksikliği veya fazlalığı durumunda kanserojenik stresse karşı vücut içi direncinde birtakım bozukluklar beklenir.¹⁵⁴ Bioelementolojik yaklaşımın geliştirilmesi ile insanların hastalıklarında teşhis ve tedavilerinin tanımlanması ve beslenme ile hastalıklar arasında ilişkinin kurulması sonucu sağlık durumlarının belirlenmesi sağlanabilir.

Canlı organizmada oldukça düşük miktarlarda bulunan çinko, on üç biyoelementten biridir ve insan vücudunda ikinci sırada yer alan eser elementtir. Çinko, mavimsi açık gri renkte olup periyodik tablonun II B grubunda yer alır. Erime noktası düşük olan kırılğan bir metaldir. Biyolojik sistemlerdeki çinko oksidasyon veya redüksiyona uğramayan ve sadece 2+ değerlikli olarak bulunan bir biyoelementtir.³⁴ Yetişkin bir insandaki miktarı yaklaşık 1.4-2.5 gr olan çinko, karaciğer, böbrek, retina, eritrositler, prostat, semen, hipokampus, kemik ve kas dokusu gibi bütün dokular, organlar ve vücut sıvılarında bulunmaktadır. Çinko yaklaşık %85 iskelet kası ve kemikte, %11 deri ve karaciğerde, % 2-3 ise diğer dokularda bulunmaktadır.

Çinko belirli bir derişim aralığında enzimatik düzenlemeler, gen ekspresyonu, nörotransmisyon ve hücre ölümü gibi pek çok patofizyolojik proseste önemli rolü olan biyolojik açıdan önemli bir metal iyonudur. Çinkonun fazlalığı veya eksikliği

durumlarında homeostasisi bozularak kardiyovasküler hastalıklar, yara iyileşmesinin gecikmesi, konjenital anomaliler, intrauterin büyüme geriliği, büyüme-gelişme geriliği, bozulmuş nörofizyolojik performans, enfeksiyonlara duyarlılığın artması, koku-tat duyusu bozukluğu gibi çeşitli ağız hastalıklarını da kapsayan bazı klinik bulgular ve kanser vakaları meydana gelir.³⁵ Çinko eksikliğinin bakır emilimini arttırması ve immun fonksiyon bozukluğuna neden olmasının kanser oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁵ Bu nedenle biyolojik örneklerde çinko miktarının belirlenmesi belirtilen hastalıkların gelişimi, etiyolojisi ve tanısında önemli yardımcı bir faktör olabilir.

Plazma, tam kan, serum, idrar, saç ve tükürük çinko düzeylerinin yeterli hassasiyete sahip bir analitik yöntem ile tayin edilmesi çinkonun organizmadaki durumu hakkında bilgi verir. İdeal bir biyolojik örneğin biyokimyasal, moleküler ve hücrel olarak bütün lokalizasyonları içermesi gerekir.

Ağız içindeki homojen olmayan, renksiz, kokusuz, az kıvamlı ve hafif bulanık olan vücut sıvısı tükürük olarak tanımlanır. Mineral, hormon, enzim, immünglobulin, sitokin, elektrolit ve diğer bileşenlerden oluşan tükürüğün % 95-99.4'ü sudur.¹⁵⁶ Tükürüğün sistemik dolaşımdaki pek çok molekülü ihtiva eden oldukça büyük bir sıvı kaynağı olması, tükürük bileşenlerinin lokal damar ağından elde edilmesi ve lokal damar ağının ise kaynağını karotit arterinden alması ile ilişkilidir.¹⁵⁷ Tükürük; hastalıkların tanısında veya vücudun uygulanan tedaviye karşı verdiği yanıtın takibinde zengin içeriği nedeni ile bir tanı aracı olarak kullanılması ve vücuttaki fizyolojik ve patolojik değişikliklerin belirlenmesine yardımcı olan biyobelirteçler vasıtasıyla ihtiyaç duyulan tanıları gerçekleştirebilmesi yönüyle vücudun aynası olarak değerlendirilebilmektedir.¹⁵⁸ Tükürük; teşhis özelliklerine sahip çeşitli bileşenler içermesine rağmen, kandaki seviyelerle karşılaştırıldığında düşük derişimlerde olmasının tükürük teşhisinin klinik olarak pratik olmasını engelleyebileceği endişesi vardır. Ancak, yeni ve oldukça hassas

tekniklerin (moleküler teşhis ve nanoteknoloji gibi) geliştirilmesiyle birlikte tükürükteki düşük analit derişimi artık bir sınırlama olmaktan çıkmıştır.^{43,159}

Tükürüğün toplanması, depolanması, nakliyesi ve hacimli örnekleme bakımından birçok avantajı vardır ve bu işlemlerin tümü serum veya idrarla karşılaştırıldığında çok daha ekonomik bir şekilde gerçekleştirilebilir. Tükürük ayrıca teşhis prosedürleri sırasında kanda olduğu gibi bir pıhtılaşma durumu olmadığından gerekli manipölasyon sayısını azaltır ve kandan daha kolay bir şekilde kullanılır. Bunların yanı sıra, sağlık çalışanları için tükürük testi, kan kaynaklı hastalıkların bulaşma riskinin olduğu serumu kullanmaktan daha güvenlidir. Tükürük toplama işleminin kolay ve noninvaziv bir yöntem olması da hastalarda kan almada yaşandığı gibi endişe ve rahatsızlığı oluşturmamakta ve ayrıca idrarla ilgili yaşanan mahremiyet sorunları gibi rahatsızlıkları önemli ölçüde azaltmaktadır. Hastalar veya denekler için, invaziv olmayan toplama yaklaşımı kaygı ve rahatsızlığı önemli ölçüde azaltabilir ve zaman içinde genel sağlıklarını izleme ve erken aşamada morbidite tanısı koyma fırsatını büyük ölçüde artıracak olan sağlık kontrollerine katılma isteklerini artırabilir.¹⁵⁶⁻¹⁶⁰ Tükürük toplamak için farklı yöntemler, uyarıcı kullanılıp kullanılmamasına göre sınıflandırılabilir. Uyarılmış tükürük toplanırken genellikle tükürük akış hızını arttırmak için parafin, balmumu veya sakız çiğneme yöntemleri kullanılır. Bu yöntem açıkça tükürüğün miktarını ve pH'sını etkiler ve genellikle sadece yeterince tükürük üretmekte güçlük çeken hastalarda kullanılır. Tükürük toplama işleminden önce çalışmaya katılanlara, kontaminantları önlemek amacıyla ağızlarını suyla iyice durulayarak ağız boşluğunu temizlemeleri talimatı verilmelidir.¹⁵⁹

Günümüzde, tükürük tanı yöntemlerinin biyoteknoloji ile kombinasyonu sonucu geliştirilen yöntemler ile tükürükte belirlenebilen pek çok değerli tıbbi madde, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, hormonal hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları

(bakteriyel/viral), böbrek hastalıkları, psikiyatri, ilaç bağımlılıkları ve kanser gibi pek çok hastalığın tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilir. Tükürükteki biyobelirteçler birçok sistemik hastalığın yanı sıra ağız bölgesi hastalıklarının tespitinde de kullanılabilir. Oral prekanser ve oral kanserin tükürük ile anatomik olarak yakınlığı, tükürüğün bu hastalıkların erken tanısı için oldukça önemli bir araç olduğunu düşündürmekte ve bu durum, tükürük biyobelirteçlerini oral kanserlerin tespiti ve ilerleyişinin görüntülenmesi yönünden önemli kılmaktadır.^{156,158,161,162}

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, tükürükteki çinko seviyesi değişiminin oral prekanser ve oral kanser hastalıklarının biyobelirteçi olarak kullanılabileceği söylenebilir ve tükürükte çinko miktarının çeşitli analitik yöntemler kullanılarak belirlenmesi önemli bilimsel çalışmalar arasında yer almaktadır.

Tükürükte Zn^{2+} 'nin miktar tayinine yönelik AAS^{75-79,81,82,84,86-89,94,96,97,120}, elektrotermal AAS⁸ ve ICP-MS^{82,83,92} yöntemlerine ulaşılmıştır. Bu atomik spektroskopi temeline dayanan yöntemler güvenilir ve duyarlıdır. Fakat örnek hazırlama yönünden zaman alıcıdır ve alet satın alımı ve bakımı yönünden oldukça pahalıdır. Ayrıca her zaman analize hazır değildir ve kullanımı uzmanlık gerektirir. Bu nedenle sadelik, çok yönlülük, basitlik, hız ve maliyet etkinliği bakımından moleküler spektroskopi temeline dayanan yöntemlere ihtiyaç vardır.

Spektroskopi, genel olarak ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanır ve spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanır ve oldukça geniş bir analitik yöntemler grubunu oluşturur. *Lüminesans*, bir atom veya iyon elektronunun uyarılmış, yani yüksek enerji düzeyinden düşük bir enerji düzeyine geçtiğinde oluşan ve ısı oluşturmada yayılan ışımadır. Uyarılma, atom veya molekülün fotonları absorplaması ile gerçekleşiyorsa, bunun sonucunda gözlenen ışık emisyonuna *fotolüminesans* denir ve fotouyarılmış türlerde uyarılmış elektronun spini

değişmeden, uyarılmış halden temel hale bir geçiş gerçekleşiyor ise, gerçekleşen fotoluminesans, *floresans* olarak adlandırılır. Spinde bir değişim varsa, o zaman fotoluminesans, *fosforesans* olarak adlandırılır. Genelde, türler uyarılmış hale eriştikten sonra, floresans emisyonu çok çabuk ($10^{-9} - 10^{-6}$ s) meydana gelir. Bir emisyon spektrumunun, uyarıcı görevi yapan absorpsiyon spektrumlarından her zaman daha uzun dalga boyu bölgesinde (daha düşük frekans bölgesinde) meydana gelmesinin nedeni, bir miktar enerjinin iç dönüşümlerde ya da ışımasız dönüşümlerle harcanmasıdır. Yayılan ışınlar bir florometrede veya spektrofloreometrede kaydedilir.

Maddenin floresans özelliğini hem maddenin çevresi, hem de yapısı (floresans verimi, emisyon dalga boyu ve ışın şiddeti) büyük ölçüde etkiler. Yayılan foton sayısının, absorblanan foton sayısına oranı o molekülün fotoluminesans kuantum verimi, ϕ , olarak tanımlanır. Temel haldeki molekülün enerjisi ile uyarılmış singlet molekülün enerjisi birbirinden ne kadar çok farklıysa, iç dönüşümün olasılığı o ölçüde azalır ve bunun sonucunda floresans verimi artar. Benzer şekilde, bir molekülün uyarılmış triplet hallerinin enerjileri arasındaki fark ne kadar ise sistemler arası geçiş olasılığı o ölçüde azalır ve dolayısıyla floresans verimi artar. Ayrıca moleküllerde düzlemsellik, konjugasyon ve halka sayısı artışı ve dönmenin engellenmiş olması genellikle floresans veriminin artmasına neden olur. Halkalı yapıda organik bir moleküldeki halkanın elektron yoğunluğunu arttıran süstitüentler molekülün floresans veriminde bir artış olmasını sağlar. Floresans özelliği gösteren bir boya, maddenin yüzeyine adsorbe edildiği zaman maddenin emisyon şiddeti artar. Bunun nedeni boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditenin artmasıdır. Sıcaklık artışı sonucu uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığı da artacağı için iç dönüşüm olayının olasılığı artar ve dolayısı ile floresans verimi azalır. Ortam pH'sındaki değişimlerin, temel ve uyarılmış molekülleri etkilemesinden dolayı pH, molekülün floresans verimini etkileyen bir faktör olarak düşünülebilir. Asit ya da baz

grubu ihtiva eden maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerine ait floresans ışımlarının emisyon şiddetleri ve dalga boyları birbirinden farklıdır.

Floresans ışımasının emisyon şiddeti ile madde derişimi orantılıdır. Derişim arttıkça floresans verimi belli bir noktaya kadar artar ve derişim çok fazla arttırıldığı zaman ise artık derişim ile orantılı şekilde artmaz ve hemen hemen sabit kalır. ($IF = 2.303QI_0 \epsilon cl$) eşitliği seyreltik çözeltiler için geçerlidir Derişimleri 10^{-6} - 10^{-9} M arasında değişen maddeler spektrofiorometri yöntemi kullanılarak çok büyük bir doğruluk, kesinlik ve seçicilik ile tayin edilebilir. Bu özellikleri ile spektrofiorometri yönteminin UV-görünür bölge ve AAS yöntemlerinden daha üstün, kromatografik yöntemlerden ise daha kolay ve ucuz olduğu söylenir.⁵⁸⁻⁶⁰

Floresans sensörleri, düşük maliyet, basitlik ve yüksek hassasiyet avantajlarına sahiptir. Özellikle metal iyonları için florofor bazlı kemosensörler tasarlamak günümüzde ilgi gören konular arasındadır.

Çinko $3d^{10} 4s^0$ elektronik konfigürasyonuna sahiptir ve spektroskopik veya manyetik sinyaller üretemeyeceği için doğrudan spektrofiorometrik olarak belirlenmesi mümkün değildir. Spektral olarak eser element analizi, bir veya daha fazla reaktif ile oluşturdıkları kompleks veya şelat bileşiklerinin spektrofiorometrik ölçümlerine dayalı olarak gerçekleştirilebilir. Kompleks, ligandların bir metal merkezi atomuna koordinasyonu sonucu oluşan bileşiklerdir. Metal merkezi bir atom veya iyon olabilirken; kompleks bir katyon, anyon veya nötr bir molekül olabilir. Kompleksler koordinasyon bileşikleri olarak bilinirler.¹⁶³ Koordinasyon bileşikleri, metallerin saf olarak elde edilmesi, radyoaktif metallerin uzaklaştırılması, enzim inhibisyonu ve metal iyonlarının titrasyonu gibi birçok endüstriyel ve bilimsel alanda kullanılmaktadır. Koordinasyon bileşiklerinin, biyolojik sistemlerdeki önemi gün geçtikçe artmaktadır. Mesela, metal

komplekslerinin organizmalardaki biyolojik aktivitelerinin gözlemlenmesi, her geçen gün bu bileşiklere olan ilgiyi arttırmaktadır.¹⁶⁴

Literatürde, çinkonun belirlenmesinde kompleks oluşumuna dayalı ilk spektrofotometrik çalışmada beyin, kalp ve bazı diğer dokularda Zn^{2+} -florofor 6-metoksi-8-p-toluensülfonamido-kinolin bileşiği oluşturularak tayin edilmiştir. Fakat ne kompleksin yapısı ne de stabilitesi tanımlanmamıştır.¹⁰⁹ 1997 yılında pH 7.2’de 2:1 formunda Zinkon asit ile çinko kompleksi oluşturmuş ve çinkonun dedeksiyon limitini 4 pM’e düşürmüşlerdir.¹¹⁶ Fakat Zn-zinkon kompleksinin stabilite sabitinin yeterince büyük olmadığını ve metaloenzim ve çinko parmak proteinlerine zinkonun bağlandığını ve floresansı etkilediğini belirtmişlerdir. Çinkoya şelatlayıcısı olarak TPEN (N, N, N', N'-tetra (2-pikolil) etilendiamin) kullanıldığında bu sorun ortadan kaldırılmıştır. Ayrıca çinkonun çeşitli atrasen türevleri ile şelat oluşturulmasıyla floresans özelliği geliştirilmiştir.¹⁶⁵ Huston ve ark.¹¹⁰ asetonitril ortamında pH 10’da 9,10-bis(2,5-dimetil-2,5-diazahezil) antrasen ile şelat oluşturarak çinkoyu analiz etmiştir ve belirtilen antrasen sistem makro siklik sisteme genişletilmiş ve iki proton eklenmiş ligandların pH 12’de çinko ile 0-20 μ M derişim aralığında floresans özellik gösterdiği belirtilmiştir. Fakat biyolojik pH için uygun olmadığı belirtilmiştir. Hirano ve ark.¹¹¹ floresein ve dört metil grubuna dört azot ekleyerek makrosiklik tetraamin oluşturmuş ve yüksek kuantum verimine sahip floresans bileşik oluşturmuştur. Zhang ve ark.¹¹² ise iki farklı 9-antrildiamin ligandı sentezlemiş ve çinko ile oluşturdukları kompleksleri incelemiştir. Walkup ve ark.¹¹³ ise Zinpir-1 bileşiğini sentezlemiş ve 0.89 kuantum verimi ile çinko ile kompleksini oluşturmuş ve 0.7 nM çinkoyu belirlemişlerdir. Burdette ve ark.⁵⁶ ise Zinpir-1 ve Zinpir-2 ile çinko komplekslerini incelemiştir ve hücrelerde 0.1 nM’dan daha düşük dedeksiyon limitlerine ulaştıklarını belirlemişlerdir. Zinpir-1’in Zinpir-2’ye göre hazırlanmasının daha basit olduğunu belirtmiş ve çinko ile Zinpir-1 kompleksinin 2:1

oranında gerçekleştiğini ve çözülebildiğini belirtmişlerdir. You ve ark.¹⁰³ ise çinkoyu belirlemek için floresans özellik göstermeyen Mn-Zinpir-1 kompleksi oluşturmuş ve bu kompleksteki Mn ile çinkonun yer değiştirmesi temeline dayalı floresans bir yöntem geliştirmiştir. Mn-Zinpir-1 kompleksinin Kd değerlerinin Zn-Zinpir-1'e göre 10^{10} ve 10^3 kat büyük olduğunu ve çinkonun mangan ile kolayca yer değiştirdiğini belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtilen çinkonun çeşitli organik maddelerle oluşturduğu şelat veya kompleks bileşiklerinin biyolojik sıvılardan olan tükürükte uygulamasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır ve belirtilen yöntemlerin hepsinde çinko, çeşitli yaşam hücrelerinde çinko ile kompleks oluşturacak organik bileşik ile inkube edildikten sonra floresans mikroskop resimleri alınarak belirlenmiştir.

Biyolojik bir ortamda floresans esasına dayalı sensörlerin geliştirilmesi, mevcut yapıların kimyasal özelliklerinin anlaşılmasına bağlıdır. Birçok iyon sensörü, analit bağlama reseptöründen bir alkil ara halkasını floresans bileşenden ayırarak iyi bilinen florofor ara halkası-reseptör tasarımına dayanmaktadır. "Açma" sensörleri, çoğunlukla, PET mekanizması ile işlev görür. Bu mekanizmaya göre, reseptör ünitesi, analit yokluğunda bir elektron donörü olarak florofor uyarılmış halini söndürür. Analitin reseptöre bağlanması üzerine, elektron transferi önlenir ve söndürme mekanizması engellenir. Böyle bir floresans sensör reseptörünün bileşeni tek bir heteroatomdan veya küçük bir kimyasal birimden oluştuğunda, bileşiğin söndürme davranışı kolaylıkla tanımlanır.¹³⁸ Yapılan bir çalışmada da kompleks bir floresein türevinde, daha uzaktaki heteroatomların söndürme işleminde elektron vericileri olabileceği görülmüştür.¹⁶⁶ Reseptör olarak DPA kullanıldığında metalsiz durumda üçüncül azot atomu elektron verir. Düşük pH değerlerinde ise piridil grubunun protonasyonu ile elektron verilir veya proksimal elektron verici olarak görev yapar. Floroforlar standart Mannik benzeri reaksiyonlar ile elde edilir ve genellikle simetrik problemlerdir.¹³⁸

Mannik reaksiyonu, reaktifler ve uygulanan şartlara göre farklı mekanizmalar üzerinden oluşur. Nötr veya asidik ortamda meydana gelen tepkime mekanizması 3 basamaktan oluşur (Bölüm 2.6.1).⁵⁷

Bu bilgiler ışığında; Zn^{2+} için floresein bazlı floresans sensör olup, bire yakın bir kuantum verimine ($\Phi = 0,95$) ve 490 nm'yi aşan uyarma ve emisyon dalga boylarına sahip olan Zinpir-1 bileşiği Mannik kondenzasyon tepkimesi ile sentezlendi.^{56,114} %94 verim ile elde edilen somon-pembe renkli katı Zinpir-1 bileşiğinin (Şekil 4.2) yapısı 1H - NMR ve ^{13}C - NMR, FT-IR ve kütle spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

Kimya, biyoloji, fizik, elektronik, uzay, endüstri ve mekanik gibi pek çok alanda kullanılması yönü ile disiplinler arası bir bilim olan nanoteknoloji,⁴⁷ maddeye atom ve molekül seviyesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak yeni özellikler kazandırmayı amaçlamayan, yeni ve hızla gelişen bir teknoloji alanıdır. Nano boyutlardaki malzemelerin yüzey/hacim oranlarının artması ve bunun sonucunda malzemenin özelliklerinde büyük değişikliklerin meydana gelmesi, nanoteknolojinin diğer bilim dallarından ayrılmasını sağlayan en önemli özelliğidir.⁴⁶ Nanoteknolojinin gelişmesi nanopartikül, nanotüp ve nanokristal gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, ev aletleri ve ürün kaplamaları, mücevhercilik, biyomedikal uygulamalar, tıp ve elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamaları gibi pek çok alanda kullanılabilmeleri yönüyle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.¹⁶⁷

Günümüzde spesifik bileşikler ile üstün ve istenen özelliklere sahip farklı matrikslere ve takviye elemanlarına sahip kompozitlerin geliştirilmesine olan ilgi gün geçtikçe artmakta ve analitik yöntem uygulamaları giderek daha değerli olmaktadır. Metal analizlerinin in-vivo uygulamalarında rahatlık sağlamak için küçük moleküllere

dayanan çeşitli floresans problemler tasarlanmıştır.^{115,168-170} Fakat bu problemler oldukça verimli olmalarına rağmen, yapılarında barındırdıkları küçük moleküller zehirlidir¹⁶⁹ ve bu molekülleri organizmalardan uzaklaştırmak veya çıkarmak mümkün değildir.¹⁷⁰ Ayrıca bu küçük moleküller floresans problemlerin geri kazanılabilirliği düşük olduğundan pratik uygulamaları sınırlıdır. Son zamanlarda bu zorluğu çözmek için küçük moleküller floresans problemler inorganik destek materyalleri ile birleştirilmiş ve geri kazanılabilirliği iyileştirilmiştir. Floresans problemlerin tasarımında inorganik destek materyali olarak manyetik nanopartiküller, nanotüpler, mezo-gözenekli silis, metal nanopartiküller ve TiO₂ içeren çeşitli mezoskopik veya nanoskopik materyaller kullanılmıştır.^{104,124,171-173} Manyetik silika çekirdek/kabuk nanopartiküllerinin biyolojik ve çevresel uygulamalarda bahsedilen diğer inorganik destek materyallere göre avantajları vardır. Bu avantajlardan birincisi, harici manyetik alanla basitçe ayrılabilmesi veya geri kazanılabilmesidir. İkincisi ise manyetik silika çekirdek/kabuk nano parçacıklarının, düşük toksisiteye ve biyoyumluluk özelliklerine sahip olmasıdır.^{174,175} Ayrıca manyetik çekirdeğin etrafındaki silika kabuğu floresans problemlerin geniş yüzey alanına sahip olmasını sağlar.

Bu bilgilere göre, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve geri kazanılabilir florometrik Zn²⁺ sensörleri geliştirmek için, küçük moleküller floresans maddeleri manyetik silika nanopartiküllerine dahil edilebilir ve istenen özellikte nanokompozitler elde edilebilir.

Zn²⁺'nin kompleks oluşturabildiği 8-kloroasetilaminokinolin¹²⁵, N-(kinolin-8-il)-2-(3-(trietoksisilil-propilamino)-asetamit¹²⁹, 8-aminokinolin¹²⁷, DTH¹²⁴ ve N-(kinolin-8-yl)-2-(3-trietoksisilil-propilamino)-asetamit¹³¹ bileşiklerinin Fe₃O₄-SiO₂ nanopartiküllerine modifiye edildiği çalışmalar vardır. Ayrıca mezo gözenekli silika materyali¹⁰⁴ ve silikon nanoteller¹⁷⁶ kullanılarak da Zn²⁺ belirlenmiştir. Fakat bahsedilen

bu çalışmaların bazılarında yöntemin seçiciliği düşüktür bazılarında ise yöntem biyolojik matrikse uygulanamamıştır.

Metal iyonlarının çeşitli matrikslerden uzaklaştırılması için metal oksit nanopartiküller (Fe_3O_4 , ZnO ve TiO_2) kullanılmaktadır. Toksik olmaması ve manyetik özelliğinden dolayı manyetit (Fe_3O_4), MRI, ilaç salınımı, teşhis cihazları ve hipotermi gibi birçok biyomedikal ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Fakat Fe_3O_4 metal oksit nanopartikülleri kullanılarak biyolojik sıvılarda analitin belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çünkü Fe_3O_4 nanopartiküllerinin çözelti içerisinde kararlılığı yüksek değildir ve Fe^{+3} iyonu olarak çözeltiye geçer. Bu durum Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kullanıldığı uygulamalarda istenmeyen durumların ortaya çıkmasına sebep olur. Bu sorunu ortadan kaldırmanın en etkin yolu Fe_3O_4 nanopartiküllerinin silika (SiO_2) ile kaplanmasıdır. Demir oksit manyetik nanopartiküller için en fazla kullanılan reaktif silikadır. Silika kaplama, partikül kararlılığını artırır ve partikül içi etkileşimleri ve kümeleşmeyi önler. Biyolojik olarak uyumlu ve hidrofilik özellikte olan silika ile aynı zamanda partikül boyutu da kontrol edilebilir. Silika ile kaplanan partiküller, biyolojik ligandların yanı sıra diğer ligandlara da kolaylıkla bağlanabilir. Silika kaplama ile yüzeyin biyomoleküllere, küçük organik moleküllere ve polimerlere karşı seçici olması sağlandığı gibi bu kaplama işleminin genelde, partikül boyutunu artırıp nanopartiküllerin manyetik özelliklerini değiştirebildiği söylenebilir. Nanopartiküllerin hidroksil grupları üzerinden gerçekleşen silika kaplama işleminde, silika molekülündeki metoksi grupları, demir oksit nanopartiküller üzerindeki hidroksil grupları ile reaksiyona girerek Si-O bağı oluşturur ve bu da başka moleküllerle modifikasyona olanak verir.⁵¹

Bu çalışmada, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülleri, hem Fe^{3+} iyonunun çözeltiye geçmesini engellemek hem de matriks ortamından bir mıknatıs yardımıyla manyetik olarak ayırabilmek amaçlı seçildi.

Silika kaplı Fe_3O_4 nanopartikülleri ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) kimyasal olarak kararlı ve yüzeyi oksidasyona karşı kararlı olduğu için medikal ve klinik uygulamalarda önemli avantajlara sahiptir. Daha da önemlisi, fonksiyonel grupların yüzeye bağlanmasına olanak sağlaması ve biyolojik uyumluluk gibi avantajlarından dolayı $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülünün yüzeyi çeşitli gruplar takılması yolu ile fonksiyonel hale getirilerek çok farklı uygulamalarda kullanılabilir. Nanopartiküller, yüzeye bağlanan bu fonksiyonel gruplar sayesinde biyomoleküller, metaller ve polimerler ile kolaylıkla etkileşime girer. Merkaptopropil trietoksi silan, paminofenil trimetoksi silan ve APTES gibi reaktifler amino ve kükürt gruplarının yapıya bağlamasına olanak sağlar.⁵⁰

Bugüne kadar Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi için birçok fiziksel ve kimyasal yöntem geliştirilmiştir. Ancak hazırlanan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin parçacık boyutu kontrolü, manyetik özellikleri ve yüzeyinin silika ile homojen olarak kaplanması düşünüldüğünde en uygun yöntem, organik çözücü içerisinde başlangıç metal komplekslerinin sürfaktant(lar) varlığında ısı bozunması veya indirgenmesi yöntemidir.^{134,180} Bu yöntem ile morfoloji kontrollü çok yüksek kalitede Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenebilmektedir.

Bu bilgiler ışığında, çalışma kapsamında Murray ve ark.^{134,180} tarafından önerilen metal komplekslerinin sürfaktant(lar) varlığında ısı bozunması veya indirgenmesi yöntemi kullanıldı ve tekdüze parçacık boyutlu Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin sentezi Bölüm 3.4'te belirtildiği gibi demir (III) asetilasetonatın ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) oleyilamin içerisinde termal bozunması yolu ile ısı kontrolünün yapılabildiği ve inert gaz atmosferinde (N_2 veya Ar gazı) çalışmaya olanak sağlayan 4 boyunlu özel tasarım bir

cam reaktör sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Sentezlenen bileşiğin yapısı TEM ve XRD yöntemleri ile aydınlatıldı. TEM görüntülerinden (Şekil 4.7) Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin ortalama parçacık boyutunun 7.8 nm olduğu, oldukça homojen bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğu ve herhangi bir büyük parçacık oluşumunun (çökelme) olmadığı gözlemlendi. Kolloidal Fe_3O_4 'ün XRD spektrumundaki karakteristik pikler (Şekil 4.8) ise kübik spinel faz ile uyumlu bulundu.

Fe_3O_4 nanopartiküllerinin silika ile kaplanması ise genellikle Stöber yöntemi¹³⁶ kullanılır. Bu yöntem etanol içerisinde TEOS'un Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinde polimerleşmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile literatürde birçok $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikülleri sentezlenmiş ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin yüzeyi farklı yöntemler kullanılarak çeşitli fonksiyonel gruplarla fonksiyonel hale getirilmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartikül yüzeyinin fonksiyonlaştırılmasına dair aşağıda bazı literatür örneklerine yer verilmiştir. Liu ve ark.⁷¹ amino-silan ile modifiye edilmiş süperparamanyetik nanopartiküller oluşturmuşlardır. Bunun için $\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ bileşiklerinden çıkarak Fe_3O_4 nanopartiküllerini elde etmişler, daha sonra sodyum silikat ile asidik ortamda 80°C de pH 6-7 civarında polimerizasyonu gerçekleştirip, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin üzerini silika ile kaplamışlardır. Zhang ve ark.⁷² ise sol-jel prosesini kullanarak TEOS ve APTES ile $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerini sentezlemişler ve elde etmiş oldukları $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin (~200 nm çaplı) optimum aktif amino uçları ile su örneklerinden Pb^{2+} 'yi ekstrakte etmişlerdir.

Bu bilgiler ışığında, çalışma kapsamında sentezlenen Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin yüzeyinin silika ile kaplanması ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin oluşturulması için Stöber ve Fink¹³⁶ tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Bu bağlamda, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinin silika ile kaplanması, elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 'nin amin sonlu grupla yüzey modifikasyonu ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) ve

yapısal tanımlamaları için, sentezlenen kolloidal Fe_3O_4 nanopartikülleri bazik ortamda TEOS ile etkileşime sokulup, TEOS'un hidroliz yolu ile yüzeylerinin silika ile kaplanması sağlandı (Bölüm 3.5). TEOS ile silika kaplanması farklı iki oranda (2 mL ve 3 mL TEOS) gerçekleştirildi. Daha sonra silika ile kaplanan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) yüzeyi Zinpir-1 ligandının bağlanmasını sağlamak amacıyla APTES ile fonksiyonel hale getirildi. Bu aşamada daha fazla Zinpir-1 ligandını $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerine bağlamak amacıyla, başta kullanılan APTES miktarı 0.5 mL'den 2 ve 8 mL'ye çıkarıldı. Yüzeyi farklı miktarlarda TEOS (2 veya 3 mL) ve farklı miktarlarda APTES (0.5, 2 ve 8 mL) ile fonksiyonlaştırılan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$) yapısı TEM ve FT-IR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı. TEM görüntülerinden ortalama parçacık boyutlarının 7.8 nm'den 9 nm'ye yükseldiği hesaplandı (Parçacık boyut histogramı, Şekil 4.9) ve Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinin 0.6 nm kalınlığında silika ile kaplandığı belirlendi. 3.0 mL TEOS ve 8.0 mL APTES kullanılarak hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerine ait farklı büyütmelemlerde alınmış TEM görüntülerinden (Şekil 4.10) TEOS miktarının arttırılması ile Fe_3O_4 nanopartikülleri yüzeyinde oluşan silika tabakasının kalınlığının arttığı açıkça gözlenmektedir. Gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda 3.0 mL TEOS ve 8.0 mL APTES kullanılarak hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin daha fazla oranda Zinpir-1 ligandını bağladığı ve böylece daha fazla Zn^{2+} ile yüklenebildiği için daha iyi sensör özelliği gösterdiği belirlendi (Bölüm 3.5).

Günümüzde, algılama hassasiyetini artırmak ve manyetik olarak geri kazanılmasını sağlamak için, sensör tasarımlarında nanopartiküllerin uygulanmasına yönelik bir eğilim vardır. Çeşitli metallerin kompleks oluşturabileceği organik bileşiklerin nano yapılandırılmış materyal yüzeyine modifikasyonunun sağlandığı çalışmalar mevcuttur. Amino fonksiyonel grubu, güçlü metal kompleks yapabilme

kapasitesine sahiptir. Bu yüzden sulu çözeltilerden bazı ağır metalleri ayırmak için amino modifiye edilmiş nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.^{73,181}

Yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerine basit bir yolla çeşitli metal kompleks bileşikleri kovalent bağlanma yolu ile immobilize (sabitleme) edilebilir. Oluşturulan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ -ligand-metal kompleks nanokompozitleri farklı analitik uygulamalarda kullanılabilir. Pal ve ark.¹⁰⁴ yeni bir floresans çinko sensörünü, sıralı bir mezogözenekli silika materyali, MCM-41 üzerine QTEPA modifiye ettikten sonra, MCM-41'e modifiye edilmiş QTEPA'nın Tris-HCl (pH 7.22) sulu tampon çözeltisi içinde Zn^{2+} ile yükleme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Wang ve ark.¹²⁴ ise Zn^{2+} 'nin yeni bir floresans sensörü olan DTH'ı, manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerinin yüzeyine kovalent olarak bağlanması ile tasarlamışlar ve sonrasında elde edilen DTH- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanokompozitinin Zn^{2+} ile yükleme işlemini etanol ortamında gerçekleştirmişlerdir. Xu ve ark.¹²⁵ ise CAAQ sentezlemişler ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmasını gerçekleştirmişlerdir ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$). Elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-CAAQ}$ nanokompozitini asetonitril çözeltisi içerisinde Zn^{2+} iyonları ile yüklemişlerdir. Başka bir çalışmada Xu ve ark.¹²⁶ Cd^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} için bir kolorimetrik floresans nanosensör olan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-QTEPA}$ 'yı sentezlemiş ve ilgili iyonlar ile yükleme işlemini gerçekleştirmişlerdir. Gu ve ark.¹²⁷ R6G ve 8-AQ'nun birlikte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanopartiküllerine modifiye edilmesine dayalı Hg^{2+} ve Zn^{2+} için geri dönüşümlü bir floresans sensörü geliştirmiş ve ilgili iyonların bu nanokompozite yüklenme işlemini 0.05 M HEPES tamponunun (pH 7.0) sulu çözeltisinde gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmamızda oluşturulan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülü, amino fonksiyonel grubu içerdiği için güçlü metal kompleks yapabilme kapasitesine sahiptir fakat birden fazla metale ilgisi olduğu için seçiciliği düşüktür.⁷³ Bu yüzden nanopartikülün belirli bir

metale duyarlı olabilmesi için seçilen metal ile kompleks oluşturabilecek bir organik bileşiğin nano yapılandırılmış materyal yüzeyine modifikasyonunun sağlanması gerekir.

Zincir bileşikler ile Zn^{2+} komplekslerinin yüksek kuantum verimi ile floresans özellik gösterdiği bilinmektedir.^{113,56} Literatürde Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik zincir bileşikler ile yüzeyi fonksiyonel hale getirilmiş $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanopartiküllerinin sentezi bulunmamaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda Zn^{2+} 'ye duyarlı bir nanokompozit elde edebilmek için $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ nanopartikülü yüzeyine Zincir-1 bileşiğinin amit bağları ile modifikasyonu amaçlandı.

Amit bağları tipik olarak karboksilik asitler ve aminlerin birleşmesinden sentezlenir; ancak, bu iki fonksiyonel grubun birleşmesi ortam sıcaklığında kendiliğinden gerçekleşmez. Bu nedenle, genellikle, ilk olarak amin ile muamele edilmeden önce, asitin -OH'nın iyi ayrılan bir gruba dönüştürülmesi için karboksilik asidi aktive etmek gereklidir.¹⁸² Karboksilik halojenürler (klorürler, florürler), karboksilik azitler, simetrik veya karışık anhidritler ve karbodiimidler (N, N'-N, N'-Disikloheksilkarbodiimid (DCC) ve EDC.HCl) karboksilik asidi aktive etmek amacıyla kullanılan bağlayıcı reaktiflerdendir. HOBt son yıllarda en popüler bağlayıcı reaktif olmuştur.¹⁸³ HOBt, peptit sentezi sırasında rasemizasyonun azaltılmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle düzenli olarak bir bağlayıcı reaktif olarak kullanılır. HBTU, çözelti ve katı faz peptit sentezi sırasında serbest karboksilik asitlerin aktivasyonu için yaygın olarak kullanılan standart bir bağlayıcı reaktiftir.^{74,183} Hünig's baz olarak da bilinen DIEA ise, sterik olarak engellenmiş bir amindir. Yer değiştirme reaksiyonları için yaygın olarak kullanılan nükleofilik olmayan bir bazdır.¹⁸⁴ Bir çalışmada, $Fe_3O_4-SiO_2$ çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin yüzeyine amit bağı vasıtasıyla bir anti kanser ajanı olan DOX modifikasyonunu gerçekleştirmek üzere bir spacer kolu sentezlenmiş ve aktif -COOH grubunun DOX moleküllerinin -NH₂ grubu ile EDC ve NHS varlığında reaksiyona

girmesi sağlanmıştır.⁶⁹ Başka bir çalışmada ise; folat, amit bağı oluşumu vasıtasıyla nanopartikül yüzeyinin amino gruplarına kovalent olarak bağlanmıştır. Folik asidin karboksil grupları, NHS varlığında EDC ile aktive edilmiş, kararlı amit bağı oluşturmak üzere CCM/SiO₂-NH₂'nin amino grupları ile reaksiyona sokulmuş ve curcumin yüklü folatla fonksiyonlaştırılmış silika nanopartikülleri (CCM/SiO₂-FO) elde edilmiştir.⁷⁰

Bu bilgiler ışığında; bu çalışmada Zinpir-1 ile Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülünün kovalent olarak bağlanmasını sağlamak amacıyla DCC, EDC, HOBt ve HBTU gibi bağlayıcı reaktiflerin kullanıldığı reaksiyonlar gerçekleştirildi ve elde edilen ürünler FT-IR spektroskopisi yöntemi ile karakterize edildi. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek bu çalışmada; Zn²⁺'ye duyarlı bir nanokompozit elde edebilmek için Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülünde bulunan amin fonksiyonel grubu ile Zinpir-1 bileşiğinde bulunan karboksil fonksiyonel grubu arasında amit bağı oluşturmak amacı ile Mali ve ark.⁷⁴ tarafından belirtilen yöntemin modifiye edilerek kullanılmasına karar verildi. Bu bağlamda, Zinpir-1'in karboksil fonksiyonel grubu, HOBt ve HBTU bağlayıcı reaktifleri kullanılarak DIEA ilavesi ile aktive edildi ve daha sonra ortama Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülü ilave edilerek nanopartikülde bulunan -NH₂ grubu ile kovalent bağlanma yoluyla amit bağının oluşması sağlandı (Bölüm 3.6). Sonuç olarak, Zn²⁺'ye seçici bir ligand olan Zinpir-1 bileşiğinin amin sonlu bir ligand ile yüzeyi fonksiyonlaştırılmış silika kaplı manyetik nanopartikülüne (Fe₃O₄-SiO₂-NH₂), kovalent bağlanma yolu ile immobilizasyonu sonucu manyetik olarak geri kazanılabilen, floresans özellik gösteren ve Zn²⁺'ye karşı seçici olan Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompoziti sentezlendi.

Elde edilen kırmızı-kahverengi Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) bileşiğinin manyetik ve floresans özellik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.12). Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitin FT-IR spektrumuna göre (Şekil 4.13 (b)); Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanopartikülünde görülen 1610 (serbest NH₂ gerilme titreşimi) pikinin kaybolarak

1652'de (C=O-N gerilme titreşimi) amit karboniline ait yeni belirgin bir pikin ortaya çıkması ve 1094'de (Si-O-Si gerilme titreşimi) karakteristik $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikül pikinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin IR spektrumunda görülmesi Zinpir-1 bileşiğinin $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartikülüne konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Yukarıda belirtilen nanokompozit oluşumuna dayalı Zn^{2+} 'nin belirlenmesine yönelik çalışmalarda^{84,87,104,124-127} metal ile kompleks oluşturabilecek ligandların, nanopartiküle kovalent olarak immobilizasyonu yapıldıktan sonra ilgili metal yüklemesi yapılmaktadır.

Bu bilgiler ışığında; çalışmamızda, Zinpir-1 bileşiğinin amin sonlu bir ligand ile yüzeyi fonksiyonlaştırılmış silika kaplı manyetik nanopartikülüne ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$), kovalent bağlanma yolu ile immobilizasyonu sonucu elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitlerine Zn^{2+} yüklenmesi işlemi (Bölüm 3.7) gerçekleştirildi ve elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin yapısı ICP-MS ve FT-IR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatıldı.

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile oluşan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin manyetik özelliği devam etmekle birlikte rengi sarıya boyanmakta ve floresans şiddeti de buna bağlı artmaktadır (Şekil 4.14). Zn^{2+} yüklenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin ICP-MS analiz sonuçları (Tablo 4.2), yapıya Zn^{2+} 'nin girdiğini ve yapıda Fe^{3+} 'ün de var olduğunu göstermektedir.

FT-IR spektrumuna göre (Şekil 4.16); $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinde görülen 1652 (C=O-N gerilme titreşimi) amit karboniline ait gerilme pikinin Zn^{2+} yüklenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ nanokompozitinde 1630'a kaydığı gözlenmektedir. Al-Awadi ve ark.¹³⁷ belirttiği gibi bandın düşük frekansa kayması, metal katyonları ile ligandda bulunan azot atomlarının koordine olduğunun bir göstergesidir.

Literatürde Zinpir-1'in Zn^{2+} ile yüklenmesine dayalı çalışmalara bakıldığı zaman; bir çalışmada Burdette ve ark.⁵⁶ DMSO'da hazırladıkları Zinpir-1 ve Zinpir-2'in Zn^{2+} ile yüklenmesi sonucu emisyon spektrumlarını pH 7'de 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 50 mM PİPES tamponu içerisinde almışlardır. Burdette ve ark.⁵⁶ diğer bir Cos-7 hücrelerinde gerçekleştirdikleri inkübasyon çalışmasında ise pH 7.4 20 mM HEPES tamponunda Zn^{2+} ile yüklenmiş Zinpir'in emisyon spektrumlarını almışlardır. Wong ve ark.¹³⁸ ise pH 7'de 100 mM KCl içeren 50 mM PİPES sulu tamponunda Zinpir-1'in Zn^{2+} ile yüklenmesine dayalı bir çalışma gerçekleştirmişler ve Zinpir-1'in metanol veya DMSO'nun su ile birlikte kullanıldığı bir çözücü karışımında daha iyi çözündüğünü belirtmişlerdir. Woodroffe ve ark.¹¹⁴ Zinpir-1'in stok çözeltisini DMSO'da hazırlamış ve Zinpir-1'in Zn^{2+} ile yüklenmesini pH 7.5'te 100 mM KCl içeren 50 mM HEPES tampon çözeltisinde gerçekleştirmişlerdir.

Bu bilgiler ışığında çalışmada; Zn^{2+} yüklenen $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin en yüksek floresans şiddeti verebileceği ortamı belirlemek amacı ile öncelikle Bölüm 4.6.1'de belirtildiği gibi çeşitli çözücülerde 1mg/3mL derişimde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin çözünürlüğüne bakıldı. Nanokompozitin sulu ortam, metanol ve DMSO'da iyi bir şekilde dispers olduğu gözlemlendi. Wong ve ark.¹³⁸ tarafından önerilen bir çalışmada, Zinpir-1 bileşiğinin metanol-deiyonize su ve DMSO-deiyonize suyun birlikte kullanıldığı karışım halindeki çözücü sisteminde daha iyi çözündüğü ve ortamın iyonik gücünün sabit kalmasını sağlamak amacıyla 100 mM KCl elektrolit çözeltisinin eklenmesi gerektiği bildirilmiştir. Burdette ve ark.⁵⁶ ise çalışılan fizyolojik ortamın benzer olmasını sağlamak amacıyla 100 mM KCl elektrolit çözeltisi ve ortamdaki Zn^{2+} dışındaki diğer iyonları bertaraf etmek amacıyla 50 μ M EDTA eklenmesi gerektiğini belirtmiştir. Bu bilgilere göre, $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin dispers olduğu 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren

deiyonize su, metanol ve DMSO'dan oluşan çözücü karışımları hazırlandı ve Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-(Zinpir-1) nanokompozitinin en iyi dispers olduğu çözücü karışımı olarak 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren DMSO ve deiyonize su karışımı seçildi. En iyi çözücü karışımının oranını belirlemek amacı ile 1:4, 2:3 ve 4:1 h/h olmak üzere farklı oranlarda 100 mM KCl ve 50 µM EDTA içeren DMSO-deiyonize su çözücü karışımları hazırlandı ve en iyi dispers olduğu çözücü karışım oranı 2:3 h/h olarak belirlendi.

Zinpir-1 üzerinde Zn²⁺ veya H⁺ ile koordinasyon bileşiği oluşturan iki ayrı N₃O elektron verici atom seti ile dört heteroatomun koordinasyona katıldığı bildirilmiştir.¹²² (Şekil 2.1). Bu gibi çok işlevli elektron veren birimlerdeki floresans etkileri genellikle bir bütün olarak ele alınır. Zinpir-1 sensör ailesinin Zn²⁺ veya H⁺ bağlama özellikleri hakkında ayrıntılı bir moleküler resim, potansiyometrik titrasyon yapılarak ve absorpsiyon ve emisyon spektroskopisi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.¹³⁸ Bu çalışmada, Zinpir-1'in Zn²⁺ ile oluşturduğu kompleks bileşiğinin oluşum sabitleri, mevcut pKa değerleri ile ZnCl₂ ilave edildiği titrasyonlar ile belirlenmiştir. Fakat metal:ligand oranının 1:1'den büyük olduğu çözeltilerin bulanık olduğu ve deney sonuçlarının uygun olmadığı belirtilmiş ve K_{d1} değerini metal:ligand oranı 1:1 olacak şekilde ZnCl₂ içeren deneyler ile belirlemişlerdir. K_{d2}'de yaklaştırılarak belirlenmiştir. Protonlanmış ve Zn²⁺ bağlı türlere ek olarak (HLZn)⁺, (H₂LZn)²⁺ ve (H₃LZn)³⁺ karışık türleri de bilgisayar modelleme ile dahil edilmiştir. 25°C'de 100 mM KCl içeren HCl içerisinde hazırlanan Zinpir-1 çözeltisinin potansiyometrik titrasyonunda ligand veya ligand kompleksinden Zn²⁺ veya H⁺ ayrılması Tablo 4.3 ve Şekil 4.17'de gösterilmektedir. Bileşiğin floresans artışı, her iki bağlama cepliğinin doluluk durumuna karşılık gelen ikinci protonun ve/veya Zn²⁺'nin bağlanması üzerine oluşur. İki ilave protonun ve/veya Zn²⁺'nin bağlanması sırasında ikinci bir artış meydana gelmektedir

(Şekil 4.18). Zn^{2+} ve Zinpir-1 1:1 oranında karıştırıldığında floresans değişimini gösteren pH titrasyon verileri Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

Bu bilgiler dahilinde, Zn^{2+} ’nin Zinpir-1 bileşiği ile metal:ligand ekivalent miktarı 1:1 olacak şekilde kompleks oluşturacağı pH 6.96-8.2 aralığı çalışıldı. Bu amaç ile, Bölüm 4.6.1’de belirtildiği şekilde farklı pH’larda (pH 7-8.2) ve farklı tampon maddeleri (PIPES ve Tris-HCl) kullanılarak tampon çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler içerisinde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları kaydedildi. Daha sonra belirtildiği şekilde Zn^{2+} eklendi ve çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları kaydedildi (Tablo 4.4). Elde edilen uyarma ve emisyon spektrumlarından yararlanılarak belirtilen tampon çözeltilerinde $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine Zn^{2+} yüklenmesi ile floresans şiddetinde artış sağlanmasına rağmen floresans şiddetindeki en iyi artışın 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde gerçekleştiği belirlendi. 100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisi kullanmamızın nedeni Zn^{2+} yüklendiği zaman seçilen uyarma dalga boyunda, emisyon pikinde floresans şiddetinde en iyi artışın olmasıdır. (Tablo 4.4). Bundan sonraki tüm çalışmalarımız, bu tampon çözelti ortamında yapıldı.

100 mM KCl ve 50 μ M EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisinde hazırlanan $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -(Zinpir-1) manyetik nanokompozitine (1mg/3mL) final derişimi 80 ng/mL olacak şekilde Zn^{2+} yüklenerek hazırlanan $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2-Zn$ (Zinpir-1) çözeltisinin 200-600 nm dalga boyu aralığında eksitasyon ve 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon taraması yapıldı ve en uygun uyarma dalga boyunun 490 nm ve buna karşılık gelen uygun emisyon dalga boyunun 530 nm olduğu tespit edildi (Şekil 4.21).

Bölüm 4.6.3’de belirtildiği üzere $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) nanokompozitinin oluşumunda floresans şiddeti üzerine zamanın etkisini belirlemek amacıyla, belirtilen tampon çözeltisinde hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitine Zn^{2+} yüklenerek $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) oluşturmak üzere gerçekleştirilen reaksiyonun meydana gelmesi için λ_{uy} :490 nm ve λ_{em} :530 nm dalga boylarında laboratuvar oda koşullarında belirtilen dakikalarda (0-40) floresans spektrumları alındı. Zn^{2+} belirlenmesinde kullanılan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) manyetik nanokompozitinin floresans şiddetinin 20. dakikaya kadar arttığı ve bu dakikadan sonra sabit kaldığı belirlendi (Şekil 4.22) ve bundan sonra Zn^{2+} analizi için yapılan tüm çalışmalarda bu süre göz önüne alındı.

Yapay tükürükte Zn^{2+} ’nin belirlenen spektrofotometrik yöntem ile analizi için Bölüm 3.8’de belirtilen yapay tükürük hazırlandı ve hazırlanan yapay tükürük çözeltisine standart Zn^{2+} eklendi ve nötralize edildi ve daha sonra çözeltiye belirlenen tampon içerisinde hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozit çözeltisi eklenerek Zn^{2+} iyonları ile etkileşimi sağlandı. Ardından elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn}$ (Zinpir-1) nanokompozitleri bir magnet yardımı ile tutularak süpernatant uzaklaştırıldı, belirtilen tampon çözeltisi içerisinde derişimi 1mg/3mL olacak şekilde çözeltisi hazırlandı ve 490 nm uyarma ve 530 nm emisyon dalga boyunda spektrumları alındı.

Tükürükte Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} metal katyonları bulunmaktadır. Bunlara ilaveten protetik tedavi (kuron-köprü (kaplama) ve metal destekli bölümlü ve tam protezler¹³⁹, ortodontik tedavi¹⁴⁰, diş çürüklerinin konservatif tedavisi¹⁴¹ ve implant tedavisi¹⁴² sonrasında tükürüğe salınan metal katyonları Cr^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ti^{4+} ve Al^{3+} ’dır. Ayrıca tükürükte sigara içen kişilerde Al^{3+} iyonun kontrol grubuna göre yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir.⁸³

Bu bilgiler ışığında; $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitini kullanarak Zn^{2+} 'nin tayininde, tükürükte bulunan bazı metal iyonlarının (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mo^{2+} , Cr^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Sn^{2+} , Ti^{4+} ve Al^{3+}) girişim etkileri araştırıldı. Bu amaçla; girişim özelliği incelenen türlerin Bölüm 3.9'da belirtildiği gibi çözeltileri hazırlandı ve oluşum sabitlerine bağlı olarak 490 nm uyarmada meydana gelen 530 nm emisyon dalga boyunda floresans spektrumları alındı ve girişim etkisi, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin floresansını artıracak veya azaltacak yönde etki göstermesi ile belirlendi. %10'dan daha fazla bu etkiyi gösteren ilgili derişimdeki türün girişim etkisi olduğu sonucuna varıldı. Buna göre, Şekil 4.23'de görüldüğü gibi Zn^{2+} tayininde, Mn^{2+} ve Hg^{2+} 'nin, Zn^{2+} 'nin en yüksek kalibrasyon derişiminin 100 katı derişimlerinde olumsuz etkileri gözlenirken diğer belirlenen metal iyonlarda gözlenmedi. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitinin floresansını Mn^{2+} azaltacak yönde, Hg^{2+} ise artıracak yönde etki gösterdi. Protetik tedavi gören hastalarda gözlenen Mn^{2+} 'nin uygulamadan 3 gün sonra pg/mL seviyesine düşmesi ve diş çürüklerinin konservatif tedavisinde artık amalgam malzemenin tercih edilmemesi ve yine Hg^{2+} deşiminin zamanla pg/mL seviyesine azalması yönünden tükürükte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompozitini kullanarak Zn^{2+} 'nin tayininin rahatlıkla yapılabileceği söylenebilir.

Analitik yöntem seçimi ve yöntemin optimisasyonu yapıldıktan sonra geliştirilen bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, doğrusallık, seçicilik, spesifiklik ve hassaslık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testlerinde bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Kullanılan standart maddeler, analizi yapılacak analit ile aynı ya da kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması gerekir.¹³²

Çalışmada, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ -(Zinpir-1) nanokompoziti kullanılarak Zn^{2+} 'nin belirlenmesi için geliştirilen spektrofotometri yönteminin validasyonu (Bölüm 4.7)

doğruluk, kesinlik, doğrusallık, belirleyicilik ve duyarlılık gibi parametreleri içeren geçerlilik testleri ile sırasıyla Zn^{2+} 'nin Bölüm 3.9'da belirtildiği şekilde hazırlanan standart ve yapay tükürük örneklerinde gerçekleştirildi.

Standart Zn^{2+} çözeltileri için yöntemin, 0.9973 korelasyon katsayısı ile 20 ile 160 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 5.04 ng/mL ve 15.3 ng/mL olarak bulundu. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerlerinde ise sırasıyla % BSS değerinin 2.52'den, % BH değerinin ise 0.95'den küçük olduğu belirlendi.

Yapay tükürükte hazırlanan Zn^{2+} çözeltileri için yöntemin, 0.9988 korelasyon katsayısı ile 20 ile 160 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edildi. LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 5.89 ng/mL ve 17.8 ng/mL olarak bulundu. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerlerinde ise sırasıyla % BSS değerinin 2.47'den, % BH değerinin ise 2.22'den küçük olduğu belirlendi.

Çalışmanın son kısmında, geliştirilen ve valide edilen nanokompozit oluşumuna dayalı bu spektrofotometrik yöntem ile sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanser ve oral kanser teşhisi konulmuş hastaların tükürük Zn^{2+} derişimlerinin belirlenmesi amaçlandı.

Literatürde sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanser ve oral kanser teşhisi konulmuş hastaların tükürük Zn^{2+} derişimlerini belirlemeye yönelik çalışmalar mevcuttur. Zn^{2+} derişiminin AAS kullanılarak belirlendiği bir çalışmada ortalama tükürük Zn^{2+} derişimi OL ($27.33 \pm 3.05 \mu\text{g/dL}$), OSMF ($24.67 \pm 4.86 \mu\text{g/dL}$) ve OSHK ($15.23 \pm 2.93 \mu\text{g/dL}$) hastalarında ve sağlıklılarda ($35.78 \pm 3.97 \mu\text{g/dL}$) belirlenmiş ve hasta grupları sağlıklı gönüllüler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu ($p=0.001$) bulunmuştur.⁹⁴ Benzer bir AAS çalışmasında, tükürük Zn^{2+} derişiminin sağlıklılarda ($146.76 \pm 29.18 \mu\text{g/dL}$) daha yüksek, OL hastalarında ($116.96 \pm 38.73 \mu\text{g/dL}$) daha düşük olduğu ve OL hastaları ile sağlıklılar karşılaştırıldığında tükürük Zn^{2+} seviyelerinde anlamlı farklılık

olduğu ($p=0.003$) belirtilmiştir.⁹⁶ OSMF'li hastalar ile sağlıklıların karşılaştırıldığı bir AAS çalışmasında da OSMF'deki ortalama tükürük Zn^{2+} derişimlerinin (0.10 ± 0.21 ppm) sağlıklılara (0.10 ± 0.29 ppm) göre azaldığı ve aralarında anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) gösterilmiştir.⁹⁷ Diğer bir AAS yöntemi ile belirlenen Zn^{2+} derişiminin oral kanserli (16.97 ± 5.36 $\mu\text{g/dL}$), potansiyel oral kanserli (2.25 ± 5.32 $\mu\text{g/dL}$) ve sağlıklı gönüllülere doğru gidildikçe anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir ($p<0.001$).⁹³ OSMF'li gutkha alım öyküsü olan hastalar (A grubu: 0.4472 $\mu\text{g/mL}$), sağlıklı gutkha alım öyküsü olan gönüllüler (B grubu: 0.3821 $\mu\text{g/mL}$) ve sağlıklı gönüllülerin (C grubu: 0.2740 $\mu\text{g/mL}$) tükürük Zn^{2+} derişimi, AAS ve pulslu anodik sıyırma voltametri yöntemleri kullanılarak belirlenmiş ve tükürük Zn^{2+} seviyelerinin C grubundan A grubuna doğru arttığı bildirilmiştir.¹²⁰ Fakat Zn^{2+} derişiminin ICP-MS yöntemi kullanılarak belirlendiği çalışmada tükürük Zn^{2+} seviyelerinin oral kanserli (411.30 ± 152.24 ppb) ve oral prekanserli hastalardan (284.26 ± 124.64 ppb) sağlıklı gönüllülere (175.62 ± 37.20 ppb) doğru gittikçe azaldığı ve gruplar arasında anlamlı farkın olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir.⁹² Benzer bir AAS yöntemi çalışmasında da OSHK hastalarının ameliyat öncesi tükürüğünde (0.38 ± 0.28 ppm) tespit edilen Zn^{2+} derişiminin sağlıklı gönüllülere göre (0.19 ± 0.04 ppm) yüksek olduğu belirlenmiştir.⁸⁹ Ayrıca literatürde bulunan mevcut çalışmaların tümü değerlendirildiğinde sağlıklı gönüllülerin tükürük Zn^{2+} derişiminin 46 ng/mL ile 1467 ng/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir.^{75-78,80,82-84,89,93,94,96,97} Bölgeler arasındaki farklılıklara bağlı olarak çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıklarının değişmesi metabolizmadaki çinko derişimini değiştirmektedir. Bu yüzden yukarıda belirtilen bu çalışmalarda görüldüğü üzere çalışmalar arasında oral kanser ve oral prekanser hastaları ile sağlıklı gönüllülerden elde edilen Zn^{2+} derişimleri farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında, herbiri altı kişiden oluşan sağlıklı, oral prekanserli ve oral kanserli gönüllülerin tükürük örnekleri Bölüm 3.13'te belirtildiği şekilde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalında toplandı. Bölüm 3.9'da anlatıldığı şekilde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompoziti hazırlanıp 100 mM KCl ve 50 μM EDTA içeren 0.01 M Tris-HCl (DMSO/ H_2O 2:3 h/h, pH 7.2) tampon çözeltisi ortamında sağlıklı gönüllü, oral prekanserli ve oral kanserli hastaların tükürük örneklerinde Bölüm 4.8'de belirtildiği şekilde Zn^{2+} ile seçici olarak etkileşimi ve manyetik olarak ayrımı gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-Zn(Zinpir-1)}$ nanokompozitinin 1mg/3mL olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Bu tükürük çözeltilerinin 490 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 530 nm emisyon dalga boyunu kapsayacak şekilde 400-800 nm dalga boyu aralığında emisyon spektrumu alındı. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-(Zinpir-1)}$ manyetik nanokompozitinin 530 nm'de gözlenen emisyon pikinde tükürükte bulunan Zn^{2+} derişimine bağlı olarak floresans şiddetinde artış görüldü. Yapay tükürük içerisinde elde edilen Zn^{2+} derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek standart ekleme yöntemi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanserli ve oral kanserli hastaların tükürük örneklerindeki Zn^{2+} derişimleri bulundu (Tablo 4.9 ve Şekil 4.31). Gruplar arasındaki farklılığın anlamlılık düzeyini ortaya koymak amacıyla tek yönlü ANOVA analizinin non-parametrik karşılığı olan Kruskal-Wallis tek yönlü analizi veri setine uygulandı (Tablo 4.10). Elde edilen istatistiksel veriler ışığında; sağlıklı, oral prekanserli ve oral kanserli gönüllülerin tükürük Zn^{2+} derişimlerinde $p<0.001$ seviyesinde anlamlı farklılığın olduğu ve sağlıklı gruptan (619.77 ± 44.45 ng/mL), sırasıyla oral prekanser (498.64 ± 24.96 ng/mL) ve oral kanser gruplarına (367.08 ± 25.65 ng/mL) doğru gidildikçe ortalama tükürük Zn^{2+} derişimlerinde anlamlı derecede ($p=0.0005$) bir azalma olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tıbbi gelişmelere rağmen oral kanserler, DSÖ'nün listesine göre en ölümcül kanser türleri arasında yer alan ve baş ve boyun bölgesinde görülen kanser türlerinden biridir. OSHK, oral kanserlerin %90'ından fazlasını oluştururken, OLP ise en sık rastlanılan oral prekanser lezyonlardan biridir. Günümüzde oral kanserler, klinik özelliklerinin yetersiz olmasından ve tanıda kullanılabilecek yöntemlerin eksikliğinden dolayı çok geç teşhis edilebilmektedir. Bu bağlamda, oral kanser araştırmalarının ilgi noktalarından biri yeni biyolojik belirteçleri keşfetmektir. Dolayısıyla, biyolojik sıvıların analizine duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Vücuttaki birçok süreçte önemli görevleri olan biyoelementlerden biri çinkodur. Çinkonun fazlalığı veya eksikliği durumlarında homeostasisi bozularak kanser gelişebilir. Oral prekanser ve oral kanserin tükürük ile anatomik olarak yakınlığından ve kanser gelişimi ile tükürük çinko derişimi değişebileceğinden dolayı tükürük çinko düzeyinin bu hastalıkların erken tanısı için oldukça önemli bir biyobelirteç olabileceği söylenebilir. Nanoteknoloji, maddeye atom ve molekül seviyesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak yeni özellikler kazandırmayı amaçlamayan, yeni ve hızla gelişen bir teknoloji alanıdır. Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, biyomedikal uygulamalar, tıp ve elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamaları gibi pek çok alanda kullanılabilmeleri yönüyle son yıllarda oldukça önem kazanmaktadır.

Çeşitli metallerin veya metal komplekslerin nano malzemeler yüzeyinde modifikasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olup bu yöntemler ile tükürüğü içeren biyolojik örneklerde biyoelementlerin belirlenmesine yönelik bir çalışma yoktur. Bu bağlamda; bu çalışma hem çinko için seçici ve manyetik olarak geri kazanılabilen nanokompozit sentezi hem de hazırlanan nanokompozitlerin tükürük içindeki çinkonun tayininde uygulanması yönünden özgündür. Ayrıca çalışma kapsamında biyolojik öneme

sahip çinkonun tükürükte analizi için geliştirilmiş nanokompozit temeline dayalı spektrofotometrik yöntem bir ilk olup, çinkonun analizi için bilinen atomik spektroskopisi ve floresans görüntüleme temeline dayalı yöntemlerden daha etkin, ppb seviyesinde hassas, seçiciliği yüksek ve daha ekonomiktir. Aynı zamanda geliştirdiğimiz bu yöntem, kullanımı uzmanlık gerektirmeyen ve basit bir yöntemdir. Geliştirdiğimiz ve valide ettiğimiz yöntem, sağlıklı gönüllülerin ve oral prekanser ve oral kanser hastalarının tükürük çinko seviyesinin belirlenmesinde başarı ile uygulandı ve hastaların ve sağlıklı gönüllülerin tükürük çinko seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Buna bağlı olarak, kolaylıkla hastadan alınabilecek tükürük örneğinde belirlenecek çinko seviyesinin oral kanser tanısında bir biyobelirteç olabileceği ve geliştirdiğimiz nanokompozit oluşum temeline dayalı spektrofotometrik yöntemin de klinik ve epidemiyolojik çalışmaların rutin analizlerinde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca, nanoboyutta manyetik nanopartiküllerle katılanmış bu tür nanokompozitlerin ve bu nanokompozitlerle biyolojik sistemlerde elementel analiz yöntemlerinin geliştirilmesi Avrupa Birliği'nin getirdiği normlar çerçevesinde çevrenin daha az kirlenmesine neden olan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilmesine örnek teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*, 2018, 68:394–424.
2. Scully C. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br dent J*, 1992, 173:53-59.
3. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr.*, 1995, 61:437-445.
4. Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2016, 42:327-336.
5. Carl W. Local radiation and systemic chemotherapy: preventing and managing the oral complications. *J Am Dent Assoc*, 1993, 124:119-123.
6. World Health Organization. Latest world cancer statistics – GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <https://www.iarc.fr/.../latest-world-cancer-statistics-globocan>. 3 Mayıs 2019.
7. Kowalski LP, Franco EL, Torloni H, Fava AS, de Andrade Sobrinho J, Ramos G, Oliveira BV, Curado MP. Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur J Cancer B Oral Oncol.*, 1994, 30:167-173.
8. Kujan O, Duxbury AJ, Glenney AM, Thakker NS, Sloan P. Opinions and attitudes of the UK's GDPs and specialists in oral surgery, oral medicine and surgical dentistry on oral cancer screening. *Oral Dis*, 2006, 12:194-199.
9. Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg*, 1985, 61:373-381.
10. Jamal S, Mushtaq S. Oral squamous cell carcinoma (OSCC): Review and histological types. *Pak Armed Forces Med J*, 2015, 65:420-425.

11. Öztürk B, Coşkun U, Yaman E, Kaya AO, Yıldız R, Benekli M, Büyükberber S. The risk factors, premalignant lesions and chemoprevention oral cavity cancers. *International Journal of Hematology and Oncology*, 2009, 19:117-126.
12. Kusama K, Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Sakashita H, Ochiai K. Microorganisms and cancer of the oral cavity. *Integr Cancer Sci Therap*, 2016, 3: 510-515.
13. Ho MW, Field EA, Field JK, Risk JM, Rajlawat BP, Rogers SN, Steele JC, Triantafyllou A, Woolgar JA, Lowe D, Shaw RJ. Outcomes of oral squamous cell carcinoma arising from oral epithelial dysplasia: rationale for monitoring premalignant oral lesions in a multidisciplinary clinic. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 51:594-599.
14. Dreizen S, Daly DE. Oral complications of cancer radiotherapy. *Postgrad Med*, 1977, 61:85-92.
15. Yalçın ED, Süslü N, Avcu N. Retromolar trigon skuamöz hücreli karsinom: Olgu sunumu. *J Dent Fac Atatürk Uni*, 2014, 9:1-5.
16. Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncology*, 2003, 39:91-100.
17. Cawson Ra, Odell Ew, Porter S. *Cawson's Essentials Of Oral Pathology and Oral Medici-Ne*, 7th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2002:230-254.
18. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc*, 2002, 68:617-622.
19. Yardımcı G, Kutlubay Z, Engin B, Tuzun Y. Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases*, 2014, 2:866-872.

20. Goodson ML, Thomson PJ. Management of oral carcinoma: benefits of early precancerous intervention. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2011, 49:88-91.
21. Bánóczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ*, 2001, 65:322-327.
22. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia review. *Oral Oncol*, 2005, 41:551-561.
23. Groome PA, Rohland SL, Stephen F. Hall SF, Irish J, Mackillop WJ, O'Sullivan B. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. *Oral Oncology*, 2011, 47:642-647.
24. Hazarey VK, Erlewad DM, Mundhe KA, Ughade SN. Oral submucous fibrosis: study of 1000 cases from central India. *J Oral Pathol Med*, 2007, 36:12-17.
25. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol*, 2010, 28:100-108.
26. Yıldırım B, Şengüven B, Barış E, Gültekin SE. Potansiyel malign bozukluklar ve ağız kanseri şüphesi bulunan lezyonlara yaklaşım ve diş hekimlerinin erken tanıdaki rolü. *Journal of Clinical Sciences*, 2011, 5:881-886.
27. Van Der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*, 2009, 45:317-323.
28. Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 2000, 38:370-377.
29. Kalabalık F, Ertaş ET. Oral premalign lezyonların teşhis yöntemleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2015, 4 :59-63.

30. Mealey BL, Semba SE, Hallmon WW. Dentistry and the cancer patient: Part 1- Oral manifestations and complications of chemotherapy. *Compendium*, 1994, 15:1252, 1254, 1256 passim; quiz 1262.
31. Sadık E, Alkurt MT. Oral Mukozanın şüpheli lezyonlarının teşhisinde kullanılan yardımcı yöntemler. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, 2012, 29:201-208.
32. Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head & Neck Oncology*, 2011, 3:33-40.
33. Cheng YSL, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. *Clinical and Translational Medicine*, 2014, 3:3-12.
34. Ülger H, Coşkun A. Çinko: temel fonksiyonları ve metabolizması. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 5:38-44.
35. Belgemen T, Akar N. Çinkonun yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004, 57:161-166.
36. Wang FD. Maternal zinc deficiency impairs brain nestin expression in prenatal and postnatal mice. *Cell Research*, 2001, 11:135-141.
37. Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Research Bulletin*, 2000, 34:137-148.
38. Forbes RM. Use of laboratory animals to define physiological functions and bioavailability of zinc. *Federation Proceedings*, 1984, 43:2835-2839.
39. Maret W. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 9:237-241.
40. Dardenne M, Pleau JM, Nabama B, Lefancier P, Denien M, Choay J, Bach JF. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic

- factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79:5370-5373.
41. Domellof M, Lonnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Hemell O. Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79:111-115.
 42. Root AW, Duckett G, Sweetland M, Reiter EO. Effects of zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats. *Journal of Nutrition*, 1979, 109:958-964.
 43. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 1992, 172:305-312.
 44. Lagerlof F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res*, 1994, 8:229-238.
 45. Dodds MWJ, Johnson DA, Chih-Ko Y. Health benefits of saliva. *A Review Journal of Dentistry*, 2005, 33:223-233.
 46. Beykaya M, Çağlar A. Bitkisel özütler kullanılarak gümüş-nanopartikül (AgNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. *Akü Femübid*, 2016, 16:631-641.
 47. Liu WT. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Engineering*, 2006, 102:1-7.
 48. Gürmen S, Ebin B. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri – 1.https://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi150/d150_3138.pdf. 2 Eylül 2018.
 49. Oyar P. Diş hekimliğinde kullanılan nanopartiküller, kullanım alanları ve biyouyumluluk. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2014, 24: 125-133.

50. Ngomsik AF, Bee A, Draye M, Cote G, Cabuil V. Magnetic nanoand microparticles for metal removal and environmental applications: a review. *Comptes Rendus Chimie*, 2005, 8:963-970.
51. Gündoğdu M. Demir Oksit Nanopartiküller ile Metal İyonlarının Sulardan Uzaklaştırılması, Önderiştirilmesi ve Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2016.
52. Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124:8204-8205.
53. Liu YM. TCE dechlorination rates, pathways, and efficiency of nanoscale iron particles with different properties. *Environ. Sci. Technol*, 2005, 39:1338-1345.
54. Sonmez M, Georgescu M, Alexandrescu L, Gurau D, Ficai A, Ficai D, Andronesu E. Synthesis and applications of Fe₃O₄/SiO₂ core-shell materials. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21:1-12.
55. Lu Y, Yin Y, Mayers BT, Xia Y. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano Letters*, 2002, 2:183-186.
56. Burdette SC, Walkup GK, Spingler B, Tsien RY, Lippard SJ. Fluorescent sensors for Zn²⁺ based on a fluorescein platform: Synthesis, properties and intracellular distribution. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:7831-7841.
57. H Lu, R Wu, H Cheng, S Nie, Y Tang, Y Gao, Z Luo. An efficient, mild, solvent-free, one-pot three-component mannich reaction catalyzed by (C₄H₁₂N₂)₂[BiCl₆]Cl·H₂O. *Synthesis*, 2015, 47:1280-1290.
58. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed. United States of America, Cengage Learning, 2016:361-389.

59. Eisinger J, Flores J. Front-face fluorometry of liquid samples. *Analytical Biochemistry*, 1979, 94:15-21.
60. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*, 10. Baskı. Ankara, Gazi Kitabevi, 2007.
61. He BB. *Two-Dimensional X-ray Diffraction*, 3rd ed. United States, Wiley VCH, 2009:1-23.
62. Hirschmugl CJ. Frontiers in infrared spectroscopy at surfaces and interfaces. *Surf. Sci.*, 2002, 500:577-604.
63. Egerton RF. *Physical Principles of Electron Microscopy An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, 1st ed. USA, Springer, 2005:1-202.
64. Moldovan M, Krupp EM, Holliday AE, Donard OFX. High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19:815-822.
65. Caner M. ICP-MS ile Demir Analizlerindeki Girişim Etkilerinin Gıda, Cam ve Su Örneklerinde İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, 2014.
66. Zhang JM, Zhai SR, Zhai B, An QD, Tian G. Crucial factors affecting the physicochemical properties of sol-gel produced Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ core-shell nanomaterials. *Journal of Sol-Jel Science and Technology*, 2012, 64:347-357.
67. Shokouhimehr M, Shin KY, Lee JS, Hackett MJ, Jun SW, Oh MH, Jang J, Hyeon T. Magnetically recyclable core-shell nanocatalysts for efficient heterogeneous oxidation of alcohols. *J. Mater. Chem. A*, 2014, 2:7593-7599.
68. Chang Q, Tang H. Immobilization of horseradish peroxidase on NH₂-modified magnetic Fe₃O₄/SiO₂ particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol. *Molecules*, 2014, 19:15768-15782.

69. Chen FH, Gao Q, Ni JZ. The grafting and release behavior of doxorubicin from Fe₃O₄@SiO₂ core-shell structure nanoparticles via an acid cleaving amide bond: the potential for magnetic targeting drug delivery. *Nanotechnology*, 2008, 19:165103-165111.
70. de Oliveira LF, Bouchmella K, Gonçalves KdeA, Bettini J, Kobarg J, Cardoso MB. Functionalized silica nanoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs. *Langmuir*, 2016, 32:3217-3225.
71. Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H. Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 270:1-6.
72. Zhang J, Zhai S, Li S, Xiao Z, Song Y, An Q, Tian G. Pb(II) removal of Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ core-shell nanomaterials prepared via a controllable sol-gel process. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 215:461-471.
73. Wang J, Zheng S, Shao Y, Liu J, Xu Z, Zhu D. Amino-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010b, 349:293-299.
74. Mali SM, Kumar MG, Katariya MM, Gopi HN. HBTU mediated 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) conjugate addition: synthesis and stereochemical analysis of β-benzotriazole N-oxide substituted γ-amino acids and hybrid peptides. *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12:8462-8472.
75. Mathur A, Wallenius K, Abdulla M. Relation between zinc content in saliva and blood in healthy human adults. *Scand J Clin Lab Invest*, 1977, 37:469-472.
76. Greger JL, Sickles VS. Saliva zinc levels: potential indicators of zinc status. *Am. J. Clin. Nutr*, 1979, 32:1859-1866.

77. Bales CW, Graves JHF, Askey S, Behmardi F, Pobocik RS, Fickel JJ, Greenlee P. Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age-and sex-related differences. *Am J Clin Nutr.*, 1990, 51:462-469.
78. Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nomura S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chemical Senses*, 2005, 30:121-125.
79. Zahir S, Sarkar S. Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 2006, 24:27-29.
80. Burguera-Pascu M, Rodríguez-Archilla A, Burguera JL, Burguera M, Rondón C, Carrero P. Flow injection on-line dilution for zinc determination in human saliva with electrothermal atomic absorption spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 600:214-220.
81. Dural S, Büyükköprü D. The effect of head and neck radiotherapy on trace elements of saliva. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2008, 32:82-90.
82. Menegário AA, Packer AP, Gin'e MF. Determination of Ba, Cd, Cu, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 2001, 126:1363-1366.
83. Kim YJ, Kim YK, Kho HS. Effects of smoking on trace metal levels in saliva. *Oral Diseases*, 2010, 16:823-830.
84. Khozeimeh F, Jafari N, Attar AM, Jafari S, Ataie M. Comparative analysis of salivary zinc level in recurrent herpes labialis. *Dental Research Journal*, 2012, 9:19-23.

85. Monica M, Ankola AV, Hebhal M. Prevalence of dental caries and its relationship with trace elements present in drinking water among 12 year old children in rural areas of Andhra Pradesh, India. *Journal of Research in Dentistry*, 2015, 3:792-797.
86. Bhandary S, Shetty S, Shetty A, Hegde MN. Correlation of trace elements in saliva with dental caries activity. *International Journal of Current Research*, 2015, 7:18574-18577.
87. Hussein AS, Ghasheer HF, Ramli NM, Schroth RJ, Abu-Hassan MI. Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Shah Alam, Malaysia. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 2013, 14:113-118.
88. Li Q, Zhao X, Lv Q, Liu G. The determination of zinc in water by flame atomic absorption spectrometry after its separation and preconcentration by malachite green loaded microcrystalline triphenylmethane. *Sep Purif Technol*, 2007, 55:76-81.
89. Al-Rawi NH, Talabani NGA. Quantitative analysis of trace elements in saliva of oral cancer patients from Iraq. *J Coll Dentistry*, 2005, 17:32-35.
90. Khannaa S, Udas AC, Kumar GK, Suvarna S, Karjodkar FR. Trace elements (copper, zinc, selenium and molybdenum) as markers in oral sub mucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2013, 27:307-311.
91. Shetty SR, Babu S, Kumari S, Shetty P, Hegde S, Karikal A. Role of serum trace elements in oral precancer and oral cancer - a biochemical study. *Journal of Cancer Research and Treatment*, 2013, 1:1-3.
92. Ayinampudi BK, Narsimhan M. Salivary copper and zinc levels in oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2012, 16:178-182.

93. Shetty SR, Babu SG, Rao PK, Kishor SK, Rao KA, Castelino R. Interdependence of antioxidants and micronutrients in oral cancer and potentially malignant oral disorders: A serum and saliva study. *Journal of Dentistry*, 2014, 11:696-702.
94. Shetty SR, Babu S, Kumari S, Shetty P, Hegde S, Karikal A. Status of trace elements in saliva of oral precancer and oral cancer patients. *J Can Res Ther*, 2015, 11:146-149.
95. Baloch S, Devrajani BR, Pir M, Pir MA, Baloch MA. Trace metals concentration in patients with oral cancer by atomic absorption spectroscopy. *Jokull Journal*, 2015, 65:113-122.
96. Kanneppady SK, Bhaskar A, Rao PK, Lakshman AR, Barua A, Kanneppady SS. Role of salivary zinc in oral leukoplakia – A biochemical study. *IJIRSET*, 2015, 4:44-47.
97. Okade AR, Hallikeri KS, Trivedi DJ. Salivary estimation of copper, iron, zinc and manganese in oral submucous fibrosis patients: A case-control study. *Clin Cancer Investig J*, 2015, 4:302-306.
98. Henary MM, Wu Y, Fahrni CJ. Zinc(II)-selective ratiometric fluorescent sensors based on inhibition of excited-state intramolecular proton transfer. *Chem. Eur. J.*, 2004, 10:3015-3025.
99. Sarkar K, Dhara K, Nandi M, Roy P, Bhaumik A, Banerjee P. Selective zinc(II)-ion fluorescence sensing by a functionalized mesoporous material covalently grafted with a fluorescent chromophore and consequent biological applications. *Adv. Funct. Mater.*, 2009, 19:223-234.
100. Li L, Dang YQ, Li HW, Wang B, Wu YQ. Fluorescent chemosensor based on Schiff base for selective detection of zinc(II) in aqueous solution. *Tetrahedron Letters*, 2009, 51:618–621.

101. Chen XY, Shi J, Li YM, Wang FL, Wu X, Guo QX, Liu L. Two-photon fluorescent probes of biological Zn(II) derived from 7-hydroxyquinoline. *Organic Letters*, 2009, 11:4426-4429.
102. Zhou XY, Yu BR, Guo YL, Tang XL, Zhang HH, Liu WS. Both visual and fluorescent sensor for Zn²⁺ based on quinoline platform. *Inorganic Chemistry*, 2010, 49:4002-4007.
103. You Y, Tomat E, Hwang K, Atanasijevic T, Nam W, Jasanoff AP, Lippard SJ. Manganese displacement from Zinpyr-1 allows zinc detection by fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging. *Chem Commun (Camb)*, 2010, 46:4139-4141.
104. Pal P, Rastogi SK, Gibson CM, Aston DE, Branen AL, Bitterwolf TE. Fluorescence sensing of zinc(II) using ordered mesoporous silica material (MCM-41) functionalized with N-(Quinolin-8-yl)-2-[3-(triethoxysilyl)propylamino] acetamide. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, 3:279-286.
105. Liu T, Liu S. Responsive polymers-based dual fluorescent chemosensors for Zn²⁺ ions and temperatures working in purely aqueous media. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:2775-2785.
106. Dong D, Jing X, Zhang X, Hu X, Wu Y, Duan C. Gadolinium (III)-fluorescein complex as a dual modal probe for MRI and fluorescence zinc sensing. *Tetrahedron*, 2012, 68:306-310.
107. Helal A, Harun M, Rashid M, Choi CH, Kim HS. New regioisomeric naphthol-substituted thiazole based ratiometric fluorescence sensor for Zn²⁺ with a remarkable red shift in emission spectra. *Tetrahedron*, 2012, 68:647-653.
108. Ashokkumar P, Ramakrishnan VT, Ramamurthy P. Photoinduced electron transfer (PET) based Zn²⁺ fluorescent probe: transformation of turn-on sensors into

- rationetric ones with dual emission in acetonitrile. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2011, 115:14292-14299.
109. Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (boutsin zinc) in the brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 1987, 20:91-103.
110. Huston MH, Haider KW, Czarnik AW. Chelation-enhanced fluorescence in 9,10-bis(TMEDA)anthracene. *Journal of American Chemical Society*, 1988, 110:4460-4462.
111. Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Nagano T. Novel zinc fluorescent probes excitable with visible light for biological applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000, 39:1052-1054.
112. Zhang GQ, Yanga GQ, Zhua LN, Chenb QQ, Ma JS. A potential fluorescent sensor for Zn^{2+} based on a selective bis-9-anthryldiamine ligand operating in buffer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 114:995-1000.
113. Walkup GK, Burdette SC, Lippard SJ, Tsien RY. A new cellpermeable fluorescent probe for Zn^{2+} . *Journal of American Chemical Society*, 2000, 122:5644-5645.
114. Woodroffe CC, Masalha R, Barnes KR, Frederickson CJ, Lippard SJ. Membrane-permeable and -impermeable sensors of the zinpyr family and their application to imaging of hippocampal zinc in vivo. *Chemistry & Biology*, 2004, 11:1659-1666.
115. Xu Z, Baek KH, Kim HN, Cui J, Qian X, Spring DR, Shin I, Yoon J. Zn^{2+} -triggered amide tautomerization produces a highly Zn^{2+} -selective, cellpermeable, and ratiometric fluorescent sensor. *J Am Chem Soc*, 2010a, 132:601-610.
116. Hendrickson KM, Rodopoulos T, Pittet PA, Mahadevan I, Lincoln SF, Ward AD, Kurucsev T, Duckworth PA, Forbes IJ, Zalewski PD, Betts WH. Complexation of zinc(II) and other divalent metal ions by the fluorophore 2-methyl-8-(toluene-

- psulfonamido)-6-quinolyloxyacetic acid in 50% aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1997, 20:3879-3882.
117. Balpande AR, Sathawane RS. Estimation and comparative evaluation of serum iron, copper, zinc and copper/zinc ratio in oral leukoplakia, submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 2010, 22:73-76.
 118. Nayak AG, Chatra L, Shenai PK. Analysis of copper and zinc levels in the mucosal tissue and serum of oral submucous fibrosis patients. *World Journal of Dentistry*, 2010,1:75-78.
 119. Shettar SS, Mubeen. Estimation of serum copper and zinc levels in patients with oral submucous fibrosis. *JIAOMR*, 2010, 22:193-196.
 120. Kode MA, Karjodkar FR. Estimation of the serum and the salivary trace elements in OSMF patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2013, 7:1215-1218.
 121. Baharvand M, Manifar S, Akkafan R , Mortazavi H , Sabour S. Serum levels of ferritin, copper, and zinc in patients with oral cancer. *Biomed J*, 2014, 37:331-336.
 122. Joseph AK. Estimation of copper and zinc levels in the serum of oral submucous fibrosis patients. *Int J Res Health Allied Sci*, 2017, 3:19-21.
 123. Adnan SNAM, Hasan S, Zakaria S, Yusof YM. Dimethylaminodiethylenetriamine derivatives of fluorescence chemosensor for detection of Zn^{2+} in aqueous solution. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 2017, 172:1-10.
 124. Wang Y, Peng X, Shi J, Tang X, Jiang J, Liu W. Highly selective fluorescent chemosensor for Zn^{2+} derived from inorganic-organic hybrid magnetic core/shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 2012, 7:86-98.

125. Xu Y, Zhou Y, Ma W, Wang S. Fluorescent sensor for zinc detection and removal based on core-shell functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 70:1-7.
126. Xu Y, Zhou Y, Li R. Simultaneous fluorescence response and adsorption of functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles to Cd^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} . *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 459:240-246.
127. Gu Y, Meng G, Wang M, Huang Q, Zhu C, Huang Z. R6G/8-AQ co-functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles for fluorescence detection of trace Hg^{2+} and Zn^{2+} in aqueous solution. *Sci China Mater*, 2015, 58:550-558.
128. Li Q, Zhang Y, Jin Y, Yang Q, Du J, Li Y. Fluorescent magnetic nanosensors for Zn^{2+} and CN^- in aqueous solution prepared from adamantane-modified fluorescein and β -cyclodextrin-modified $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ via host-guest interactions. *RSC Adv.*, 2015, 5:68815-68821.
129. Rastogi SK, Pal P, Aston DE, Bitterwolf TE, Branen AL. 8-Aminoquinoline functionalized silica nanoparticles: A fluorescent nanosensor for detection of divalent zinc in aqueous and in yeast cell suspension. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2011, 3:1731-1739.
130. Sun Z, Li H, Guo D, Sun J, Cui G, Liu Y, Tian Y, Yan S. A multifunctional magnetic core-shell fibrous silica sensing probe for highly sensitive detection and removal of Zn^{2+} from aqueous solution. *J. Mater. Chem. C*, 2015, 3:4713-4722.
131. Xua Y, Zhou A, Lia R. Simultaneous fluorescence response and adsorption of functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles to Cd^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} . *Colloids and Surfaces. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014, 459:240-246.
132. Soguterttas O, Kayalı A. Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 34:41-57.

133. Miler JN, Miler JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Çeviri: Uyanık A. *Analitik Kimyacılar İçin İstatistik ve Kemometri*, 6. Baskı. Ankara, Pegem Akademi Yayıncılık, 2012:217-221.
134. Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal superlattices, *Annual Review of Materials Research*, 2000, 30:545-610.
135. Xu Z, Shen C, Hou Y, Gao H, Sun S. Oleylamine as both reducing agent and stabilizer in a facile synthesis of magnetite nanoparticles. *Chem. Mater*, 2009, 21:1778-1880.
136. Stöber W, Fink A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010, 26:62-69.
137. Al-Awadi NA, Shuaib NM, Abbas A, El-Sherif AA, El-Dissouky A, Al-Saleh E. Synthesis, characterization, and biological activity of N¹-Methyl-2-(1H-1,2,3-Benzotriazol-1-y1)-3-Oxobutan-ethioamide complexes with some divalent metal (II) ions. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2008, 4:1-10.
138. Wong BA, Friedle S, Lippard SJ. Solution and fluorescence properties of symmetric dipicolylamine-containing dichlorofluorescein-based Zn²⁺ Sensors. *J Am Chem Soc*, 2009, 131:7142-7152.
139. Siddharth R, Gautam R, Chand P, Agrawa KK, Singh RD, Singh BP. Quantitative analysis of leaching of different metals in human saliva from dental casting alloys: An in vivo study. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 2015, 15:206-210.
140. Agaoglu G, Arun T, Izgu B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthodontist*, 2001, 71:375-379.

141. Garhammer P, Hiller KA, Reitinger T, Schmalz G. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. *Clinical Oral Investigations*, 2004, 8:238-242.
142. Okazaki Y, Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials*, 2005, 26:11-21.
143. Fulton JS, Middleton GJ, McPhail JT. Management of oral complications. *Semin Oncol Nurs*, 2002, 18:28-35.
144. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases (review). *Oncol Rep.*, 2015, 33:3-18.
145. Erbaşar GNH, Alpaslan C. Ağız kanserinin önlenmesi ve erken teşhisi konusunda Ankara'daki diş hekimlerinin farkındalığı. *ACTA ONCOLOGICA TURCICA*, 2017, 50:139-147.
146. Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2016, 42:327-336.
147. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquout JE. *Oral & Maxillofacial Pathology*, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders, 2002:356-366.
148. Tekkeşin MS, Ersan N, Aksakallı N, Olgaç V, Alatlı C. Oral skuamöz hücreli karsinom: 147 vakanın retrospektif çalışması. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, 2012, 29:93-98.
149. Horowitz AM, Drury TF, Goodman HS, Yellowitz JA. Oral pharyngeal cancer prevention and early detection. Dentists' opinions and practices. *J Am Dent Assoc*, 2000, 131:453-462.
150. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people a comprehensive literature review. *Oral Oncol*, 2007, 37:401-418.

151. Carter LM, Ogden GR. Oral cancer awareness of general medical and general dental practitioners. *Br Dent J*, 2007, 203:248-249.
152. Skalny AV. Bioelementology as an interdisciplinary integrative approach in life science: terminology, classification, perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2011, 25:3-10.
153. Feinendegen LE, Kasperek K. Medical aspects of trace element research. In: Bratter P, Schramel P (eds). *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Berlin, Walter de Gruyter, 1980:1.
154. Yaman M, Kaya G, Yekeler H. Distribution of trace metal concentrations in paired cancerous and non-cancerous human stomach tissues. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 13:612-618.
155. Costello LC, Franklin RB, Tan M, Bagasra O. Zinc and prostate cancer: a critical scientific, medical, and public interest issue (United States). *Cancer Causes Control*, 2005, 16:901-915.
156. Araz M, Güven Y, Aktören O. Tükürük biyomarkerların erken tanıdaki rolü. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2013, 47:73-80.
157. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*, 2010, 4:171-189.
158. Büyükakyüz N, Öztürk M. Tükürüğün yapısı ve tanı açısından önemi. *Türkiye Klinikleri J Dental Sci*, 2012, 18:191-197.
159. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*, 2009, 22:241-248.

160. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva:Current state and future applications. *Clinical Chemistry*, 2011, 57:675-687.
161. Wagner P, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1022:9-16.
162. Kocík M, Vymetalová Y, Málek I. Cellfree human DNA in body fluids-potential for clinical applications. *Cas Lek Cesk*, 2007, 146:96-101.
163. Sertekin S. Etilendiamin İçeren Ni(II), Co(II), Cu(II) Komplekslerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2009.
164. Yardan A. Çok Dişli Schiff Bazlarının Sentezi ve Bazı Geçiş Metalleri ($M=Ni^{2+}$, Zn^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{2+}) ile Yaptığı Koordinasyon Bileşiklerinin Hazırlanması, Yapılarının Aydınlatılması ve Termal Davranışlarının İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2010.
165. Kimura E, Aoki S. Chemistry of zinc(II) fluorophore sensors. *BioMetals*, 2001, 14:191-204.
166. Bissell RA, Calle E, de Silva AP, de Silva SA, Gunaratne HQN, Habib-Jiwan JL, Peiris SLA, Rupasinghe RADD, Samarasinghe TKSD, Sandanayake KRAS, Soumillion JPJ. Luminescence and charge transfer. Part 2. aminomethyl anthracene derivatives as fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors for protons. *Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1992, 2:1559-1564.
167. Üçüncü Tunca E. Nanoteknoloji temeli nanopartiküller ve nanopartiküllerin fitoremediasyonu. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, 2015, 5:23-34.

168. De Silva AP, Gunaratne HQN, Gunnlaugsson T, Huxley AJM, McCoy CP, Rademacher JT, Rice TE. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem Rev*, 1997, 97:1515-1566.
169. Marshall M, Draney D, Seveck-Muraca E, Olive D. Single-dose intravenous toxicity study of IRDye 800CW in sprague-dawley rats. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12:583-594.
170. Hermann IK, Urner M, Koehler FM, Hasler M, Roth-Z'Graggen B, Robert N, Grass UZ, Beck-Schimmer B, Stark WJ. Blood purification using functionalized core/shell nanomagnets. *Small*, 2010, 6:1388-1392.
171. Dong Z, Yang B, Jin J, Li J, Kang H, Zhong X, Li R, Ma J. Quinoline group modified carbon nanotubes for the detection of zinc ions. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4:335-340.
172. Gao L, Wang Y, Wang J, Huang L, Shi L, Fan X, Zou Z, Yu T, Zhu M, Li Z. A novel ZnII-sensitive fluorescent chemosensor assembled within aminopropyl-functionalized mesoporous SBA-15. *Inorg Chem*, 2006, 45:6844-6850.
173. Dong Z, Wang P, Tian X, Geng H, Li R, Ma JA. Fluorescent probe for zinc detection based on organically functionalized SBA-15. *Appl. Surf. Sci.*, 2010, 257:802-806.
174. Corr SA, Rakovich YP, Gunko YK. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications, *Nanoscale Res Lett*, 2008, 3:87-104.
175. Wang B, Hai J, Liu Z, Wang Q, Yang Z, Sun S. Selective detection of iron (III) byrhodamine-modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2010a, 49:4576-4579.
176. Mu L, Shi W, Chang J. Silicon nanowires-based fluorescence sensor for Cu (II). *Nano Lett*, 2008, 8:104-109.

177. Salgueirino-Maceira V, Correa-Duarte MA. Increasing the complexity of magnetic core/shell structured nanocomposites for biological applications. *Advanced Materials*, 2007, 19:4131-4144.
178. Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine*, 2007, 2:23-39.
179. Kalele S, Gosavi SW, Urban J, Kulkarni SK. Nanoshell particles: synthesis, properties and applications. *Current Science*, 2006, 91:1038-1052.
180. Murray CB, Sun S, Gacshler W, Doyle H, Betley TA, Kagan CR. Colloidal synthesis of nanocrystals and nanocrystal superlattices. *IBM Journal of Research and Development*, 2001, 45:47-56.
181. Sharma, RK, Puri A, Monga Y, Adholeya A. Acetoacetanilide-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles for selective and cyclic removal of Pb²⁺ ions from different charged wastewaters. *Journal of Materials Chemistry A-Royal Society of Chemistry*, 2014, 2:12888-12898.
182. Valeur E, Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38:606-631.
183. Han SY, Kim YA. Recent development of peptide coupling reagents inorganic synthesis. *Tetrahedron*, 2004, 60:2447-2467.
184. Kim OK, Cho YH, Chung DY, Kim MJ, Yoo JM, Park JE, Choe H, Sung YE. Facile and gram-scale synthesis of metal-free catalysts: Toward realistic applications for fuel cells. *Scientific Reports*, 2015, 5:8376-8383.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Elmas POLATDEMİR
Doğum Tarihi: 02.02.1985
Doğum Yeri: Erzincan
Medeni Hali: Evli
Uyruğu: T.C.
Adres: Ergenekon Mah. 143. Sok. Eryapı Sitesi Kat:2/5 ERZİNCAN
Tel: 544 446 36 45
Faks:
E-mail: elmas.kbd@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzincan Anadolu Lisesi
Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı
Doktora: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: ÜDS 60
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

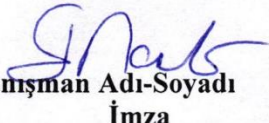
T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU* danışmanlığında sunulan “Zinpir-1 Ligandı ile Fonksiyonlaştırılmış Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ Nanokompozit Oluşumuna Dayalı Spektroflorometri Yöntemi ile Oral Premalign ve Malign Hastalarda Tükürük Çinko Seviyesinin Belirlenmesi ” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	5	15
Genel Bilgiler	8	30
Materyal ve Metod	12	35
Bulgular	5	10
Tartışma	4	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 04 / 07/ 2019


Öğrenci Adı-Soyadı
İmza
Elmas POLATDEMİR


Danışman Adı-Soyadı
İmza
Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih vesayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih vesayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu



Sayı : 93722986.12/649
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

11/11/2015

Sayın Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

İlgi: 09.11.2015 tarih ve 755 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 11.11.2015 tarihinde almış olduğu 11' nolu kararı ile "Zinpir-1 ligandı ile fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{NH}_2$ nanokompozit oluşumuna dayalı spektrofotometri yöntemi ile oral premalign ve malign hastalarda tükürük çinko seviyesinin belirlenmesi" başlıklı Doktora öğrenciniz Elmas POLATDEMİR ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Doç. Dr. Meltem ÇETİN
Etik Alt Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ: 11.11.2015
TOPLANTI SAYISI: 7

Karar-11-Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'nun Danışmanı olduğu Doktora Öğrencisi Elmas POLATDEMİR'in Fakültemiz Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma ve Tıp Fakültesi Patoloji Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Zinpir-1 ligandı ile fonksiyonlaştırılmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2\text{NH}_2$ nanokompozit oluşumuna dayalı spektrofotometri yöntemi ile oral premalign ve malign hastalarda tükürük çinko seviyesinin belirlenmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 10.11.2015 tarih ve 755 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne (Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU oylamaya katılmadı) karar verildi.

EK-4. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU		

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUMAK İÇİN ZAMAN AYIRINIZ

Sizi Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU tarafından yürütülen “Ağız kanseri olan veya ağız kanseri riski taşıyan hastaların tükürük ve kan çinko miktarında meydana gelebilecek değişikliklerin yeni, hızlı ve ekonomik yöntemler ile belirlenmesi ve geliştirilen yöntemlerin bu hastalıklarda bir biyobelirteç olarak kullanılması” amacı olan **araştırmaya** davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz.

Bu çalışmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahipsiniz. **Çalışmayı yanıtlayanız, araştırmaya katılım için onam verdiğiniz** biçiminde yorumlanacaktır. Size verilen **formlardaki** soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler: (Hastanın anlayabileceği bir dilde olmalıdır)

- Araştırmanın Amacı: Ağız kanseri olan veya ağız kanseri riski taşıyan hastaların tükürük ve kanda çinko miktarında meydana gelebilecek değişikliklerin yeni, hızlı ve ekonomik yöntemler ile belirlenmesi ve geliştirilen yöntemlerin bu hastalıklarda bir biyobelirteç olarak kullanılması amaçlanmaktadır.
- Araştırmanın İçeriği: Biyopsi sonucuna göre ağız kanseri olduğu veya ağız kanseri riski taşıdığı belirlenen hastalardan alınan tükürük ve kanda çinko miktarının belirlenmesi için sağlıklı kişilerden alınan tükürük ve kandaki çinko miktarı ile karşılaştırılması ve elde edilen sonuçlara göre geliştirilen bu yöntemlerin ağız kanseri hastalığında bir biyobelirteç olarak kullanılması gerçekleştirilecektir.
- Araştırmanın Nedeni: ☐ Bilimsel araştırma ☐ Tez çalışması
- Araştırmanın Öngörülen Süresi: 2 yıl
- Araştırmanın Yapılacağı Yer(ler): Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD ve Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AD

2. Çalışmaya Katılım Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce katılımcıya/gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve katılmam istenen çalışmanın kapsamını ve amacını, gönüllü olarak üzerime düşen sorumlulukları tamamen anladım. **Çalışma hakkında yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı, soru sorma ve tartışma imkanı buldum ve tatmin edici yanıtlar aldım. Bana, çalışmanın muhtemel riskleri ve faydaları sözlü olarak da anlatıldı.** Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmadan bırakabileceğimi ve bıraktığım takdirde herhangi bir olumsuzluk ile karşılaşmayacağımı anladım.

Bu koşullarda söz konusu araştırmaya kendi isteğimle, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcının (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:.....

İmzası:

(Varsa) Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin:

Veli veya Vasisinin (kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:.....
İmzası:

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı

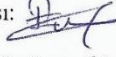
Adı-Soyadı:.....
İmzası:

Araştırmacının

Adı-Soyadı: Elmas POLATDEMİR

Cep Tlf: 0544 446 3645

İmzası:



Not: Bu form, iki nüsha halinde düzenlenir. Bu nüshalardan biri imza karşılığında gönüllü kişiye verilir, diğeri araştırmacı tarafından saklanır.