



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RAMAN CİMBIZLAMA SPEKTROMETRESİ
KULLANARAK TEKİL BİYOLOJİK HÜCRELERDEKİ
FARKLILIKLARIN ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ
YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

Uğur PARLATAN

Fizik Anabilim Dalı

Atom ve Molekül Fiziği Programı

1. Danışman

Prof . Dr. Gönül Başar

2. Danışman

Doç. Dr. Günay Başar

Haziran, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RAMAN CİMBIZLAMA SPEKTROMETRESİ
KULLANARAK TEKİL BİYOLOJİK HÜCRELERDEKİ
FARKLILIKLARIN ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ
YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

Uğur PARLATAN

Fizik Anabilim Dalı

Atom ve Molekül Fiziği Programı

1. Danışman

Prof . Dr. Gönül Başar

2. Danışman

Doç. Dr. Günay Başar

İSTANBUL

Bu alışma 18/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı Atom ve Molekül Fiziğı programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Gönül Başar (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşen Özel
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Yasemin Akkaya
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Gülay Acar
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Elif Akalın
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 4330 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimimin başından sonuna kadar tüm iniş ve çıkışlarımda bana yardımcı olan, tez çalışması aşamasında desteklerini her an hissettiren Prof. Dr. Gönül Başar ve Doç. Dr. Günay Başar'a teşekkür ederim.

Örnek alımları konusunda bize birimlerinin kapısını açan İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Hastalıkları ve Doğum anabilim dalından İbrahim Kalilioğlu ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum anabilim dalından Doç. Dr. Ali Benian'a, Solmaz Hemşire'ye, örneklerimizin saklanması konusunda bize yardımcı olan İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Levent Üge'ye teşekkür ederim.

Çok değişkenli analiz yöntemlerinin öğrenilmesi aşamasında bana teorik yardımcı olan Marmara Üniversitesi İstatistik Bölümü başkan vekili Prof. Dr. Müjgan Tez'e, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü öğretim görevlisi Doç. Dr. Zehra Çataltepe'ye teşekkür ederim.

Yaptığı çalışmaları benimle paylaşan ve fikirleriyle bana her ihtiyacım olduğunda soluk aldırان Şeyma Şeninak'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yaptığım çalışmalara her zaman inanan annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Haziran, 2010

Uğur PARLATAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	VI
SEMBOL LİSTESİ	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. PREEKLAMPSİ	3
2.2. OKSİDATİF STRES İŞARETÇİLERİ.....	3
2.2.1. NİTRİK OKSİT (NO)	4
2.2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU	5
2.2.3. PROTEİN OKSİDASYONU	5
2.3. SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLER.....	6
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	7
3.1.RAMAN SPEKTROSKOPİSİ	7
3.1.2. RAMAN SPEKTROSKOPİSİNİN BİYOLOJİK UYGULAMALARI	11

3.2. OPTİK TUZAKLAMA	12
3.3.1. OPTİK TUZAKLAMA ile YAPILAN BİYOLOJİK UYGULAMALAR.....	16
3.3 DENEYSEL DÜZENEK	16
3.4. ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ METOTLARI.....	21
3.4.1. TEMEL BİLEŞENLER ANALİZİ (PCA).....	21
3.4.2. ÖZDEĞER ÖZVEKTÖR ÇÖZÜMÜ	22
3.4.3. TEKİL DEĞER AYRIŞTIRMASI – (SVD).....	23
3.4.4. TEMEL BİLEŞENLER ANALİZİ İÇİN ÖNİŞLEM SÜRECİ.....	24
3.4.5. DOĞRUSAL AYIRMA ANALİZİ – LDA	31
4. BULGULAR.....	37
4.1. ELDE EDİLEN SPEKTRUMLARIN ÖNİŞLEMLERİ.....	39
4.2. İSTATİSTİK ANALİZ İŞLEMLERİ	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
EK	63
MATLAB’DA HAZIRLANAN ARAYÜZ İÇİN YAZILAN KOD SATIRLARI	63
Statistikus.m.....	63
sort_eig.m.....	71
PCA_mean.m	71
PCA_MSC.m	72
MSC.m	72
SNV.m.....	72
SVD.m.....	73
AxisCorr.m.....	73
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Rayleigh, Stokes, Anti-Stokes ve Rezonans Raman geçişleri	9
Şekil 3.2: Radyasyon basıncı etkilerinin gözlenmesi	14
Şekil 3.3: Optik tuzaklamada Işın Optik Rejiminde etkin kuvvetler.....	14
Şekil 3.4: Raman cıvırlama düzeneği.....	17
Şekil 3.5: Raman cıvırlama düzeneği: Şematik gösterim.....	17
Şekil 3.6: Laser çizgi fitlersinin 0° geliş açısı için geçirme karakteristiği.....	19
Şekil 3.7: Raman kenar fitlersinin 0° geliş açısı için geçirme karakteristiği.....	19
Şekil 3.8: Mikroskop düzeneği.....	20
Şekil 3.9: Örnek serum Raman spektrumu $780-980\text{ cm}^{-1}$ bölgesi.....	26
Şekil 3.10 : MSC uygulanmış veri takımına ait ortalama etrafında saçılma grafiği.....	26
Şekil 3.11: Şekil 3.4'teki örnek veri takımının MSC uygulandıktan sonraki serum Raman spektrumu, $780-980\text{ cm}^{-1}$ bölgesi.....	27
Şekil 3.12: MSC uygulandıktan sonra ortalama etrafında saçılma grafiği.....	27
Şekil 3.13: Normalizasyon sonrası MSC uygulandıktan sonra serum Raman spektrumu; $780-980\text{ cm}^{-1}$ bölgesi.....	28
Şekil 3.14: Şiddet normalizasyonu sonrası MSC ve ortalamaya göre düzeltme uygulanmış serum spektrumu($780-980\text{ cm}^{-1}$ arasında)	29
Şekil 3.15: SNV uygulanmış serum spektrumu ($780-980\text{ cm}^{-1}$ arasında).....	30
Şekil 3.16: Normalizasyon sonrası SNV uygulanmış serum spektrumu	30
Şekil 3.17: Rastgele deneme verileri için saçılma grafiği	32
Şekil 3.17: Deneme verisi grafiğinde sınıflar arası mesafeler	32
Şekil 3.18: Rastgele deneme verisine Fisher ayırma çizgisi uygulandıktan sonra görülen sınıflandırma.....	33
Şekil 3.19: Mahalanobis Uzaklığı kullanılarak elde edilen sınıf ayrımı grafiği	34
Şekil 3.20: Birden çok grup olması durumunda çizilen ayırım çizgileri	33
Şekil 4.1: Normal Raman düzeneği.....	35
Şekil 4.2: Raman Cıvırlama düzeneği.....	35

Şekil 4.3: Tüm ortalama ham serum örnekleri.....	38
Şekil 4.4 : Preeklampitik ve normal serum Raman spektrumları.....	38
Şekil 4.5 : Arka plan çıkarılmış preeklampitik ve kontrol serum spektrumları.....	38
Şekil 4.6: Normal kalibrasyon yöntemiyle kalibre edilmiş toluene spektrumları.....	39
Şekil 4.7: Geliştirilmiş kalibrasyon sonrası toluene spektrumları.....	40
Şekil 4.8: Manuel ve kontrollü kalibre edilen toluen spektrumları için PCA skorları....	41
Resim 4.9 : Manuel ve Kontrollü kalibre edilen toluene spektrumları için LDA skorları.....	46
Şekil 4.10 : Taban eğrisi çıkarılmış tüm serum örnekleri.....	47
Şekil 4.11 : Tüm taban çıkarılmış plazma örnekleri.....	47
Şekil 4.12 : Plazma ortalama spektrum karşılaştırması ve ortalama spektrumların farkı.....	48
Şekil 4.13 : Serum ortalama spektrum karşılaştırması ve ortalama spektrumların farkı.....	48
Şekil 4.14: Düzleştirilmiş ve ham Raman spektrumları	49
Şekil 4.15: Şekil 4.14'te verilen spektrumun 910-1020 cm^{-1} bölgesi.....	49
Şekil 4.16: 10 farklı konsantrasyonda sodyum asetat metanol karışımı.....	50
Şekil 4.17: Sodyum asetat ve metanole ait bantlar	51
Şekil 4.18: 490-1740 cm^{-1} bölgesinde sodyum asetat-metanol karışımı spektrumunun PCA analizi için skor grafiği.....	51
Şekil 4.19: Elde edilen sodyum asetat metanol karışımı spektrumları için ve en yüksek açıklama oranlı iki vektör.....	52
Şekil 4.20: Serum Raman spektrumları 380-1750 cm^{-1} bölgesi için PCA skorları.....	53
Şekil 4.21: Serum spektrumları için PCA skorları. Fisher ayırma çizgisi ile birlikte....	54
Şekil 4.22: Kontrol ve preeklampitik serum spektrumları LDA skorları	54
Şekil 4.23: Plazma spektrumları için PCA skor grafiği	55
Şekil 4.24: Plazma spektrumları için skor grafiği. Fisher karar çizgisi ile birlikte.....	55
Şekil 4.25: Plazma spektrumlarının Fisher ayırma fonksiyonu grafiği.....	56
Şekil 4.26: PCA-LDA analizi için hazırlana arayüzün ekran görüntüsü.....	57
Şekil 4.27: Plazma skorları için Matlab'da hesaplanan skor grafiği.....	57
Şekil 4.28: Plazma spektrumları için Matlab'da hesaplanan LDA skor grafiği	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Oksidasyona yatkın aminoasitler. (* Protein karbonil oluşumuna yol açanlar).....	5
Tablo 4.1: Manuel kalibrasyon sonrası toluen spektrumu dalga sayıları (cm ⁻¹).....	6
Tablo 5.1 : Preeklampitik ve sağlıklı serum spektrumlar için bant atamaları	60
Tablo 5.2 : Preeklampitik ve sağlıklı plazma spektrumlar için bant atamaları.....	62

SEMBOL LİSTESİ

E : Elektrik alan

$\langle \mu \rangle$: Kutuplanma

α : Kutuplanabilirlik

ν_m : Molekül titreşim frekansı

ν_0 : Rayleigh frekansı

t : Zaman

q : Normal titreşim mod katsayıları

I : Işık şiddeti

K : Şiddet sabiti

μ : İndüklenmiş dipol

$\hbar$: Planck sabiti

$E_{k(e)}$: k sanal seviyesi ile e seviyesi arasındaki geçişin enerjisi

T₂ : Titreşim geçişleri yarıömrü

P : Işıma momentumu

c : ışık hızı

F_{rad} : Işıma kuvveti

d : Dipoller için ayrılık vektörü

ÖZET

RAMAN CİMBIZLAMA SPEKTROMETRESİ KULLANARAK TEKİL BİYOLOJİK HÜCRELERDEKİ FARKLILIKLARIN ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Preeklampsi hastalığı gebelikte karşılaşılan, görülme sıklığı ırklara, sosyoekonomik sınıflara göre değişmekle birlikte, tüm gebeliklerin yaklaşık olarak %8-10'unda rastlanan sistemik bir hastalıktır. Hipertansiyon ve proteinüri ile tanımlanır. Hastalığın erken teşhisi hem anne hem bebek için hayati önem taşıdığından erken dönem biyoişaretçilerinin belirlenmesi ilgi konusudur.

Preeklampsi hastalığı bugüne kadar Raman spektroskopik olarak incelenmemiştir. Çalışmamızda, çalışılan preeklampsi biyoişaretçileri serum ve plazma örnekleri için Raman spektroskopisi ve tam kan örnekleri için Raman cimbizlama yöntemi ile incelenerek kontrol gruplarına göre bir farklılık sergileyip sergilemediği araştırılmıştır. Bu biyoişaretçilerden en belirgin olanları aromatik amino asitler, beta karoten ve yağ asitleridir.

Tez çalışması çerçevesinde, yukarıda sayılan biyoişaretçiler için iki sınıf arasında bir ayrım bulunmak istenmiştir. Alınan spektrumlar yüksek benzerliğe sahip olduğunda geleneksel yöntemlerle iki sınıf arasındaki ayrımı yapmak oldukça zordur. Bunun için kemometrik yöntemlere başvurulmuştur. Kemometrik yöntemlerden biri olan Temel Bileşenler Analizi (PCA) açıklayıcı grafikler elde etmek ve bir başka kemometrik yöntem olan LDA'ya (Doğrusal Ayırma Analizi) veri hazırlamak üzere kullanıldı. Kemometrik analizleri yapmak için Matlab platformunda bir arayüz hazırlandı.

SUMMARY

DETERMINATION OF DIFFERENCES IN SINGLE BIOLOGICAL CELLS BY MULTIVARIATE ANALYSIS USING RAMAN TWEEZERS SPECTROMETER

Preeclampsia is a pregnancy specific disorder whose frequency depends on races, socioeconomical classes but generally it is encountered about 8-10% of all pregnancies around the world. It is defined as hypertension and proteinuria. Early diagnosis of the disease is a focus point because of its mortality for both mother and infant

To date, preeclampsia disease has not been investigated by Raman spectroscopy. In our study, we studied preeclampsia biomarkers for serum and plasma samples using Raman spectroscopy and for red blood cells using Raman tweezers, all taken from preeclamptic and healthy pregnant. We investigated if there is a difference between preeclamptic and healthy samples. The most clear differences in biomarkers are aromatic amino acids, beta caroten and fatty acids.

In the view of thesis study, we wanted to make a classification between two classes by means of the biomarker mentioned above. When there is a big similarity between spectra, it is very difficult to make a classification between two classes. That is why we oriented chemometric methods. One of these chemometric methods is PCA (Principal Component Analysis) which was used to obtain descriptive results by means of scores plots and to make input for another chemometric method, LDA (Linear Discriminant Analysis). A software interface was programmed on Matlab platform in order to make chemometric analysis mentioned above.

1. GİRİŞ

Preeklampsia hastalığı gebelikte karşılaşılan, görülme sıklığı ırklara, sosyoekonomik sınıflara göre değişmekle birlikte, tüm gebeliklerin yaklaşık olarak %8-10'unda rastlanan sistemik bir hastalıktır. Bu hastalık günümüzdeki tıbbi imkanlarla üçüncü trimesterde, yani tüm hastalık belirtileri belirginleşmeden teşhis edilemiyor. Hastalık bu aşamadan sonra doğumu sonlandırılarak tedavi edildiğinden, erken teşhisi hem anne hem bebek için hayati önem taşır.

Çalışmamızda, 90'lı yıllardan bu yana artan bir ilgiyle çalışılan preeklampsia biyoişaretçileri serum ve plazma örnekleri için Raman spektroskopisi ve tam kan örnekleri için Raman cımbızlama yöntemi ile incelenerek kontrol gruplarına göre bir farklılık sergileyip sergilemediği araştırılmıştır. Bu biyoişaretçilerden en belirgin olanları aromatik amino asitler, beta karoten ve yağ asitleridir.

Aromatik amino asit bölgesinde özellikle tirozin ve histidin moleküllerine ait bantlarda NMR spektroskopisiyle yapılan çalışmalarda preeklampsiaye özgü değişimler görülmüştür. Endotel yapının oksidatif stresle bozulması ile gerçekleşen preeklampsia hastalığında, bu amino asitlerin oksidatif stres için işaretçi olabilecekleri belirtilmiştir.

Oksidatif stres, metabolizmada oksidanların oluşturacağı hücre veya doku hasarını engelleyecek yeterli antioksidan bulunmamasından kaynaklanan bir dengesizlik durumudur. Preeklampsia hastalığında bu antioksidanların konsantrasyonlarının düşmesi beklenir. Bunlardan Raman spektrumunda en belirgin olarak gözlenenlerinden biri de beta karotendir.

Oksidatif stres lipid peroksidasyonu ya da protein oksidasyonu şeklinde gerçekleşebilir. Lipid peroksidasyonu gözlemlendiği durumda kan serumunda ve plazmasındaki yağ asidi (palmitik asit, oleik asit, linoleik asit) konsantrasyonlarının azalması beklenir. Bu değişimler de Raman spektroskopisi ile belirlenebilmektedir.

Normal Raman ölçümleri sağlıklı ve preeklampsia hastası gebelerden alınan serum ve plazma örneklerinin optik cam küvet içinde 30 saniye pozlama zamanı, 20 ardışık

ölçüm alınarak yapılmıştır. Kırmızı kan hücreleriyle yapılan deneyler ise Raman Cımbızlama düzeneğinde yapılmıştır. 6 preekleptik gebenin kanlarının aynı gün deneyler için hazırlanmasından sonra, her örnek için 5'er tane kan hücresi tuzaklanarak 20 pozlama zamanı ve 10 ardışık ölçüm ile spektrumları alındı.

Tez çalışması çerçevesinde, yukarıda sayılan preeklampsie özgü biyoişaretçiler için iki sınıf arasında bir ayırım aranmıştır. Alınan Raman spektrumları yüksek benzerliğe sahip olduğundan geleneksel yöntemlerle iki sınıf arasındaki ayırımı yapmak oldukça zordur. Bunun için kemometrik yöntemlere başvurulmuştur. Bunlardan Temel Bileşenler Analizi (PCA) spektroskopik veriler gibi çok yüksek boyutlu verileri en büyük değişimlerin olduğu, birbiriyle korelasyonsuz koordinatlara indirgeyerek boyut indirgemesi yapar. Sonuçta elde edilen skor grafikleri birbiriyle korelasyonsuz eksenleri vereceğinden gözlenen spektrumlar arasındaki farklar görülebilir. Çalışmamızda PCA skorlarını açıklayıcı grafikler elde etmek ve bir başka kemometrik yöntem olan LDA'ya (Doğrusal Ayırma Analizi) girdi yapmak üzere kullandık. LDA açıklayıcı sonuçlar elde eden PCA verilerini daha nicel bir şekilde ele alarak sınıflar arasındaki ayırımı ortaya koyar. Değişim beklenen biyoişaretçilerin olduğu bölgelerin verileri kullanarak daha belirgin ayırımlar görülmüştür.

Yapılan çalışmada Raman spektroskopisi ile ilgili bilgiler 3.1 bölümünde, optik cımbızlama ile ilgili bilgiler 3.2 bölümde verilecektir. Çok değişkenli analiz metodları ise 3.3 bölümünde anlatılacaktır. Deneylerde elde edilen sonuçlar dördüncü bölümde, bulgular kısmında verilecektir. Sonuçların yorumları tartışma ve sonuç bölümünde tartışılacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 PREEKLAMPSİ

Preeklampsi, hamilelikte yüksek tansiyon, proteinüri ile tanımlanan bir hastalıktır. Hipertansiyon, kan basıncı değerlerinin 140/90 mmHg üzerine çıktığı durumda; proteinüri ise 24 saatlik idrarda 300 mg'dan fazla idrar kaybı olduğu durumda tanımlanır. Bu belirtiler hastada ödem, uteroplental bölgede perfüzyon yetersizliği, fetal büyüme sorunları yaratabilir. Preeklampsi hastalığı gebeliklerin yaklaşık %8'ini etkileyen sistemik bir hastalıktır[1]. Siyah ırkta bu oranın bir miktar daha fazla olduğu belirlenmiştir[2]. Hastalık, ancak doğumun sonlandırılıp hasar görmüş plasentanın alınmasıyla tedavi edilebilmektedir. Bu özelliğiyle hem anne hem de bebek için ölümcül niteliği olan bir hastalıktır. Günümüzde hastalık teşhis ve tedavisinde geline nokta halen erken dönemde hastalığın tanısını koyacak belirteçler üzerinde bir anlaşma sağlanamamış ve hastalığa neden olan faktörlerin neler olduğu net olarak ortaya konamamıştır. Bu yüzden preeklampsi konusunda erken teşhis yapılabilmesini sağlayacak bir işaretçi bulunması çalışmaları 90'lı yılların ortalarından beri devam etmektedir[3].

Preeklampsi patofizyolojisi erken dönemde yanlış trofoblast saldırısı, oksidatif stres, plasental iskemi, plasental perfüzyonun azalması, anjiyojenik ve protrombik faktörlerde dengesizlik gibi etkenlerle ifade edilir. Tüm bu faktörler endotel yapının bozulmasında da kilit rol oynarlar[4]. Preeklampsi hastalığında ortaya çıkan biyokimyasal işaretçilerin belirlenmesinde bu etkenler göz önünde bulundurulur.

2.2 OKSİDATİF STRES İŞARETÇİLERİ

Besinlerin sindirim reaksiyonlarında serbest radikaller denilen son yörüngesinde çiftlenmemiş elektron bulunan oldukça reaktif moleküller açığa çıkar. Bu moleküller lipid, protein gibi organik moleküllere bağlandığında bu moleküllerin yapılarına zarar verirler. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu ($2O_2^-$),

hidroksil radikali (HO[•]), nitrik oksit (NO[•]), peroksil radikali (ROO[•]), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar.

Aerobik solunum yapan sistemlerde oksidatif ürünlerin zararlı etkilerini önlemek üzere antioksidan savunma mekanizması gelişmiştir. Fakat, hücresel ortamda bulunan antioksidan miktarı kimi zaman serbest radikallerin oluşturduğu zararlı etkilerin önüne geçemez. Bu durumda oksidatif stres ortaya çıkar.

Preeklampside oksidatif stres işaretçilerinin belirlenebilmesi için konsantrasyonu azalan oksidatif dengeyi sağlayıcı antioksidanlar takip edilir. Bu denge şu antioksidanlarla sağlanır: Hücre zarı içinde ve plazmada E vitamini; hücrelerarasında süperoksit dizmutaz ve katalaz oluşturucusu olarak glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir. Hücre dışındaki antioksidanlardan seruloplazmin, albumin, bilirubin, transferin, ürik asit biyoişaretçi olarak belirlenir[5, 6, 7].

Bunların dışında T ve B lenfositlerin, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir [8].

2.2.1 NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit, keşfedildiği ilk yıllardan beri endotel gevşetici faktör olarak bilinir. Dış yörüngesinde çitlenmemiş elektronu bulunmasıyla reaktif bir molekül olan NO, lipofilik olduğu için hücre zarından kolayca geçer [9].

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-argininden sentezlenir [10]. NO hamilelikte kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan önemli bir vazodilatördür. Ayrıca trombosit kümelenmesini, damar endotellerine lökosit tutunmasını, düz kasların prolife olmasını engeller [1]. Normal gebelerde NO

konsantrasyonu artarken, Preeklampsi hastalarında bu artışın daha az olduğu görülmüştür [11].

2.2.2 LİPİD PEROKSİDASYONU

Lipid peroksidasyonu, membran lipidleri üzerine olan olumsuz etkisi ile endotel disfonksiyonu, vasküler reaktivitede bozulma ve koagülasyon mekanizmasının aktivasyonu gibi preeklampsinin esas fizyopatolojik değişikliklerine neden olmaktadır [5]. Preeklampside artmış lipid peroksidasyon ürünlerinin esas kaynağının plasenta olduğu bilinmektedir [12].

Lipid peroksidasyonun en önemli belirteci olarak malon dialdehit(MDA) konsantrasyonunun artışı gösterilir. MDA, hücre zarının deformasyonuna, iyon geçişinin ve enzimatik fonksiyonların bozulmasına neden olur. Hücre zarlarından kolayca geçebileceği için hücre içindeki protein sentezini, enzimatik olayları ve DNA yapısını da olumsuz yönde etkilemektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir[13]. Yapılan çalışmalarda MDA konsantrasyonları ölçülerek metabolizmadaki lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarı hakkında bir ilişki bulunmuştur[14].

2.2.3 PROTEİN OKSİDASYONU

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent bağ yapması ile ortaya çıkar[E. Shacter, 200]. Oksijen molekülü aktive olup süperoksit radikal anyonu (O^{*-}_2), hidroksil radikali (*OH), nitrojen monoksit (NO^*) veya dioksit radikali (NO^{*}_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerini oluşturur. Bunlardan (*OH), peptid bağlarını yapabilme özelliği ile en reaktif olanlarıdır.

Protein oksidasyonu sonucunda, histidin, prolin, arginin gibi çok sayıda aminoasit ve proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil (PCO) ürünleri meydana gelir. Tablo 2.1' de oksidasyona yatkın aminoasitler ve oksidasyon ürünleri verilmistir [15]

Tablo 2.1: Oksidasyona yatkın aminoasitler. (* Protein karbonil oluşumuna yol açanlar)

Aminoasit	Oksidasyon Ürünleri
Sistein	Disüfitler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3- ve 4- hidroksifenilalanin
Tirozin	Tirozin – tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin*	2-oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Arginin*	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin*	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, -aminoadipik semialdehit
Glisin*	Amino valerik asit
Prolin*	2-Pirrolidon, 4- ve hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin*	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Lösin*	Lösin hidroperoksitleri ve hidroksitleri -ketoizokaproik asit
İzolösin	İzolösin hidroperoksitleri
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asit	Okzalik asit, pirüvik asit

2.3 SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLER

Preeklampsi hastalığında teşhis amaçlı olarak yapılan ilk spektroskopik çalışmalar elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi ile plazma örneklerindeki askorbat ve tiyol konsantrasyonların gözlenmesi idi[16]. Daha sonraki yıllarda yine plazma örneklerinin kütle spektroskopisi ile incelendiği bir çalışmada preeklampsiye neden olan biyoişaretçiler spektroskopik olarak ortaya kondu [17]. Preeklampsi konusunda kemometrik yöntemler yapılan çalışmalardan iki tanesi aromatik aminoasitlerden preeklampsi patogenezinde etkin olanları ortaya koyan NMR çalışmaları idi [18, 19]. Fakat bugüne kadar bu hastalığı ele alan Raman spektroskopik bir çalışma yapılmamıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

Raman olayı, 1928 yılında Sir C.V. Raman tarafından oldukça ilkel bir düzenele gözlemlendi. Bahsi geçen düzenele günümüzde bilinen Raman spektroskopisi düzenelelerinden farklı olarak Sir C.V. Raman, ışık kaynağı olarak Güneş ışığı, toplayıcı olarak teleskop, algılayıcı olarak da kendi gözlerini kullandı. Bu olayın günümüzdeki gibi kullanışlı ve yaygın hale gelmesi uyarıcı kaynakların gelişmesi sayesinde oldu. Önce civa lambaları ve daha sonra laserlerin düzenelelerde sıklıkla kullanılmaya başlaması yöntemin etkisinin daha iyi farkedilmesini sağladı [20].

Raman olayı klasik olarak molekülün üzerine gönderilen fotonların, o moleküldeki elektron bulutu ile etkileşmesi olarak açıklanabilir. Etkileşme elektrik alanın pertürbasyonu olarak tanımlanır. Işık molekülle etkileştiğinde bir dipol alanı indükler ve molekülü kutuplar.

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.1)$$

$$\phi = \alpha \cdot E = \alpha \cdot E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.2)$$

Denklem 3.1 ve 3.2’de E elektromanyetik alanı, ϕ kutuplanmayı, ν_0 moleküle gönderilen ışığın frekansını, α ise kutuplanabilirliği tesil ediyor. Titreşen bir dipol için q uzanımı da zamana bağlı olarak molekülün q_0 denge noktası etrafında ν_m frekansıyla sinüzoidal salınım yapacaktır.

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t) \quad (3.3)$$

Küçük titreşimler için kutuplanabilirlik katsayısı ifadesindeki ilk iki terimi almak yeterli olacaktır.

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad (3.4)$$

Bu bilgilerle molekülde indüklenen dipol momentinden kaynaklanan kutuplanabilirlik ifadesi aşağıdaki hale gelir:

$$\mathcal{P} = \alpha E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (3.5)$$

$$= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q E_0 \cos(2\pi \nu_0 t)$$

$$= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \cos(2\pi \nu_m t)$$

$$= \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 [E_0 \cos\{2\pi(\nu_0 - \nu_m)t\} \{2\pi(\nu_0 + \nu_m)t\}]$$

Yukarıdaki çıkarımda denklemin son satırı elde edilirken temel trigonometrik bağıntılar kullanıldı. Bu ifadede görülebileceği gibi, $h\nu$ enerjili bir kaynaktan çıkan ışık molekülle etkileştiğinde, üç farklı frekansta demet saçılabilir. Bunların çok büyük bir bölümü elastik saçılarak gelen demetle aynı enerjiye sahip Rayleigh saçılmalarını oluşturur. $(\nu_0 \pm \nu_m)$ frekanslı, gönderilen fotonların yaklaşık milyonda birini oluşturan fotonlardan sırasıyla düşük enerjili olanları Stokes, yüksek enerjili olanları Anti-Stokes çizgilerini

oluşturur. Denklem 3.5'te $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0$ terimi Raman aktifliği belirler. Eğer kutuplanabilirlik

uzanıma göre değişiyorsa molekülün Raman aktif olduğu anlaşılır.

Stokes çizgileri molekülün titreşimi ve kimyasal yapısı hakkında verdiği bilgi açısından Anti-Stokes çizgileri ile özdeşdir. Fakat Stokes çizgileri daha şiddetli pikler verdiği için normal Raman spektroskopisinde bu bölgede çalışılır. Stokes bölgesinde görülen titreşimlerin şiddetleri aşağıdaki şiddet bağıntısı ile verilir:

$$I = KI_i(\nu_0 - \nu_m)^4 \alpha^2 \quad (3.6)$$

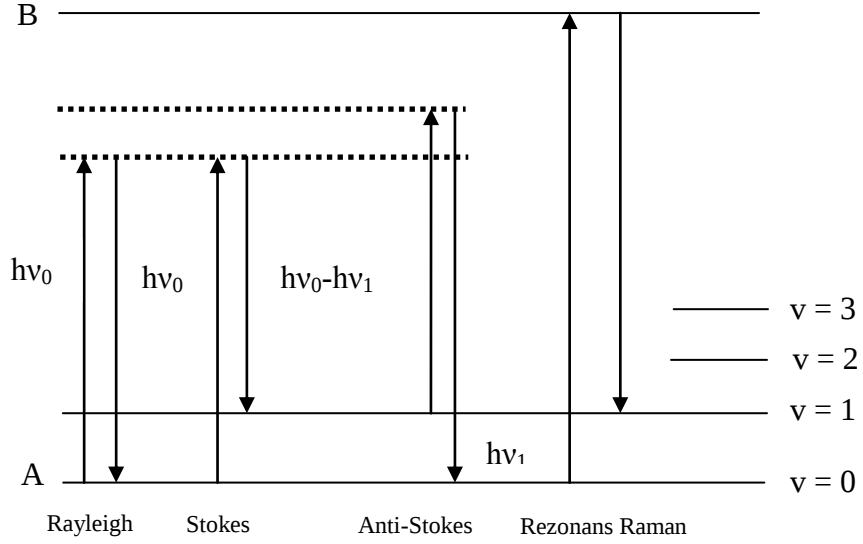
Burada K bir sabittir. Kutuplanabilirlik molekülün indüklendiği dipolden kaynaklandığı için, molekülün şekline ve büyüklüğüne bağlıdır. Molekülde bulunabilecek kalıcı dipollerden bağımsızdır. Bu durumda kutuplanabilirlik ifadesi pertürbasyon teorisi yardımıyla lineer kombinasyonlarına açılarak yazıldığından ortaya bir kutuplanabilirlik tensörü çıkar. Bu ifadede de kutuplanabilirlik terimi bu nedenden dolayı skaler olarak yazılamaz. Tensörün normu ifadesi yazılmalıdır.

Yarı klasik Raman teorisinde elektrik alan Hertziyen bir dipol gibi ele alınır. Fakat kutuplanabilirlik perturbasyon teorisi kullanılarak kuantum mekaniği yardımı ile çözülür. Bu durumda kutuplanabilirlik tensörünün normunu almak daha doğru bir yazım olacaktır.

$$I = KI_i(\nu_0 - \nu_m)^4 |\alpha^2| \quad (3.7)$$

Raman spektroskopisinde şiddetler frekansın dördüncü mertebesiyle artar. Fakat flüoresans sorunları nedeniyle yüksek frekansta çalışmayı zorlaştırabilir. Raman spektroskopinin klasik teorisi, Raman olayının temel kavramlarını açıklamak için yeterlidir. Fakat Stokes ve Anti-Stokes çizgilerinin farklı şiddetlerde gözlenmesinin nedenini açıklamak için kuantum mekaniksel teoriye ihtiyaç vardır.

Raman saçılmasının Kramers, Heisenberg, Dirac tarafından açıklanan kuantum teorisine göre titreşim enerji seviyeleri kuantumludur. Işık kaynağından çıkan bir foton molekülle etkileştiğinde inelastik saçılma yapar ve enerjisinin bir kısmını molekülün Raman aktif modlarından birine aktarır. Saçılan fotonun frekansı gönderilen fotondan titreşim frekansı kadar düşüktür. Molekül elektronik seviyeden daha düşük enerjili bir sanal duruma uyarılır ve burada taban veya uyarılmış durumlardan birine dönerler. Eğer molekül fotonla etkileştiğinde taban durumunda ise molekülün yaptığı saçılma Stokes saçılmasıdır ve molekül uyarılmış bir seviyeye geri döner. Eğer molekül fotonla etkileştiğinde uyarılmış durumda ise molekülün yaptığı saçılma Anti-Stokes saçılmasıdır ve taban seviyesine geri döner.



Şekil 3.1 : Rayleigh, Stokes, Anti-Stokes ve Rezonans Raman geçişleri

Stokes ve Anti-Stokes geçişleri 10^{-14} s ya da daha kısa süreler içinde olur. Stokes saçılmasında $h(\nu_0 - \nu_m)$ enerjisi ile taban seviyesinden başlayarak titreşimler gözlemlendiği için Anti-Stokes saçılmalarına göre daha şiddetli spektrumlar gözlenir. Bunun sebebi Boltzmann dağılımına göre, oda sıcaklığına üst enerji seviyelerindeki nüfusun, taban seviyesine göre oldukça düşük olmasıdır. Bu bilgi, Stokes şiddetleri Anti-Stokes şiddetlerine oranlanması yönteminde ortam sıcaklığının bulunması çalışmalarında kullanılmaktadır. Şekil 3.1 de görülen rezonans Raman geçişleri ise uyarma frekansının molekülün bir absorpsiyon frekansı ile çakışması durumunda gerçekleşir. Bu durumda hem Stokes hem de Anti-Stokes çizgilerinin büyük oranda şiddeti artar.

Kramers-Heisenberg-Dirac teorisi Raman spektroskopik geçişlerini dispersiyon bağıntısına göre açıklar. Teoriye göre şekil 3.1'deki gibi A ve B titreşim enerji seviyeleri arasında geçiş yapan bir molekül bu geçişini yaparken önce anlık olarak k gibi bir sanal seviyeye uyarılır. Burada yarı ömür her molekül için neredeyse özdeştir. Seviyeler arası geçiş için zamana bağlı pertürbasyon teorisinden yararlanıldığında taban seviyelerinden üst titreşim seviyelerine geçiş olasılıkları α kutuplanabilirlik tensörü ile tanımlanır.

$$\alpha_{ba} \approx (\mu_{gs} \cdot E_a)(\mu_{eg} \cdot E_s) \sum_k \frac{\langle X_{b(g)} | X_{k(s)} \rangle \langle X_{k(s)} | X_{a(g)} \rangle}{(E_{k(s)} - E_{a(g)} - h\nu_s)^2 + \left(\frac{\hbar}{T_2}\right)^2} \quad (3.8)$$

$$\alpha_{ba} = |\mu_{ge}|^2 \cdot [(E_{k(e)} - E_{a(g)} - h\nu_e)] \cdot \left[\frac{(\langle X_{b(g)} | X_{k(e)} \rangle \langle X_{k(e)} | X_{a(g)} \rangle)}{(E_{k(e)} - E_{a(g)} - h\nu_e)^2 + \left(\frac{\hbar}{T_2}\right)^2} + \right. \\ \left. i \left(\frac{\hbar}{T}\right) \left[\frac{(\langle X_{b(g)} | X_{k(e)} \rangle \langle X_{k(e)} | X_{a(g)} \rangle)}{(E_{k(e)} - E_{a(g)} - h\nu_e)^2 + \left(\frac{\hbar}{T_2}\right)^2} \right] \right] \quad (3.9)$$

Denklem 3.9, 3.8 denkleminin sanal kısmının ayrılarak yeniden yazılması ile elde edilmiştir. Denklemlerde μ indüklenmiş dipolü, E_k ve E_a k ve a seviyelerinin enerjisini, T_2 de seviyeler arasındaki geçiş için zaman sabitini sembolize eder. $\langle X_{bg} | X_{ke} \rangle$ ve $\langle X_{ke} | X_{ag} \rangle$ üst üste binme integrallerini ifade eder. 3.8 ve 3.9 incelendiğinde kutuplanabilirliğin yalnızca Raman saçılmalarını temsil ettiğini, Rayleigh saçılmalarını temsil etmediği görülür. Bu ifadede yalnızca bir titreşim enerji seviyesi göz önünde bulunduruluyor. Genelleştirilmiş durum için üst üste binme integrallerinin termal olarak ağırlıklandırılması gerekir.

3.1.2 RAMAN SPEKTROSKOPİSİNİN BİYOLOJİK UYGULAMALARI

Raman spektroskopisinde gözlenen frekanslar uyarma dalga boyundan bağımsızdır. Kullanılacak kaynak uygulamaya bağlı olarak seçilir. Biyofizik uygulamalarda genellikle yakın kızılötesi(NIR) bölgesinde uyarma kaynakları seçilir. Bunun en önemli avantajları canlı hücreye fotohasar vermemesi ve daha az floresans oluşturmastır. Canlı hücreler büyük oranda sudan oluşur. Raman spektroskopisinin absorpsiyondan etkilenmemesi bu tür örneklerin incelenmesi için uygun bir yöntem olmasını sağlar.

Raman spektroskopisinin erken zamanlarında biyolojik moleküllerin sıcaklık, pH, iyonik bağ, enzimler, virüsler, ilaçlarla etkileşimi gibi bilgilerine bu yöntemle ulaşılabilirdi. 1970'li yıllardan itibaren enstrümantasyonun gelişmesi ile birlikte daha şiddetli bantlar görülmeye başlandı. Bunun üzerine bu tarihlerde aminoasitlerle ilgili çalışmalar yapıldı. Amid fonksiyonel grubunun 1, 2, 3 modlarının frekanslarının tayin edilmesi proteinlerin ikincil yapısının anlaşılmasında yardımcı oldu. Bu on yılın sonuna kadar tüm temel aminoasitlerin Raman spektrumları ölçüldü. Yine 70'li yıllarda biyolojik hücre zarlarının yapısı DMPC (dipalmitoyl phosphatidylcholine) spektrumu

incelenerek ortaya kondu[21]. 1990-2000 yılları arasında bakteri, maya gibi tek hücreli canlıların Raman spektrumları elde edilerek mitoz bölünme, solunum, oksidatif stres gibi hücresel mekanizmaların anlık işleyişleri gösterildi [22][23]. T hücreleri, lenfositler yine bu yöntemle ele alınarak aktivasyonları incelenmiştir[24]. Kan hücrelerinde hemoglobindeki ligand bağlarının oksijenle bağ yapabilme durumlarına göre gösterdiği değişimler ayrı bir çalışmada incelenmiştir[25].

Raman spektroskopisi ile hastalık teşhisi yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. 2000’li yılların başlarına kadar bu çalışmalar, bant bileşen analizi yapılarak biyokimyasal farklılıkların aranması temeline dayanıyordu[26]. Kemometrik tekniklerin fizik ve kimyada uygulamalarının artması ile Raman spektroskopisi kullanılarak hastalık teşhisi çalışmalarında daha keskin sonuçlar elde edilmeye başlandı. Bu alanda en yoğun çalışmalar kanserli hücrelerin teşhisi yönünde olmuştur. Temel bileşenler ve ayırma analizi yöntemleri kullanılarak hastalıklı ve sağlıklı gruplar arasında oldukça hassas ayrımlar sağlanabilmiştir [27].

3.2 OPTİK TUZAKLAMA

Optik tuzaklama, mikron boyutlu parçacıkların sıkı odaklanmış laser ışığı yardımıyla tutulabildiği ve istenilen yöne hareket ettirilebildiği bir yöntemdir. Bu teknikle parçacık bulunduğu ortamda tek başına yalıtılarak düşük laser güçleriyle hiçbir fotohasar vermeksizin uzun süreler boyunca gözlenebilir. Bu, özellikle canlı hücrelerle yapılan çalışmalar için önemli bir ilham kaynağı olmuştur.

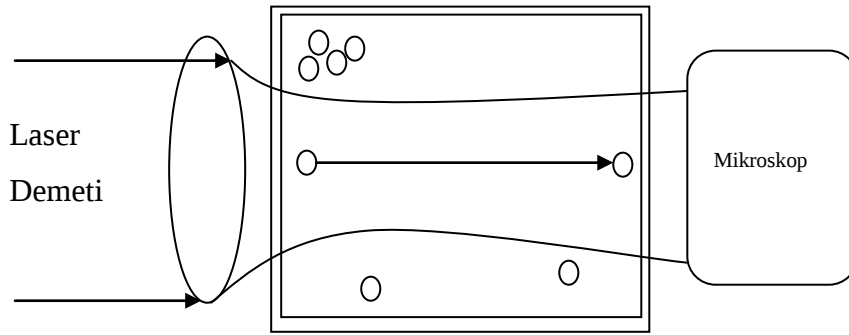
Optik tuzaklama ile yapılan ilk çalışmalar radyasyon basıncının parçacıklar üzerine etkisini test etmektir. Ashkin ve arkadaşları yaptıkları hesaplarda mükemmel yansıtıcı bir parçacığa 1W lık bir laser demeti gönderildiğinde 10^{-3} Dyne’lık bir kuvvet elde edeceklerini hesapladılar. Bu ilk bakışta küçük bir kuvvet gibi gözükebilir. Fakat mikron boyutlu bir parçacığa kazandıracağı ivme 10^6 g mertebesinde dir.

$$P = \frac{hv}{c} \quad (3.10)$$

$$F_{\text{rad}} = \frac{P}{hv} \cdot \frac{2hv}{c} = \frac{2P}{c} \quad (3.11)$$

Yukarıdaki denklemlerde P parçacığın momentumu, F_{rad} ışınma kuvvetini ifade eder. Eğer pratikte bir parçacığın %10'luk bir yansıtıcılığının olduğu varsayılırsa parçacığın ivmesi 10^5 değerine düşecektir ki bu değer hala büyüktür. Bu bilgilerle teorik olarak radyasyon basıncıyla bir parçacığa dinamik bir etki ettirilebileceği anlaşıldı.

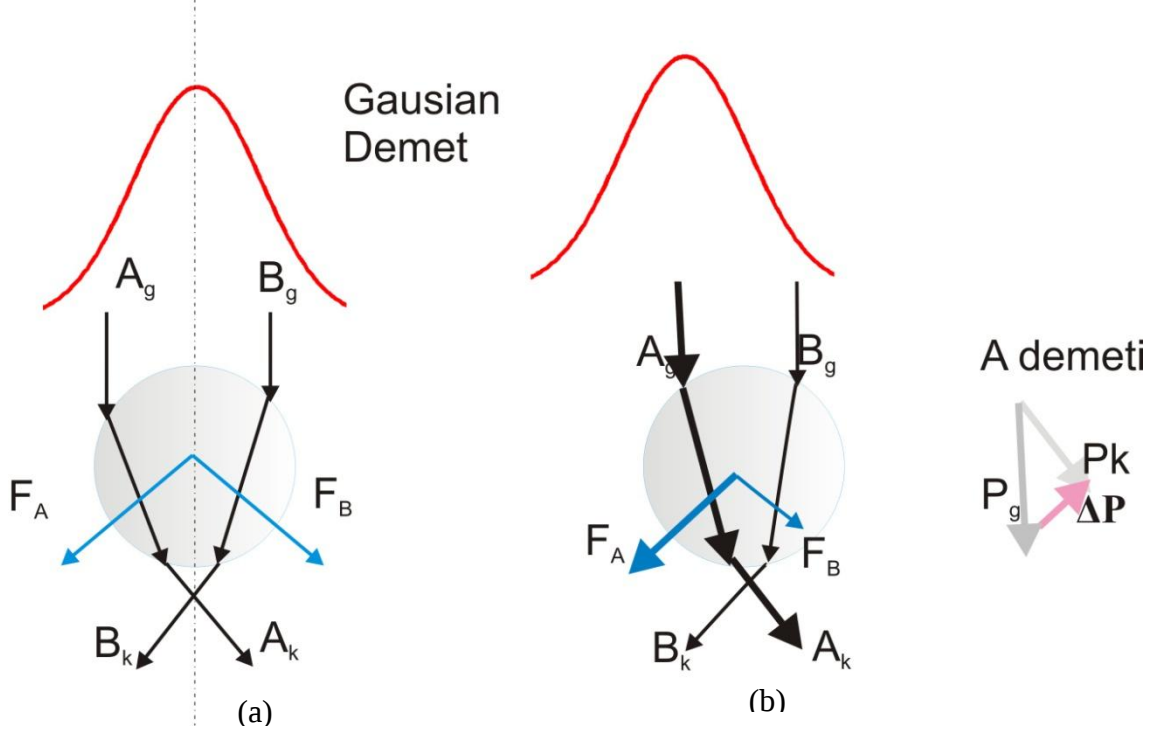
Radyasyon basıncının ilk gözlenişi, 200-300 mW sürekli (CW) laser kullanılarak 2.5 ve 10 μm boyutlarında polisitiren lateks kürecikler üzerinde yapılan deneylerde gösterildi. Bu deneylerde Şekil 3.2'de bir hücre içinde eksen üzereinde bulunan bir küreciğe odaklanan laser ışığının radyasyon basıncı etkisiyle küreciğin hücrenin diğer ucuna kadar hızlı bir şekilde ilerlediği; laser odağı değiştirildiğinde ise ışığı takip ettiği, yani ışıkla kılavuzlandığı görüldü.



Şekil 3.2 Radyasyon basıncı etkilerinin gözlenmesi

Parçacığa etki eden tek kuvvetin radyasyon basıncı olup olmadığını denemek üzere kürecik Şekil 3.3-b'de olduğu gibi eksen dışına yerleştirildi. Ayrıca tartışmaya devam ederken odaklanma durumlarını incelemek üzere ortamın kırılma indisinin küreciklerin kırılma indisinden küçük olduğu durumu göz önünde bulunduruluyor. Gaussian bir ışık kaynağından bir küreciğe eksenel doğrultuda ve eksen dışında gelen demetlerin

oluşturacağı kuvvetlerin nasıl tuzak oluşturacağı Şekil 3.3'te verilmiştir. Küreciğin çapı kaynak ışığın dalga boyundan daha büyük olduğu için ışın optik yaklaşımı kullanılacaktır.



Şekil 3.3 Optik tuzaklamada Işın Optik Rejiminde etkin kuvvetler

Şekil 3.a'da parçacık demet ekseninde bulunuyor. Bu durumda küreciğe gelen demet çiftlerinin uyguladığı kuvvetler simetrik olarak birbirine eşit olacaktır. F_A ve F_B kuvvetlerinin bileşkesi kuvvetlerin birbirine eşit olduğu durumda F_{scat} 'ı verir ve bu eksenel doğrultudadır.

Kürecik eksen dışında olduğunda (Şekil 3.3.b) ve demetin kenarı küreciğe çarptığında $F_a > F_b$ olacaktır. Şeklin en sağında görülen vektörel toplamda A demetinin momentumundaki değişim gösterilmiştir. A kuvveti bu vektörün zıt doğrultusundadır. Bu durumda parçacığı eksene çeken kuvvet F_a ve F_b 'nin bileşkesi olan bir kuvvet olacaktır ve bu sadece eksenel doğrultuda değildir. Öyleyse küreciği tuzakta tutan radyasyon basıncından başka bir kuvvet vardır. Şiddet gradyenti doğrultusunda olan bu kuvvet F_{grad} olarak adlandırılır ve F_{scat} 'a dik doğrultudadır.

Gözlenen parçacığın kırılma indisinin ortamın kırılma indisinden küçük olduğu durum incelendiğinde parçacıktan kırılan demetlerin Şekil 3.3'teki durumun tersine odaktan uzaklaşarak parçacığı tuzaktan itecek bir bileşke kuvvet oluşturmaktadır.

Gözlenen parçacığın çapı ışık kaynağının dalgaboyundan küçük olduğunda parçacık elektromanyetik alanda dipol gibi davranır. Bu durumda parçacık üzerine etki eden kuvveti açıklamak için elektrik dipol yaklaşıklığı kullanılır.

$$F_{dip} = \mathbf{d} \cdot \nabla E$$

(3.12)

$$F_{dip} = -\frac{1}{2} \alpha \nabla E^2 \quad (3.13)$$

$$\alpha = \alpha_0 \cdot \frac{\nu - \nu_0}{(\nu - \nu_0)^2 + \gamma_n^2/4} \quad (3.14)$$

Parçacık üzerinde indüklenen dipolden dolayı oluşan kutuplanma dolayısıyla bir elektrik alan oluşur. Bu elektrik alanın parçacık üzerine uyguladığı kuvvet 3.13 kuvveti ile verilir. Elektromanyetik dalga'nın frekansı ν , rezonans frekansı ν_0 olmak üzere $\nu < \nu_0$ ise $\alpha > 0$ olur ve parçacık en yüksek şiddet bölgesine odaklanır. $\nu > \nu_0$ olduğunda parçacık tuzaktan itilir. Bu temel bilgiler kullanılarak 1970 yılında nötral atomlar için tuzaklama deneyleri yapılmıştır.

İyi bir tuzaklama yapabilmek için birkaç şartın bir araya gelmesi gerekir. Laser gücü yeterince yüksek olmalıdır. Yüksek sayısal açıklıklı bir mikroskop kullanılmalı, mikroskop objektifinin arka açıklığının kaynak ışığıyla tam doldurulması gereklidir. Optik tuzaklamanın gerçekleşmesi için ortam kırılma indisinin parçacık kırılma indisinden büyük olması gerekir.

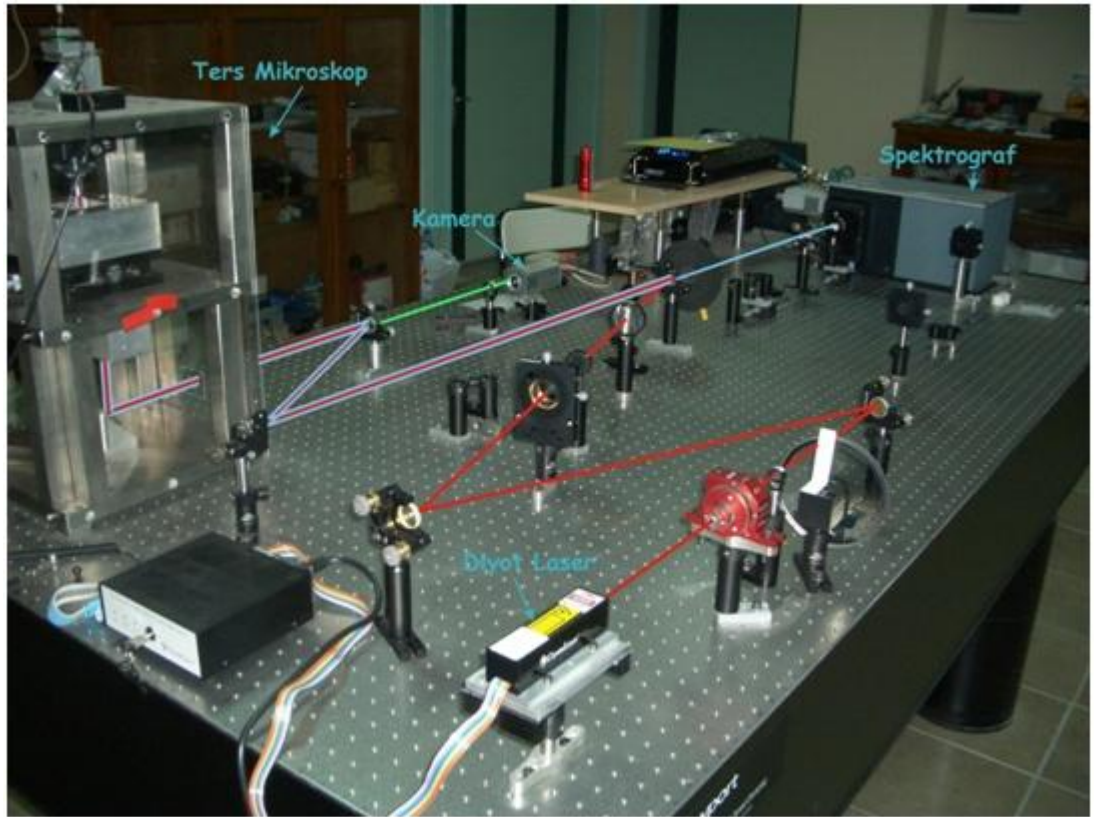
3.3.1 OPTİK TUZAKLAMA İLE YAPILAN BİYOLOJİK UYGULAMALAR

Biyolojik parçacıklarla yapılan ilk optik tuzaklama deneyleri Ashkin ve arkadaşları tarafından tütün mozaik virüsünün tuzaklanması ile yapılmıştır[A. Ashkin,1987]. Çubuk şekilli ve protein yapılı bu tek hücreli kolayca tuzaklanabilen bir yapıya sahiptir. Fotohasarsız bir şekilde tuzaklama yapıldıktan sonra bu virüslerle farklı tuzak uygulamaları yapılmıştır. Çoklu virüsler bir arada tuzaklanarak aralarındaki mesafe sabit tutulmak şartı ile sabit dizi tuzaklaması yapılmıştır. İlerleyen yıllarda E.coli bakterileri ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan birinde bakteriler lamel yüzeyine yapıştırılarak bakterinin cama yapışabilirlik durumunun bakterinin hangi özelliklerine bağlı olduğu gözlenmiştir [28] Bir diğer çalışmada kan hücrelerinin virüslere yapışabilirliği gözlenmiştir [29]. Lamel yüzeyine yapıştırılan sinir hücrelerinin gözlemlendiği başka bir çalışmada, bu süre boyunca sinir hücrelerinin gelişimi incelenmiştir. Optik tuzaklama deneylerinde yakın zamanlarda en çok ilgi gören çalışmalar motor moleküllerin özelliklerini görselleyen çalışmalardır. Kinesin, miyosin gibi motor moleküller mikrotübüller üzerinde yaklaşık 10nm’lik adım aralıklarıyla ilerlerler. Bu hareketler optik cımbızlama yardımıyla gösterildi [30]. Bunların dışında DNA, RNA gibi protein yapıda moleküller sabitleme yöntemi ile tuzaklanmış ve üzerlerine etkiyen kuvvetler ölçülmüştür[31].

3.3 DENEYSEL DÜZENEK

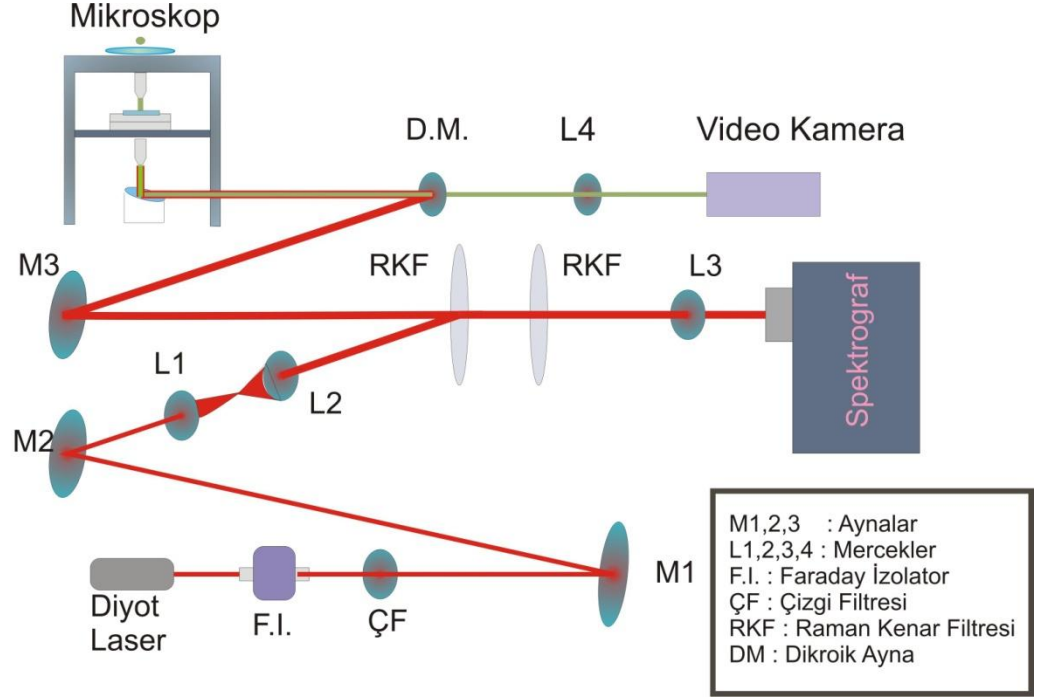
Deney düzenek Şekil 3.4’tek gibi bir optik masa üzerinde aşağıdaki bileşenlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur:

- Mikroskop
- Spektrograf ve soğutucu
- Diyot Laser
- Raman Kenar Filtresi
- Laser Çizgi Filtresi
- Teleskop düzeneği
- Düz aynalar ve dikroik ayna
- Faraday İzolatörü
- Video Kamera



Şekil 3.4 : Raman cımbızlama düzeneği

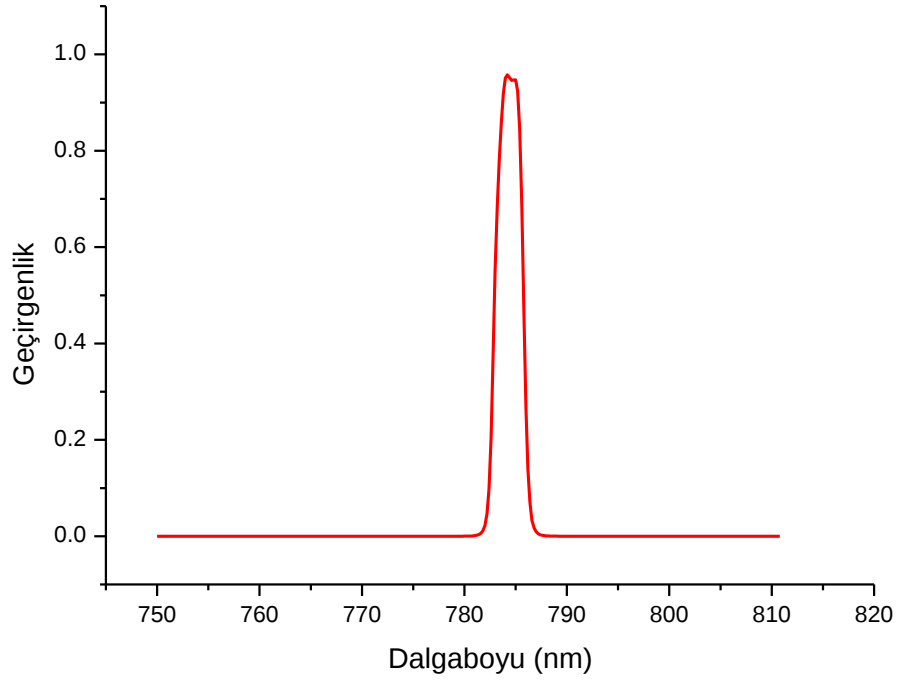
Laboratuvarımızda 785 nm 100 mW'lık CrystaLaser marka TEM₀₀ modunda çalışan diyot laser bulunmaktadır. Laser kaynağı soğutması 20 cm x 20 cm alüminyum plaka ile sağlanmıştır. Bu kaynaktan çıkan ışınların hemen önüne Faraday izolatorü yerleştirilerek istenmeyen geri yansıyan ve saçılan ışıkların diyot lasere ulaşması ve mod kayması oluşturması engellenmiştir.



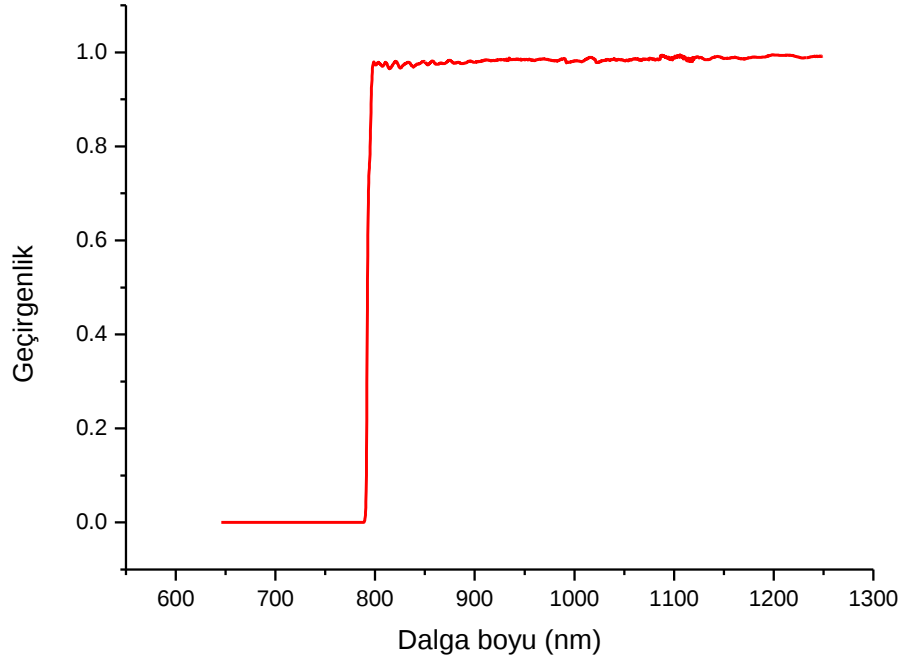
Şekil 3.5 : Raman cımbızlama düzeneği: Şematik gösterim

Faraday izolatörden sonra bir laser çizgi filtresi yerleştirilmiştir. Laser çizgi filtresi çok dar bir aralıkta ışık geçirgenliği sağlayan optik malzemedir(bandpass filter). Böylece laserin yan modlarından kaynaklanan bantları ve istenmeyen geri yansıyan ve saçılan ışıklar çok yüksek bir oranda engelleniyor.

Dielektrik düzlem aynalar yardımıyla paralelleştirilen, optik tuzaklama için gerekli olan objektif arka açıklığının doldurulması gerekliliğinin yerine getirilmesi amacıyla 2 mercekten oluşan teleskop sisteminden geçerek istenilen spot çapına ulaştırılıyor. Bu ışın Raman Kenar Filtresine yönlendirilerek dalga boyu seçimi yapılması sağlanır. Raman Kenar Filtresi, 785 nm 'den küçük her 10^6 fotondan birini geçirirken, 785 nm'den büyük ışınları %99 oranında geçirir. Dalga boyu 790 nm'den küçük ışınları %99 oranında yansıtırken, 790 nm'den büyük ışınları yaklaşık %0.0001 oranında geçirir. Böylece çok yüksek oranda Raman saçılma ışınlarının dışında bir ışının spektrografa girmesi engellenir.



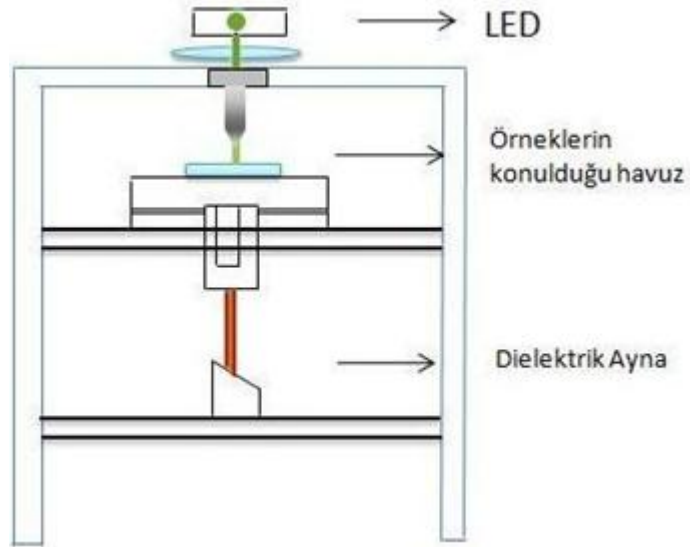
Şekil 3.6 : Laser Çizgi Filtresinin 0° geliş açısı için geçirme karakteristiği



Şekil 3.7 : Raman Kenar Filtresi 0° geliş açısı için geçirme karakteristiği

Filtrelenen ışınlar 303 mm odak uzaklıklı Andor iDus monokromatorünün slitine paralel bir şekilde girmesi sağlanıyor. Monokromatör, 3 adet 600, 1200 ve 1800 çizgi/mm kırınım ağına sahiptir. Bu tez çalışması boyunca yapılan tüm deneyler 600 çizgi/mm kırınım ağı ve 100 μm slit kullanılarak yapılmıştır.

Mikroskop düzeneği bir mekanik atölyede yaptırılmıştır. Düzenekte birbirine bağlı 3 çelik platform kullanılmıştır. Düzeneğin ilk katında platforma 45° lik açıda yerleştirilmiş 600-1000 nm dalgaboyu aralığında $\sim 99\%$ yansıtmaya sahip bir dielektrik ayna laser ışınını masa düzlemine dik olarak yukarı yansıtmaktadır. İkinci katta bulunan mikroskop objektif tutacı doğrusal kaydırıcı üzerine sabitlenmiştir. Diferansiyel mikrometreye sahip dikey kaydırıcı ters mikroskop objektifi (Newport, 60x, NA = 1.2) düşey ekseninde hareket ettirir. En üst kata lam camının ortası delinerek her iki tarafına lamel konularak hazırlanmış 1 mm derinliğindeki havuz x-y eksenlerinde kaydırılabilir düzlem üzerine yerleştirilmiştir. En üst katta bulunan yeşil LED ışık kaynağı ile örnek aydınlatılmıştır.



Şekil 3.8 : Mikroskop düzeneği

3.4. ÇOK DEĞİŞKENLİ ANALİZ METOTLARI

3.4.1 TEMEL BİLEŞENLER ANALİZİ (PCA)

Günümüze kadar yayınlanan eserler arasında PCA'nın ilk kullanımı konusunda çeşitli iddialar vardır. Muhtemelen ilk eserlerden en ünlüsü Pearson'un 1901 [32] yılında yayınladığı makaleydi. Fakat yaklaşımlar üzerine temel fikirler fizikçiler ve matematikçiler tarafından daha uzun zaman öncelerden beri biliniyordu. Hatta bazı matematik bölümlerinin müfredatında kimyasal problemleri çözmeye dayalı matris çözme yöntemleri gösteriliyordu. Fizikteki ilk makale Cauchy tarafından 1829 [33]. yılında yayınlanan makale idi.

Çok değişkenli analizde devrim niteliği taşıyan çalışma Hotelling'in 1930 ve 1940'larda yaptığı psikometrik çalışmalarda kullandığı yöntemi esas alır [39]. Psikometrik, önceden hazırlanmış psikolojik bir teste verilen cevapların sayısal karşılıklarının oluşturduğu matrisin analiz edilmesine dayanan bir bilim dalıdır. PCA yöntemi ile bu sayılardan oluşan matristeki psikolojik faktörlerin ortaya çıkarılması beklenir. İstatistiğin birçok alanında faktör analizi ve PCA aynı yöntemlermiş gibi kullanılabilir; fakat kimya ve fizikte bu yaklaşımların farklı anlamları vardır: PCA patternlere ulaşmak için verideki soyut fonksiyonları kullanırken, faktör analizi spektrumlar gibi fizik ve kimyayla doğrudan ilişkili verilerdeki bilgileri elde eder.

Son yirmi-otuz yılda doğa bilimcileri arasında bu yönetime olan ilgi oldukça arttı. Kimya alanında ilk önemli çalışma 1970 yılında yayınlandı[34].

Temel bileşenler analizine tabi tutulan bir veri takımının değişken sayısı 2'den fazla olmalıdır. Yani, veri takımı çok değişkenli olmalıdır. Örneğin, spektroskopik bir veri takımı, tek gözlemde birçok dalga sayısı içerir. Bu yüzden çok değişkenli olarak adlandırılır. Temel Bileşenler Analizi(PCA)'nin öncelikli amacı çok büyük boyutlu bu veri takımındaki boyut sayısını düşürmektir. Fakat temel bileşenler analizinin veri tarama (data exploration) özelliği ele alınırsa verebileceği bilgi çok daha fazladır. Temel bileşenler analizi veri takımının boyutunu indirgeyerek en belirgin özelliklere sahip bileşenlerini sunar ve bunlar karşılaştırıldığında açıklayıcı bir sonuç elde edilebilir. Spektroskopik bir veri takımı kaç bileşenden oluşuyor? Bir biyolojik örnekteki protein

konsantrasyonu nedir? Bu biyolojik örnekteki gözlenmek istenen bileşenin spektrumu nasıldır? Elbette bunun gibi nicel soruların cevabı için yalnızca PCA uygulanması yetmeyecektir. Fakat diğer uygulamalar için (Ayrırma Analizi, Kümeleme Analizi, vb...) girdi olması ve önemli tanımlayıcı bilgileri vermesi açısından PCA istatistik biliminin en önemli ve en sık kullanılan araçlarından biridir[35].

3.4.2 ÖZDEĞER - ÖZVEKTÖR ÇÖZÜMÜ

PCA yöntemi, başlangıçtaki veri takımını, bu veri takımının kolonlarının doğrusal kombinezonları şeklinde olan yeni bir veri takımına dönüştürür. Bu veri takımında eksenler birbirleriyle tamamen ilişkisiz ve ortonormaldir. Bu doğrusal model aşağıdaki gibi gösterilir:

$$\begin{pmatrix} \text{.....} & \mathbf{K} & \text{.....} \\ & \mathbf{M} & \mathbf{A} & \mathbf{M} \\ \text{.....} & \mathbf{L} & \text{.....} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} & & \mathbf{T} & & \\ & & & & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \text{.....} & \mathbf{K} & \text{.....} \\ & \mathbf{M} & \mathbf{V} & \mathbf{M} \\ \text{.....} & \mathbf{L} & \text{.....} \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

Burada anlaşılacağı gibi A vektörü başlangıç veri takımını temsil ediyor. Oluşturulan doğrusal modele göre yeni bulunacak değişkenlerle oluşturulan doğrusal kombinasyon, bir miktar hatayı ihmal ettiğimiz durumda, ilk baştaki veriyi bize verecektir. Burada hatadan kasıt deneysel hatalar değildir. Verileri doğrusallaştırırken yapılan fit işleminde ortaya çıkan hesaplama hatalarıdır. Bunların da dahil edildiği eksiksiz bir denklem aşağıdaki gibi yazılabilir

$$\mathbf{A} = \mathbf{T}\mathbf{V}' + \epsilon \quad (3.11)$$

Yukarıdaki denklemde T ve V büyüklükleri ise doğrusal modelin özdeğer-özvektör çözümü sonucu elde edilen yeni büyüklüklerdir: Skor ve Yük. T skor büyüklüğünün saçılma grafiği dağılımı boyutu indirgenmiş veri takımının sınıfsal dağılımı hakkında açıklayıcı bilgi verir. V yük vektörlerine aynı zamanda soyut faktörler, öz spektrum gibi değişik adlandırmalar da yapılır. Çünkü bu veri değişkenlere göre çizdirildiğinde aynı spektral özellikleri gösterir. Bu da bir spektruma ait özvektörleri kullanarak ona ait fiziksel özellikler hakkında yorum yapılabilineceğini gösterir. Skor veri takımının ilk

sütunu ile ilk özvektör birlikte ilk faktöre karşılık gelirler. İlk faktör orijinal verideki varyansın en büyük olabileceği kısım veriyi en küçük kareler anlamında açıklar. Faktörlerin sıralanışı toplam varyans açıklama oranlarına göre yapılır ve gereğinden fazla analiz uygulamamak için belirli sayıda faktör hesaplanır. Bu sayı yamaç eğrisi grafiğinin düzleştiği noktadaki faktör sayısından bulunur.

3.4.3 TEKİL DEĞER AYRIŞTIRMASI – (SVD)

SVD yöntemi, simetrik bir kovaryans matrisine ihtiyaç duyulmaksızın, doğrudan ham veri takımının tekil değerlerine ayrıştırılması yöntemiyle temel bileşenlere ulaşılmasını sağlar. Bu uygulamada, özdeğer yönteminin aksine standart bir ortalamaya göre düzeltme yapılmaz.

SVD yönteminde sütun uzayındaki bir vektör, satır uzayındaki başka bir vektörün doğrusal kombinasyonları cinsinden yazılır.

$$U = Av \quad (3.12)$$

Elde edilen bu U vektörü ortogonal ve ortonormal yapmak için bir Lagrange çarpanıyla çarpılır.

$$U\sigma = Av \quad (3.13)$$

Denklem genelleştirilirse,

$$U\Sigma = AV \quad (3.14)$$

A vektörü her iki taraf V^T ile çarpılarak yalnız bırakılırsa,

$$A = U\Sigma V^T \quad (3.15)$$

elde edilir.

$$\begin{pmatrix} \dots & \mathbf{K} & \dots \\ \mathbf{M} & \mathbf{A} & \mathbf{M} \\ \dots & \mathbf{L} & \dots \end{pmatrix}_{m \times n} = \begin{pmatrix} \dots & \mathbf{K} & \dots \\ \mathbf{M} & \mathbf{U} & \mathbf{M} \\ \dots & \mathbf{L} & \dots \end{pmatrix}_{m \times n} \begin{pmatrix} \Sigma \end{pmatrix}_{m \times m} \begin{pmatrix} \mathbf{M} \mathbf{K} & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} \mathbf{O} & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} \mathbf{V}^T & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} \mathbf{O} & \mathbf{M} \\ \mathbf{M} \dots & \mathbf{M} \end{pmatrix}_{n \times n} \quad (3.16)$$

Şekil 3.16'da görülen U ve V vektörleri sırasıyla sol ve sağ özvektörler olarak isimlendirilir. Σ ise köşegenleri özdeğerler olan matrisi temsil eder. Eğer örnek sayısı matris boyutundan küçükse kalan köşegen elemanları sıfır olur. Hesaplamalı uygulamalarda işlemci zamanını azaltmak için bu elemanların hesabını yapmayan ekonomi modunda çalışılabilir. Matlab[®] programlama dilinde aşağıdaki gibi basit bir komut verilere U, Σ , V matrisleri ve dolayısıyla temel bileşenler kolaylıkla elde edilebilir:

$$>> [\mathbf{U}, \mathbf{\Sigma}, \mathbf{V}] = \text{svd}(\mathbf{A});$$

3.4.4 TEMEL BİLEŞENLER İÇİN ÖNİŞLEM SÜRECİ

3.3.4.1 Ortalamaya Göre Düzeltme

Bir veri takımını ortalama göre düzeltmek, o veri takımının ortalama değerini kendisinden çıkarmak anlamına gelir. Matematiksel olarak bu işlem,

$$\bar{A}_{ij} = A - \sum_{i=1}^n A_{ij} \quad (3.17)$$

şeklinde ifade edilebilir.

Ortalamaya göre düzeltme işlemini yapılmasının sebebi verilerin ortalama etrafında ne kadar saçıldığının gösterilmesidir. Ticari PCA paketlerinin çoğunda ortalama göre düzeltme işlemi kullanıcı isteğinden bağımsız olarak uygulanmaktadır. Bu da skor grafiklerinin orijin etrafında dağılmasını sağlar. skor grafiklerinin orijin etrafında dağılması sınıf ayrımlarını açıklamak için iyi bir yöntemdir. Fakat, spektroskopik verilerde taban çizgisi problemi varsa, bu ortalama göre düzeltilmiş skor verilerini büyük ölçüde etkileyecektir [35].

3.4.4.2 Standardizasyon

Standardizasyon işlemi, bir veri takımındaki kolonların her biri ortalamaya göre düzeltilmesinin ardından standart sapmasına bölünerek yapılır.

$$A'_{ij} = \frac{A_{ij} - \bar{A}}{S_j} \quad (3.18)$$

Bu işlem istatistikte farklı birimlerde değişkenlerin incelendiği veri takımlarında değişkenleri birimsizleştirmek için kullanılır. Bunun dışında spektroskopik örneklerde olduğu gibi varyansın çok değişken olduğu veri takımlarında da kullanılması elverişlidir. Böylece veri takımı içinde varyans değeri baskın olarak gözüken bir örnek için standardizasyon uygulandığında, bu değer düşürülerek daha dengeli bir PCA sonucu elde edilebilir[37]. Standardizasyon, PCA paketlerinde ortalamaya göre düzeltme işlemi gibi varsayılan uygulama olarak çok yaygın bir şekilde yer almasa da, pratik uygulamalarda (spektroskopi, yüz tanıma, vb...) standart seçenek olarak sunulmaktadır. Fakat bu seçeneğin kullanılması için veri takımının muhakkak ortalamaya göre düzeltilmiş olması gerekir; çünkü programın yapacağı tek işlem bu veri takımını alıp her satırını standart sapmasına oranlamak olacaktır.

3.4.4.3 Çarpımsal Saçılma Düzeltmesi – (MSC)

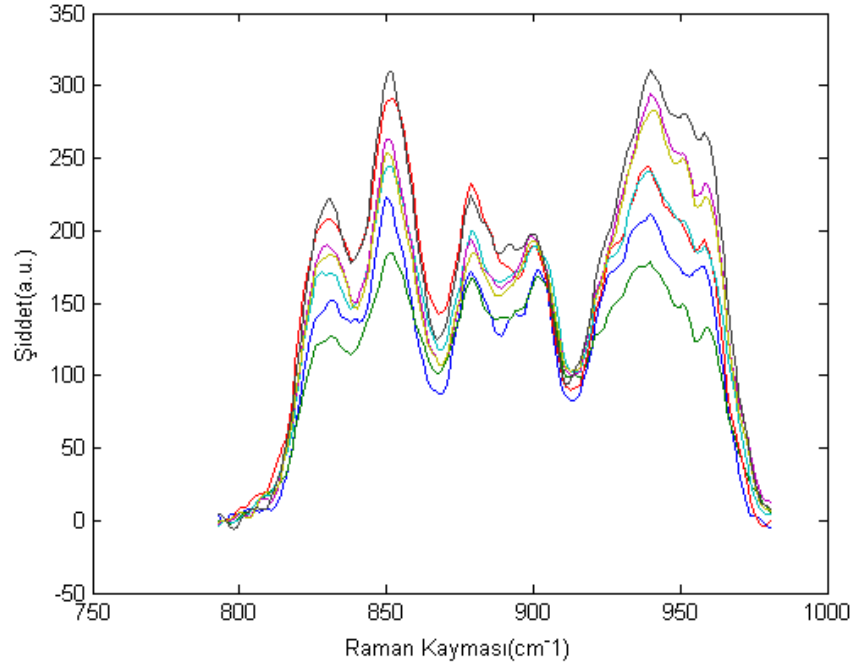
Spektroskopide optik kusurlar ve incelenen örneklerin farklı floresanslarından dolayı taban düzeylerinde farklılıklar gözlenir. Bu farklılıklar, doğrusal fit parametreleri kullanılarak spektrumların ortalama spektrum etrafındaki saçılması azaltılabilir [38]. Bu yöntem MSC denir.

MSC yöntemi ile saçılma düzeltmesi; A ile isimlendirilen başlangıç veri matrisinin $\bar{A}$ ortalama spektrumun, b_i birinci dereceden polinomyal fit parametrelerinin, her bir spektrumdan farkının m_i eğime oranı bulunarak elde edilir.[36].

$$A_i = m_i \bar{A} + b_i \quad (3.19)$$

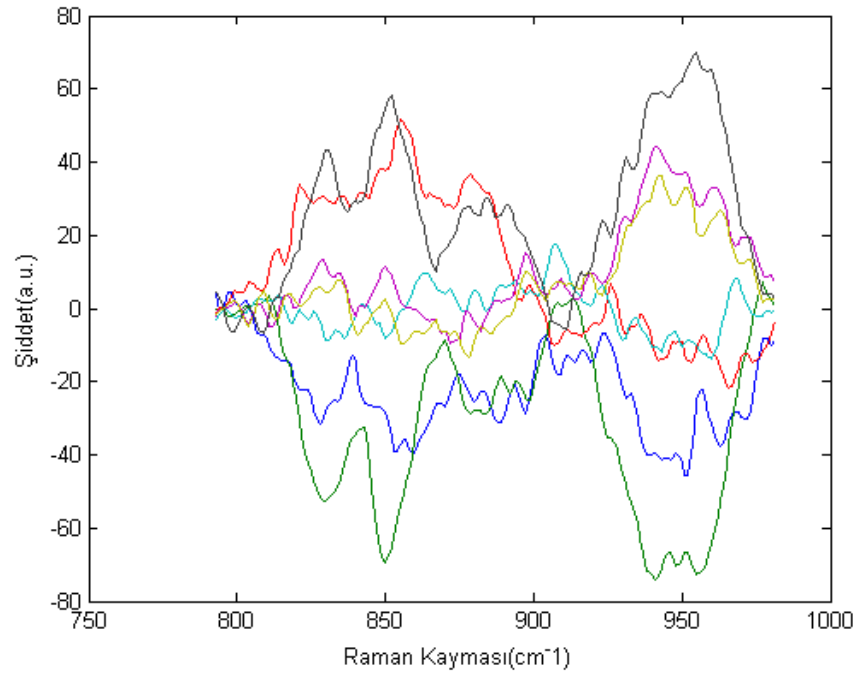
MSC düzeltme:

$$A_{i(MSC)} = \frac{A_i - b_i}{m_i} \quad (3.20)$$

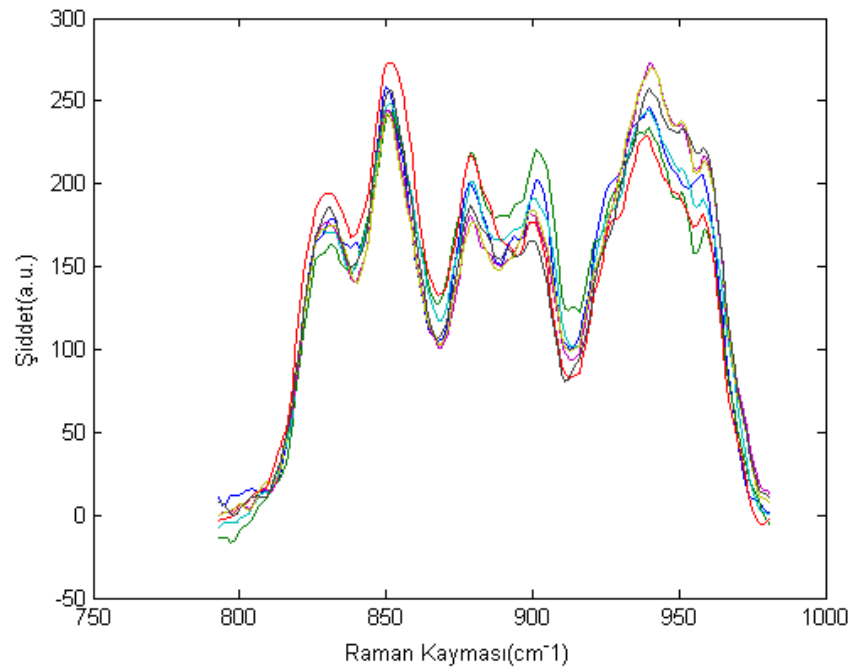


Şekil 3.9: Örnek serum Raman spektrumu 780-980 cm^{-1} bölgesi

Şekil 3.9’da önışlem uygulanmamış 7 farklı örneğin serum Raman spektrumundan oluşan bir veri takımına ait grafik görülüyor. Bu veri takımının ortalama etrafında dağılımı Şekil 3.10’daki gibidir. MSC uygulandığında spektrumdaki veriler ortalamaya doğru çekileceğinden MSC sonrası ortalama etrafındaki saçılmanın azalması beklenir.

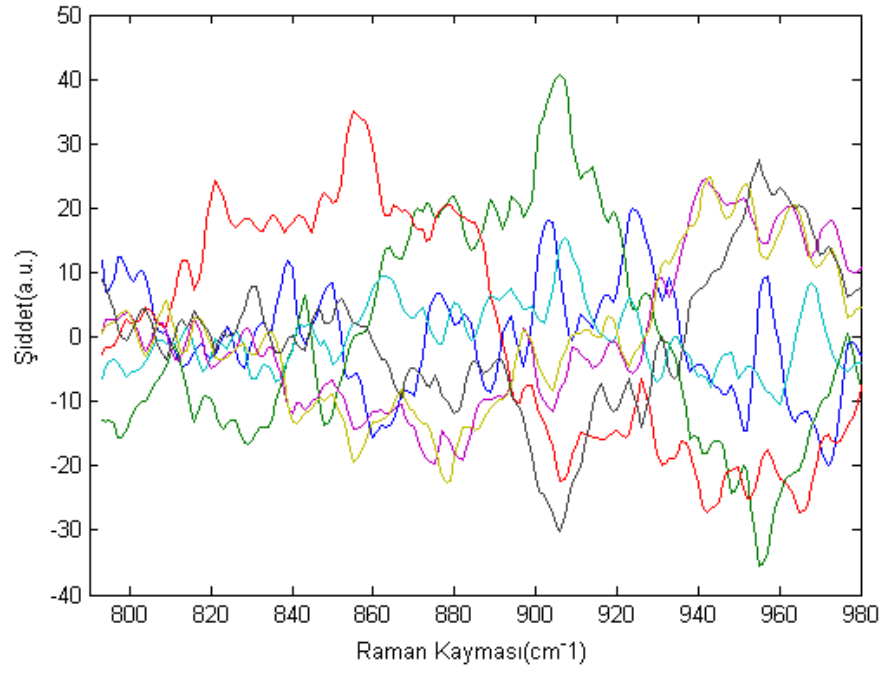


Şekil 3.10 : MSC uygulanmış veri takımına ait ortalama etrafında saçılma grafiği.

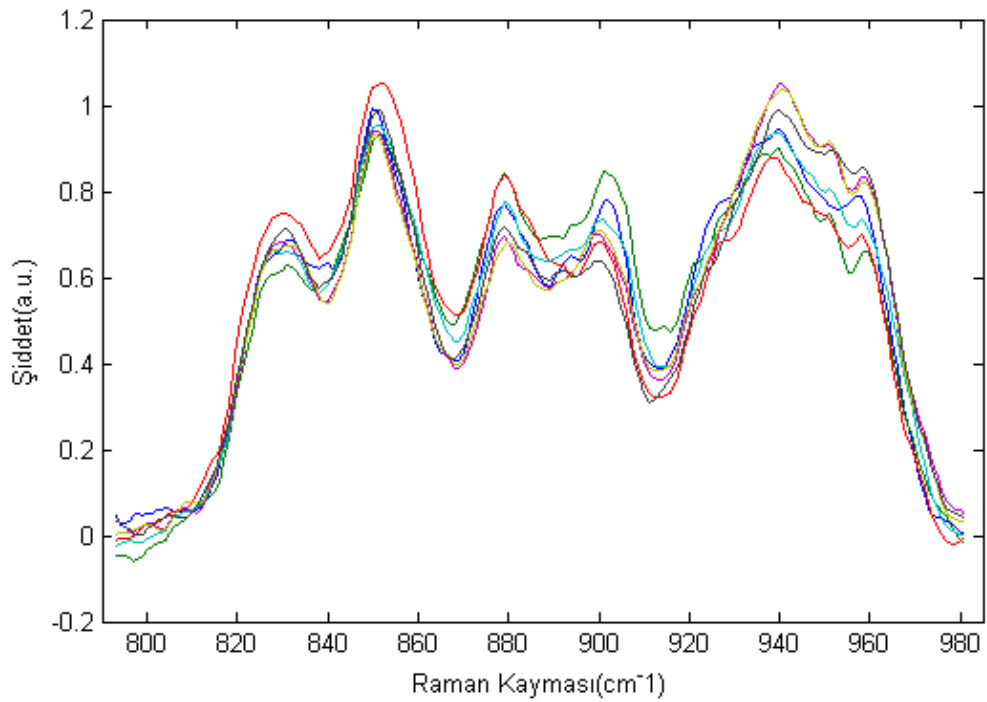


Şekil 3.11: Şekil 3.4'teki örnek veri takımının MSC uygulandıktan sonraki serum Raman spektrumu, 780-980 cm^{-1} bölgesi

Şekil 3.11'de MSC uygulandıktan sonra veri takımının grafiğinin aldığı şekil görülüyor. Amaçlandığı gibi saçılma ve spektrumların taban farklılıkları azaltılmıştır. Şekil 3.12 Şekil 3.10 ile karşılaştırıldığında, ortalama etrafında saçılımın azaldığı görülüyor.



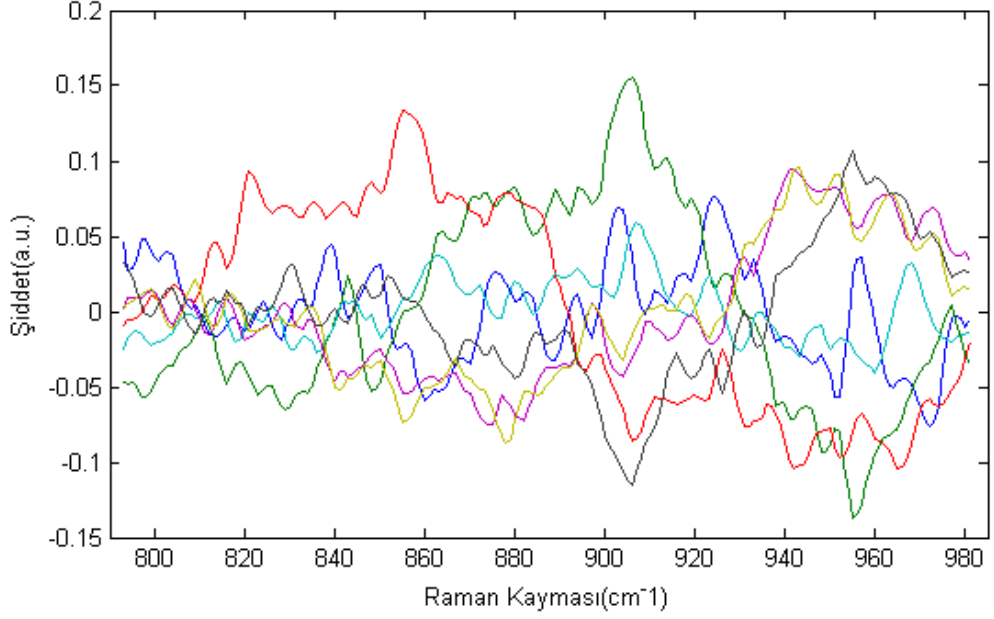
Şekil 3.12 : MSC uygulandıktan sonra ortalama etrafında saçılma grafiği



Şekil 3.13: Normalizasyon sonrası MSC uygulandıktan sonra serum Raman spektrumu; 780-980 cm^{-1} bölgesi

MSC uygulamasında normalizasyon etkisi görülmek üzere aynı veri takımı önce en şiddetli pikine göre normalize edildikten sonra MSC uygulanarak Şekil 3.8 elde edilmiştir.

Şekil 3.13'deki MSC düzeltmesi ve Şekil 3.14'daki Şekil 3.13'e ait ortalama etrafında saçılma grafikleri karşılaştırıldığında normalizasyon işleminin saçılma karakteristiğinde bir farklılık oluşturmadığı bulunmuştur. Normalizasyonla birlikte MSC uygulanmış veri takımlarının PCA ve LDA sonuçları bu ölçeklemenin istatistik analiz sonuçlarına bir katkı vermediği bulunmuştur.



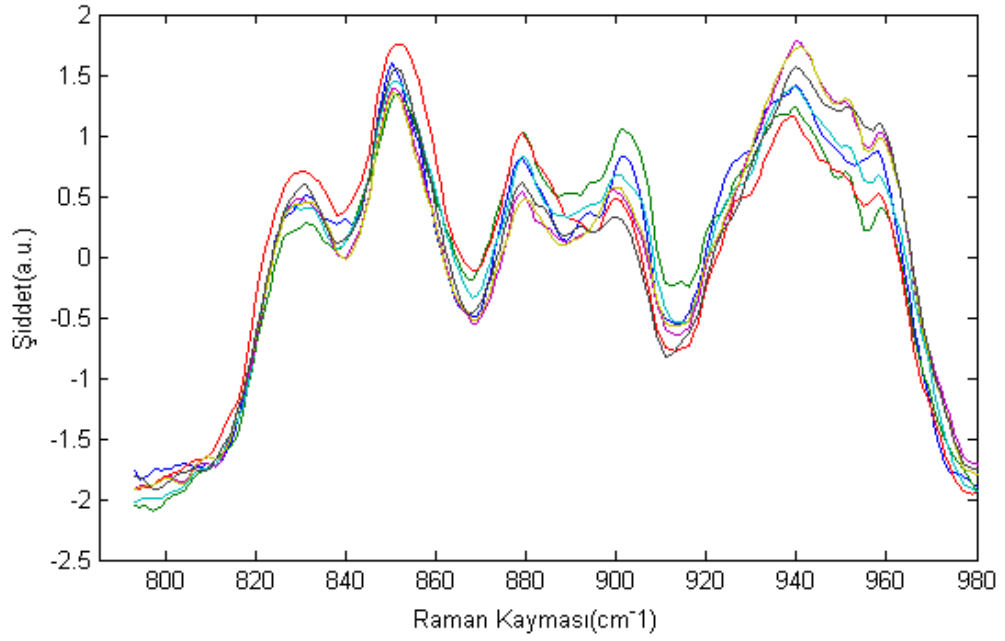
Şekil 3.14: Normalizasyon sonrası MSC uygulanmış veri takımının saçılma grafiği.

3.4.4.4 SNV ile düzeltme

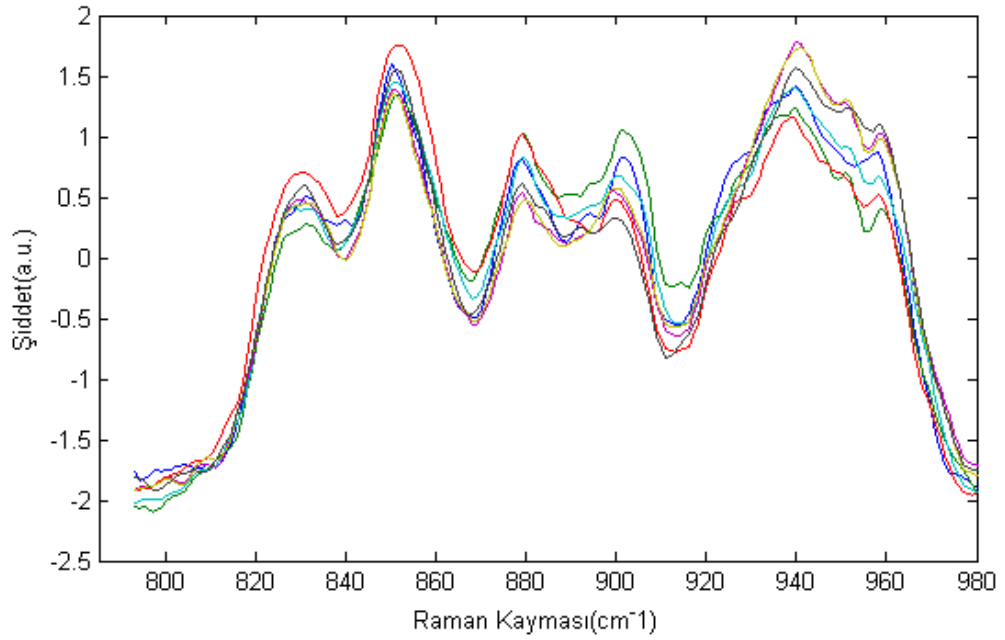
SNV uygulanmasındaki amaç, birbirleri arasında taban farkı olan spektrumları, her birini kendi içinde standardize ederek düzeltmektir.

SNV düzeltmede her spektrum ortalamaya göre düzeltilir ve standart sapmasına bölünür. Böylece sıfır ortalama ve sıfır varyansa sahip olurlar ve başlangıçtaki veri takımının doğrusal ölçeğinden ve veri takımı karakteristiğinden bağımsız, birimsiz hale gelirler. Şekil 3.10'da SNV uygulanmış veri takımlarına ait grafik gösterilmiştir. SNV uygulanmamış veri takımına ait Şekil 3.4 ile karşılaştırıldığında Şekil 3.10'da taban saçılmalarının büyük ölçüde düzeltildiği görülüyor.

$$A_{i(SNV)} = \frac{(A_i - \bar{A}_i)}{\sigma_i} \quad (3.21)$$



Şekil 3.15: SNV uygulanmış serum spektrumu(780-980 cm^{-1} arasında)



Şekil 3.16: Normalizasyon sonrası SNV uygulanmış serum spektrumu

Şekil 3.15 ve Şekil 3.16 da şiddet normalizasyonu uygulanmadan önce ve sonra SNV uygulanmış serum Raman spektrumları verilmiştir. Elde edilen iki spektrum için yapılan PCA ve LDA sonuçları arasında fark olmadığı bulunmuştur. Bunun sebebi, SNV önişleminin ele aldığı veri takımını 6 standart sapma aralığında ölçekleyerek en küçük saçılım değerlerine doğru yaklaştırmak istemesidir. Ölçek değişmeyeceği için spektrumun karakteristiği ve SNV sonrası şiddet değerleri de değişmeyecektir.

3.4.4.5 Taban(Baseline) Düzeltmesi

Raman spektrumları çoğunlukla floresans ve saçılma etkileri nedeniyle taban farklılıklarıyla beraber gelir. Bu farklılıklar spektrumun yapısına bağlı olarak basitçe sabit bir ofset, 2 noktalı doğrusal bir eğri ya da daha çok nokta kullanarak kübik bir eğri çıkarılarak düzeltilebilir. Bu yapılmadığı takdirde Raman saçılması olarak gözlenmeyen ve/veya gürültü olarak spektruma katılan veriler PCA sonuçlarında molekülde araştırılan kimyasal yapıya ait bilgi veriyormuş gibi ortaya çıkacaktır.

3.4.5 DOĞRUSAL AYIRMA ANALİZİ – LDA

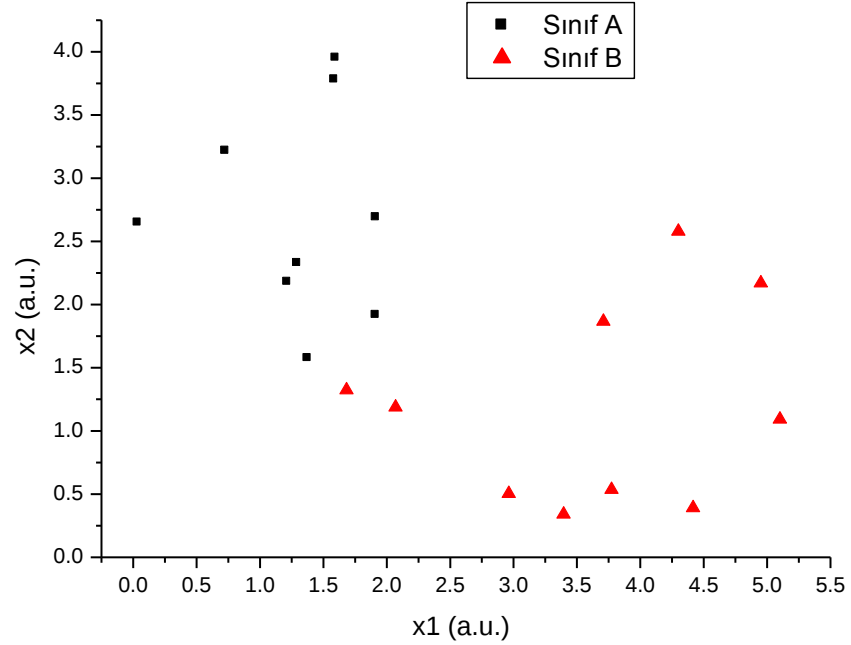
LDA, esas veri takımını, özellikle sınıf içi gözlem sıklıkları birbirine eşit olmadığında, kapladığı uzaydan daha düşük boyutlu bir uzaya dönüştürür ve sınıf içi kovaryans matrisini en küçükleştirirken, sınıflar arası kovaryans matrisini en büyükleştirir. Böylece sınıflar arasında bir ayrım sağlar.

LDA, büyük boyutlu veri takımlarının boyutunu düşürmek için PCA yöntemini kullanır ve skor verilerini girdi olarak alır. PCA yöntemi ile de sınıf ayrımı yapılabilir, fakat bu nitel bir ayrım olur. Başka bir deyişle PCA temsiller için bir matris dönüşüm doğrultusu ararken, LDA ayrım için bir doğrultu arar. Örneğin; ülkelerin yıllık tarımsal ihracat bilgilerini içeren bir veri tablosu PCA ile incelendiğinde ortaya çıkan skor tablosuna bakılarak hangi ülkelerin tarımsal ihracat konusunda birbirlerine yakın olduğu nitel olarak açıklanabilir. Bu ayrım nicel olarak yapılmak isteniyorsa LDA iyi bir yöntemdir. LDA, PCA skorlarını kullanarak esas datayı temsil eden verileri sınıfların dağılımının birbiriyle en ilişkisiz olduğu düzlemden bir doğru geçirerek bir ayrım sağlar.

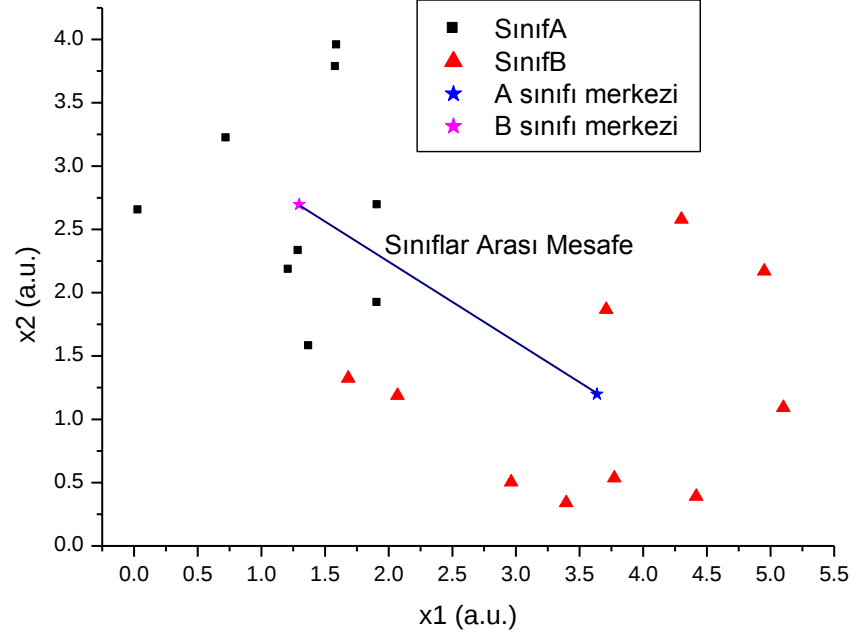
LDA, veri takımını sınıflandırırken bir seçim kuralı bulmayı hedefler. Bu kural Fisher ayırma fonksiyonudur. Sınıflar arasındaki doğruyu çizerken veya sınıfları birbirinden saçılma grafiğinde ayırırken bu kuralı kullanır. Bu işlemleri yaparken kullandığı veri takımını da deneme veri takımı olarak adlandırılır.

Hesapları yapılacak iki grup olduğu varsayılın. Bunlar A ve B olarak isimlendirilebilir. A ve B sınıflarının oluşturduğu kümelerin merkezleri arasındaki uzaklıklar ortalamalarının farkları alınarak bulunur. Ayrım yalnızca kümelerin merkezleri arasındaki Öklidyen uzaklıklara bakılarak da yapılabilir. Fakat, bu durumda saçılmanın nasıl olduğu gözlenemez ve varyans kriteri göz önünde bulundurulmadığından ‘doğrumsu’(false truth) verilerle baş etmek durumunda kalınır. Örneğin, hayvanların ebatlarına göre karşılaştırıldığı bir grafikte bebek bir filin iri bir fare ile çok ilişkili çıktığı görülür. Burada bebek fili fare ile aynı sınıfa koymamak için varyansları hesaba katma ve ölçeklemeyi iyi yapmak gerekir[35].

Şekil 3.17’de A ve B sınıfları için deneme verileri oluşturularak saçılma grafiği çizdirilmiştir. Şekil 3.18’de ise grupların ağırlık merkezleri arasındaki öklidyen uzaklıklar aynı grafik üzerinde görsellenmiştir. Fisher fonksiyonu bu gruplar için çizdirildiğinde öklidyen uzaklık kullanmaksızın gruplar arasında bir ayrım oluşturacaktır. Bunun için grupların kovaryans matrisleri hesaba katılır.



Şekil 3.17: Rastgele deneme verisi için saçılım grafiği



Şekil 3.18: Deneme verisi grafiğinde sınıflar arası mesafeler

Fisher ayırma fonksiyonu aşağıdaki gibi tanımlanır

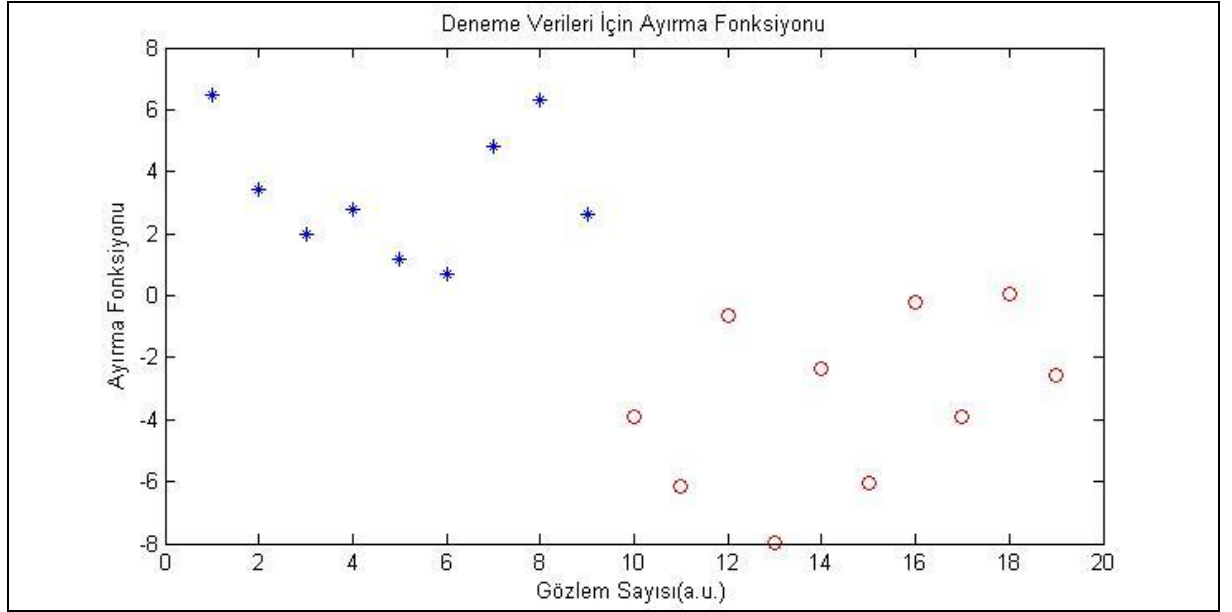
$$W_{ab} = (x_A - x_B) \cdot S^{-1} \cdot x' \quad (3.11)$$

Burada S pooled kovaryans matrisi temsil ediyor. Bu matris var olan bütün sınıfların bulunma olasılıklarına göre ağırlıklandırılmış ortalamasıdır. Örneğin, yukarıdaki grafiği oluşturan veriler toplam 19 örnekten oluşurken 9 tanesi sınıf A'yı, 10 tanesi sınıf B'yi meydana getirir. Bu durumda A sınıfının ağırlığı 9/19 olurken B sınıfının ağırlığı 10/19 olur. Tüm bu bilgilerle pooled kovaryans matrisi yazarsak:

$$S = \frac{(N_A - 1)S_A + (N_B - 1)S_B}{N_A + N_B - 2} \quad (3.12)$$

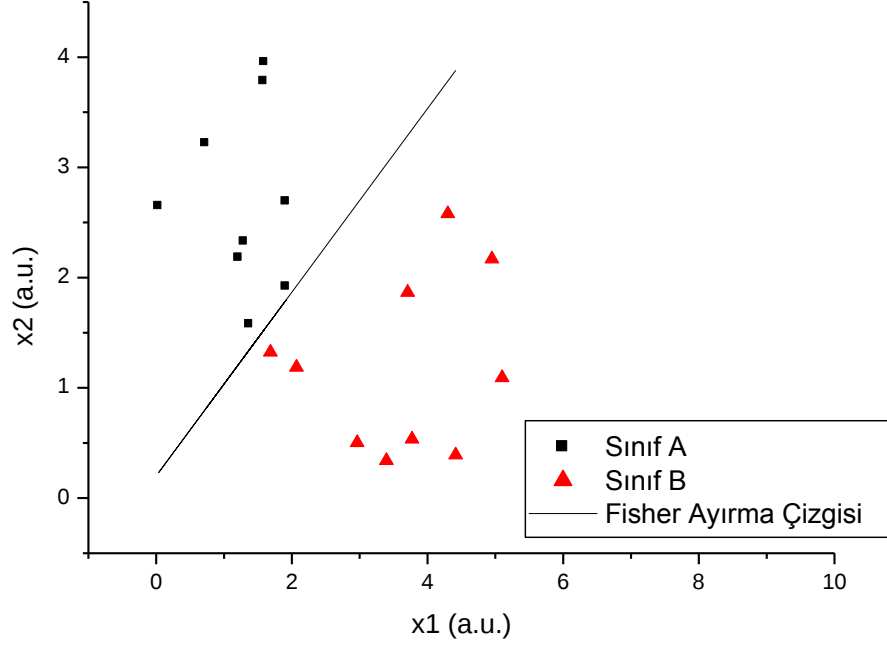
Ölçeklemeyi kaydırmak amacıyla her sınıfın ortalamasını kendisinden çıkarma etkisi yapan bir terim genellikle ayırma fonksiyonuna eklenir:

$$W_{AB} = (\bar{x}_A - \bar{x}_B)^{-1} x' - \frac{1}{2} \cdot (\bar{x}_A - \bar{x}_B) S^{-1} (\bar{x}_A + \bar{x}_B) \quad (3.13)$$



Şekil 3.19: Rastgele deneme verileri için ayırma fonksiyonu grafiği

Denklem 3.18’de $\bar{x}_A$ ve $\bar{x}_B$ her bir sınıfının ortalama değerini, x de ortalamaya göre düzeltilmiş veri takımını temsil ediyor. Yukarıda verilen matematiksel modelleme yardımıyla Matlab® platformunda yazılmış LDA kodu ile üretilmiş ayırma fonksiyonu görülüyor. Elde edilen çıktı daha önce bahsedilen rastgele deneme verileri kullanılarak elde edilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi sınıflar birbirinden oldukça iyi bir şekilde yatay eksene göre birbirinden ayrılıyor. Sınıflandırma yapılırken kimi zaman bir sınıfın elemanları LDA uygulandıktan sonra diğer sınıfa oldukça yaklaşır ya da o sınıfa dahilmiş gibi görünür. Buna sınıflandırma hatası denir. Şekil 3.19’a bu anlamda bakıldığında iyi bir sınıflandırma yapıldığı anlaşılır. Fakat sınıf içi saçılmalar hala fazladır ve burada sınıf içi bazı elemanların diğer sınıfa ait olma olasılıkları ortaya çıkar. Sınıflandırma hatası yapıp yapılmadığı Fisher ayırma çizgisi ile daha iyi görülebilir. Şekil 3.17 için çizilen Fisher ayırma çizgisi Şekil 3.20’de gösterilmiştir.



Şekil 3.20: Rastgele deneme verisine Fisher ayırma çizgisi uygulandıktan sonra görülen sınıflandırma

Fisher ayırma çizgisi iki sınıfı birbirinden doğrusal bir çizgi ile açıkça ayırmıştır. Her sınıftan ikişer eleman bu doğruya çok yaklaştığından *doğrumsu* (false truth) sonuçlar doğruma olasılığı vardır. Bu veriler değerlendirilirken t-kare gibi başka istatistik analiz yöntemleri de birlikte kullanılarak güven aralıkları belirlenebilir ve hangi verilerin hangi sınıfa dahil olduğu kesin olarak bulunabilir.

Bir dağılımdaki elemanların nasıl kümelendiğini görmek için önce nasıl saçıldıklarının görülmesi gerektiği daha önce ifade edilmişti. Bunu görmenin bir yolu Öklidyen uzaklık yerine Mahalanobis uzaklığını kullanmaktır. Burada her bir elemanın varyansı uzaklık hesaplarına dahil edildiğinden uzaklıklara göre grafik yeniden çizildiğinde kümelemeler nitel bir şekilde gözlenebilir. Şekil 3.19’da rastgele üretilen veriler için Mahalanobis uzaklığı kullanarak bir sınıf ayrımı yapılmıştır. Sınıflar arasındaki ayrım Fisher ayırma çizgisi kullanılarak gösterilmiştir.

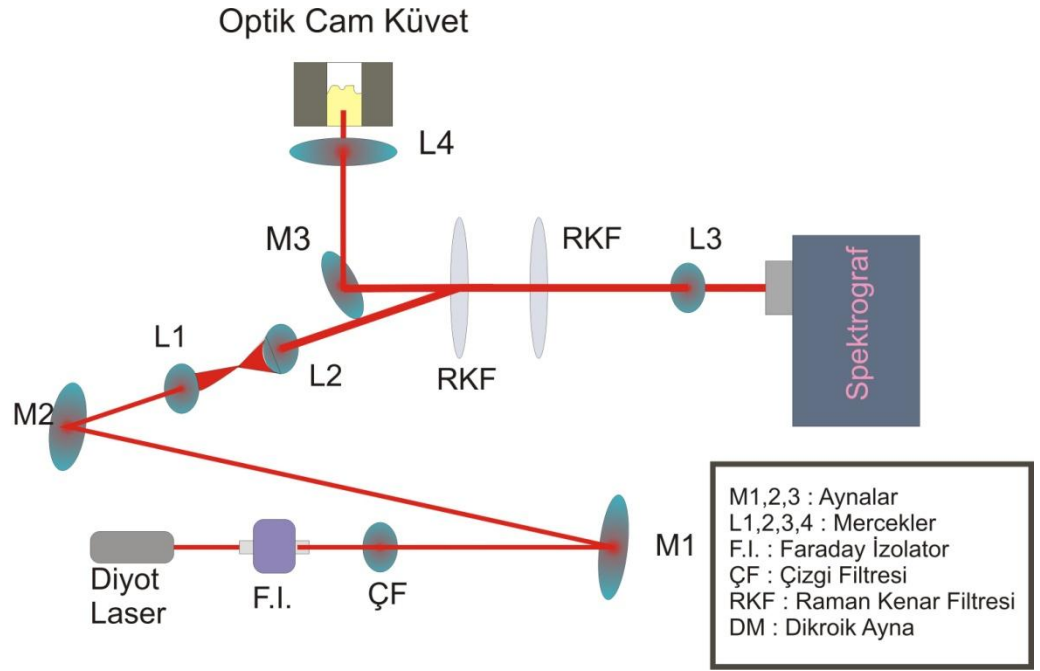
Birden çok grup olması durumunda W_{AB} dışında sınıf sayısına göre W_{AC} , W_{BC} gibi yeni ayırma fonksiyonlarına ait veriler elde edilecektir. Bu veriler birbirine göre çizdirildiğinde sınıflar arasında birer ayırma çizgisi oluşacaktır.

Doğrusal ayırma analizinde kovaryans matrisini tersinin satır sayısının boyutunun sütunlardan düşük tutulması gerekliliği bir dezavantaj gibi dursa da, girdi olarak PCA skorları kullanılması bu sorunun kolaylıkla aşılmasını sağlıyor. Eğer çok hassas verilere ihtiyaç varsa, skor verileri alınırken toplam varyansı yüzde yüze yakın olan bileşenler seçilebilir.

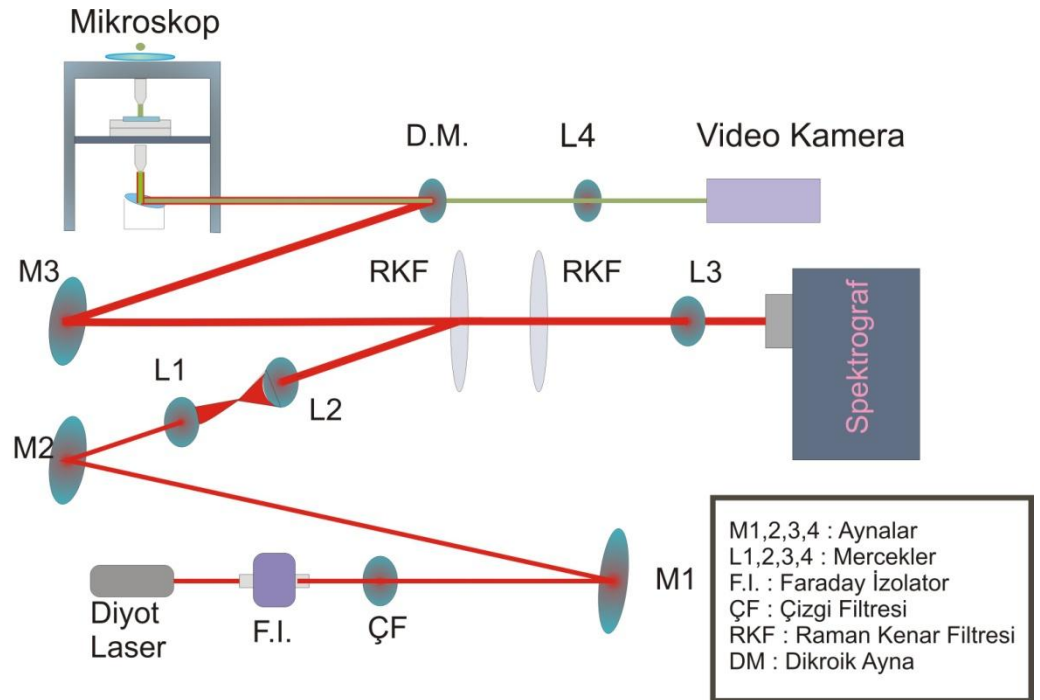
4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum Ünitelerindeki preeklampitik gebelerden ve kontrol gruplarından tüplere alınan venöz kanlar yarım saat içinde santrifüj edilerek plazma ve serumlarına ayrılmıştır. Plazma elde etmek için kanlar EDTA'lı tüpe alınırken, serum elde etmek jelli düz tüplere alınarak yaklaşık 5 dakikalık bir süre pıhtılaşması için beklenmiştir. Kan alınacak hastaların seçimi yapılırken 32 hafta ve üzeri gebe olması, preeklampsiden başka bir hastalığı olmaması, hipertansiyon ve şeker hikayesinin olmamasına dikkat edilmiştir. Serum ve plazma örnekleri her hastadan 2 adet 1 mL'lik eppendorf tüpüne alınarak İTÜ genetik bölümünde -20°C'lik buzdolabında saklanmıştır. Kan örnekleri ise bekletilmeden hastadan alındığı gün ölçülmüştür.

Örnekler 1 cm x 1 cm'lik optik cam küvete konulmuştur ve Şekil 4.1'de verilen Raman düzeneğinde 30 saniye pozlama zamanı ile ardışık olarak 20 kez (kinetik ölçüm) ölçülmüştür. Şekil 4.2'de verilen Raman cımbızlama düzeneğinde her bir preeklampitik ve sağlıklı gebenin ortalama 5'er adet eritrosit hücresi tek olarak tuzaklanmış ve 30 saniye pozlama zamanı ile 10'ar kinetik Raman spektrumları elde edilmiştir. Normal Raman ölçümleri için toluen, mikro Raman ölçümleri için polisitiren Raman spektrumları her örnek ölçümünden sonra alınarak daha sonra iteratif kalibrasyonda kullanılmak üzere kaydedilmiş, ölçüm sırasında kalibrasyon yapılmamıştır. Arka plan spektrumu olarak plazma ve serumlar için su spektrumu, kan örnekleri için fizyolojik serum spektrumu alınmış ve elde edilen spektrumlardan çıkarılmak üzere kaydedilmiştir.



Şekil 4.1: Normal Raman düzeneği



Şekil 4.2 : Raman Cımbızlama düzeneği

4.1 ELDE EDİLEN SPEKTRUMLARIN ÖNİŞLEMLERİ

- Her bir plazma ve serum örneğinin spektrumu ardışık olarak 20 kez 30 saniye sürelerde dalga sayılarına karşılık gelen piksel numaraları ile alındı.
- Her ölçümden sonra 10 saniye süresince aynı şekilde toluen spektrumu alındı.
- Her bir ölçüm günü sonunda su spektrumu alındı.
- Alınan her bir 20 kinetik ölçüm kozmik ışıklardan temizlendi.
- Plazma, serum ve su spektrumlarının 20 kinetik ölçümünün ortalaması ANDOR programında hesaplandı.
- Ortalaması alınmış spektrumlar su spektrumundan çıkartılarak arka plan düzeltilmesi yapılmış spektrumlar elde edildi.
- Kalibrasyon işlemi için alınan her bir toluen spektrumu GRAMS programı ile fit edilerek band merkezleri bulundu.
- Toluene spektrumu, referans değerleri [20] kullanılarak Microcal Origin programında 3. dereceden polinom ile fit edilerek piksel numaralarına karşılık gelen dalga sayıları elde edildi. Bu değerler Andor programındaki kalibrasyon tablosuna girildi ve üçüncü dereceden kalibre edilerek Raman Shift (cm^{-1}) biriminde spektrumlar elde edildi.
- Kontrol için toluene spektrumu aynı şekilde kalibre edildi.
- Kalibrasyonu yapılan toluene spektrumları GRAMS programı ile fit edilerek kalibrasyon sonrası band merkezleri hesaplandı. Kalibrasyon öncesi ve sonrası band merkezlerinin standart sapma değerleri hesaplanarak karşılaştırma yapıldı.
- Kalibrasyonu yapılan spektrumlar ANDOR programında eğri şeklini alan üçüncü derece interpolasyon yöntemiyle taban eğrisi çıkarıldı.

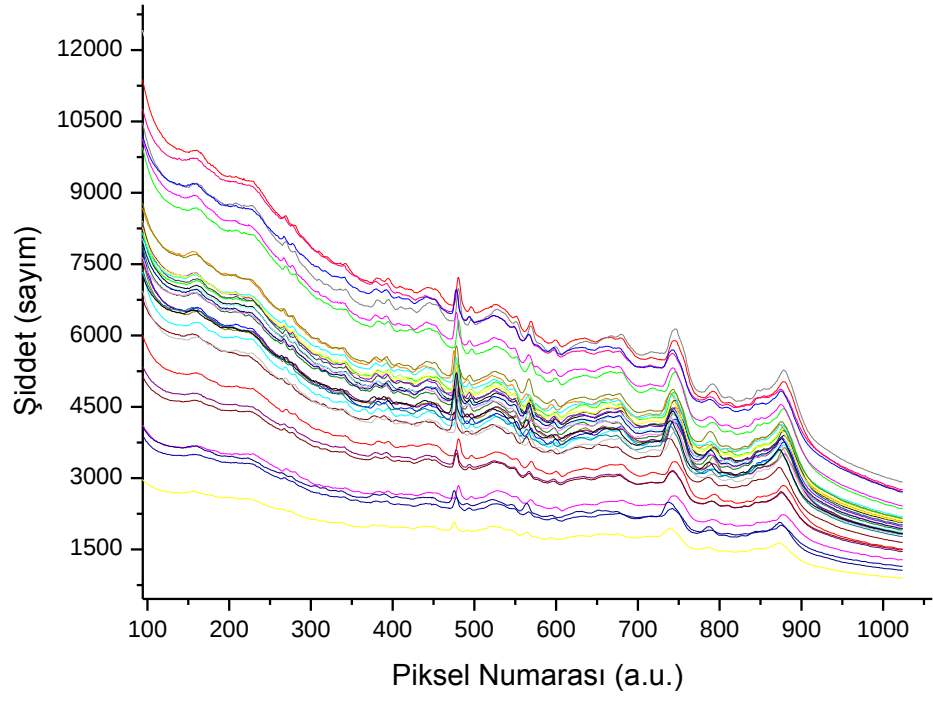
4.2 İSTATİSTİK ANALİZ İŞLEMLERİ

- Taban düzeltilmesi yapılan verilerin çok değişkenli istatistik işlemlerine girdi olabilmesi için dalga sayısı aralıkları eşitlendi. Bunun için Matlab[®] platformunda bir spektral genişlik düzeltme programı yazıldı. Dalga sayısı eksenini $\Delta\bar{\nu} = 1 \text{ cm}^{-1}$ aralığında ve aynı spektral karakteristikleri gösterecek şekilde düzenlendi.

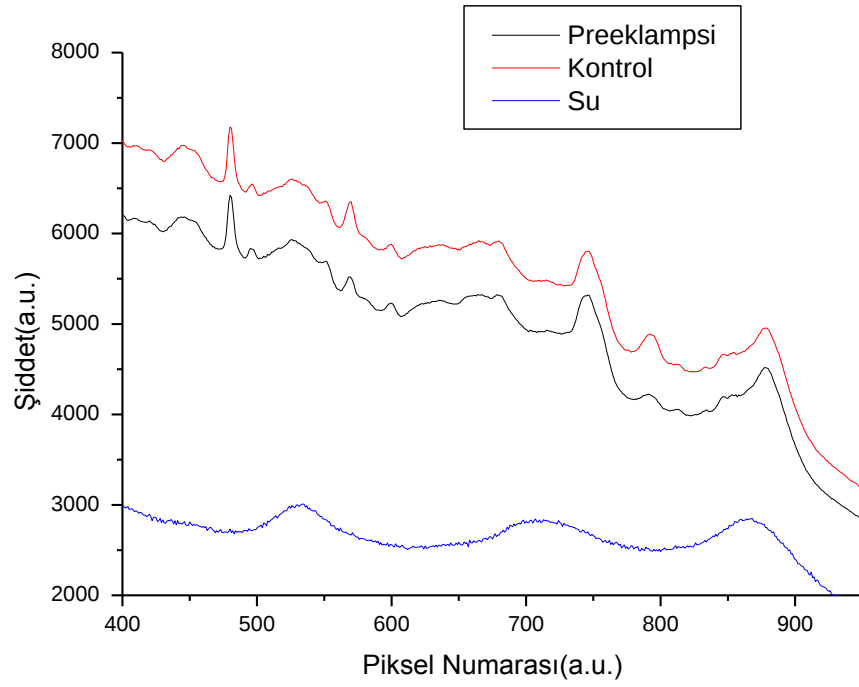
- Gürültülü verileri azaltmak için ikinci dereceden 5 nokta Savitzky-Golay düzeltme (smoothing) yöntemi uygulandı. İstatistiksel başarıyı karşılaştırmak üzere hem düzeltilmiş, hem düzeltme uygulanmamış veri takımlarına çok değişkenli analiz uygulandı.
- PCA analizlerinin yapılabilmesi için Matlab platformunda bir program yazıldı. Bu programın kullanım kolaylığının sağlanması için bir arayüz tasarlanmıştır.
- PCA (Temel Bileşenler Analizi) aşamasında çapraz sağlama (cross validation) yöntemini uygulayan Grams AI yazılımı tercih edilmiştir.
- Veri takımlarının hangi önışleme tabi tutulacağı hem MSC hem SNV önışlemler uygulanarak karar verilmiştir. MSC önışleminin serum ve plazma spektrumlarının çok değişkenli analizi için daha uygun olduğu bulunmuştur.
- Grams AI yazılımında MSC ile birlikte ortalamaya göre düzeltme seçildi. Analiz yapılmak istenen bölge ve faktör sayısı belirlendi. İteratif olarak en ideal faktör sayısı bulundu.
- Bu işlemlerden sonra program çalıştırıldı ve her bir bölge için skor, faktör, açıklama değerleri, spektral artık değerleri incelendi. Skor değerleri LDA için girdi olarak hazırlanmak üzere kaydedildi. Faktör sonuçları ise en iyi ilişkili olduğu spektrum bulunmak üzere Spectral ID'de incelendi.

Şekil 4.3'te alınan tüm serum örneklerinin işlenmemiş Raman spektrumları gösterilmektedir. Her bir spektrum 20 kinetik spektrumun ortalamasıdır. Grafikte arka plan spektrumu olarak alınan suyun Raman spektrumu da birlikte verilmiştir. Şekil 4.4'te su spektrumunun Şekil 4.3'te verilen ortalama serum spektrumlarından çıkarılmış şekli veriliyor. Böylece su spektrumuyla gelen taban yükselmesi ve bu spektruma özgün karakteristik bant katkıları serum spektrumundan atılmış olur.

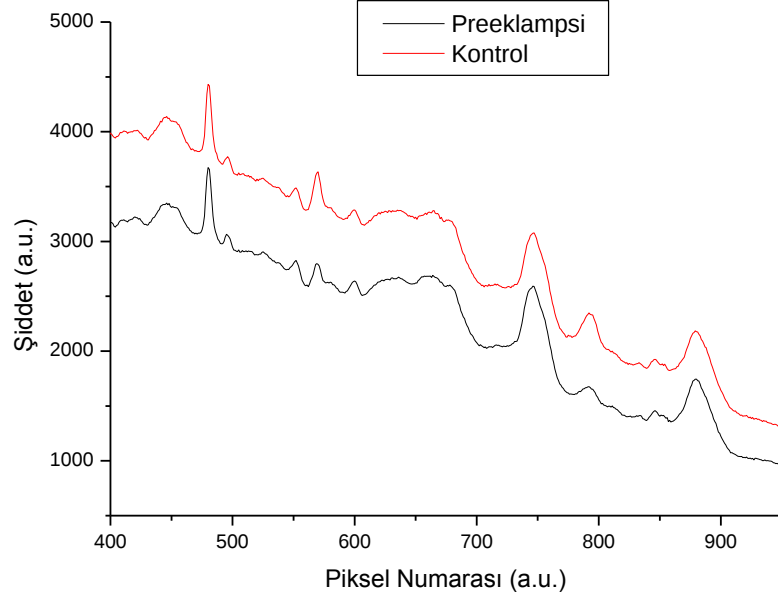
Spektrumlarda farklı floresans seviyeleri nedeniyle şiddet seviyelerinde farklılıklar oluşmuştur. Bir preeklamptik ve bir kontrol grubuna ait spektrum ve su spektrumunun 400-950 piksel numaraları arasındaki bölgesi Şekil 4.4'te verilmektedir. Bu spektrumların arka planı oluşturan su spektrumu çıkarılmış spektrumu Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.3: Tüm ortalama ham serum örnekleri



Şekil 4.4 : Preeklampitik ve normal serum Raman spektrumları. Altteki mavi grafik su spektrumudur.

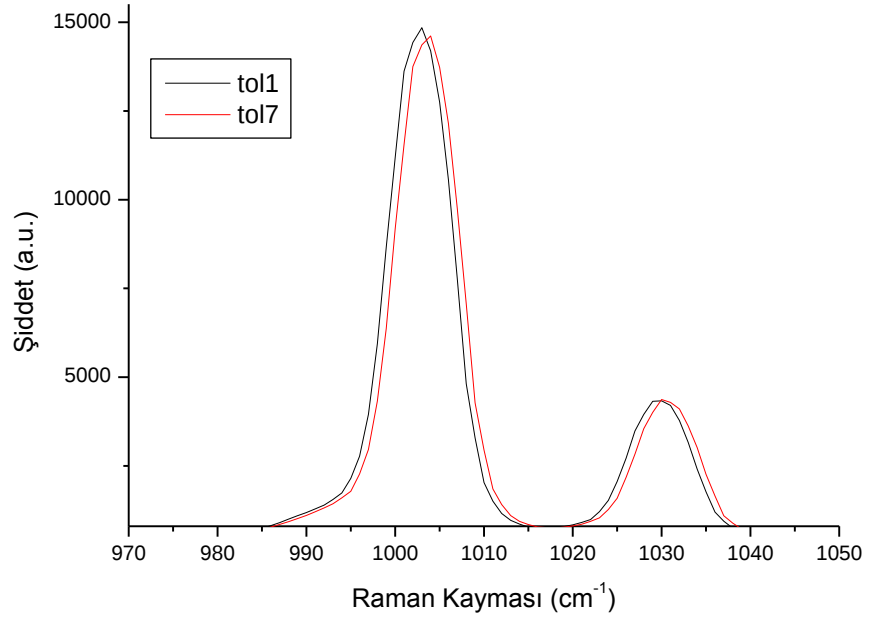


Şekil 4.5 Arka plan çıkarılmış preeklampitik ve kontrol serum spektrumları

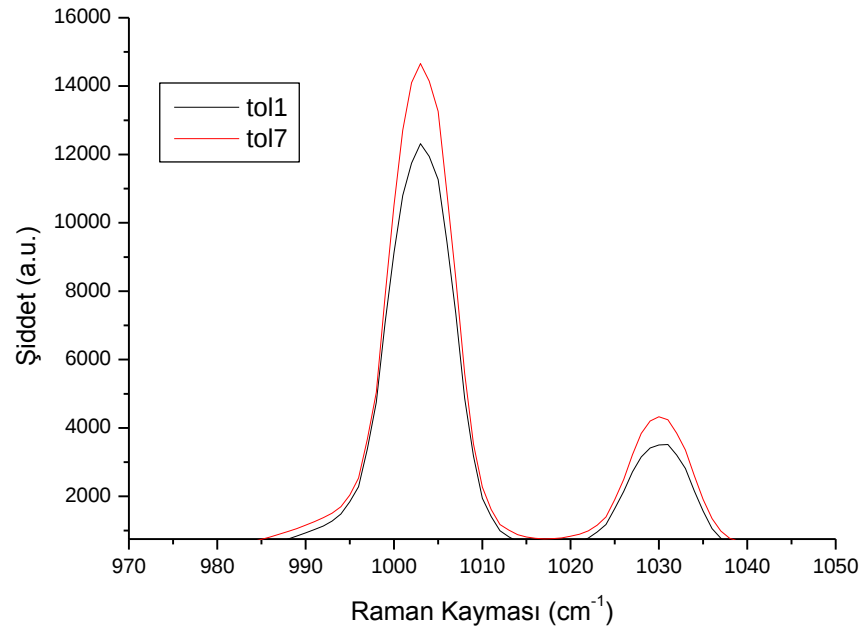
Tüm Raman spektrumları dalga sayısı biriminde olacak biçimde kalibre edilmişlerdir. Normal Raman spektrumlarının kalibrasyonu için tolüen bandları [20] referans olarak kullanılmıştır. Serum ve plazma ölçümlerinde her bir ölçümden sonra tolüen spektrumu dalga sayısına karşılık gelen piksel biriminde alınmıştır.

Geliştirdiğimiz kalibrasyon yönteminde, referans değerleri Andor programının kalibrasyon tablosuna elle girmeden kontrollü ve tekrarlı bir şekilde kalibrasyon yaparak daha küçük hata değerleri bulunması hedeflendi. Bunun için ilk önce tolüen spektrumundaki bant merkezleri GRAMS AI yazılımı yardımıyla piksel cinsinden elde edildi. Elde edilen bant merkezlerine karşılık gelen referans bantların dalga sayıları üçüncü dereceden fit edilerek kalibrasyon grafiği bulundu. Kalibrasyon grafiğinden piksel numarasına karşılık gelen dalga sayısı Andor iDus yazılımına girilip üçüncü dereceden fit edilerek kaydedilen spektrumların kalibrasyonu yapıldı.

Geliştirilen kalibrasyon yöntemini test etmek için tolüen spektrumları bu yöntemle kalibre edildi. On farklı günde alınan tolüen spektrumlarının yapılan kalibrasyon için dalga sayısı ve standart sapma değerleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 de verilmektedir. Bu tablodaki bilgiler kullanılarak Şekil 4.6’da normal kalibrasyon yöntemiyle kalibre edilmiş en çok kayma gösteren tolüen spektrumlarından ikisi verilmiştir.



Şekil 4.6: Normal kalibrasyon yöntemi ile kalibre edilmiş tolüen spektrumları

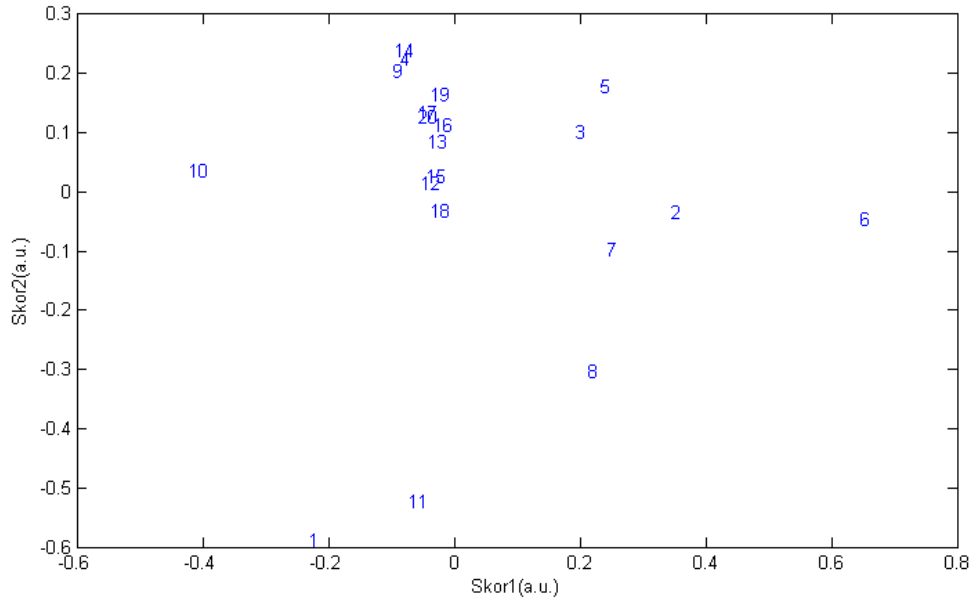


Şekil 4.7: Geliştirilmiş kalibrasyon ile kalibre edilmiş tolüen spektrumları

Şekil 4.7’de geliştirilmiş kalibrasyon sonrası tolüen spektrumu verilmiştir. Görüldüğü gibi iki spektrumun tepe noktalarına karşılık gelen dalga sayıları en iyi şekilde birbirine yaklaştırılmıştır.

Kalibrasyon işlemlerinin, ne kadar iyi yapıldığı ve ne kadarlık bir katkı sağladığı çok değişkenli analiz hesaplarıyla incelendi. Normal ve geliştirilmiş kalibrasyon yöntemiyle kalibre edilmiş toluen spektrumlarının PCA ve LDA sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’de verilmiştir.

Şekil 4.8’de 1-10 arası numaralandırılmış spektrumlar normal kalibre edilmiş toluen spektrumlarını, 11-20 arası numaralandırılmış spektrumlar ise geliştirilmiş kalibrasyon yöntemi ile kalibre edilen spektrumları temsil ediyor. Skor 1 eksenini yüksek varyanslı eksendir, açıklama oranı bu veri takımı için %85’dir. Skor 2 ekseninin açıklama oranı ise % 8 dir. Kontrollü kalibre edilen toluen spektrumlar, düşük varyanslı ekseninde çok yaygın olmayan bir dağılım gösterirken, manuel kalibrasyon verileri ise her iki ekseninde de kontrollü kalibrasyon verilerine göre oldukça geniş bir dağılım sergiliyor.



Şekil 4.8: Manuel ve kontrollü kalibre edilen toluen spektrumları için PCA skorları

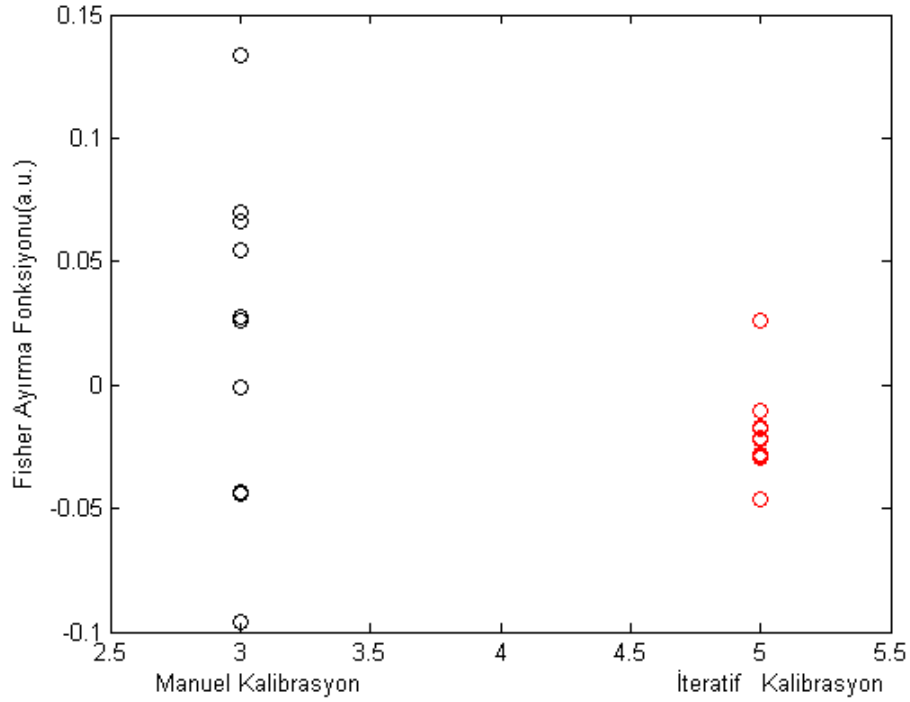
Tablo 4.1 Manuel kalibrasyon sonrası toluen spektrumu dalga sayıları (cm⁻¹)

Toluen 1	Toluen 2	Toluen 3	Toluen 4	Toluen 5	Toluen 6	Toluen 7	Toluen 8	Toluen 9	Toluen 10	ortalama	stdsapma
216.3554	215.9985	218.5204	217.0823	216.8331	217.4195	218.3206	217.3450	217.1743	217.9391	217.29882	0.80439
520.5000	520.6123	521.4865	521.2079	520.9068	521.5145	521.6086	520.9198	520.8607	521.1937	521.08109	0.38321
621.3010	621.4402	622.0365	621.8985	621.6716	622.1882	622.1996	621.6042	621.5784	621.7925	621.77107	0.30734
785.2098	785.3627	785.7676	785.7484	785.5130	785.8673	785.9952	785.6047	785.5041	785.4646	785.60372	0.24067
1002.8100	1002.9245	1003.3519	1003.2356	1003.0414	1003.1929	1003.5671	1003.3393	1003.3005	1002.9793	1003.1743	0.23187
1029.7930	1029.9120	1030.3622	1030.2167	1030.0243	1030.1740	1030.5938	1030.3722	1030.3240	1029.9823	1030.1755	0.2468
1209.8175	1209.8503	1210.4852	1210.1378	1209.9218	1210.0479	1210.7987	1210.4734	1210.5263	1210.0945	1210.2153	0.33379
1379.2351	1379.2436	1379.8939	1379.4584	1379.1354	1379.4889	1380.3841	1379.8044	1380.0726	1379.6392	1379.6356	0.40327
1604.8102	1604.7205	1605.1366	1604.8777	1604.1295	1605.2906	1606.2537	1604.6591	1605.6057	1605.3654	1605.0849	0.58749

Tablo 4.2 Geliştirilmiş yöntemle yapılan kalibrasyon sonrası toluen spektrumu dalga sayıları (cm⁻¹)

Toluen 1	Toluen 2	Toluen 3	Toluen 4	Toluen 5	Toluen 6	Toluen 7	Toluen 8	Toluen 9	Toluen 10	ortalama	stdsapma
217.93086	217.9135	217.8232	217.81073	218.37985	218.0554	217.9159	217.7826	217.9272	217.8815	217.94207	0.17219
521.12754	521.161	521.1056	521.13157	521.21435	521.1786	521.1301	521.1192	521.1266	521.1348	521.14294	0.03251
621.75245	621.7399	621.7056	621.70776	621.76773	621.7532	621.7234	621.6873	621.7107	621.7456	621.72936	0.02611
785.50684	785.4688	785.4723	785.48486	785.44742	785.4644	785.5161	785.5035	785.4555	785.4819	785.48016	0.02283
1003.0574	1003.027	1003.056	1003.0549	1003.0315	1003.057	1003.06	1003.039	1003.059	1003.066	1003.0507	0.01333
1030.0501	1030.042	1030.055	1030.0604	1030.0293	1030.073	1030.069	1030.047	1030.063	1030.066	1030.0555	0.01359
1210.101	1210.091	1210.141	1210.1102	1210.1736	1210.131	1210.149	1210.106	1210.133	1210.139	1210.1275	0.0252
1379.4801	1379.613	1379.503	1379.5088	1379.5934	1379.637	1379.531	1379.535	1379.564	1379.575	1379.554	0.05093
1604.7918	1604.985	1604.84	1604.8063	1604.7567	1604.855	1604.834	1604.895	1604.807	1604.815	1604.8385	0.0635

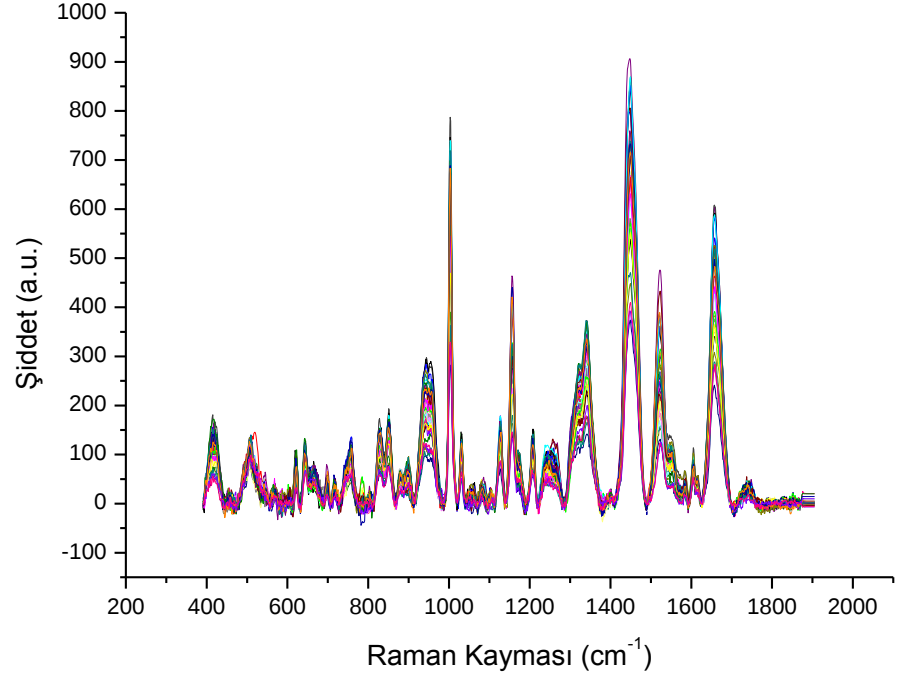
PCA analizi yapılan on farklı günün toluen spektrumlarının LDA sonuçları şekil 4.9’da verilmiştir. 11 numaralı spektrum geliştirilmiş kalibrasyon yapılmış gruptan bir miktar uzaklaşmıştır. Fakat Tablo 4.1 incelendiğinde bu ölçümün standart sapmasının bu ayrılmayı ihmal edecek kadar küçük olduğunu gösteriyor. Sonuçta kalibrasyondan kaynaklanabilecek istatistiksel farklılıkların ne kadar aza indirgendiği gösterilmiştir. LDA sonuçları da PCA ile uyumlu sonuçlar doğurmuştur. Kontrollü kalibre edilmiş spektrumların fisher fonksiyonu değerleri birbirine oldukça yakın çıkarken, manuel kalibre edilmiş toluen spektrumlarının ayırma analizi mesafeleri ekseninde dağınık gözüküyor.



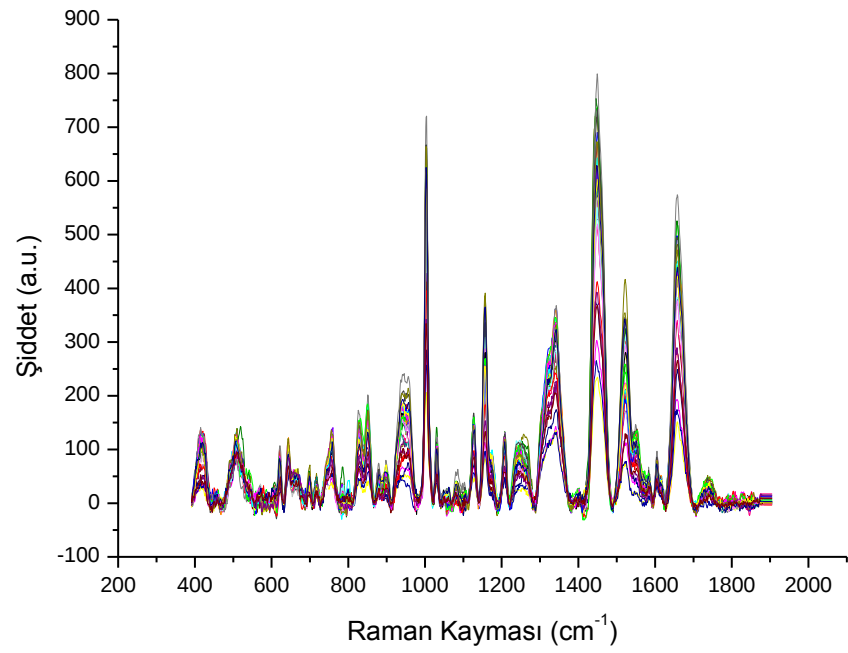
Şekil 4.9 : Manuel ve Kontrollü kalibre edilen toluene spektrumları için LDA skorları.

Kalibre edilmiş spektrumların floresans kaynaklı taban seviyesinin düzeltme işlemi yapıldı. Andor yazılımı kullanılarak üçüncü dereceden “cubic spline” interpolasyon yöntemiyle taban karakteristiğiyle en iyi şekilde eşleşen taban eğrisi bulunarak asıl spektrumdan çıkarıldı. Bu yapılırken örneklerin kimyasal yapısı hakkında bilgi veren bantları değiştirmemesine dikkat edildi. İnterpolasyon için kullanılan noktalar her spektrum için x ekseninde aynı olacak biçimde seçildi. Böylece taban çizgisi çıkarma işleminin her spektrum için standart bir işlem olması sağlandı. Şekil 4.10 ve

Şekil 4.11 da taban eğrisi çıkarılmış plazma ve serum örneklerinin tümü tek grafikte gösteriliyor.

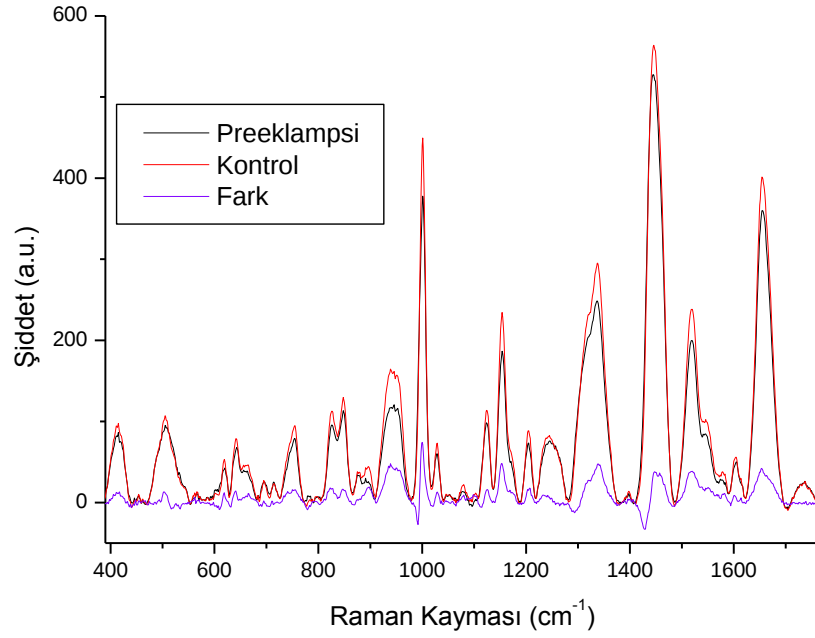


Şekil 4.10: Taban eğrisi çıkarılmış tüm serum örnekleri

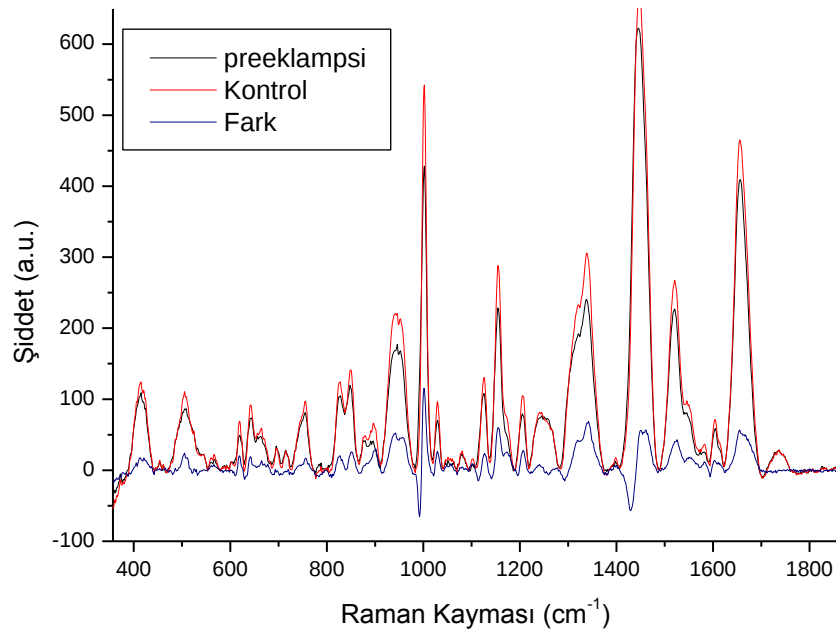


Şekil 4.11 : Tüm taban çıkarılmış plazma örnekleri

Taban çizgisi çıkarılmış tüm spektrumlar arasında ne gibi farklılıklar olduğunu görmek için; preeklampsi ve kontrol gruplarının spektrumlarının ayrı ayrı ortalamaları alındı. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de ortalama spektrumlar ve fark spektrumları verilmiştir.

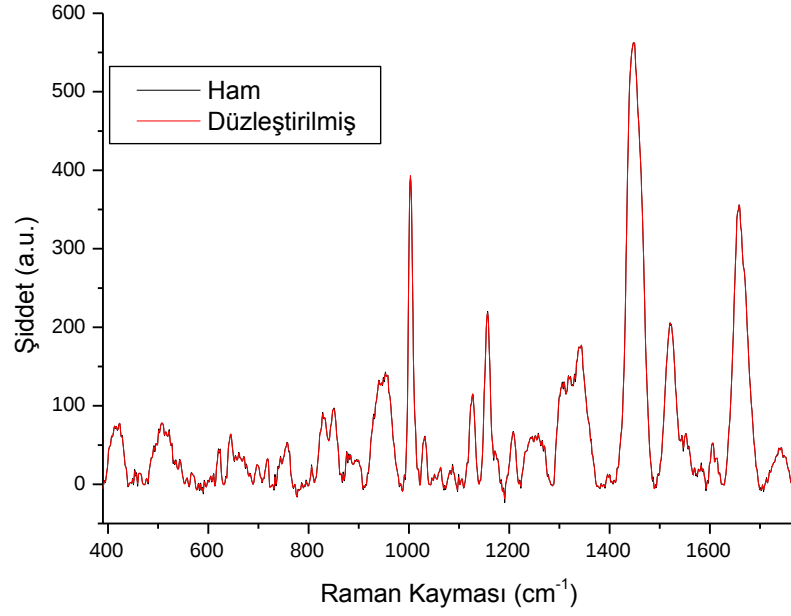


Şekil 4.12 : Plazma ortalama spektrum karşılaştırması ve ortalama spektrumların farkı

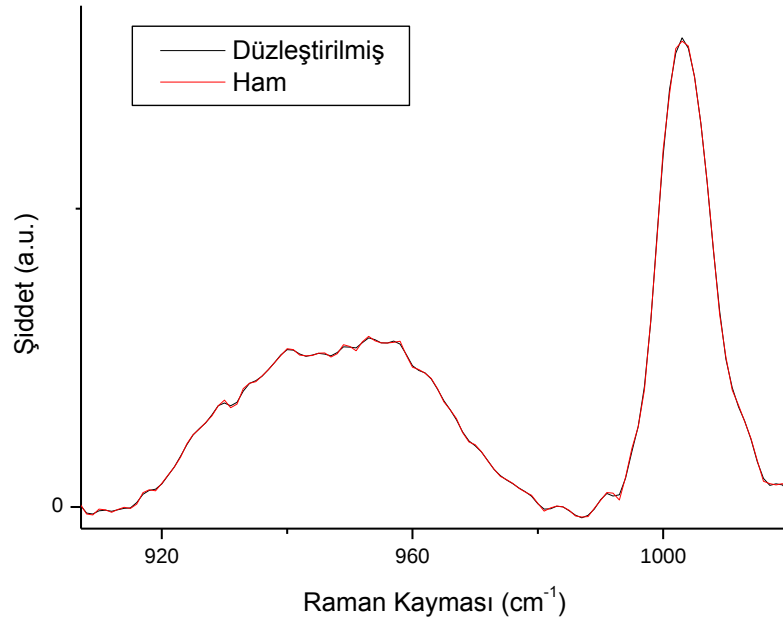


Şekil 4.13 : Serum ortalama spektrum karşılaştırması ve ortalama spektrumların farkı.

Taban çizgisi çıkarılmış serum ve plazma örneklerine spektral düzeltme (smoothing) uygulandı. Şekil 4.14 ve 4.15'te düzleştirmenin spektrumlara yaptığı etki gösterilmiştir.



Şekil 4.14: Düzleştirilmiş ve ham Raman spektrumları.

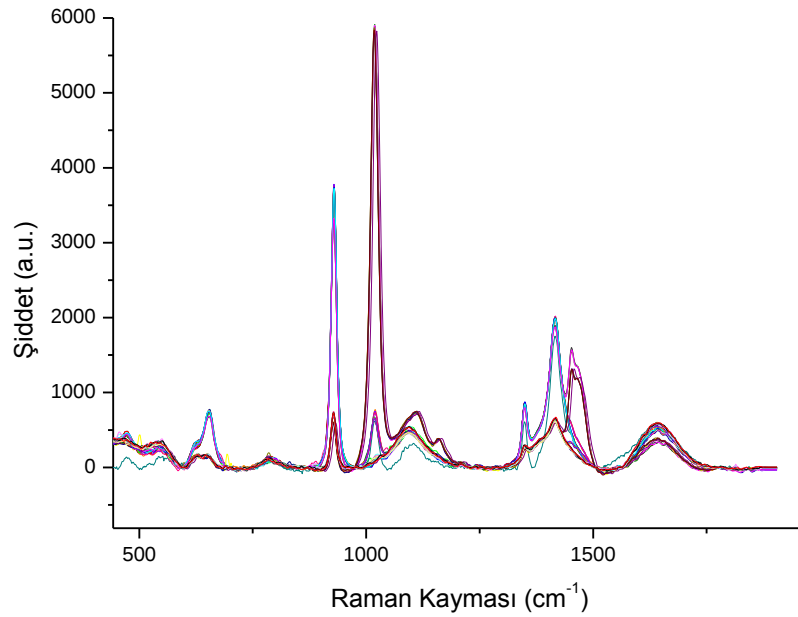


Şekil 4.15: Şekil 4.14'te verilen spektrumun 910-1020 cm⁻¹ bölgesi

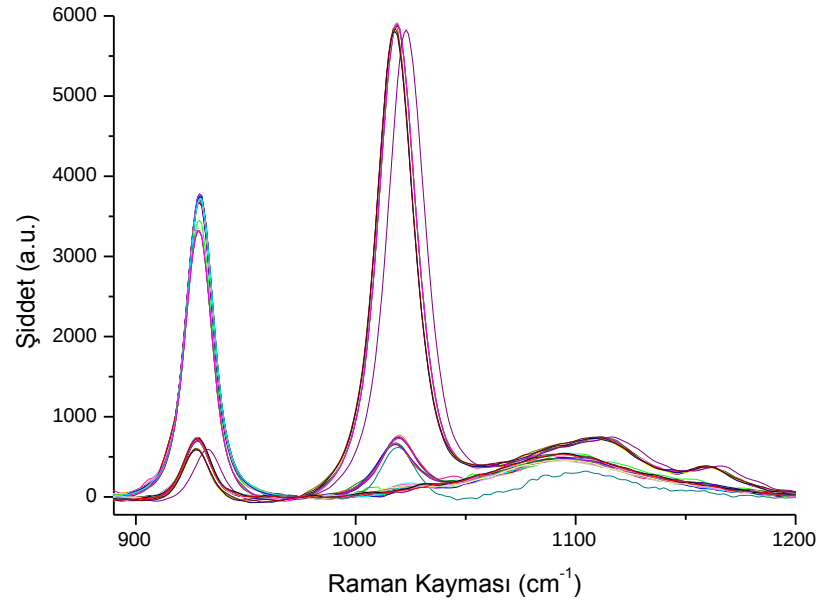
Düzleştirme yapılarak spektrumların istatistik analizi sonucunda gürültülerden kaynaklanan varyansların kimyasal yapıda değişiklik gösteriyormuş gibi sonuçlar doğurması engellendi. Bu varsayıma rağmen, bu önışlemin ne gibi farklar doğurduğunun gözlenmesi amacıyla çok değişkenli analiz süresince hem düzleştirme uygulanmamış, hem de uygulanmış veri takımlarıyla çalışılmıştır.

İstatistik analiz sürecinde, öncelikle içeriği oldukça karmaşık biyolojik moleküllerden oluşan serumun sonuçlarını basit bir örnekle anlayabilmek için 0.5 M ve 0.125 M konsantrasyonlarında iki farklı 100 mL sodyum asetat çözeltisi metanol ile hacimce %10, %1, %0.1, %0.05 konsantrasyonlarında karıştırılarak Raman spektrumları 10 saniye pozlama zamanı ve 5 ardışık ölçüm ile alındı. Bu spektrumlara PCA uygulandı.

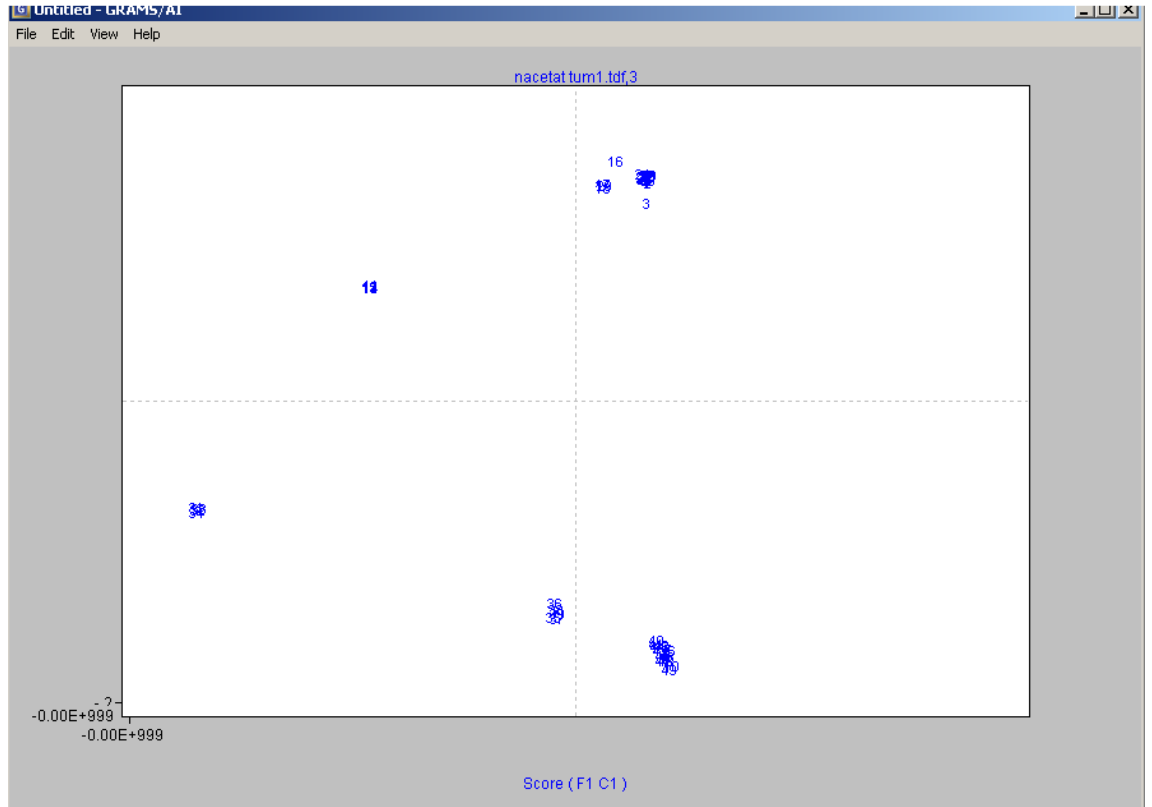
Şekil 4.16'da PCA için hazırlanan spektrumlar topluca gösterilmiştir. Şekil 4.17'de metanol ve sodyum asetatın en şiddetli bantları gözüküyor. Temel bileşenler analizi anlamında yalnızca bu bölge alınarak işlem yapılabilirdi. Fakat iki kimyasala ait diğer bantlardaki değişimler de katılmak istendiği için floresans ve gürültü bölgeleri hariç tüm bölge için hesap yapıldı.



Şekil 4.16 : 10 farklı konsantrasyonda sodyum asetat methanol karışımı

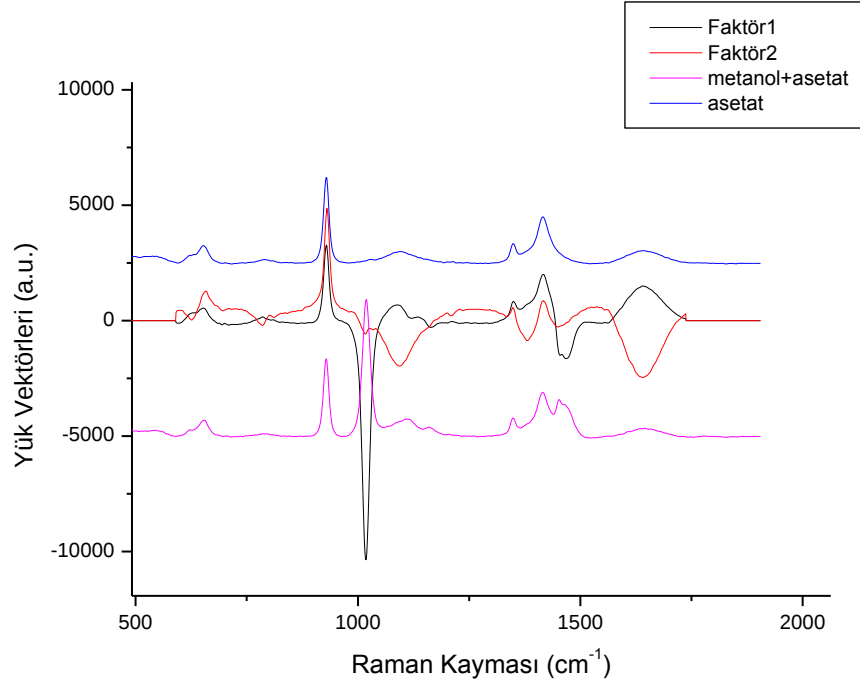


Şekil 4.17 : Sodyum asetat ve metanaole ait bantlar



Şekil 4.18 : 490-1740 cm⁻¹ bölgesinde sodyum asetat-metanol karışımı spektrumunun PCA analizi için skor grafiği.

Şekil 4.18’de sodyum asetat metanol karışımı için skor grafiği verilmiştir. 10 farklı konsantrasyondaki spektrumlara ait skorlar grafikte görülüyor. Konsantrasyon 10^{-4} mertebelerine geldiğinde spektrumlar birbirine çok yaklaştığından skor grafiğindeki değerler de birbirinden ayırt edilemezler. $490-1740\text{ cm}^{-1}$ bölgesi dalga sayısına karşı yük vektörleri grafiği de Şekil 4.19’da verilmiştir. Bu grafikte karşılaştırmanın yapılabilmesi için su+sodyum asetat çözeltisi spektrumu ve 0.5 M sodyum asetat metanol spektrumu aynı grafikte verilmiştir.

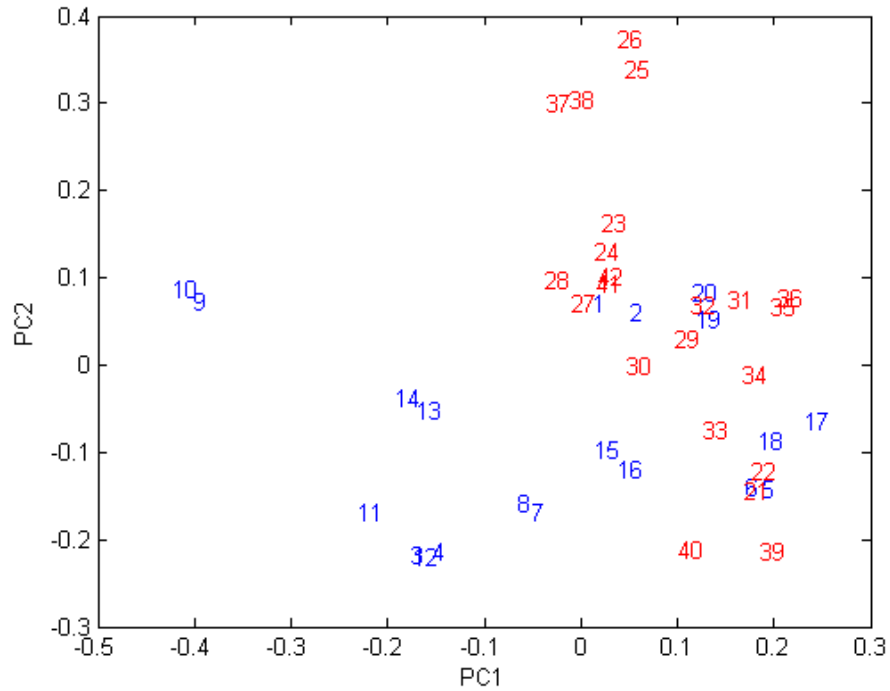


Şekil 4.19 : Elde edilen spektrumlar ve en yüksek açıklama oranlı iki vektör

Şekil 4.19’da birinci faktör spektrumunda en şiddetli tepe noktası 1014 cm^{-1} ’deki metanol bandıdır. Birinci faktörde negatif bir tepe noktası görülürken, ikinci faktörde bu noktada bir tepe noktası görülmemiyor. Sodyum asetat spektrumunda da bu noktada bir tepe noktası görülmemesi ikinci faktörün büyük oranda sodyum asetatla ilişkili olabileceğini gösteriyor. 1014 cm^{-1} ’deki tepe noktasının negatif olması ise bu bantta bir ters korelasyon olduğunu gösteriyor. Bu ilişkili olduğu bandın durumuna göre artma ya da azalma olabilir. İkinci faktör 1091 ve 1640 cm^{-1} dalga sayılarında açık ve şiddetli ters tepe noktaları veriyor. Bu tepelerin her ikisi de asetata ilişkin olduğundan, bu bölgelerde ters korelasyon olduğu yorumu yapılabilir. Metanol konsantrasyonunun kontrollü olarak

azaltıldığı için bu bantta görülen tepe noktasının bir negatif varyasyonu gösterdiği, yani konsantrasyonlardaki azalmayı doğruladığı söylenebilir. Metanole ait olan 1463 cm^{-1} tepe noktasında yine bir tepe noktası görülüyor. Bu bölgede su bandında azalan şiddetler bu ters korelasyona neden olmuştur..

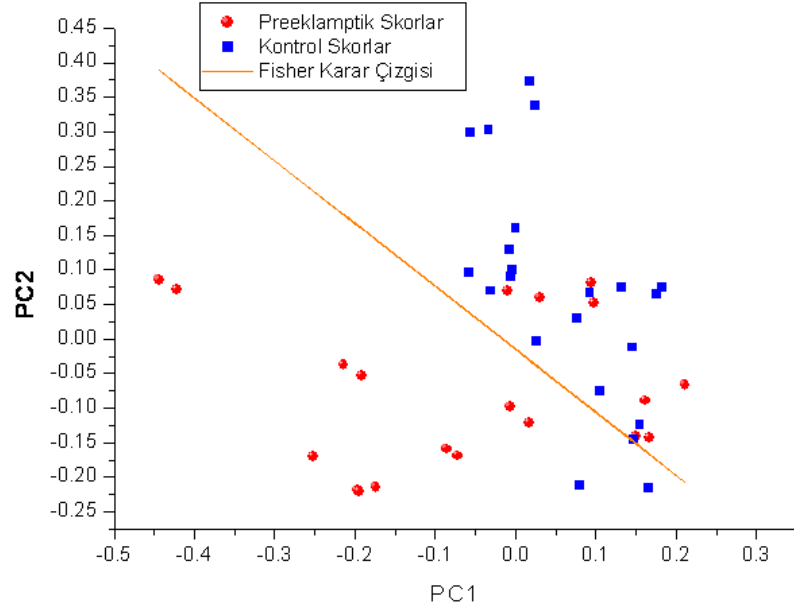
Serum spektrumlarının istatistik analizine PCA skorları hesaplanarak başlandı. Şekil 4.20’de görülen skor grafiğinde kontrol spektrumlarına ait skorların 25,26,37,38 numaralı spektrumlar hariç çok fazla saçılmadığı görülüyor. Şekilde 3,4, 7-10, 12-16 arası numaralandırılmış skorlar preeklampitik spektrumlara ait olup iyi bir kümelenme oluşturmuşlardır. Kalan preeklampitik spektrumlar saçılmalardan dolayı kontrol spektrumlarına ait skorlarla aynı bölgede görünüyor.



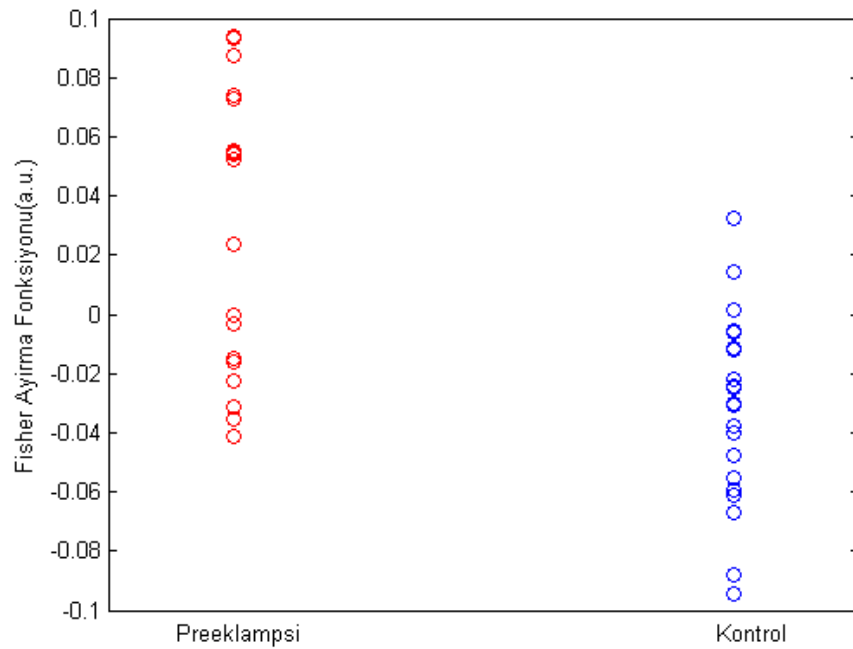
Şekil 4.20 : Serum Raman spektrumları $380\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ bölgesi için PCA skorları

Şekil 4.20’deki skor grafiği hasta örneklerin bulunması anlamında açıklayıcı sonuçlar veriyor. Bu sonuçları nicel olarak ifade etmek için doğrusal ayırma analizi (LDA) kullanıldı. Şekil 4.21’de Şekil 4.20’de verilen skor grafiğine Fisher karar çizgisi çekilmiştir. Buna göre sınıflandırma hatası preeklampitik örnekler için 7/20, kontrol grubu için 2/22’dir. Şekil 4.23’te yalnızca iki sınıf olduğu bilindiğinden, bu özel durum

için Fisher mesafeleri hesaplanarak kontrol ve preeklampitik spektrumların nasıl gruplandırıldığı gösterilmiştir.

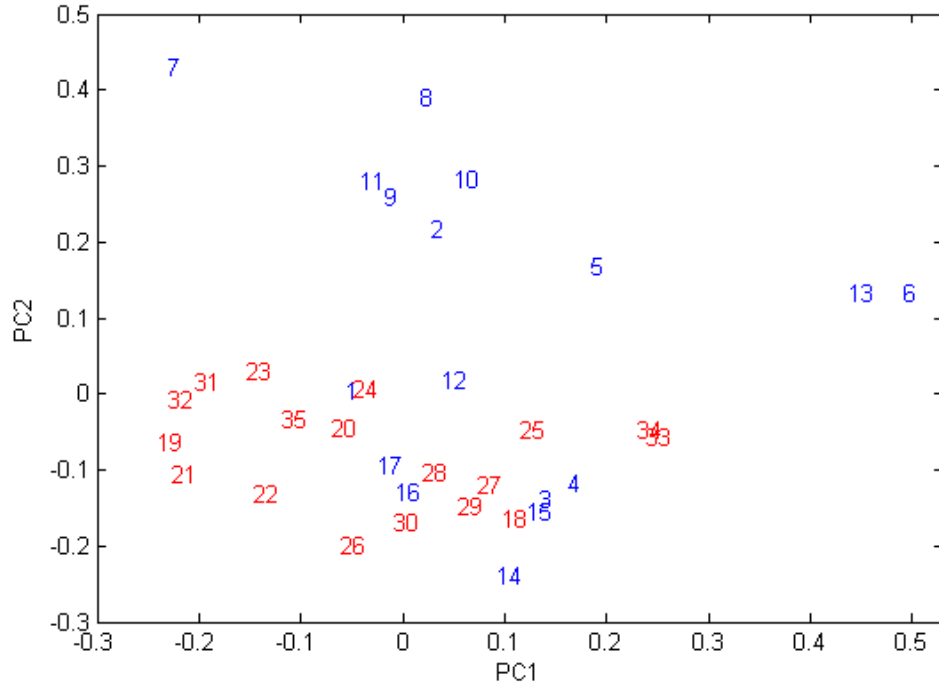


Şekil.4.21 : Serum spektrumları için PCA skorları. Fisher ayırma çizgisi ile birlikte Şekil 4.22'deki sınıflandırma hatası kırmızı renkli preeklampitik spektrumlar için 7/20, mavi renkli kontrol spektrumları için 2/22'dir. Bulunan sonuçlar Şekil 4.22 ile aynıdır.

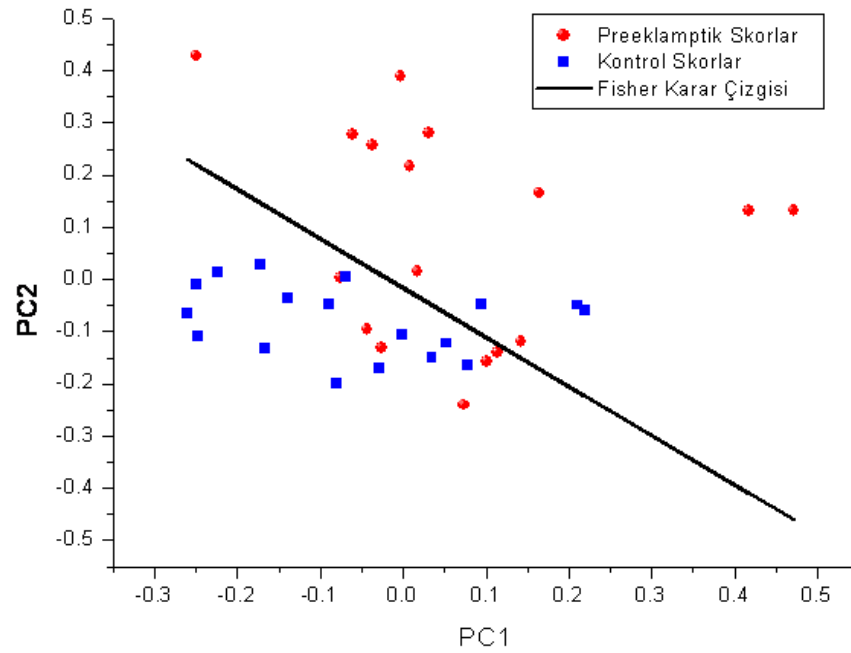


Şekil 4.22 : Kontrol ve preeklampitik serum spektrumları LDA skorları

Şekil 4.23’de 17 preeklampitik 18 kontrol spektrumu plazma spektrumları için yapılan PCA analizi sonucunda skor grafiği verilmiştir. Şekilde mavi renkli skorlar preeklampitik, kırmızı renkli skorlar ise kontrol spektrumlarını temsil ediyor.

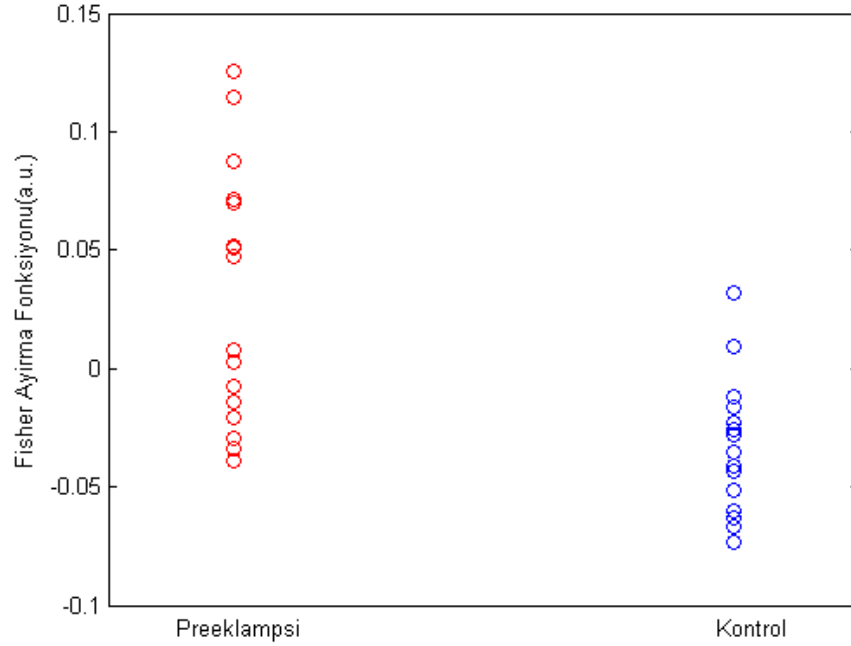


Şekil 4.23 : Plazma spektrumları için PCA skor grafiği



Şekil 4.24 : Plazma spektrumlarının skor grafiği; Fisher karar çizgisi ile birlikte

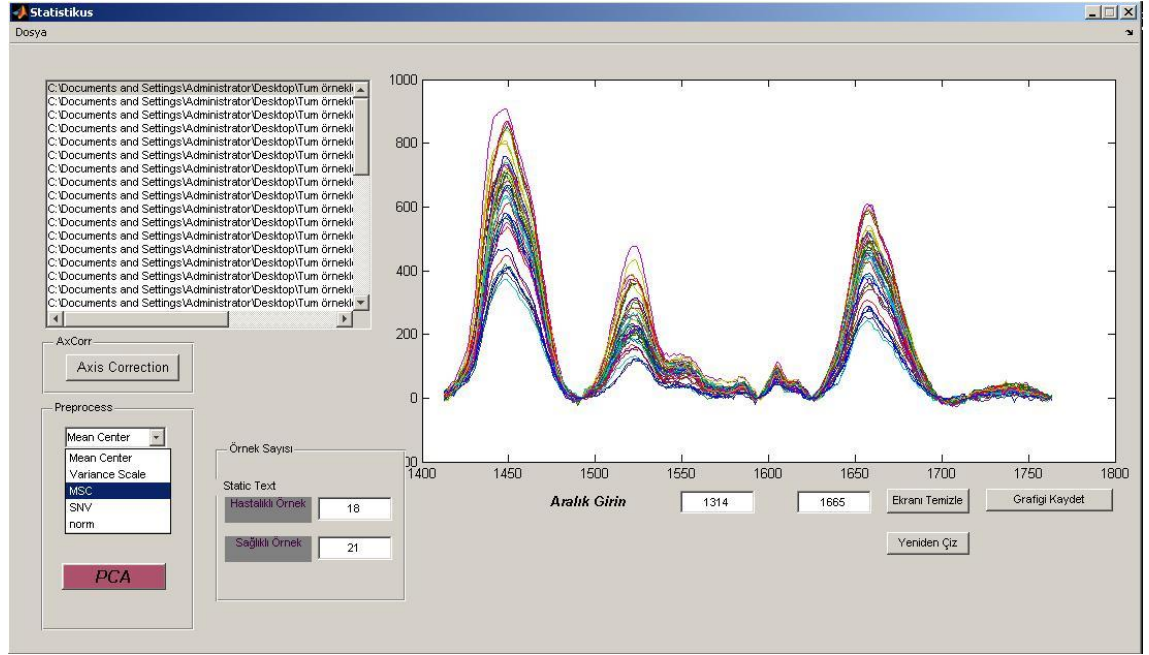
Grupları birbirinden ayırmak için Şekil 4.24'te doğrusal ayırma fonksiyonu olan Fisher karar çizgisi çekildi. Böylece sınıflandırma nicel olarak değerlendirilebildi. Şekil 4.24'te ayırma çizgisinin yaptığı sınıflandırmaya göre 3/18 kontrol, 5/17 preeklampatik spektrumların skorlarında yanlış sınıflandırma yapılmıştır.



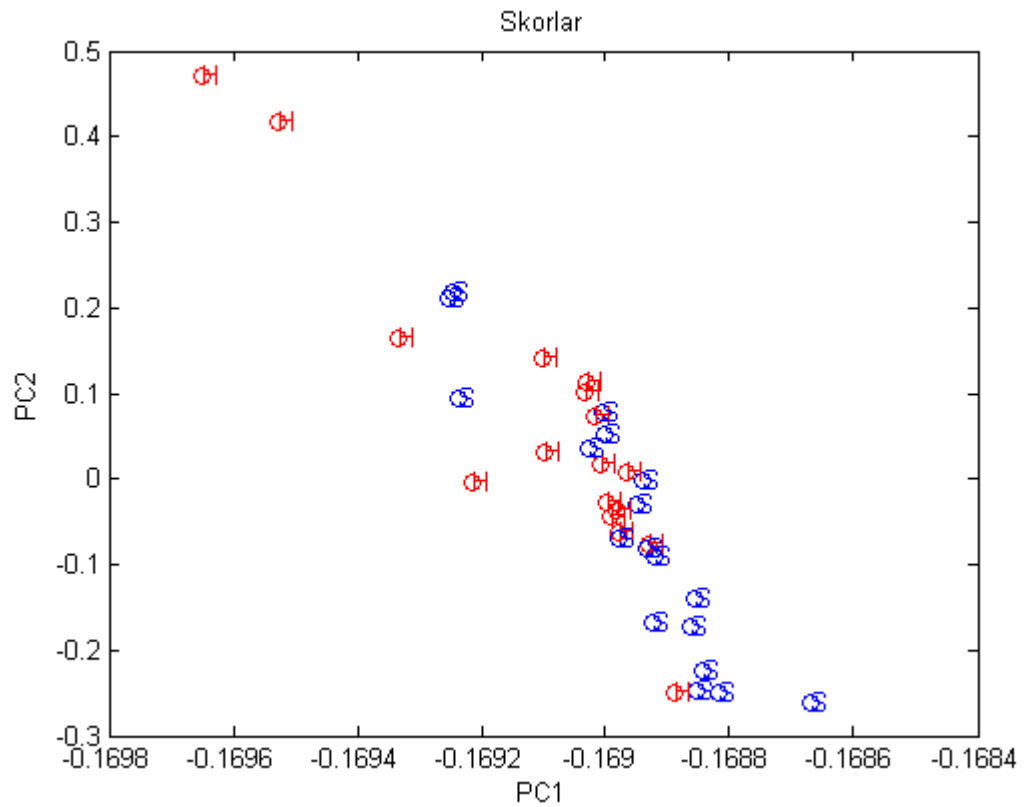
Şekil 4.25 : Plazma spektrumlarının Fisher ayırma fonksiyonu grafiği

Şekil 4.25'de plazma spektrumları için LDA uygulanmıştır. Serum spektrumları için de uygulanan bu yöntem de ilk grafikte yalnızca iki örnek olduğu bilindiğinden yalnızca Fisher uzaklıklarına göre skorlar hesaplanıyor ve ayırım bulunuyor. Sınıflandırma sonuçlarına göre 5/20 preeklampatik, 2/22 kontrol örneklerinde yanlış sınıflandırma yapılmıştır.

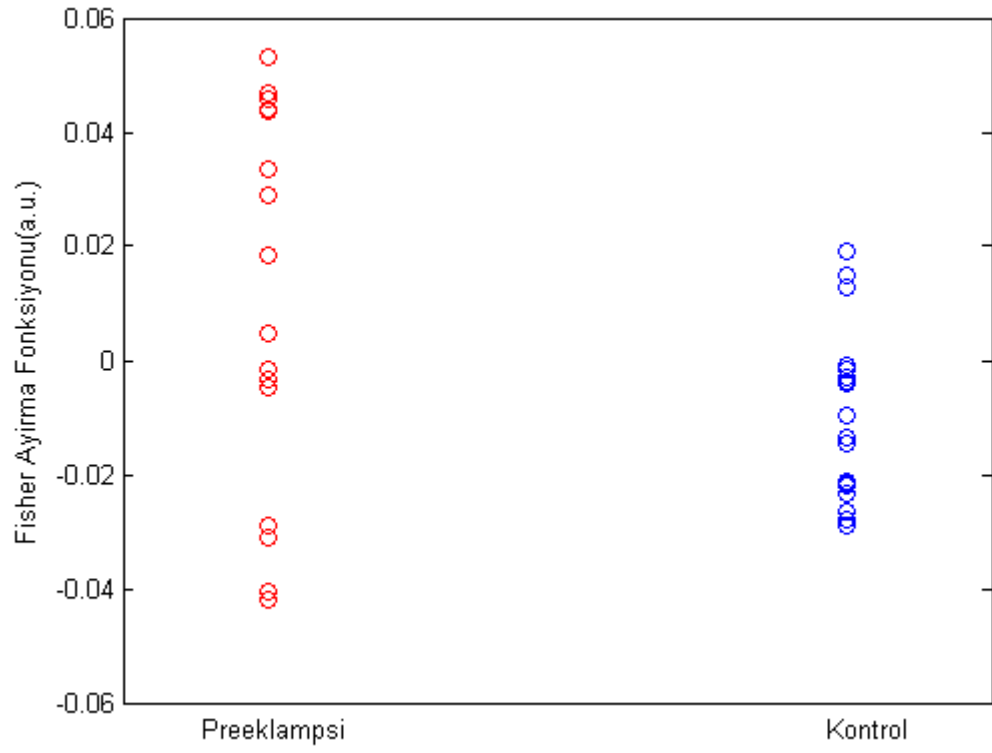
PCA-LDA analizinin yapılması için Matlab platformunda Şekil 4.27'deki gibi bir arayüz hazırlandı. Bu arayüzle yapılan hesaplar Grams PLS PLUS IQ ile benzer sonuçlar sağladı. Fakat çapraz sağlama (cross validation) yapılamadığından bazı farklılıklar gösterdi. Analiz sonuçları Şekil 4.28-4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.26: PCA-LDA analizi için hazırlanan arayüzün ekran görüntüsü



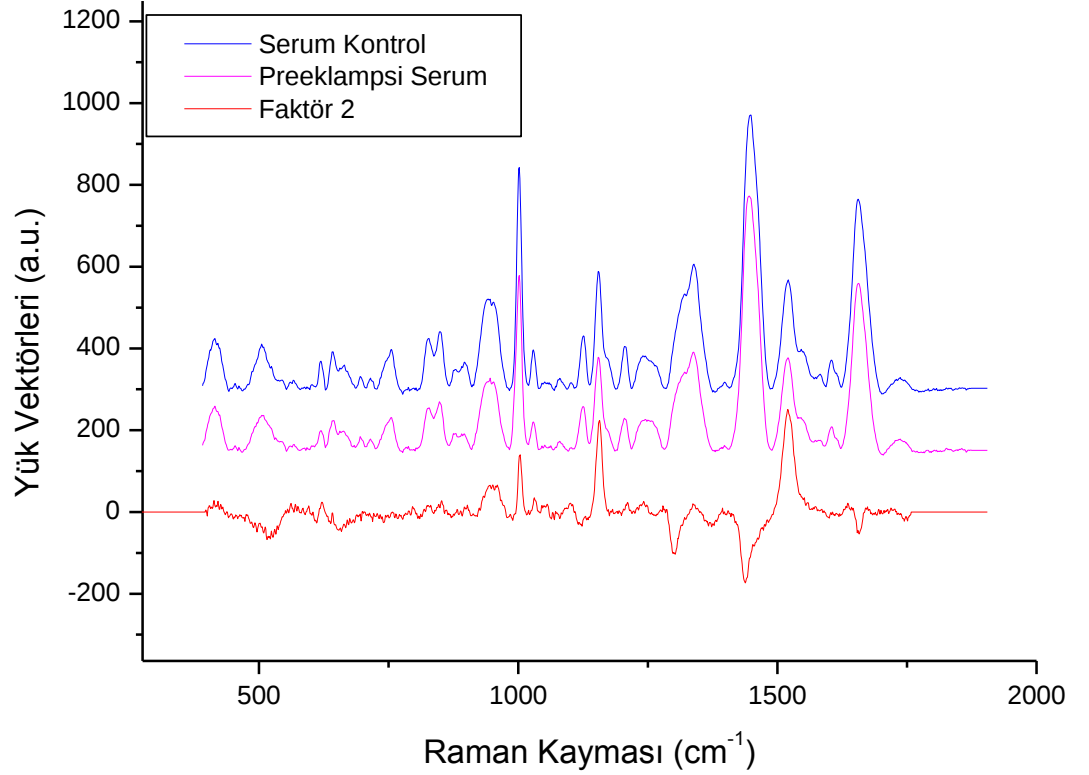
Şekil 4.27 : Plazma spektrumları için Matlab’da hesaplanan skor grafiği



Şekil 4.28 : Plazma spektrumları için Matlab’da hesaplanan LDA skor grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Elde edilen spektrumlarda hangi moleküllerde farklılıklar oluştuğunun çok değişkenli analiz yöntemiyle gözlenebilmesi için PCA özvektörleri veya diğer adıyla yük spektrumu kullanıldı. Özvektörler skorlarda olduğu gibi GRAMS AI-PLS PLUS/IQ yazılımı ile bulundu. Algoritmada özvektör sıralamasının nasıl yapıldığı bilinmediğinde, önemlilik dereceleri Origin 8 programında t-kare testi ($p>0.05$) yapılarak bulundu. Şekil 5.1’de serum Raman spektrumlarının PCA analizi sonucu seçilen özvektörü ortalama preeklampsi serum spektrumu ve ortalama kontrol spektrumu ile birlikte dalga sayısına göre grafiği verilmiştir.



Şekil 5.1 : Serum spektrumları PCA yük grafikleri ve kontrol ve preeklampatik örnekler

Yük grafiğine bakıldığında şiddetli tepe noktası veren dalga sayıları varyansın yüksek olduğu bileşenler hakkında bilgi veriyor. Düşük şiddetli yük vektörleri ölçümlerden kaynaklanan şiddet farklılıkları, önışlemlere rağmen yok edilemeyen taban farklılıkları

hakkında bilgi veriyor. 941, 958, 1003, 1156, 1522 cm^{-1} bantlarında pozitif korelasyon görüldü. Çalışma grubumuzdan Şeyma Şeninak'ın yaptığı, sonuçları Tablo 4.1'de verilen bant bileşen analizi çalışmaları ve hastalığın moleküler yapısı hakkında bilgi veren referanslara dayanarak özvektör yönlerinden pozitif olanı azalma, negatif olanı artma yönünde seçildi. Özvektör grafiğinde görülen konsantrasyonu azalan bantlardan 941 cm^{-1} arjinin molekülüne aittir. Preeklampsi patogeneğinde arjinin, çok güçlü bir endojen vazodilatör olan NO⁻ sentezinden sorumludur ve azalması beklenir [40]. 621 cm^{-1} 'deki protein bandında, 958 cm^{-1} 'de ve 827 cm^{-1} 'deki C-H rock moduna atanan bantlarda ve 851 cm^{-1} 'deki tirozine ait C-C gerilme bağlarında azalma bulunmuştur. 827 ve 851 cm^{-1} 'deki bantların yük spektrumu şiddet değerleri t-kare testi sonucu bulunan güven aralığı içinde bulunmadığından bu bölgedeki azalmaların ölçümler sonucu oluşan şiddet farklılıkları ya da eşitlenemeyen taban düzeylerinden kaynaklandığı söylenebilir. 1003 cm^{-1} 'de fenilalanin bandındaki azalmaya işaret eden güçlü bir pik bulunmaktadır. 1341 cm^{-1} 'de triptofan aminoasidine ait bantta azalma bulunmuştur. 1156 ve 1521' cm^{-1} 'deki beta karotene ait bantta azalma olduğu tespit edilmiştir. Konsantrasyonu artan bantlar 523, 1300, 1440, 1657 cm^{-1} 'de bulunmuştur. Bu bantlardan 523 cm^{-1} 'de sistin aminoasidinin konsantrasyonu preeklampitik spektrumlarda beklendiği ve Tablo 5.1'de görüldüğü gibi artmaktadır.

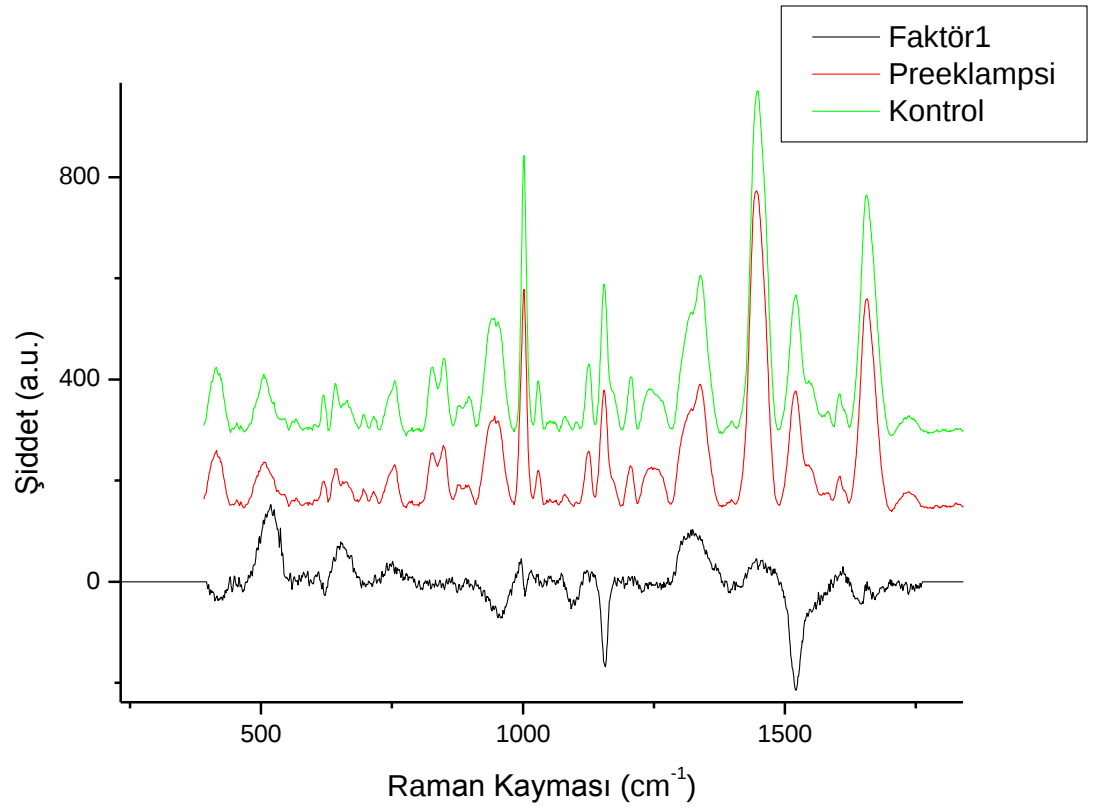
Tablo 5.1 : Preeklampitik ve sağlıklı serum spektrumlar için bant atamaları

Preeklampsi	Sağlıklı	
Raman Kayması Frekansı (cm^{-1})		Band Ataması
523.88 ± 2.54	524.84 ± 2.23	S-S disulfide stretch, sistin
654.33 ± 2.23	654.70 ± 2.44	
827.10 ± 0.94	827.01 ± 1.00	CH rock in CH ₂ , Tirozin
941.98 ± 1.62	941.34 ± 1.05	Skeletal stretch α , arginin
958.22 ± 0.82	957.65 ± 0.64	CH ₂ rock
1003.11 ± 0.48	1003.11 ± 0.38	Fenilalanin
1156.45 ± 0.38	1156.57 ± 0.42	Beta Karoten
1298.16 ± 1.20	1299.03 ± 1.18	Palmitik asit, $\delta(\text{CH}_2)$ twisting, lipid, kollajen
1341.88 ± 0.58	1341.94 ± 0.67	Triptofan, Adenin, α heliks, Fosfolipid
1442.24 ± 0.91	1443.60 ± 0.44	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, (lipid ve protein)
1522.05 ± 0.58	1522.07 ± 1.21	Beta Karoten
1655.15 ± 0.73	1655.33 ± 0.97	Amid I, $\nu(\text{C=O})$, α heliks, C=C Lipid Gerilme

Ayrıca 1300 cm^{-1} ve 1440 cm^{-1} 'de yağ asitleriyle ilişkili olan CH₂ bükülme modu bulunmaktadır. Bu bantta da artış yük vektörleri aracılığıyla görülmüş ve bant bileşen

analizi sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Preeklampsi patogenezinde verildiği üzere lipid peroksidasyonu sonucu Preeklampsi hastasının kan serum ve plazmasında yağ asitleri konsantrasyonu artar. Bu artış doğumdan hemen sonra normale döner.

Şekil 5.2’de plazma spektrumları için yük vektörleri ortalama kontrol ve ortalama preeklampsi serum spektrumu ve ortalama kontrol spektrumu ile birlikte dalga sayısına göre grafiği verilmiştir.



Şekil 5.2 : Plazma spektrumları yük vektörleri

Şekil 5.2 incelendiğinde artış gösteren bantlar 520, 655, 1334, 1443 cm^{-1} ’de bulunmuştur. Konsantrasyonu azalan bantlar ise 420, 621, 1001, 1101, 1157, 1401, 1522 cm^{-1} ’de bulunmuştur. Tablo 5.2’de bu bantların hangi molekül veya titreşim modlarına karşılık geldiği verilmiştir. Serum spektrumları için açıklanmayan bantlardan 621 cm^{-1} ’de C-C twisting modu atanmıştır. 1001, 1101 ve 1401 cm^{-1} ’de ise fenilalanin molekülüne ait bantlar vardır. Fenilalanin seviyesindeki bu azalmanın nedeni oksidatif stres reaksiyonlarında fenilalaninin hidrokstile olup tirozine dönüşerek konsantrasyonunun azalmasıdır. Buradaki azalmalar serum spektrumlarıyla paraleldir.

420 cm^{-1} 'de bulunan bantta bir azalma hesaplanmıştır. Fakat bu banda karşılık bir atama yapılamamıştır. Beta karotene ait 1157 ve 1522 cm^{-1} bantlarındaki azalma, 1443 cm^{-1} 'deki yağ asitleri konsantrasyonundaki artma serum spektrumları ile paraleldir.

Tablo 5.2 : Plazma spektrumları için bant bileşen analizi sonu elde edilen atamalar

Preeklampsı	Sağlıklı	
Dalga Sayısı (Raman Kayması (cm^{-1}))		Band Ataması
523.98 $\pm$ 2.50	524.83 $\pm$ 2.23	S-S disulfide stretch, sistin
621.53 $\pm$ 0.98	621.66 $\pm$ 0.76	C-C twisting, fenilalanin
652.95 $\pm$ 2.67	653.33 $\pm$ 3.79	
743.64 $\pm$ 1.57	744.07 $\pm$ 1.32	fosfolipid
958.11 $\pm$ 0.59	958.15 $\pm$ 1.03	CH2 rock
1003.05 $\pm$ 0.45	1003.32 $\pm$ 0.43	Fenilalanin
1104.72 $\pm$ 1.50	1104.84 $\pm$ 1.32	Fenilalanin
1126.79 $\pm$ 0.48	1127.21 $\pm$ 0.45	$\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-C})$, Protein, Fosfolipid
1156.47 $\pm$ 0.38	1156.58 $\pm$ 0.32	Beta Karoten
1320.80 $\pm$ 1.07	1320.78 $\pm$ 0.87	CH3 CH2 twisting, kollajen
1442.53 $\pm$ 0.94	1443.95 $\pm$ 0.52	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, (lipid ve protein)
1451.15 $\pm$ 0.67	1451.92 $\pm$ 0.64	
1460.81 $\pm$ 0.78	1461.90 $\pm$ 0.55	
1521.93 $\pm$ 0.44	1522.28 $\pm$ 0.97	Beta Karoten
1605.09 $\pm$ 0.64	1605.29 $\pm$ 0.43	$\delta(\text{C=C})$, Tirozin, Fenilalanin, Histidin
1615.78 $\pm$ 1.17	1615.91 $\pm$ 0.68	$\nu(\text{C=C})$, Triptofan, Tirozin

Yapılan kemometrik hesaplamalar sonucunda PCA ve LDA skorları kullanılarak hastalıklı örnekler sağlıklı örneklerden büyük oranda ayırt edilmiştir. PCA analizi sonucu özvektör spektrumu kullanılarak hastalığa neden olan biyokimyasal faktörler %95 güven aralığındaki vektör şiddetine sahip dalga sayıları kullanılarak bu dalga sayılarına karşılık gelen titreşim modları literatür taraması ve Spectral ID yazılımı yardımıyla bulunmuştur. LDA analizi sonucunda bulunan yanlış sınıflandırma oranları örnek sayısının nispeten az olduğu bu çalışmada sınıflandırmanın beceresini ortaya koyamayabilir. Fakat örnek sayısı 100 ve üzerine çıkarıldığında yüzde sınıflandırma hatasının Fisher ayırma fonksiyonu ile düşmesi beklenir.

Kan örnekleriyle alınan spektrumlar istatistik analiz kapsamında değerlendirilecek sayıda olmadığı için tez kapsamında değerlendirmeye alınmamıştır. Tuzaklanmış kan örneklerinde görülebilecek farklılıklar ileriki çalışmalarda incelenecektir.

EK**MATLAB'DA HAZIRLANAN ARAYÜZ İÇİN YAZILAN KOD SATIRLARI****Statistikus.m**

```

function varargout = Statistikus(varargin)
% STATISTIKUS M-file for Statistikus.fig
%     STATISTIKUS, by itself, creates a new STATISTIKUS or raises the
existing
%     singleton*.
%
%     H = STATISTIKUS returns the handle to a new STATISTIKUS or the
handle to
%     the existing singleton*.
%
%     STATISTIKUS('CALLBACK', hObject,eventData,handles,...) calls the
local
%     function named CALLBACK in STATISTIKUS.M with the given input
arguments.
%
%     STATISTIKUS('Property','Value',...) creates a new STATISTIKUS
or raises the
%     existing singleton*. Starting from the left, property value
pairs are
%     applied to the GUI before Statistikus_OpeningFunction gets
called. An
%     unrecognized property name or invalid value makes property
application
%     stop. All inputs are passed to Statistikus_OpeningFcn via
varargin.
%
%     *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows
only one
%     instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help Statistikus

% Last Modified by GUIDE v2.5 05-May-2010 20:34:26

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',   gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @Statistikus_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @Statistikus_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',   [] , ...
                  'gui_Callback',    []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargin
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});

```

```

else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

%% --- Executes just before Statistikus is made visible.
function Statistikus_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin    command line arguments to Statistikus (see VARARGIN)

% Choose default command line output for Statistikus
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes Statistikus wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = Statistikus_OutputFcn(hObject, eventdata,
handles)
% varargout    cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

% --- Executes on selection change in inputFiles_listbox.
function inputFiles_listbox_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to inputFiles_listbox (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns inputFiles_listbox
%         contents as cell array
%         contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from
inputFiles_listbox

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function inputFiles_listbox_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to inputFiles_listbox (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles     empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: listbox controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.

```

```

if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUiControlBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

%% ----Dosya Ekle-----
---
function Add_File_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Add_File (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

[input_file,pathname] = uigetfile( {'*.xls', 'Excel (*.xls)';'*.','*'.',
'All Files (*.*)'}, 'Select files','MultiSelect', 'on');

%if file selection is cancelled, pathname should be zero
%and nothing should happen
if pathname == 0
    return
end

%gets the current data file names inside the listbox
inputFileNames = get(handles.inputFiles_listbox,'String');

%if they only select one file, then the data will not be a cell
%if more than one file selected at once,
%then the data is stored inside a cell
if iscell(input_file) == 0

    %add the most recent data file selected to the cell containing
    %all the data file names
    inputFileNames{end+1} = fullfile(pathname,input_file);

else, data will be in cell format
else
    %stores full file path into inputFileNames
    for n = 1:length(input_file)
        %notice the use of {}, because we are dealing with a cell
        here!
        inputFileNames{end+1} = fullfile(pathname,input_file{n});
    end
end

%updates the gui to display all filenames in the listbox
set(handles.inputFiles_listbox,'String',inputFileNames);

%make sure first file is always selected so it doesn't go out of range
%the GUI will break if this value is out of range
set(handles.inputFiles_listbox,'Value',1);

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);
% -----
function File_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to File (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB

```

```
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
%% -----Dosya Oku-----
-----
```

```
function Read_File_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to Read_File (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
inputFileNames = get(handles.inputFiles_listbox, 'String');
```

```
l = length(inputFileNames);
```

```
if (l == 1)
    for x=1:l
        %display the file name on the command prompt
        inputFileNames{x};
        %display the excel data on the display prompt
        result = xlsread(inputFileNames{x});
    end
    k = xlsread(inputFileNames{1});
    wn = k(:,1);
else if (l > 1)
    a = inputFileNames;
    k = xlsread(inputFileNames{1});
    wn = k(:,1);
    [n,p] = size(a)
    result = zeros(size(k,1),n+1);
    result(:,1) = k(:,1);
        for x=2:(n+1)
            s = xlsread(inputFileNames{x-1});
            result(:,x) = s(:,2);
        end
    end
end
```

```
plot(wn,result(:,2:size(result,2)))
xlswrite('input.xls',result)
```

```
%% -----Dosya Sil-----
-----
```

```
function Delete_File_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to Delete_File (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
%get the current list of file names from the listbox
inputFileNames = get(handles.inputFiles_listbox, 'String');
```

```
%get the values for the selected file names
option = get(handles.inputFiles_listbox, 'Value');
```

```

%is there is nothing to delete, nothing happens
if (isempty(option) == 1 || option(1) == 0 || isempty(inputFileNames))
    return
end

%erases the contents of highlighted item in data array
inputFileNames(option) = [];

%updates the gui, erasing the selected item from the listbox
set(handles.inputFiles_listbox, 'String', inputFileNames);

%moves the highlighted item to an appropriate value or else will get
error
if option(end) > length(inputFileNames)
    set(handles.inputFiles_listbox, 'Value', length(inputFileNames));
end

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% --- Executes on button press in ResMatch.
function ResMatch_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to ResMatch (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
global wn f1 f2 input IntCor
f1 = str2double(get(handles.init, 'String'));
f2 = str2double(get(handles.final, 'String'));
input = xlsread('input.xls');
Int = AxisCorr(input);
IntCor = Int(f1:f2, 2:size(Int, 2));
wn = Int(f1:f2, 1);
plot(wn, IntCor)
handles.legend_plot = legend('data');
xlswrite('corrected.xls', Int)
delete('input.xls')

%% İlk ve Son Kullanici Degerleri
function init_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to init (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject, 'String') returns contents of init as text
%        str2double(get(hObject, 'String')) returns contents of init as
a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function init_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to init (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.

```

```

%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function final_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to final (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of final as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of final
%         as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function final_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to final (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      empty - handles not created until after all CreateFcns
%              called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

%% Grafik Sil
% --- Executes on button press in ClearPlot.
function ClearPlot_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to ClearPlot (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
cla

%% Hastalikli ve Saglikli ornek Kullanici girisi
function Disease_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to Health (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of Health as text
%         str2double(get(hObject,'String')) returns contents of Health
%         as a double

```

```

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function Disease_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Health (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

function Health_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Health (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of Health as text
%       str2double(get(hObject,'String')) returns contents of Health
as a double

% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function Health_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to Health (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns
called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'),
get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end

%% Preprocess Panel Kontrol
function preprocessPanel(hObject, eventdata)

%updates the handles structure

% --- Executes on selection change in PreProcessMenu.
function PreProcessMenu_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to PreProcessMenu (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: contents = get(hObject,'String') returns PreProcessMenu
contents as cell array
%       contents{get(hObject,'Value')} returns selected item from
PreProcessMenu

```

```

inputFileNames = get(handles.inputFiles_listbox, 'String');
Int = xlsread('corrected.xls');
f1 = str2double(get(handles.init, 'String'));
f2 = str2double(get(handles.final, 'String'));
IntCor = Int(f1:f2, 2:length(inputFileNames)+1);
size(IntCor)
wn = Int(f1:f2, 1);
xlswrite('wn.xls', wn)
data = IntCor';
size(data)
switch get(handles.PreProcessMenu, 'Value')
    case 1
        [S, P] = PCAmean(data);
    case 2
        [S, P] = PCAscale(data);
    case 3
        [S, P] = PCAbySVD(data);
    case 4
        [S, P] = PCA_SNV(data);
    case 5
        [S, P] = PCA_norm(data);
    otherwise
end
xlswrite('scores.xls', horzcat(S(:, 1), S(:, 2)))
%% PCA İçin Grafik Çizimi

figure, plot(wn, P(:, 1)) %% yük 1 plot
t1 = str2double(get(handles.Disease, 'String'));
t2 = str2double(get(handles.Health, 'String'));
title('Yük 1'); xlabel('Raman Shift(cm^-1)'); ylabel('Loading1');
figure, plot(wn, P(:, 2)) %% yük 2 plot
title('Yük 1'); xlabel('Raman Shift(cm^-1)'); ylabel('Loading2');
figure, plot(S(1:t1, 1), S(1:t1, 2), 'ro', S(t1+1:t1+t2, 1), S(t1+1:t1+t2, 2), 'bo') %% skor plot
text(S(1:t1, 1), S(1:t1, 2), 'H', 'Color', [1 0 0])
text(S(t1+1:t1+t2, 1), S(t1+1:t1+t2, 2), 'S', 'Color', [0 0 1])
x = S(:, 1); y = S(:, 2);
xlim('auto')
ylim('auto')
title('Skorlar'); xlabel('PC1'); ylabel('PC2');
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function PreProcessMenu_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to PreProcessMenu (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: popupmenu controls usually have a white background on Windows.
%         See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject, 'BackgroundColor'),
get(0, 'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject, 'BackgroundColor', 'white');
end

```

```
% --- Executes on button press in Save_Plot.
function Save_Plot_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to Save_Plot (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)
handles.legend_plot = legend('data');
savePlotWithinGUI(handles.plotSpec,handles.legend_plot);

% --- Executes on button press in RePlotButton.
function RePlotButton_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject      handle to RePlotButton (see GCBO)
% eventdata    reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles      structure with handles and user data (see GUIDATA)

inputFileNames = get(handles.inputFiles_listbox,'String');
Int = xlsread('corrected.xls');
f1 = str2double(get(handles.init,'String'));
f2 = str2double(get(handles.final,'String'));
IntCor = Int(f1:f2,2:length(inputFileNames)+1);
size(IntCor)
wn = Int(f1:f2,1);
plot(wn,IntCor)
```

sort_eig.m

```
function [v,d]=sort_eig(a);

[v,d]=eig(a);
eval=diag(d);
[y,index]=sort(-abs(eval));
v=v(:,index);
d=diag(eval(index));
```

PCA_mean.m

```
function [S, P] = PCA_mean(data)

veri = data(:,2:size(data,2))';
k = data(:,1);
%% ortalamaya göre düzelt
veri = mncenter(veri,1);

%% kovaryans
sigma = cov(veri);

%% özdeğer ve özvektörler
[P,val]=sort_eig(sigma);
P = -1*P;
S = veri*P;
```

PCA_MSC.m

```
%function [scores, loadings] = PCA(veri)

%% veri al
%x= xlsread('corrected.xls','A296:AJ1661');
veri = x(:,2:size(x,2))';
k = x(:,1);
[n,p] = size(veri);
%% to unit vector
%veri = veri/ norm(veri);

%% ortalamaya göre düzelt
ver = mncenter(veri,1);

%veri = veri./repmat(std(veri),size(veri,1),1);

%% scale
v = MSC(veri);

%% kovaryans
sigma = cov(veri);

%% özdeğer ve özvektörler
[P,val]=sort_eig(sigma);
P = -1*P;
%% PCA skorları ve grafiği
S = ver*P;
loadings = P;
```

MSC.m

```
function b = MSC(data)
[n,p] = size(data);
x = mean(data);

for i = 1:n
    y = data(i,:);
    fit = polyfit(x,y,1);
    b(i,:) = (data(i,:)-repmat(fit(2),1,p))/fit(1);
end
```

SNV.m

```
function s = SNV(veri)

mx = mncenter(veri,1);
s = norm1(mx);

s = mx./repmat(std(veri,0,1),size(veri,1),1);
```

SVD.m

```
function SVD(x)
k = x(:,1);
data = x(:,2:size(x,2))';
[M,N] = size(data);

% subtract off the mean for each dimension
data = MSC(data);
data = mncenter(data,2);

[u,s,v]=svd(data);
v=-v;
u=u(:,1:4);
s=s(1:4,1:4);
v=v(:,1:4);
```

AxisCorr.m

```
function doc = AxisCorr(input)
%input = xlsread('input.xls');
vm = input(:,1);

intensity = input(:,2:size(input,2));
[n,p] = size(intensity);

im =(100:1905)';

[k,l] = size(im);
t = intensity';

for i=1:k
dist = (vm-(repmat(im(i,:),n,1))).^2;
[sortval, sortpos] = sort(dist,'ascend');
xDist(:,i) = sqrt(sortval(1:2));
s(:,i) = sortpos(1:2,:);
prop(:,i) = xDist(1,i)/(xDist(2,i)+xDist(1,i));
end

    for j= 1:p
        for i=1:k
            newInt(j,i) = prop(i)*(t(j,s(2,i))-
t(j,s(1,i)))+t(j,s(1,i));
        end
    end

z = zeros(k,p);

    for i=1:p
        z(:,i) = newInt(i,:);
    end

doc = zeros(k, (p+1));
doc(:,1) = im;
```

```

for i=2:(p+1)
    doc(:,i) = z(:,i-1);
end

```

LDA.m

```

a = xlsread('fileLDA.xls',1);
[n,p] = size(a);

n1 = input('hastalikli ornek sayisi giriniz:');
n2 = input('sagikli ornek sayisi giriniz:');
x1 = a(1:n1,:); x2= a(n1+1:n1+n2,:);
mna = mncenter(a,1);
m1 = mncenter(x1,1); m2 = mncenter(x2,1);

%mn1 = mna(1:n1,:); mn2 = mna(n1+1:n,n,:);
mu1 = mean(x1); mu2 = mean(x2);
c1 = cov(m1); c2 =cov(m2);

cov3 = (n1-1/n-2)*c1+(n2-1/n-2)*c2;
iCov3=cov3^-1;
mnBar = mu1-mu2;
mnSum = mu2 + mu1;

for i = 1:n
    f(i,:) = mnBar*iCov3*a(i,:)'- 0.5*mnBar*iCov3*mnSum';
    fa(i,:) = 0.5*log(det(c1)) + 0.5*(a(i,:)-mu1)*c1^-1*(a(i,:)-mu1)';
    fb(i,:) = 0.5*log(det(c2)) + 0.5*(a(i,:)-mu2)*c2^-1*(a(i,:)-mu2)';

    if (fa(i,:) > fb (i,:))
        label(i) = 1;
    else
        label(i) = 2;
    end
end
[r1,c1] = find(label == 1); [r2,c2] = find(label == 2);
LD1 = fa(c1); LD2 = fb(c2);
figure,plot(c1,LD1,'ro',c2,LD2,'bo',0:42,repmat(0,43,1),'k')
xlabel('Örnek No(a.u.)'); ylabel('Açıklanan Uzaklık(a.u.)');
title('LDA')
createfigure(3,f(1:n1,:),5,f(n1+1:n1+n2))
xlim([2.5 5.5])
ylim ('auto')

```

KAYNAKLAR

- [1] BAUMANN, M. U.; BERSINGER N. A., SURBEK D.V., Molecular Aspects of Medicine 28 (2007) 227–244
- [2] ARISAN, K., Doğum Bilgisi, volum 2, 1989, sf 970-1010
- [3] TALLEDO, O.E., 1966. Renin–angiotensin system in normal and toxemic pregnancies. I. Angiotensin infusion test. Am. J. Obstet. Gynecol. 96, 141–143.
- [4] REDMAN, C.W., Sargent, I.L., 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. Science 308, 1592–1594.
- [5] HUBEL, C.A., ROBERTS J.M., TAYLOR R.N., Lipid peroxidation in pregnancy: New perspectives on preeclampsia. Am J Obstet Gynecol (1989);161:1025-1034.
- [6] HALLIWELL, B., (1995) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochemical Pharmacology 49(10), 1341-1348
- [7] ALTAN, N., DİNÇEL, A.S., KOCA, C., Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2); 51–56.
- [8] EIZIRIK, D.L., FLODSTRÖM, M., KARLSEN. A.E., WELSH, N., (1996) The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic β cells. Diabetologia 39(8), 875-890.
- [9] LEVINE, R.L., Ischemia: from acidosis to oxidation. FASEB J. 1993 ; 7(13): 1242-1246.
- [10] MONCADA, S., HIGGS, A., 1993. The L-arginine–nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med. 329, 2002–2012

- [11] KNOCK, G.A., POSTON. L., Bradykinin-mediated relaxation of isolation maternal resistance arteries in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1668-1674.
- [12] HENRIKSEN. T., The role of lipid peroxidation and oxidative lipid derivatives in the development of preeclampsia. *Semin Perinatol* 2000; 24:29-32.
- [13], ÖZKINAY, S. S., E. Preeklampsi etyopatogenizinde lipid peroksidasyonu. *T Klin Jineköl Obst* 2000; 10: 7-15.
- [14] ZETEROĞLU, Ş., ÜSTÜN, Y.E., ÜSTĞÜN, Y., GÜVERCİNCİ, M., KAMACI. M., DÜLGER, H., Preeklampsi ve Eklampsilerde Plasental Lipid Peroksidasyon Hasarı ve Klinikle ilişkisi; *Artemis*, Vol. 5(1); 2004 38-41.
- [15] KAYALI, R, ÇAKATAY U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpasa J Med* 2004; 35:83-89.
- [16] HUBEL, C.A.,Oxidative Stress in the Pathogenesis of Preeclampsia; *Society for Experimental Biology and Medicine* 1999;**222**:222-235
- [17] KENNYA, L. C., DUNNB, W B., ELLIS, D. I., MYERSA, J., BAKERA, P. N. Ve GOPEC Consortium, ve. KELLB, D.B., *Metabolomics* Vol. 1, No. 3, July (2005)
- [18] TURNER, E., BREWSTER.,J. A., SIMPSON, N.A.B., WALKER, J. J. ve FISHER, J., Fisher, *Hypertension in Pregnancy*, 26:329–342, 2007
- [19] TURNER, E., BREWSTER.,J. A., SIMPSON, N.A.B., WALKER, J. J. ve FISHER, J., *Hypertension in Pregnancy*, 27:225–235, 2008
- [20] NAKAMOTO, K., Elsevier,2003, ISBN: 978-0-12-254105-6
- [21] *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Molecules (NATO Science Series)*, 1979, ISBN: 9789027709660

- [22] XIE, C., GOODMAN, C., DINNO, A.M., LI, Y.Q., (170.5660) Raman spectroscopy; (170.1530) Cell analysis, 2004
- [23] VOLPE, G., SINGH, G., PETROV, D., APPLIED PHYSICS LETTERS 88, 231106 _2006
- [24] SANDSTORM, P.A., MANNIE, M.D., ve BUTTKE, T.M., Journal of Leukocyte Biology, Vol 55, Issue 2 221-226, Copyright © 1994 by Society for Leukocyte Biology
- [25] WOOD, B., CASPERS, P., PUPPELS, G.J., PANDIANCHERRI, S., McNAUGHTON, D., Anal Bioanal Chem (2007) 387:1691–1703
- [26] BANERJEE, H., ZHANG, L., Molecular and Cellular Biochemistry 295: 237-240, 2007
- [27] CHAN, J., FORE, S., HOGIU, S.W., HUSER, T., Laser & Photon. Rev. 2, No. 5, 325–349 (2008)
- [28] JONES, J.F., DEICK, J.D., IMOUDU, D., CHUKWUMAH, N., VIGEANT, M., VELEGOL, D., Applied and Environmental Microbiology, November 2003, p. 6515-6519, Vol. 69, No. 11
- [29] MAMMEN, M., HELMERSON, K., KISHORE, R., CHOI, S.K., PHILIPS, W.D., WHITESIDES, G., Chemistry & Biology, Volume 3, Issue 9, 757-763, 1 September 1996
- [30] BIANCENIELLO, P.L., CROCKER, J.C., Rev. Sci. Instrum. 77, 113702 (2006)
- [31] NEUMAN, K., BLOCK, S.M., Sci. Instrum. 75, 2787 (2004)
- [32] PEARSON, -The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal, Volume 6, Issue 2, 1901
- [33] CAUCHY, A.L., (1829), Oeuvres, IX (2), 172-175
- [34] ALBANO, C., DUNN III, W.J., EDLAND, U., JOHANSSON, E., NORDEN, B., X SJÖSTRÖM, M., levels of Pattern Recognition, Analytica Chimica Acta, 103 (1978), 429–433

[35] BRERETON, R, Applied Chemometrics For Scientists, 2007, ISBN: 978-0-470-01686-2

[36] www.thermo.com [04/06/2010]

[37] GEMPERLINE, P., Practical Guide To Chemometrics, CRC PRESS, 2 edition (April 16, 2006), ISBN-13: 978-1574447835

[37] www.mathworks.com [04/06/2010]

[38] SCHULZ, H., BARANSKA, M.,QUILITSCHA, R ve SCHULTZE, WOLFGANG., Analyst, 2004, 129, 917–920

[39] HOTELLING, H., Analysis of a complex of statistical variables into principal components. Journal of Educational Psychology, 24 (1933), 417–441 and 498–520

[40] KIM, Y.J., PARK, H.S., LEE, H.Y., HA, E.H., SUH, S.H., OH, S.K., YOO, H.S., Placenta. 2006 Apr-May;27(4-5):438-44.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzincan’da doğdu. Lise öğrenimini Kabataş Erkek Lisesi’nde tamamladıktan Yıldız Teknik Üniveristesi Fizik Bölümü’ne girdi. Bu bölümden 2006 senesinde mezun oldu. 2005 yılında Çekmece Nükleer Araştırma Merkezi’nde yaz stajı yaptı. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi’nde Atom ve Molekül Fiziği yüksek lisans programına dahil oldu. İstanbul Teknik Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesinde öğrenci laboratuvar derslerinde görev aldı. Mesleki ilgi alanlar Raman Spektroskopisi ve Biyofotoniktir. İngilizce biliyor.