

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KANSER ÇEŞİTLERİNİN NEFES ANALİZİ İLE AYIRT
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERFİN SOLMAZ

DENİZLİ, MAYIS - 2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**KANSER ÇEŞİTLERİNİN NEFES ANALİZİ İLE AYIRT
EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERFİN SOLMAZ

DENİZLİ, MAYIS - 2022

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2021FEBE004 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Berfin SOLMAZ

ÖZET

KANSER ÇEŞİTLERİNİN NEFES ANALİZİ İLE AYIRT EDİLMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BERFİN SOLMAZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞÜKRÜ GÖKHAN ELÇİ)

DENİZLİ, MAYIS - 2022

Eski zamanlardan bu yana nefes, farklı hastalık türlerinin teşhisinde bir araç olarak kullanılmıştır. Literatüre göre insan nefesinde çeşitli uçucu organik bileşikler (VOC) rapor edilmiştir. Bu VOC'ler vücudun metabolik süreçlerinin ürünleridir. Bu nedenle nefes, tıbbi teşhis ve terapötik izleme için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Ayrıca non-invaziv bir yöntem olduğu için nefes örnekleme işlemi ağrısız bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca, analiz için sınırsız bir kaynaktır. Birçok çalışmada, araştırmacılar nefes örnekleri toplamak için Tedlar torbalarını kullanırlar. Tedlar torbaları nefes numunelerini saklamak için kullanışlı olsa da torbalar maliyetlidir ve Tedlar torbasının duvarındaki nem birikimi analiz sonucunu etkiler. Kantitatif analiz için, Tedlar torbasının bilinen bir hacmi olmasına rağmen, ondan VOC'leri örnekleme hala büyük bir zorluktur. Dolayısıyla Tedlar torbası kullanımından kaynaklanan bu sorunların üstesinden gelmek için alternatif yeni bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır. Burada, nefes örnekleme ve analizi için 3 boyutlu basılan bir nefes toplama aparatı tasarlanmıştır. Nefesteki VOC'ler, 3 boyutlu basılan toplama aparatı kullanılarak bir SPME fiberi tarafından toplandı, ardından GC-MS kullanılarak tespit edilmeleri takip edildi. Covid-19 pandemisi nedeniyle, küçük bir sağlıklı gönüllü grubu seçildi (farklı cinsiyetlerden sigara içenler ve içmeyenler). 20 kişiden alınan nefes örnekleri Lineer Diskriminant Analiz (LDA) ile incelendi. LDA, aralarında herhangi bir ilişki olup olmadığını gözlemlemek için sonuçları ayırt eden istatistiksel bir tekniktir. Sonuçlar, cinsiyet ve sigara içme farklılıklarının belirgin bir şekilde ayrıldığını ve bu istatistiksel analiz kullanılarak tanımlandığını göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Nefes, VOC, SPME, GC-MS, 3 boyutlu yazıcı

ABSTRACT

DIFFERENTIATION OF CANCER TYPES VIA BREATH ANALYSIS
MSC THESIS
BERFİN SOLMAZ
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOMEDICAL ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SUKRU GOKHAN ELCI)

DENİZLİ, MAY 2022

From old times until now, breath has been used as a tool for diagnosing different types of diseases. According to the literature, various volatile organic compounds (VOC) in human breath have been reported. These VOCs are products of the body's metabolic processes. For this reason, the breath composes significant potential for medical diagnosis and therapeutic monitoring. In addition, since it is a non-invasive method, breath sampling can be done painlessly. Also, it is an endless resource for analysis. In many studies, researchers use Tedlar bags to collect breath samples. Although the Tedlar bags are handy for storing the breath samples, the bags are costly, and the moisture accumulation on the wall of the Tedlar bag affects the result of the analysis. For quantitative analysis, even though the Tedlar bag has a known volume, sampling VOCs from it is still a big challenge. Thus, an alternative new system is required to overcome these problems faced due to the use of the Tedlar bag. Here, a 3D printed breath collection apparatus is designed for breath sampling and analysis. The VOCs in breath were collected by an SPME fiber using the 3D printed collection apparatus, then followed by their determination using GC-MS. Due to the pandemic of Covid-19, a small group of healthy volunteers was selected (smokers and non-smokers of different genders). The breath samples collected from 20 individuals were examined with Linear Discriminant Analysis (LDA). LDA is a statistical technique that discriminates the results to observe if there is any relationship between them. The results indicated that the gender and smoking differences are distinctly separated and identified using this statistical analysis.

KEYWORDS: Breath, VOC, SPME, GC-MS, 3D printer

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | v |
| TABLO LİSTESİ..... | vi |
| SEMBOL LİSTESİ..... | vii |
| ÖNSÖZ..... | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Tezin Amacı..... | 1 |
| 1.2 Kanser Tespitinin Önemi..... | 1 |
| 1.3 Literatür Özeti..... | 2 |
| 2. KANSER TÜRLERİNİN NEFES ANALİZİ İLE AYIRT EDİLMESİ..9 | 9 |
| 2.1 Kanser Tanımı ve Kanser Türleri..... | 9 |
| 2.1.1 2020 Yılı DSÖ Kanser verileri..... | 9 |
| 2.2 Kanser Teşhisinde Kullanılan Yöntemler..... | 10 |
| 2.3 Uçucu Organik Bileşikler..... | 12 |
| 2.3.1 Nefes Örneklemesi ile Tespit Edilen Uçucu Organik Bileşikler..... | 15 |
| 2.3.2 Nefeste Bulunan VOC'lerin Üretim Mekanizması..... | 16 |
| 3. KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLER KULLANILARAK YAPILAN NEFES ÖRNEKLEMELERİ..... | 19 |
| 3.1 Nefes Örneklemeye Yöntemleri..... | 19 |
| 3.1.1 Gaz Kromatografisi..... | 19 |
| 3.1.2 Kütle Spektrometrisi..... | 20 |
| 3.1.3 İyon Hareketlilik Spektrometrisi..... | 21 |
| 3.1.4 Elektronik Burunlar..... | 22 |
| 3.1.5 Köpeklerde Koku Alma Duyusu (Canine Olfaction)..... | 22 |
| 3.1.6 Sorbent tuzakları..... | 23 |
| 3.1.7 Katı Faz Mikroekstraksiyon..... | 24 |
| 3.2 3D Yazıcı Kullanımının Önemi..... | 28 |
| 3.3 Lineer Diskriminant Analizi..... | 30 |
| 4. YÖNTEM..... | 31 |
| 4.1 3D yazıcı ile nefes toplama düzeneğinin hazırlanması..... | 31 |
| 4.2 SPME fiberlerinin seçimi..... | 32 |
| 4.3 Nefes örneklerinin toplanması..... | 33 |
| 4.4 Nefes Örneklerinin Analizi..... | 35 |
| 5. BULGULAR..... | 36 |
| 5.1 Nefes Toplama Düzeneğinin Boyutunun Seçimi..... | 36 |
| 5.2 GC-MS sisteminin çalışma koşulları..... | 37 |
| 5.3 SPME fiber seçimlerinin karşılaştırılması..... | 37 |
| 5.4 Nefes Verme Süresi..... | 38 |
| 5.5 Nefes örneklerine ait profillerin karşılaştırılması..... | 39 |
| 5.6 Sağlıklı kişilerden toplanan nefes örneklerinin karşılaştırılması..... | 40 |
| 6. TARTIŞMA..... | 43 |
| 7. SONUÇ..... | 45 |
| 8. KAYNAKLAR..... | 47 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 9. EKLER | 55 |
| EK A 55 | |
| 10. ÖZGEÇMİŞ | 62 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 3.1: GC-MS analizini gerçekleştirmek için gereken tipik kurulum..... | 20 |
| Şekil 3.2: SPME fiberi ve Tedlar torbası..... | 25 |
| Şekil 3.3: SPME yöntemi | 26 |
| Şekil 4.1: Nefes toplama düzeneği prototipinin a)üst kapak resmi b)alt platform resmi | 32 |
| Şekil 4.2: a) SPME fiberinin görüntüsü b)SPME fiberi yardımı ile nefes örneğinin toplanmasının şematik gösterimi | 34 |
| Şekil 5.1: 3 farklı fiber üzerinde tutulan nefes profillerine ait kromatogramların karşılaştırılması..... | 38 |
| Şekil 5.2: Nefes verme sürelerinin karşılaştırılması | 39 |
| Şekil 5.3: Kadın ve Erkek bireylerden alınmış olan sonuçların karşılaştırılması..... | 40 |
| Şekil 5.4: 20 kişilik gruptan elde edilmiş olan sonuçlara ait kromatogramlar | 41 |
| Şekil 5.5: 20 kişiye ait nefes örneklerinin lineer diskriminant analizi ile incelenmesi..... | 42 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Tablo 1.1: Literatürde yer alan farklı örnekleme metotları ve analitik yöntemler..... | 7 |
| Tablo 2.1: Kanseri tiplerine göre tespit edilen VOC'ler | 15 |
| Tablo 2.2: VOC sınıflarının üretim mekanizması | 17 |
| Tablo 3.1: Ekshale edilen nefes analizi için gözden geçirilen teknolojilerin karşılaştırılması..... | 26 |
| Tablo 4.1: SPME fiberlerinin çeşitleri ve tutunan VOC'lerin özellikleri | 33 |
| Tablo 4.2: Nefes içerisinde yer alan VOC'lerin listesi | 34 |
| Tablo 5.1: GC-MS cihazı ölçüm parametreleri..... | 37 |

SEMBOL LİSTESİ

| | | |
|------------------|---|---|
| VOC | : | Uçucu Organik Bileşik |
| SPME | : | Katı faz mikroekstraksiyon |
| WHO | : | Dünya Sağlık Örgütü |
| BT | : | Bilgisayarlı Tomografi |
| PET | : | Pozitron Emisyon Tomografisi |
| MRG | : | Manyetik Rezonans Görüntüleme |
| GC | : | Gaz Kromatografisi |
| MS | : | Kütle Spektrometrisi |
| GC-MS | : | Gaz Kromatografi Kütle Spektrometrisi |
| PTR-MS | : | Proton Transfer Reaksiyon Kütle Spektrometrisi |
| SIFT-MS | : | Seçilmiş İyon Akış Tüpü Kütle Spektrometrisi |
| IMS | : | İyon Mobilite Spektrometrisi |
| QCM | : | Kuvars Kristal Mikroterazi |
| SAW | : | Yüzey Akustik Dalgası |
| FT-ICR MS | : | Fourier Dönüşümü İyon Siklotron Rezonansı |
| NO | : | Azot monoksit |
| CO | : | Karbon monoksit |
| ROS | : | Reaktif Oksijen Türleri |
| CYP450 | : | Sitokrom P450 |
| SESI | : | İkincil Elektron Püskürtme İyonizasyon |
| SESI-MS | : | İkincil Elektron Püskürtme İyonizasyon Kütle Spektrometrisi |
| LC-MS | : | Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi |
| PDMS | : | Polidimetilsiloksan |
| PDMS-DVB | : | Polidimetilsiloksan-divinilbenzen |
| PA | : | Poliakrilat |
| PPM | : | Milyonda bir |
| PPB | : | Milyarda bir |
| LDA | : | Lineer Diskriminant Analizi |

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yürütülmesinde değerli bilgileri ile bana yol gösteren, tez çalışmamı titizlikle takip edip desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Gökhan ELÇİ'ye,

Tez sürecim boyunca bana her daim yardımcı olan desteğini esirgemeyen arkadaşım Ahmet KANAT'a, numunelerin sağlanmasına yardım eden Uzm. Onkolog ve İç Hastalıkları Uzmanı Canan KARAN'a, Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarındaki hocalarıma, arkadaşlarıma,

Tüm yaşamım boyunca bana güvenen, desteğini hissettiğim sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Tezin amacı üç ana başlık altında toplanmaktadır. Tezin öncelikli hedefi nefes örneklerinin daha kolay ve doğru bir şekilde toplanması için gerekli olan toplama sisteminin 3 boyutlu yazıcı sistemi kullanılarak geliştirilmesidir. Devamında, basılmış olan nefes toplama düzeneği ve katı faz mikroekstraksiyon (SPME) fiberi yardımı ile VOC profillerinin elde edilmesi olacaktır. Son olarak, elde edilen profillerin teşhis amaçlı kullanımlarının incelenmesi ve gerekli istatistiksel analizler yardımı ile farklı kanser çeşitlerinin bu VOC'ler yardımı ile sınıflandırılması amaçlanmaktadır.

1.2 Kanser Tespitinin Önemi

Dünyadaki ölümlerin ana nedenleri arasında kanser önemli bir yere sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre, 2018 yılında yaklaşık 9.6 milyon kanser vakasının ölümle sonuçlanacağı ön görülmüştür. Aynı organizasyona göre dünya üzerinde 2018 yılı itibari ile yaklaşık 200 kanser çeşidi olduğu bilinmektedir. Bu farklı kanser çeşitlerinden en sık rastlanan ve ölüm oranı en fazla olan kanser (%85.6) akciğer kanseridir. Bunu, rastlanma olasılığı sıklığına göre sırasıyla meme, kolorektal, prostat, cilt, karaciğer ve pankreas kanserleri takip etmektedir (Siegel ve diğ. 2017).

Bu tür kanserlerin çoğu hastalığın ilk evrelerinde hiç ya da çok az sayıda semptom göstermesinden dolayı erken teşhis konması zordur. Erken teşhis, kanser tedavisinde en kritik ve önemli basamaktır. Çünkü erken evrede teşhis hastalarda ölüm oranlarını önemli ölçüde azaltabilmektedir. Örneğin, akciğer kanserli hastalarda, kanserin teşhisinden 5 yıl sonra sadece %14 kadarı hayatta kalabilmektedir. Eğer hızlı erken teşhis gerçekleştirilip ve hızlı bir şekilde tedavi

uygulanırsa 5 yıllık evrede hayatta kalma oranının %48'e kadar yükseleceği tahmin edilmektedir (Philipps ve diğ. 1930-1933).

1.3 Literatür zeti

Kanser teŖhisinde sıklıkla endoskopi, mamogram, biyopsi, kan, idrar testleri ve görüntüleme yöntemleri (Bilgisayarlı Tomografi, BT; Pozitron Emsiyonu Tomografisi, PET; Manyetik Rezonans Görüntüleme, MRG) kullanılmaktadır (Haick ve diğ. 2014, Van Rossum ve diğ. 2008). Bu yöntemler zahmetli, zaman alıcı, pahalı, invazif ve can yakıcı olabilmektedir. İdrar testleri hastaları utandırabilmekte ve ayrıca bazı görüntüleme tekniklerinde, hastaların radyasyona maruz kalmasını ve ilaçla tedavi edilmesini gerektirebildiğinden, bu iŖlemlerin sonucunda yan etkiler olabilmektedir (Smith-Bindman ve diğ. 2009, Einstein ve diğ. 2007). Bu görüntüleme testlerinin yanlış pozitif sonuç verme oranı da yüksektir. Örneğin, 2012 yılında ABD'de yapılan BT görüntülemeli akciğer kanseri taraması %24 oranında hatalı pozitif sonuç vermiŖtir (Haick ve Peled 2012). Kanserde hatalı pozitif sonuç, gereksiz ilaç ve tedavilere neden olduğu gibi, hatalı negatif sonuçlar da kanserin geliŖerek daha ileri aŖamalara ilerlemesine sebep olmaktadır. Tüm bunların sonucunda, kanser taramasında yüksek verimli, zahmetsiz ve kullanımı kolay, güvenilir, duyarlı, kesin ve doğru sonuçlar veren invazif olmayan yeni teŖhis yöntemlerinin geliŖtirilmesine ihtiyaç vardır.

En basit laboratuvar analiz cihazlarının ortaya çıkmasından önce, insan burnu hastalık teŖhisinde kimyasal dedektör olarak kullanılmıŖtır. Tarihte ilk olarak Hipokrat, ğrencilerine kontrolsüz diyabet, karaciğer ve böbrek hastalığını tanımlayabilmek için nefes kokusunu kullanmayı đretmiŖtir (Wallace ve Pleil 2018). Nefes matrisinin %78'i azot, %14 ila %17'si oksijen, %4 ' karbondioksit, %6'sı su buharı, 1 ppm'den az bir kısmı ise atıl gazlar ve eser (iz) uçucu organik bileŖiklerin (VOC) bir karıŖımıdır. Bu matristeki bileŖenler kiŖiden kiŖiye, niceliksel ve niteliksel olarak (zellikle de VOC'ler) deđiŖmektedir. Nefeste bulunan VOC'lerin ancak çok az bir kısmı herkes için ortaktır (Miekisch ve diğ. 2004, Schubert ve diğ. 2004).

Modern nefes analizi dönemi, 1971'de Linus Pauling ve arkadaşlarının gaz kromatografisi (GC) kullanarak insan nefesinde 200'den fazla uçucu organik bileşik belirlemesiyle başlamıştır. Bu bileşikler, sadece akciğerde lokal olarak değil aynı zamanda vücudun her yerinde lokal olarak üretilen VOC'lerin pulmoner dolaşım ve ardından alveoler kan gazı değişimi yoluyla nefese taşınan metabolik işlem ürünleridir (Pauling ve diğ. 1971).

Dolayısıyla nefes, tıbbi tanı ve terapötik izleme için büyük potansiyel oluşturmaktadır. Günümüzdeki biyo-sıvı analizleriyle karşılaştırıldığında daha az yaygın olmasına rağmen, örneklemenin invazif olmaması, zamanlama ve hacim açısından sınırsız olması ve toplanması için klinik personel gerektirmemesi nefesi çekici bir tanı aracı haline getirmektedir.

Bununla birlikte, tekniğin iyi bir tekrarlanabilirliğini ve sonuçların karşılaştırılabilirliğini garanti edebilen nefes alma ve analiz için standart prosedürlerin olmaması nedeniyle, bugüne kadar klinik uygulamada hala yeterince kullanılmayan bir teknik olmaya devam etmektedir. Klinik uygulamada nefes analizinin kullanımı için bir diğer kritik nokta, VOC'lerin dışarı verilen nefes profili tanımında hangi faktörlerin rol oynadığına dair kısmi bilgidir. Solunan nefes inorganik bir fraksiyondan (azot, oksijen, karbon dioksit ve soy gazlar) ve esas olarak izopren ve aseton gibi VOC'lerden ve alkoller, ketonlar, aldehitler, terpenler ve aromatiklerden oluşmaktadır. Dışarı verilen nefesteki bu VOC'ler endojen ve eksojen olabilmektedir. Endojen VOC'ler vücudun farklı bölgelerinde meydana gelen metabolik süreçlerle üretilir ve kan akımı yoluyla akciğerlere taşınır ve burada alveolar gaz değişim mekanizması ile nefes verme akışına yayılırlar. Eksojen VOC'ler esas olarak vücut tarafından solunma ve cilt adsorpsiyonu yoluyla alınan veya gıda alımı yoluyla emilen türler olan çevresel kirleticilerdir (Mazzone 2008).

Bu düşünceler temelinde, çeşitli çalışmalar, bir hastalığın endojen VOC'lerinin özelliklerinin belirli bir paterninin tanımlanmasının, hastalığın erken teşhisi için yararlı bir araç olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, VOC'lerin insan nefesindeki profilindeki değişikliklerin dikkate alınması önemlidir. (a) nefes numunesinin alındığı ortam havasıyla bağlantılı dış kaynaklı VOC'ler, (b) VOC'lere çevresel maruziyet, (c) cinsiyet, diyet, genetik, sigara içme alışkanlıkları vb. gibi faktörler ve (d) Polarite, uçuculuk ve yağda çözünürlük gibi fiziksel-kimyasal

özelliklerine bağlı olarak VOC'lerin kandan alveolar havaya difüzyonundaki farklılıklar dikkate alınması gereken faktörlerdendir. Eksojen VOC'lere ek olarak tüm bu faktörler, nefes analizinde hastalık belirteçlerinin tanımlanmasına müdahale edebilir. Aseton ve izopren gibi insan nefesinin en yaygın molekülleri dışında, kalan eser bileşiklerin çoğu eksojen ile ilişkili olabilmektedir. Bu nedenle, biyobelirteç moleküllerinin doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlamak, hangi bileşiklerin endojen olduğunu değerlendirmek zorunludur. Nefes analizindeki bir diğer konu, nefes verme derinliğine ve tam nefesle karşılaştırıldığında tek bir nefes veya alveolar fraksiyon yerine çoklu nefesler gibi örnekleme modalitesine bağlı olarak verilen nefes kompozisyonunun değişkenliğidir.

Çeşitli çalışmalarda bildirildiği gibi, endojen VOC'ler kan-gaz değişiminden gelse bile, insan nefesindeki varlıkları normal akciğer fizyolojisinden ve hipo veya hiper ventilasyon koşullarından da etkilenebilmektedir. Ayrıca, aseton gibi yüksek oranda çözünür VOC'lerin gaz değişiminin hemen gerçekleştiği ve bunların alveolar fraksiyondan ziyade tüm nefeste daha fazla mevcut olduğu, düşük kanda çözünür VOC'ler için ise değişimin esas olarak alveolar olduğu gösterilmiştir. Spanel ve arkadaşları alveolar kısımda izopren konsantrasyonunun tüm solunan havadakinden üç kat daha yüksek olduğunu bulmuştur (Marzorati ve diğ. 2019). Ek olarak, nefesin sadece soluk sonu fraksiyonu analiz edildiğinde verilerin daha iyi tekrarlanabilirliğinin elde edildiğine dair kanıtlar vardır, bu da karışık nefes analizlerine göre soluk sonu toplamayı arzu edilir kılmaktadır. Bununla birlikte, soluk sonu fazı toplama, solunan nefesin yalnızca son 200/300 mL'sini seçmek için CO₂ seviyesi izleme için CO₂ sensörü veya solunan nefes hacmi kontrolü gibi nefes örnekleme için daha karmaşık cihazlar gerektirir. Son olarak, nefes alma ve taşıma sırasında kontaminasyonlardan kaçınmak zorunludur (Di Gilio ve diğ. 2020).

Kanser hücrelerinin varlığı idrar, deri, kan ve nefesteki kimyasalların kimliğini ve düzeyini etkileyebilmekte veya doğrudan VOC üretimine yol açabilmektedir. Bazı metabolik kanserlerle ilgili düzensizlikler, kimyasal analiz yöntemi ile izlenebilir (Queralto ve diğ. 2014, Phillips ve diğ. 2006). Bu nedenle, erken teşhis için nefesten farklı kanser türlerine özgü VOC tespiti, diğerlerine nazaran invazif olmayan, kolay tekrarlanabilir, hızlı ve acısız bir yöntemdir (Hanna ve diğ. 2018). Nefes örneklerinde VOC tayininde, gaz kromatografisi kütle

spektrometresi (GC-MS) (Capone ve diğ. 2016, Szabó ve diğ. 2015), proton transfer reaksiyon kütle spektrometresi (PTR-MS) (Del Río ve diğ. 2016, Aprea ve diğ. 2014), seçilmiş iyon akış tüpü kütle spektrometrisi (SIFT-MS) (Kumar ve diğ. 2013), iyon mobilite spektrometrisi (IMS) (Fink ve diğ. 2014, Fink ve diğ. 2015), kuvars kristal mikroterazi (QCM), yüzey akustik dalgası (SAW) ve elektronik burun (E-burun) (Selyanchyn ve diğ. 2015, Zhang ve diğ. 2015) tabanlı sensör teknikleri kullanılmaktadır.

Son zamanlarda nefes örneklerinden alınan VOC'ler akciğer, yemek borusu, mide, kolorektal, baş ve boyun, prostat, meme ve pankreas dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin tespiti için kullanılmıştır (Taivans ve diğ. 2014, Altomare 2016, Rovira ve diğ. 2015). Bu alandaki çalışmaların çoğunda, farklı kanserlere özgü biyobelirteçleri belirlemek amacıyla kanserli ve sağlıklı hastaların örneklerinin karşılaştırması esas alınmaktadır. Bu bağlamda, Philips ve arkadaşları 400 kişinin nefesindeki VOC'lerin GC-MS profilleriyle, akciğer kanserini, %84.5 duyarlılık ve %81 kesinlik ile tanımlayarak bu tekniğin kanserin erken teşhisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Phillips ve diğ. 2008). Duyarlılık ve kesinlik sırası ile; kansere sahip olduğu belirlenebilen hasta kesri ve görüntüleme yöntemleri ile kansere sahip olmadığı belirlenmiş hasta kesri ile ilişkili büyüklüklerdir. Philips ve arkadaşlarının çalışması, her ne kadar toplanan nefesteki VOC profiline bakılarak akciğer kanseri tanısının konmasına yardımcı olsa da kesin bir tanı aracı olarak kullanılamamaktadır. Elde edilen sonuçlar olasılık olarak verilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, yüksek riskli bir grubun kesitsel çalışması olduğundan olumlu sonuçlar ile ilgili genelleme yapılması yanlış olabilir. Daha az risk taşıyan gruptan farklı sonuçlar alınarak daha kesin bilgilere ulaşmak için çalışmaların yapılması gerekmektedir. Her ne kadar kütle spektrometrisi (MS) kanser görüntülemesinde faydalı bir yöntem olsa da, kişisel diyagnostik araç olarak veya portatif bir cihaz halinde kullanımı kısıtlıdır. Ancak, kütle spektrometri yöntemi yüksek duyarlılığı ve seçiciliği sayesinde, nefes içerisinde eser düzeyde bulunan VOC'lerin tayinini gerçekleştirebilmesi yönünden önemli bir analiz yöntemi olarak yaygınca kullanılmaktadır.

Yakın zamanlarda, literatürde kanser tanısı için nefes verme testi ile ilgili bir dizi çalışma yayınlanmıştır (Zhou ve diğ. 2017, Bikov ve diğ. 2015). Bu çalışmalardan son yayınlananlar ve ilgili patent literatürü (2014-2017)

incelendiğinde, kanser tespiti için nefes testinde üç önemli adıma odaklanmaktadır: (i) Nefes VOC'lerinin, soluk vermeyle örneklenmesi; (ii) VOC'leri ve VOC profillerini tespit etmek için gerekli analitik enstrümantasyon; ve (iii) VOC profillerini analiz etmek için veri analiz yöntemleri ön plana çıkmaktadır.

Kanser tanısı için nefes testlerinin en önemli avantajlarından biri, örnekleme basitliğidir.

Uluslararası ölçekte en yaygın nefes örnekleme yöntemi polimerik torbalar kullanılarak yapılmaktadır. Deneğe ait nefes örnekleri genellikle hava geçirmez polivinil florür (bir tür plastik) torba şişirilerek toplanır. Ancak son zamanlarda uçucu organik bileşikleri (VOC'leri) sorbent tüplerine doğrudan konsantre edebilen Mistral ve ReCIVA adlı cihazlar geliştirilmiş ve piyasaya sürülmüştür (Di Gilio ve diğ. 2020).

Aslında, bugüne kadarki en yaygın çevrimdışı nefes örnekleme prosedürü, insan nefesinin polimerik torbalarda toplanması ve ardından nefes örneklerindeki VOC'lerin, gaz kromatografisi ve bir kütle spektrometrisi detektörü ile birleştirilmiş termal desorpsiyon analizi için bir sorbent tüpüne aktarılmasından oluşur. Bu prosedür, VOC'nin torbaların arka planına bağlı olarak VOC'nin nefes numunesinin profilindeki değişiklikleri ve nefes numunesinde yoğunlaşma oluşumunu veya polimerik torbaların geçirgenliğinden dolayı VOC kaybını ve/veya kontaminasyonunu potansiyel olarak belirleyen saklama ve taşıma koşullarına bağlı olarak belirleyebilir. Bu nedenle, son zamanlarda, numune saklama ve taşıma ile ilgili sınırlamaların üstesinden gelmek için, tüm ve/veya alveolar nefesi doğrudan sorbent tüpü üzerinde toplayabilen daha verimli numune alma sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında, Loccioni Group HumanCare tarafından geliştirilen sistem gibi, CO₂ kısmi basıncının sürekli izlenmesini kullanarak nefesin yalnızca bir alveolar fraksiyonunu toplayabilen sistemler vardır. ReCIVA ve Mistral cihazları, kolay ve etkili dışa verilen nefesin örnekleme için önemli bir adımı temsil etse de, bu cihazların maliyeti nefes torbalarıyla karşılaştırılamaz. Ayrıca, şimdiye kadar, bu cihazların performanslarını ve bir torba kullanımına dayalı en yaygın nefes örnekleme yöntemiyle karşılaştırılabilirliğini değerlendirmeyi amaçlayan hiçbir çalışma yapılmamıştır (Di Gilio ve diğ. 2020).

Nefes örneğinin VOC içeriklerinin analizi için örnekleme sorbent tüpleri veya katı faz mikroekstraksiyon (SPME) uçları (fiber) ile yapılır (Van der Schee ve diğ. 2012, Ochiai ve diğ. 2001). 2014 ile 2017 yılları arasında yayınlanan patentlerde, bu yöntemlere ilaveten araştırmacılar verilen nefes örneklerindeki VOC'leri türevlendirme (derivatizasyon) suretiyle farklı kütle spektrometrik cihazlar kullanarak tayinlerinin gerçekleştirilebileceğini ayrıca göstermişlerdir (Fu ve diğ. 2017, Abdel-Rehim ve diğ. 2016). VOC analizi için örnekleme yöntemlerindeki son gelişmeler ve literatürde yer alan son patentler (2014-2017) Tablo 1.1'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1: Literatürde yer alan farklı örnekleme metotları ve analitik yöntemler (Kabir ve Donald 2018).

| Patent No | Patent Sahipleri | Örnekleme Metodu | Analitik Yöntem |
|--|------------------|---|-----------------|
| US 20160363581 A1 | Philips M. | Sorbent tuzağı (aktif karbon) | GC-MS |
| US 20170184609 A1 | Milton ve diğ. | İnsan ekshale nanodroplet toplayıcı | ImmunoqPCR |
| US 9528979 B2 , WO 2011083473 A1, WO 2012023138 A2 | Haick ve diğ. | Sorbent tuzağı (aktif kömür, silika jeli, organik gözenekli polimerler) ve SPME (Divinilbenzen carboxen, polidimetilsiloksan) | GC-MS/E-burun |
| WO 2017023768 A1, US 9638695 B2 | Fu ve diğ. | Türevlendirme karbonil bileşikleri | FT-ICR-MS |
| US 20160245797 A1 | Ahmad ve diğ. | Polivinil florür torbası | Optik |
| WO 2016159863 | Abdelrehim | Adsorban kılcal (fenil metil silikon, silika sol-gel ve | GC-MS |

| | | | |
|-------------------------|--------------|---|-------|
| | | polietilen glikol) | |
| US 20140127326 A1 | Sood ve diğ. | SPME (polidimetilsiloksan ve carboxen) | GC-MS |

Tabloda da görüldüğü üzere nefes örneğinin VOC içeriklerinin analizi için literatürde farklı örnekleme metotları ve analitik yöntemler kullanılmıştır. Bu tezde literatürden farklı olarak nefes örnekleme için 3 boyutlu yazıcıdan baskı alınan kolay kullanıma sahip, düşük maliyetli, termoplastik özellikte nefes kapları kullanılmıştır. Sigara içen/içmeyen farklı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı 20 bireyden alınan nefes örneklerine ait VOC'ler gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) cihazı kullanılarak tayinleri gerçekleştirilmiştir.

2. KANSER TÜRLERİNİN NEFES ANALİZİ İLE AYIRT EDİLMESİ

2.1 Kanser Tanımı ve Kanser Türleri

Kanser anormal ve kontrolsüz hücre büyümesiyle karakterize edilen bir durumdur. Normal hücrelerde hücre artışı ve ölümü bir denge halindedir. Kanserde bu denge bozulur. Bunun sonucunda kontrolsüz hücre çoğalması olur ve işlevini yitiren hücrenin ölümü engellenir. Kanserin oluşmasında virüsler, alkol, tütün ürünlerinin kullanımı, kötü beslenme, obezite, iyonize ışınlarla maruz kalma, mesleki hastalıklar ve çevresel kirleticiler gibi çeşitli faktörler etkili olabilmektedir (Baykara 2016). Kanser hücreleri az oksijen, az yiyecek, zorlu koşullara karşı gösterdiği direnç ve zaman içerisinde bu koşulları kendi lehine çevirmesi ile hayatta kalabilmektedir. Kanser hücreleri zamanla şekil değiştirebilmektedir. Normal hücreler belli bir yere tutunarak büyüyüp yaşayabilirken, kanser hücreleri ise herhangi bir yere tutunmadan da yaşayabilmekte ve büyüyüp çoğalabilmektedir. Birçok kanser türü başlangıçta belirti vermemektedir ve her kanser türü aynı değildir. Kanser türüne bağlı olarak görülen genel belirtiler değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle her kanser türüne göre farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Ancak erken teşhisle birlikte iyi bir bakımın beklenen hayat süresini ve kalitesini arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle erken teşhiste çeşitli yeni yöntemler denenmektedir (De Martel ve diğ. 2019).

2.1.1 2020 Yılı DSÖ Kanser verileri

Kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyon ölümün gerçekleştiği dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir. En sık görülen kanserler meme, akciğer, kolon ve rektum ve prostat kanserleridir. Kanserden ölümlerin yaklaşık üçte biri tütün kullanımı, yüksek vücut kitle indeksi, alkol tüketimi, düşük meyve ve sebze alımı ve fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklanmaktadır. İnsan papilloma virüsü (HPV) ve hepatit gibi kansere neden olan enfeksiyonlar, düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser vakalarının yaklaşık %30'undan sorumludur. Kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyon

ölümün gerçekleştiği dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir. 2020'de en yaygın olanları (yeni kanser vakaları açısından) şunlardır: meme kanseri (2.26 milyon vaka); akciğer kanseri (2.21 milyon vaka); kolon ve rektum kanseri (1.93 milyon vaka); prostat kanseri (1.41 milyon vaka); cilt kanseri (melanom dışı) (1,20 milyon vaka); ve mide kanseri (1.09 milyon vaka). 2020'de kanser ölümlerinin en yaygın nedenleri ise şunlardır: akciğer kanseri (1.80 milyon ölüm); kolon ve rektum kanseri (916 000 ölüm); karaciğer kanseri (830 000 ölüm); mide (769 000 ölüm); ve meme kanseri (685 000 ölüm) (Ferlay ve diğ. 2021).

Tütün kullanımı, alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, fiziksel hareketsizlik ve hava kirliliği kanser ve diğer bulaşıcı olmayan hastalıklar için risk faktörleridir. Bazı kronik enfeksiyonlar kanser için risk faktörleridir; bu düşük ve orta gelirli ülkelerde özel bir sorundur. 2018 yılında dünya genelinde teşhis edilen kanserlerin yaklaşık %13'ü, *Helicobacter pylori*, insan papilloma virüsü (HPV), hepatit B virüsü, hepatit C virüsü ve Epstein-Barr virüsü dahil olmak üzere kanserojen enfeksiyonlara bağlıdır. Hepatit B ve C virüsleri ve bazı HPV türleri sırasıyla karaciğer ve rahim ağzı kanseri riskini arttırmaktadır. HIV ile enfeksiyon, rahim ağzı kanseri geliştirme riskini altı kat artırır ve Kaposi sarkomu gibi seçilmiş diğer kanserlerin gelişme riskini önemli ölçüde artırır (De Martel ve diğ. 2019).

2.2 Kanser Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Gittikçe yaygınlaşan kanserin, türüne göre farklı belirtileri bulunmaktadır. Kanser tanısı kimi durumlarda kolay olabilmekte, bazı durumlarda ise daha karmaşık tanı yöntemleri gerektirebilmektedir. Kanser türlerinin bir kısmı çok erken belirti verebiliyorken, bazı türleri ise ilerledikten sonra belirti verip teşhis edilebilmektedir. Kanser dışındaki hastalıkların bulguları kanserde saptanan belirtilere benzeyebilmektedir. Kanser teşhisi; klinik incelemeler, laboratuvar ve patoloji incelemeleri, görüntüleme teknikleri ile yapılmaktadır (Kumar ve diğ. 2015). Tanısal radyolojide tümörün yerine ve türüne göre farklı yöntemler uygulanmaktadır.

Konvansiyonel radyografi yöntemi X-ışınlarının dokulardan geçtikten sonra duyarlı bir film yüzeyine düşürülmeleri ile iki boyutlu görüntü oluşturması prensibine dayanmaktadır. X ışınları radyolojik görüntülemelerde farklı ortamlardaki

soğurulma farklılığı özellikleri ile kullanılmaktadır. Film üzerine düşen X ışınlarının farklı şiddet değerleri, farklı soğurma katsayılı dokulardan geçip filme ulaştığı için farklı tonlarda görülen görüntüler oluşturmaktadır. Tıpta radyografi herhangi bir organ ya da uzvun kemiklerinde gözlenen çatlak, kırık gibi durumları incelemede kullanılmaktadır. Röntgen yönteminin en büyük dezavantajlarından biri iyonize edici radyasyon içermesidir. Bir diğer dezavantajı ise birbirlerine kütle soğurma katsayısı olarak yakın olan iki farklı dokunun film üzerinde oldukça benzer kontrast oluşturması ya da farklı kütle soğurma katsayısına sahip farklı bölgelerden büyük katsayılı olanın diğer bölgeyi gölgelemesiyle bölgelerin birbirinden ayırt edilememesidir.

Tanısal radyoloji yöntemlerinden biri olan bilgisayarlı tomografi X ışınlarını kullanarak vücuttan iki boyutlu ince kesitler halinde görüntü alınması işlemidir. Alınan görüntülerde yumuşak dokular arasında ayırt edilebilir bir kontrast elde edilir ve geleneksel röntgen sistemlerinden farklı olarak karaciğer, kas, böbrek gibi farklı yumuşak dokular ayrı ayrı incelenebilmektedir. Bilgisayarlı tomografi sistemleri röntgen cihazında olduğu gibi X ışını tüpüne sahiptir ve sabit bir tüp yerine hareketli bir gantry yapısı içerisinde yerleştirilmiş tüp bulunur.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), sağlıklı veya hasta bireyin anatomisinin ve fizyolojisinin incelenmesine olanak sağlayan bir kesit görüntüleme tekniğidir. Manyetik rezonans tarayıcıları doku görüntüsü oluştururken bilgisayarlı tomografide kullanılan ve zararlı olan iyonlaştırıcı radyasyon yerine yüksek manyetik alanlar ve radyo frekans (RF) dalgaları kullanır. Dokulardaki hidrojen atomlarının yoğunluklarına ve hareketlerine bağlı olarak görüntü işleme yöntemleriyle görüntü elde edilir. MRG özellikle yumuşak dokuları görüntülemeye kullanılmaktadır. Sinir sistemi hastalıklarının teşhisinde, kas-iskelet sistemi, bel fitiği gibi rahatsızlıkların tespitinde sıklıkla kullanılan bir görüntüleme yöntemidir.

Ultrasonografi yönteminde dokulara insan kulağının duyamayacağı kadar çok yüksek frekanslı ses dalgaları (1-10 MHz) gönderilir ve dokulara çarpıp yansıyan ekolar alınıp görüntü elde edilir. Doku yoğunluğu arttıkça eko yoğunluğu artar. 1-3 MHz'lik düşük frekanslarda derindeki yapılar incelenirken, 5-10 MHz'lik frekanslarda ise daha yüzeysel bölgeler izlenir. Ultrason görüntüleme girişimsel

olmayan, iyonize edici radyasyon içermeyen, rahatlıkla taşınabilir ve maliyeti çoğu sisteme göre düşük bir yöntemdir.

Pozitron emisyon tomografisi (PET) bir canlının fizyolojik işlevlerini girişimsel olmayacak şekilde görüntülemek amacıyla kullanılır. Pozitron bozulumu sonucu pozitron yayan radyoizleyicilere dayalı bir görüntüleme sistemidir. Görüntülenmek istenen fizyolojiye uygun bir radyoizleyici canlıya enjekte edilir. Bu radyoizleyici canlının vücudunda dağıldıktan sonra radyoaktif bozulmalar yapmaya başlar. Bu bozulmalar sonucunda ortaya çıkan enerji tespit edilerek matematiksel yöntemlerle radyoizleyicinin canlı içerisindeki dağılımı görüntü haline getirilir. (Linn-Watson 2014).

Patoloji incelemeleri kanser tanısında en sık kullanılan yöntemlerdendir. Sıvılara dökülen hücrelerin incelenmesi (sitoloji) ya da dokulardan alınan örneklerin değerlendirilmesidir. Bu incelemelerin yapılmasında gerekirse histokimya, immunohistokimya, immunofloresan mikroskopi, elektron mikroskopisi, akış sitometresi gibi teknikler ile moleküler biyolojinin polimeraz zincir tepkimesi (PCR), gen sekanslama ve in situ hibridizasyon gibi yöntemlerinden de yararlanılmaktadır (Kumar ve diğ. 2015).

2.3 Uçucu Organik Bileşikler

Tıbbın babası sayılan Hipokrat, öğrencilerine M.Ö. 400 yıllarında hastalık göstergesi olarak hastalarının nefesini koklamayı öğretmiştir. 1971'de Linus Pauling ve meslektaşları, insan nefesinin çeşitli uçucu organik bileşikleri (VOC) içeren bir karışım olduğunu bildirmiş ve gaz kromatografisi kullanarak insan nefesinde 200'den fazla bileşen belirlemiştir (Oakley Girvan ve Davis 2017).

Metabolomik, biyobelirteç keşfi ve kanser taramasına ve erken teşhise çevrilmesi için önemli ölçüde kullanılmamış potansiyele sahip, gelişmekte olan bir alandır. Metabolomik yaklaşım alanı, insan vücudunda üretilen ve nefes, kan, idrar, tükürük, ter, dışkı ve diğer biyolojik matrisler yoluyla yayılan uçucu organik bileşiklerin (VOC'ler) çalışması olan "volatilomikler" dir. VOC'ler, hücresel metabolizmanın son ürünleri olarak üretilen, yüksek buhar basıncı ve düşük kaynama

noktası (250°C'nin altında) sergileyen, düşük moleküler ağırlıklı maddelerdir. Analizden önce dokulardan veya vücut sıvılarından ekstrakte edilmesi gereken diğer metabolit türleriyle karşılaştırıldığında, VOC'lere doğrudan gaz fazında (headspace) erişilebilir, bu nedenle minimum örnek hazırlığı gerektirir, cerrahi işlem gerektirmez ve gerçek zamanlı izlemeye izin verir. Hastalıkların bir bireyin fizyolojik ve metabolik durumunu değiştirdiği bilinmektedir; bu nedenle patolojik durumlarda, VOC konsantrasyonlarının değişmesi ve/veya yeni VOC'lerin üretilmesi beklenen bir durum olacaktır (Costa ve Martinis 2020).

Hacimli nefes matrisi, nitrojen, oksijen, karbondioksit, su ve inert gazların bir karışımıdır. İnsan nefesinin kalan küçük fraksiyonu, nmol / L - pmol / L (ppbv - pptv) aralığında konsantrasyonlarda oluşan eser bileşenlerden oluşur. Bu bileşiklerin 500'den fazlası açıklanmıştır. Bu uçucu maddeler vücutta üretilebilir veya çevreden kirletici olarak emilebilir. Eksojen moleküller, özellikle halojenlenmiş organik bileşikler, bileşiğe özgü vücuda alım ve vücuttan atılmayı değerlendirmek için çevresel veya maruz kalma sorunları açısından analiz edilebilir. Vücuttaki metabolik veya herhangi bir patolojik süreci izlemek için endojen maddeler belirlenmelidir (Miekisch ve diğ. 2004).

Bu endojen bileşikler, NO, CO gibi inorganik gazları, etan, pentan, aseton, izopren gibi uçucu organik bileşikler (VOC'ler) ve nefes karışımında belirlenebilen izoprostanlar, peroksinitrit veya sitokinler gibi normalde uçucu olmayan diğer maddeleri içerir.

Son yirmi yılda NO, çok sayıda fizyolojik sürecin bir aracısı ve hava yolu inflamasyonunun bir belirteci olarak kabul edilmiştir. Solunan NO artık piyasada bulunan cihazlarla belirlenebilir ve bu nedenle çok sayıda çalışmada araştırılmıştır.

İzoprostanlar, sitokinler, lökotrienler veya hidrojen peroksit gibi bir dizi normalde uçucu olmayan maddeler nefes matrisinde bulunabilir (Miekisch ve diğ. 2004).

Nefes örneklerinin kantitatif analizi bir dizi ciddi problem tarafından engellenmektedir. Varsayılan alveolar veya hava yolu konsantrasyonları ile nefes

karışımındaki madde konsantrasyonları arasında net bir ilişki yoktur. Ayrıca, bu bileşiklerin bazıları yalnızca sınırlı stabiliteye sahiptir.

Etan, pentan, izopren veya aseton gibi uçucu organik maddeler, sağlıklı ve hastalıklı insan vücudundaki farklı biyokimyasal süreçler hakkında bilgi sağlayabilmektedir. Dışa verilen nefesteki uçucu olmayan maddelerin aksine, uçucu organik maddelerin kinetiği madde çözünürlüklerine göre yaklaşık olarak tahmin edilebilir. Ek olarak, dışa verilen nefesteki organik bileşiklerin çoğu için stabilite sorunu yoktur.

İnsan nefesinde 500'den fazla farklı uçucu organik bileşik tespit edilebilir, ancak bunların çoğu endojen kökenli değildir. Genellikle teşhis amacıyla kullanılan endojen belirteçler, etan, pentan ve izopren gibi hidrokarbonlardır; aseton, asetaldehit, metanol, etanol ve 2-propanol gibi oksijen içeren bileşikler; dimetilsülfür, metil ve etil merkaptanlar gibi kükürt içeren bileşikler; ve karbon disülfür ve amonyak ve dimetil/trimetilamin gibi nitrojen içeren maddelerdir. Bu maddelerin fizyolojik anlamını ve teşhis potansiyelini değerlendirmek için biyokimyasal üretim yollarının bilinmesi gerekir (Miekisch ve diğ. 2004).

Nefesten kanser tespitinin arkasındaki ilke, (yağ) dokusundaki kansere bağlı VOC'lerin kana yayılması ve VOC kan kimyasının akciğerler yoluyla değiş tokuş yoluyla nefesteki ölçülebilir değişikliklere yansıtılmasıdır. Bazı gazların, alveollerden ziyade hava yollarında değiştiği bulunmuştur. Teorik ve deneysel çalışmalar, kanda düşük çözünürlüğe sahip gazların, özellikle polar olmayan VOC'lerin neredeyse yalnızca alveollerde değiştiğini, kanda iyi çözünen VOC'lerin, örneğin polar VOC'lerin, solunum yollarında da değişme eğiliminde olduğunu göstermiştir (Haick ve diğ. 2014).

Matristen bağımsız olarak, VOC'ler genetik, çevre, terapötikler, diyet ve sigara içme alışkanlıkları gibi bir dizi kontrolsüz değişken nedeniyle bireyler arasında farklılık göstererek VOC değerlendirmesini analitik olarak zorlaştırır.

VOC analizi, bir dizi farklı araç kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Kütle spektrometrisine (GC-MS) bağlı gaz kromatografisi, VOC'lerin kanser biyobelirteçleri olarak kimyasal karakterizasyonu için kullanılan altın standart

tekniktir. Bununla birlikte, seçilen iyon akış tüpü kütle spektrometresi (SIFT-MS) ve proton transfer reaksiyonu kütle spektrometresi (PTR-MS) gibi diğer MS tabanlı teknikler de bu amaç için başarıyla kullanılmıştır. Ek olarak, elektronik burunlar (eNose) gibi örüntü tanıma sensörü dizileri ve iyon hareketlilik spektrometresi (IMS) tabanlı teknikler de VOC profillerinin özel “koku parmak izlerini” oluşturmak için kullanılır. Son olarak, araştırmalar, koklayıcı köpeklerin, özellikle idrar örneğinde kanser varlığını tespit etmek için eğitilebileceğini göstermiştir. Literatürde VOC kanser biyobelirteçlerini tespit etmek için kullanılan teknikleri açıklayan çok sayıda inceleme bulunmaktadır. Bununla birlikte, genellikle nefes analizine, belirli bir kanser türüne (esas olarak akciğer), köpek ve eNose yöntemlerine odaklanılır veya yalnızca ayırıcı olmayan kütle spektrometrik (MS) tekniklere bakılır (Costa ve Martinis 2020).

2.3.1 Nefes Örneklemesi ile Tespit Edilen Uçucu Organik Bileşikler

Literatürde çeşitli kanser tiplerinde nefes örnekleme ile tespit edilen birçok uçucu organik bileşik (VOC) bulunmaktadır. Kanser tiplerine göre tespit edilen VOC’ler değişiklik göstermektedir. Literatürde yer alan farklı kanser tiplerinde nefes örnekleme ile tespit edilen uçucu organik bileşikler Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1: Kanser tiplerine göre tespit edilen VOC’ler (Kabir ve Donald 2018, Marzorati ve diğ. 2019).

| Tespit Edilen Biyomarker (VOC) | İlişkili Kanser Tipi | Referans |
|--|----------------------|------------------------|
| Heksanal;nonanal;oktanal; pentanal | Akciğer Kanseri | Fuchs ve diğ. 2010 |
| Dimetilsülfit;dimetilformamid;propanal; bütanal | Akciğer Kanseri | Kischkel ve diğ. 2010 |
| Propanal;bütanal;pentanal;heksanal;heptanal;oktanal;nonanal | Akciğer Kanseri | Poli 2005 |
| 1-bütanol; 3-hidroksi-2-bütanon | Akciğer Kanseri | Song ve diğ. 2010 |
| Etanol;aseton;bütan;dimetilsülfit;izopren;propanal;1-propanol;2-pentanon;furan;oksilen;etilbenzen;pentanal;heksanal; nonan | Akciğer Kanseri | Ulanowska ve diğ. 2011 |

| | | |
|--|-----------------|------------------------|
| Aseton;benzen;bütanal;2-bütanon;etil asetat;etilbenzen;furan;2-pentanon;propanal;1-propanol;2-propanol | Akciğer Kanseri | Buszewski ve diğ. 2012 |
| 2-bütanon;3-hidroksi-2-bütanon;2-hidroksiasetaldehit;4-hidroksiasetaldehit;4-hidroksiheksanal | Akciğer Kanseri | Fu ve diğ. 2014 |
| 2-bütanon,3-hidroksi-2-bütanon;2-hidroksiasetaldehit;4-hidroksiheksanal | Akciğer Kanseri | Bousamra ve diğ. 2014 |
| 2-metilbütilasetat;3-metil-1-bütanol; etilbenzol;heptanal;heksanal;izopropilamin; n-dodekan;sikloheksanon | Akciğer Kanseri | Handa ve diğ. 2014 |
| Toluen;etilbenzen;p-ksilen;m-ksilen;o-ksilen;izopropil benzen | Akciğer Kanseri | Ma ve diğ. 2014 |
| 2-bütanon;3-hidroksi-2-bütanon;2-hidroksiasetaldehit;4-hidroksiheksanal | Akciğer Kanseri | Schumer ve diğ. 2015 |
| 1,1-(1-bütenildien)bisbenzen;1,3-dimetilbenzen;1-iyodononan;[(1,1-dimeteil)thio]asetikasit;4-(4-propilsikloheksil)-4-siyano[1,1-bifenil]-4-yl ester benzoik asit | Kolon Kanseri | Kabir 2018 |
| 3,3-dimetil pentan;2-amino-5-izopropil-8-metil-1-azulenkarbonitril;5-(2-metilpropil)nonan;2,3,4-trimetil dekan;6-etil-3-oktil ester 2-triflorometil benzoik asit | Göğüs Kanseri | Kabir 2018 |
| Toluen;2-amino-5-izopropil-8-metil-1-azulenkarbonitril;p-ksilen;2,2-dimetil dekan | Prostat Kanseri | Kabir 2018 |

2.3.2 Nefeste Bulunan VOC'lerin Üretim Mekanizması

Dışarı verilen nefeste çeşitli VOC sınıfları ölçülebilir. Bunlara doymuş ve doymamış hidrokarbonlar, oksijen içeren, kükürt içeren ve azot içeren bileşikler dahildir. Doymuş hidrokarbonlar (örneğin etan, pentan ve aldehitler), hücre zarlarının yağ asidi bileşenlerinin lipid peroksidasyonu sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenir. Oksidatif stresin belirteçleri olarak hissedilirler (Miekisch ve diğ. 2004). Protein oksidasyonu ve kolonik bakteriyel metabolizma ile daha küçük miktarlarda üretilebilir. Kanda çözünürlüğü düşüktür ve bu nedenle oluştukları andan itibaren dakikalar içinde nefesle atılırlar. Dışarı verilen nefeste doymamış hidrokarbonlar da tespit edilir. Örneğin izopren, kolesterol sentezinin

mevalonik yolu boyunca oluşur. Aseton gibi oksijen içeren bileşikler nefeste bulunur. Aseton, lipoliz veya lipid peroksidasyonundan türetilen asetoasetatın dekarboksilasyonu ile üretilir. Nefeste bulunan kükürt içeren bileşikler, transaminasyon yolunda metioninin tamamlanmamış metabolizması ile üretilebilir. Azot içeren bileşikler, karaciğer bozukluğu veya üremisi olan kişilerin nefeslerinde yükselebilir. Birçok endojen VOC'nin kökeni bilinmemektedir. Tespit edilebilecek tüm uçucular için önemli biyokimyasal yollar hakkında bilgi edinmek için ek çalışmaların yapılması gerekmektedir (Mazzone 2008).

Tablo 2.2: VOC sınıflarının üretim mekanizması (Mazzone 2008).

| VOC Sınıfı | Örnek | Üretim Mekanizması |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Doymuş hidrokarbonlar | Etan, pentan, aldehitler | Reaktif oksijen türleri tarafından tetiklenen hücre zarlarının yağ asidi bileşenlerinin lipid peroksidasyonu |
| Doymamış hidrokarbonlar | İzopren | Kolesterol sentezinin mevalonik yolu |
| Oksijen içeren | Aseton | Asetoasetatın lipoliz veya lipid peroksidasyonundan dekarboksilasyonu |
| Kükürt içeren | Etil merkaptan, dimetilsülfid | Metioninin tamamlanmamış metabolizması |
| Azot içeren | Dimetilamin, amonyak | Karaciğer yetmezliği ve üremide yükselir |
| Alkol | Etanol, propanol | Alkol metabolizması, keton metabolizması, hidrokarbon metabolizması |
| Keton | Aseton, bütanon | Aminoasit metabolizm ile aseton, izopropanol ile aseton, yağ asidi metabolizması ve oksidasyon |
| Aldehit | Heksanal, asetaldehit | Lipid peroksidasyonu, alkol metabolizması, enzimatik fonksiyon |

| | | |
|-----------------------------|------------------------------------|---|
| Karboksilik asit | Propanoik asit | Aldehit oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, mikrobiyal |
| Ester/eter | Butil asetat, Dimetil-eter | Enzimatik etki, yani esterazlar |
| izoprenoidler | Limonen,pinen | CYP450 aktivitesi |
| Nitrojen | Trimetilamin, amonyak | Amino asit metabolizması,mikrobiyal |
| Furan | Furan | Mikrobiyal etki |
| Sülfür | Dimetil sülfid, hidrojen sülfid | Üre döngüsü, mikrobiyal etki |
| Aromatikler | Benzen, ksilen | Yağ dokusundan salınan, CYP450 |
| Siklik hidrokarbonlar/keton | Siklopentan, sikloheksanon | Belirsiz |

3. KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLER KULLANILARAK YAPILAN NEFES ÖRNEKLEMELERİ

3.1 Nefes Örneklemeye Yöntemleri

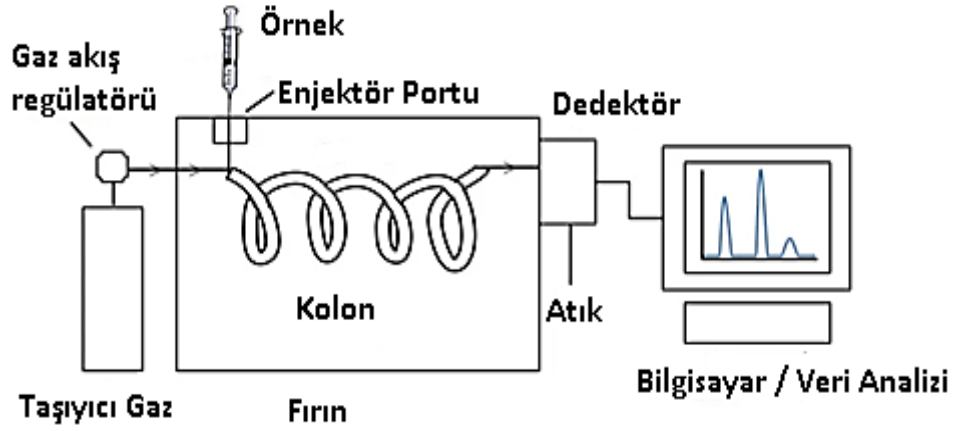
Dışarı verilen nefesteki VOC'leri analiz etmek için çeşitli analiz teknikleri kullanılabilir. İlk literatür çalışmalarına bakıldığında, nefes örneğini analiz etmek için yaygın olarak gaz kromatografisi kullanılmıştır, çünkü bu öncü çalışmaların amacı nefeste bulunan spesifik kimyasal bileşikleri keşfetmektir. Son yıllarda, araştırmacılar dışarı verilen nefes analizi için daha taşınabilir, uygun maliyetli cihazlara yönelmişlerdir.

3.1.1 Gaz Kromatografisi

Günümüzde, biyobelirteçlerin keşfi ve tanımlanması için başvurulan analitik enstrumantasyon, yüksek çözünürlükte doğru kütle tayinini sağlayan ve bilinmeyen türlerin tanımlanmasında yaygınca kullanılan MS yöntemidir. GC kısmı karışımdaki bileşenleri ayırırken, MS kısmı moleküllerin kütle/yük oranını kullanarak her bir bileşeni yapısal olarak tanımlamaktadır. GC'nin ayırma gücü ile MS'nin duyarlı ölçümünü birleştiren GC-MS uçucu organik bileşiklerin doğru bir şekilde tayininde kullanılır. Bu teknik, milyarda bir (ppb) konsantrasyon seviyelerinde bile VOC'lerin varlığını tespit edebildiği için solunan nefes örneklerinin analizini gerçekleştirmek için kullanılan en yaygın tekniktir.

GC genellikle kütle spektrometrisi (MS) ile kullanılır ve öncesinde katı faz mikroekstraksiyon (SPME) gibi örnek hazırlama teknikleri kullanılabilir. MS ile birleştirilmiş GC, analiz edilen numunede bulunan bileşikler hakkında kesin bilgi elde edilmesini sağlar (Marzorati ve diğ. 2019).

GC-MS analizini gerçekleştirmek için gerekli bileşenler Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: GC-MS analizini gerçekleştirmek için gereken tipik kurulum.

Analiz edilen numune, bir şırınga aracılığıyla GC kolonunun içine enjekte edilir. Numuneyi kolonun içinden geçirmek için taşıyıcı gaz olarak reaktif olmayan bir gaz kullanılır. Burada örneğin çeşitli bileşenleri sütun içinde ilerledikçe ayrılır. Daha sonra bileşenler kolondan ayrılır ve iyonize edildikleri ve kütle/yük oranlarına göre tespit edildikleri MS'e doğru yönlendirilir.

Dışarı verilen nefes analizi için GC kullanmanın ana avantajı, gaz halindeki bileşikleri ve numunedeki konsantrasyonlarını kesin olarak belirleme olasılığıdır. Son zamanlarda, mikro elektro-mekanik sistem (MEMS) teknolojisine dayalı portatif bir gaz kromatografisi geliştirilmiştir. Standart kromatografa göre boyutları küçültülmüş olan bu kromatografinin, ppb seviyesinde olabilecek VOC'leri tespit edebildiği bildirilmektedir (Marzorati ve diğ. 2019).

3.1.2 Kütle Spektrometrisi

GC dışarı verilen nefes örneklerinin analizi için MS ile kullanılabilir. MS tekniklerinin doğrudan kullanımı, zaman çözünürlüğünü iyileştirebilir ve numune hazırlamayı kolaylaştırabilir. Doğrudan MS teknikleriyle dışarı verilen nefes analizi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Proton Transfer Reaksiyonu Kütle Spektrometrisi (PTR-MS), birçok yazar tarafından araştırılan bir tekniktir. PTR-MS'de analiz edilen bileşikler, ayrışmayan proton transferi gerçekleştiren H_3O^+ iyonları ile reaksiyona girer. Bu yöntemin ana eksikliği, bileşikleri kesin olarak tanımlayamamasıdır.

Seçilmiş İyon Akış Tüpü Kütle Spektrometrisi (SIFT-MS), örnek bileşiklerin iyonizasyonunu kullanan dışarı verilen nefes analizi için kullanılabilen MS'e dayalı başka bir tekniktir. Bu teknik, akciğer kanseri teşhisi için potansiyel olarak önemli VOC konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılmıştır. Diskin ve arkadaşları 30 günlük bir süre boyunca 5 sağlıklı bireyin dışarı verilen nefesindeki amonyak, aseton, izopren ve etanol varyasyonlarını analiz etmiş ve bileşik konsantrasyonlarında duyarlı denek içi bileşik değişkenliği ve denekler arası farklılıklar bildirmiştir. Smith ve arkadaşları laboratuvar ortamında akciğer kanseri epitel hücreleri tarafından salınan asetaldehit konsantrasyonunu ölçmüş ve hücre sayısı ile doğrusal bir ilişki bildirmiştir. Spanel ve arkadaşları dışarı verilen nefeste formaldehit, asetaldehit ve propanol eser düzeylerinin ölçümü için SIFT-MS yöntemlerini tanımlamıştır (Marzorati ve diğ. 2019).

İkincil Elektron Püskürtme İyonizasyon Kütle Spektrometrisi (SESI-MS), MS'e dayalı VOC analizi için başka bir yöntemdir. Bu yöntemde, solunan nefes püskürtülen bir çözücü ile karıştırılır, böylece analiz altındaki bileşiklerin iyonlaşmasına neden olur. Li ve diğerleri, solunan nefes VOC'lerini analiz etmek için ticari bir SESI cihazı ile birleştirilmiş yüksek çözünürlüklü bir kütle spektrometresi kurmuştur (Marzorati ve diğ. 2019). Bu teknik dışarı verilen nefesin analizi için umut verici görünse de, literatürde SESI-MS cihazları kullanılarak akciğer kanseri dışarı verilen nefesin analizi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3.1.3 İyon Hareketlilik Spektrometrisi

IMS, iyonlaşmış molekülleri atmosferik basınçta bir elektrik alanında, saflaştırılmış bir gazın içerisinden geçirilirken iyonları hareketliliklerine göre ayırır. İyonlar, saflaştırılmış gazın içinden farklı hızlarda hareket ederek ayrılma sağlanır (Stein ve diğ. 1996).

Oldukça hassas, ucuz ve taşınabilir bir cihazdır. Lord ve iş arkadaşları, insan sağlığı için önemli belirteçler olarak aseton ve etanolü GC-IMS kullanarak tayin etmişlerdir (Lord ve diğ. 2002). Aseton ve etanol için tahmin edilen tespit limitleri sırasıyla 0.4 ve 0.5 µg/L'dir. Bu üstünlüklerinin yanısıra ön programlama gerektirmesi, bilinmeyen bileşiklere uygulanamaması ve karmaşık matrislerde hassasiyetinin azalması nedeni ile kullanımı kısıtlıdır (Mochalski ve diğ 2013).

3.1.4 Elektronik Burunlar

Bu cihazlar, bir sıvı örneğinin gaz halindeki içeriğini gerçek zamanlı olarak analiz edebilir. Gaz dedektörlerini ve elektronik bileşenleri küçük ve taşınabilir bir cihaza entegre ederler. Geniş kapsamlı olası uygulamaları arasında, elektronik burunlar dışarı verilen nefes analizi yapmak için kullanılabilir. Bir karışımdaki bir VOC'nin mutlak içeriğini ölçemedikleri için GC analizörlerinden farklıdır ancak bunun yerine dikkate alınan karışımdaki VOC'lerin kombinasyonunun bir göstergesini sağlarlar. Kimyasal ve fiziksel sensörlerden kuvars mikro terazilere ve altın nanoparçacık sensörlerine dayalı daha karmaşık çözümlere kadar elektronik burunlar oluşturmak için çeşitli dedektör türleri kullanılabilir. Prensip olarak, bu dedektörlerin her biri belirli bileşiklere göre uyarlanabilir, böylece hastalığa özgü VOC'lerin tespitine potansiyel olarak ulaşılabilir.

3.1.5 Köpeklerde Koku Alma Duyusu (Canine Olfaction)

Saf bir "teknoloji" olarak kabul edilemese bile, köpek koku alma sistemi potansiyel olarak hastalık teşhisi için kullanılabilir. Köpekler, iyi gelişmiş bir koku alma sistemi ile karakterize edilir ve bileşikleri koklamada dikkate değer bir yeteneğe sahiptir. Bu nedenle, solunan nefesi, idrarı veya cildi koklayarak kanser varlığını tespit edebilirler. Bir köpeğin kanseri koklayabildiğini bildiren ilk yazarlar 1989'da Williams ve Pembroke'dir (Williams ve Pembroke 1989). Köpeğinin benlerinden birine olan ilgisini fark ettikten sonra klinik danışmanlık arayan bir hastayı tanımlamışlardır. Ben daha sonra analiz edilmiş ve kötü huylu tümör olarak teşhis edilmiştir. Birkaç yıl sonra, Church ve Williams benzer bir olay bildirmiştir. Bir

köpek, daha sonra bazal hücreli karsinom teşhisi konan bir hastanın deri lezyonuna ilgi göstermiştir. Bu ön bulgulardan sonra, kanser tespiti için koklayıcı köpekleri içeren daha fazla çalışma yapılmıştır. Mesane, melanom, yumurtalık, kolorektal, akciğer ve prostat kanserleri ele alınmıştır. Bu çalışmalarda, köpekler idrar, deri, kan veya solunan nefesi koklayarak kanseri tespit etmek için eğitilmiştir. McCulloch ve ark. koklayıcı köpeklerle akciğer kanseri tespiti için ilk çalışmayı tasarlamıştır. Yazarlar, beş köpeğe sağlıklı, akciğer ve meme kanserinden solunan nefesi nasıl ayırt edeceklerini öğretmiştir. Sadece akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı kontroller göz önüne alındığında, yazarlar %99 duyarlılık ve %99 özgüllük elde etmiştir. Ehmann ve ark. dört köpekle 220 kişinin (110 sağlıklı, 60 akciğer kanseri, 50 KOAH hastası) nefesini analiz ederek %71 duyarlılık ve %93 özgüllük elde etmiştir. Buszewski ve ark. akciğer kanseri dışarı verilen nefes analizi için GC ve köpek algılama yaklaşımlarını karşılaştırmıştır. Genel olarak, köpek tespiti ile %82 hassasiyete ve %82 özgüllüğe ulaşmışlardır. Albertini ve arkadaşları dışarı verilen nefes analizi yapmak için üç eğitilmiş köpek kullanmıştır. 150 deneğin (57'si akciğer kanseri, 38'i diğer akciğer hastalıkları ve 55'i sağlıklı) solunan nefesi göz önüne alındığında, üç köpek arasında %80'in biraz üzerinde bir ortalama doğruluğa ulaşmışlardır. Dışarı verilen nefes analizi için köpek tespiti sonuçları umut verici görünse bile, bu yöntemin klinik uygulamaya doğrudan uygulanması mümkün görülmemektedir.

3.1.6 Sorbent tuzakları

Sorbent tuzak bazlı nefes örnekleyiciler, silika jel, aktif kömür veya organik gözenekli polimerik (Tenax ve Amberlite XAD reçineleri gibi) adsorban içeren, genellikle camdan yapılmış mini kolonlardır. Sorbent tuzaklar aynı zamanda fenil metil silikon, polietilen glikol ve sol-jel ile kaplanmış seramik veya metal kılcallardan oluşabilir. Bu adsorban malzemeler, hem hidrofilik hem de hidrofobik analitleri tutabilen, 250 °C sıcaklığa dayanan malzemelerdir. Örnekleme için birey, 2 dakika boyunca bir nefes toplama aparatı içine nefes verir. NTA genellikle kapaklı bir ağızlık ve bakteri filtresinden oluşan, iki sorbent tuzağı içerir. Bu şekilde VOC'leri içeren alveolar nefes (akciğerin en derin bölümünden gelen nefes) ve kontrol havasından ayrı olarak toplanabilir. Bu tuzaklar önceden belirlenmiş bir akış hızı kullanarak numune toplamak için kalibre edilmiş bir hava örnekleme pompasına

bağlanabilir. VOC'ler tuzak içindeki adsorban yüzeyinde tutulur. Hapsolmuş VOC'ler termal olarak tuzaktan desorbe edilir ve soğuk bir ortamda konsantre edilerek analize hazırlanır. Alternatif olarak, desorpsiyon işlemi asetonitril veya metanol gibi çözücüler kullanılarak gerçekleştirilip, elde edilen çözeltiler ESI-MS ve LC-MS ile analiz edilebilir. NTA örnekleme yönteminin en önemli avantajı, herhangi bir rahatsızlığa neden olmadan solunum sistemi hastalığı olanlar ve yaşlılar dahil olmak üzere her hastadan nefes örneği toplanabilmesidir. Toplanan VOC'ler analiz için bir GC veya GC-MS cihazına verilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı portatif olmaması ve çeşitli organik çözücüler vasıtası ile VOC örneklerinin toplanmasıdır. Ayrıca, kullanılan sistem elemanları maliyetli ve kurulumu zaman alıcıdır. Bu bağlamda daha az çevre dostu bir tekniktir (Abdel-Rehim 2016).

3.1.7 Katı Faz Mikroekstraksiyon

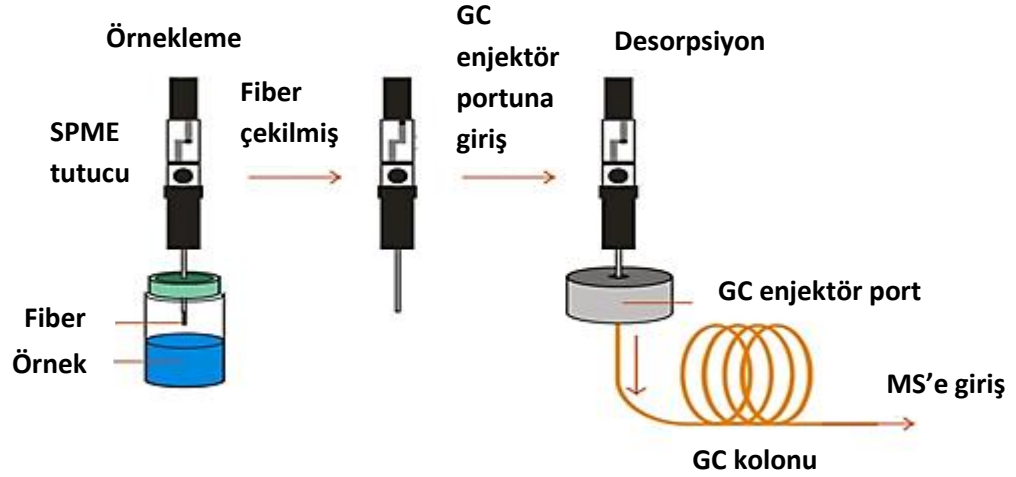
Nefesin solunum yoluyla örnekleme ve VOC'lerin zenginleştirilmesi için kullanılan diğer önemli bir uygulama katı faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemidir. SPME ilk olarak 1990'lı yılların başında Pawliszyn ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Metotta katı polimer, sabit faz olarak küçük çaplı kaynaşık silika çubuk (yaklaşık 1 cm) üzerine kaplanır. Basit, zaman verimli ve solvent içermeyen bir numune hazırlama tekniğidir ve çeşitli bileşiklerin, çevresel, gıda, biyolojik, farmasötik ve klinik örneklerdeki organik kirleticiler gibi iz seviyelerinde ekstraksiyonunda başarıyla uygulanmıştır.

SPME'nin içinde, mikron ölçekli bir fiber bulunur. Bu fiber seçici adsorpsiyon sağlanması için ekstraksiyon fazı olarak bir sıvı veya katı ile kaplanır. Bu kaplama sayesinde kompleks nefes örneklerinden VOC'lerin adsorpsiyonu sağlanır. SPME'nin en büyük avantajı, kaplama malzemesinin türüne göre ilgili bileşikleri seçici olarak toplayabilmesidir. Emici tuzak bazlı yöntemlere benzer şekilde, nefes örnekleri kimyasal olarak inert polivinil florür torbalar (tedlar poşetleri) içinde toplanabilir (Haick ve Peled 2012).



Şekil 3.2: SPME fiberi ve Tedlar torbası

Polidimetil siloksan (PDMS), polidimetil siloksan-divinil benzen (PDMS/DVB) veya polidimetil siloksan-karboksen (PDMS/Karboksen) ile kaplı bir SPME fiberi, VOC'lerin toplanması için 20 ila 30 dakika boyunca nefes örneklerini içeren torbaya (tedlar torbası) yerleştirilir. Alternatif olarak, numune VOC ekstraksiyonu için bir SPME fiberi varlığında bir emici tuzak bazlı cihaza aktarılabilir ve sonrasında termal desorpsiyon ile toplanan VOC'ler analiz için salınabilir. SPME'nin bir diğer avantajı ise, portatif ortam iyonizasyon kaynakları ve mikrometre ölçeğindeki diferansiyel iyon mobilite spektrometresi dahil olmak üzere çok sayıda farklı analitik cihaza bağlanarak veya yerleştirilerek analizin yapılmasına izin vermesidir (Dumlao ve diğ. 2017).



Şekil 3.3: SPME yöntemi

Genel olarak, sorbent tuzakları ve SPME yöntemleri karşılaştırıldığında, tedlar torbalarındaki nefes örneklerinden VOC'leri zenginleştirmek için SPME yöntemi daha verimli ve kolay bir yol olarak tercih edilmektedir. Ayrıca, SPME fiberinin portatif ve taşınabilir olması sebebi ile örnekleme işlemi daha kolay bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Tez kapsamında analizlerin gerçekleştirilmesinde SPME yönteminin kullanılması planlanmıştır. Literatürde nefes örneklerini analiz etmek için kullanılan çeşitli metotlar Tablo 3.1'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.1: Dışarı verilen nefes analizi için gözden geçirilen teknolojilerin karşılaştırılması (Marzorati ve diğ. 2019).

| Metot | Maliyet | Gerekli Uzmanlık | Bileşik Özgüllüğü | Bileşik Çözünürlüğü |
|--------------------|---------|------------------|-------------------|---------------------|
| GC-MS | Yüksek | Yüksek | Yüksek | ppb |
| IMS | Yüksek | Yüksek | Orta | ppb |
| Kolorimetrik | Orta | Orta | Düşük | ppm |
| İletken Polimer | Orta | Düşük | Düşük | ppm |
| Altın Nanopartikül | Orta | Düşük | Orta | ppm |
| Metal Oksit | Düşük | Düşük | Düşük | ppm |

| | | | | |
|------------------------|------|-------|------------|------------|
| Quartz Microbalance | Orta | Düşük | Düşük | ppm |
| Köpek Koku Duyusu | Orta | Orta | Bilinmeyen | Bilinmeyen |

GC-MS, kimyasal analiz için belirlenen bir araç olduğundan ve VOC'leri ppb seviyelerinde tespit edebildiğinden, kesinlikle dışarı verilen nefes analizi için yararlı bir aracı temsil eder ancak enstrümantasyonun yüksek maliyeti ve kullanımı için gereken uzmanlık, GC-MS'nin standart olarak uygulanmasını sınırlar. Bölüm 3.1.5'te bahsedildiği gibi, köpek koku sistemine dayalı dışarı verilen nefes analizi ile ilgili güncel çalışmalar umut verici sonuçlar elde etse bile, bu teknik olduğu gibi akciğer kanseri taraması için güvenilir bir yöntem olarak kullanılamaz. Aslında elektronik burunlar, dışarı verilen nefes analizi için kullanımı kolay, hızlı ve güvenilir bir cihazın geliştirilmesi için en umut verici araçları temsil eder. Elektronik burunlar farklı sensör teknolojilerine dayanabileceğinden, farklı sensör tipleri arasında bir karşılaştırma yapılması gerekir. Kolorimetrik sensörler, renk değişikliklerini tespit etmek için yüksek çözünürlüklü bir RGB kamera gerektiğinden ve bu, taşınabilir bir elektronik burundaki entegrasyonlarını sınırlayabileceğinden, sensör yanıtlarının tespiti ve analizleri için karmaşık bir kurulum gerektirir (Miekisch ve diğ. 2004). Metal oksit ve kuvars mikro denge sensörleri, özel malzemelerle kaplanabildikleri, ancak aynı zamanda sıcaklık ve neme karşı hassas oldukları için belirli VOC'lere karşı yüksek hassasiyet ile karakterize edilir, bu nedenle nefes analizi için bunları kullanırken dikkatli olunmalıdır. Ayrıca metal oksit sensörlerinin yüksek sıcaklıkta çalışması gerekir, bu nedenle cihazın güç tüketimine ek bir gereksinim eklenir. Birçok VOC'ye duyarlı olan iletken polimer gaz sensörleri, yüksek çok yönlülük ile karakterize edilir ve oda sıcaklığında çalışır. Dışarı verilen nefes analizi için altın nanoparçacık sensörleri hala araştırma aşamasındadır, ancak gözden geçirilen çalışmaların sonuçları umut vericidir ve diğer sensör tiplerinin aksine nem bağımlılığı tespit edilmemiştir, bu nedenle bu sensörleri nefes analizi için uygun hale getirir (Oakley-Girvan ve Davis 2017).

Bu teknolojilerin her biri, analiz edilen numunedeki belirli bileşikleri hedeflemek için uyarlanabilir. Gaz kromatografisi tekniği, nefes örneklerini analiz

etmek için en uygun perspektifi temsil eder, çünkü en son cihazlar bileşikleri ppb seviyelerinde saptayabilir.

3.2 3D Yazıcı Kullanımının Önemi

Günümüzdeki teknolojik gelişmeler, yaşam kalitesini arttırmak için her alanda karşımıza çıkmaktadır. Bu teknolojik gelişmeler, insanları sürekli olarak değişime ve yeniliğe yöneltmiştir. Ayrıca bu yönelimler girişimciliği arttırarak inovasyonu da arttırmıştır. Girişimcilik ve inovasyonun getirdiği bilişim sayesinde 3 boyutlu yazıcı teknolojileri hayatımızda önemli bir yer almaya başlamıştır. 3 boyutlu baskı, hazır olarak bulunan veya özel olarak çizilen 3 boyutlu modelin, 3 boyutlu yazıcı kullanılarak katı olarak çıktısının alındığı teknolojik bir işlemdir (Aydın ve Küçük 2017).

3 boyutlu yazıcı teknolojisi savunma sanayi, otomotiv sanayi, mühendislik, sağlık, eğlence ve eğitim sektörü gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Malik ve diğ. 2015). 3 boyutlu yazıcı teknolojisinin en yaygın kullanıldığı alanların başında mühendislik ve medikal alanı gelmektedir. Örneğin sağlık alanında, protez-ortez-implant üretimi, cerrahi enstrüman üretimi, anatomik modeller ve farmakolojik uygulamalarda 3 boyutlu yazıcı teknolojisi sıkça kullanılır (Buckley ve Gordon 2011).

Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda nefes toplama sistemi olarak Tedlar/Mylar torbası, akış reaktörü, biyo-VOC ve NTA gibi standart teknolojiler kullanılmıştır. Tedlar/Mylar torbası, standart klinik solunum ekipmanına bağlanabilmesi, belirli hacmi ve ucuz olduğu düşüncesi ile en sık kullanılan yöntemdir. Fakat bu yöntem, sızıntılara ve kırılmalığa karşı hassas olmasının yanı sıra UV bozulmalarına da maruz kalabilmektedir (Dallinga ve diğ. 2009). Bu tez kapsamında ise ilk defa 3 boyutlu yazıcı teknolojisi kullanılarak çok daha sağlam, sızıntılara karşı dayanıklı ve dış etmenlerden etkilenmeyen bir toplama kabı tasarlanmıştır. Mevcut kullanılan yöntemlerin piyasadaki satış fiyatları göz önüne alındığı zaman, 3 boyutlu yazıcı ile yazdırılabilecek olan ve tek kullanımlık kullanılacak olan nefes toplama sistemlerinin maliyeti çok daha düşük seviyelerde kalmaktadır. 3 boyutlu yazıcı teknolojisi hacmi belli bir kap üretilmesinde Tedlar

torbasına oranla daha dayanıklı ve sızdırmaz bir yapının oluşturulmasını kolaylaştırmaktadır. Polilaktik asit polimeri bazlı bir filament kullanılarak üretilebilecek bir nefes toplama sisteminin maliyeti yaklaşık olarak 0.5 Euro civarında iken, bir Tedlar torbası fiyatı 100 ile 200 Euro arasında değişmektedir (Lizama 2019). Maliyetin dışında Tedlar poşetin kullanımı sırasında toplanan nefes örneğinde bulunan nem torbanın iç çeperlerine yapışarak bazı VOC'lerin bu damlacıklar içinde çözülmesine ve güvenilir bir ölçümün yapılmasına engel olmaktadır (Robroeks ve diğ. 2013). Ayrıca, Tedlar torba örneklemede, depolanmasında ve taşınmasında komplikasyonlar meydana gelme riski de çok fazladır. Bu risklerin, 3 boyutlu yazıcı sistemi ile hazırlayacağımız nefes toplama düzeneği sayesinde giderilmesi planlanmaktadır. Örneğin, oluşturacağımız nefes toplama düzeneğinde yer alacak olan hava tahliye kanalları sayesinde nefes içerisinde bulunan nem dışarı atılarak, VOC'lerin oluşabilecek olan su damlacıklarının içerisinde çözünmesi gibi kayıplar engellenecektir.

Bir diğer yöntem olan akış reaktörü, tekrarlanabilir olduğu için nefesten VOC'lerin toplanması amacıyla seçilebilir. Fakat, bu yöntem kullanıcı dostu olmadığı gibi pahalıdır (David ve diğ. 2014). Her hastadan nefes örneğinin toplanabilmesi için hastanın bu sistemin yanına getirilmesi gerekmektedir. Bu da zahmetli ve istenmeyen bir durumdur.

Bizim çalışmamızda ise örnekleme kabı daha küçük kompakt bir hale getirilerek, hastayı rahatsız etmeden, düzenek hastaya götürülerek kullanımı basitleştirilecektir. Tezimizde geliştirdiğimiz nefes toplama sisteminin diğer toplama sistemlerinden en önemli farklarından biri de tek kullanımlık olduğu için hijyenik olmasıdır. Ayrıca, tek kullanımlık olması sebebi ile bir başka hastadan gelebilecek olan örnek taşınması durumu söz konusu değildir. Yani analiz üzerinde hafıza etkisi (memory effect) yoktur. Diğer sistemlerde (NTA, Biyo-VOC, Akış reaktörü) sadece temizlik yapılarak aynı cihaz tekrar kullanıldığı için temizlik sonrası olası kalıntı durumunda örnek taşınmaları (hafıza etkisi) söz konusudur (Riess ve diğ. 2010). Dolayısıyla bir önceki hastadan kalan bir kalıntı varsa yanlış sonuçlar elde edilir.

Literatürde günümüze kadar GC-MS kullanılarak nefes örneğinden farklı kanser çeşitlerinin sınıflandırılması ve erken teşhisi üzerine çalışmalar bulunmamaktadır. Tez kapsamında üretilecek olan nefes toplama düzeneği sayesinde kanserin erken teşhisi ve sınıflandırılması konusunda en kolay, güvenilir ve hızlı bir şekilde örnekleme yönteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

3.3 Lineer Diskriminant Analizi

Diskriminant fonksiyonları aracılığı ile gruplar arası ayırma en fazla etki eden ayırıcı değişkenleri belirlemek ve hangi gruba ait olduğu bilinmeyen bir bireyin hangi gruba dahil edileceğini belirlemek için kullanılır. Genel olarak bir ayırma yöntemi olup, bireylere ait çeşitli özelliklerden yararlanarak ait oldukları grupları belirlemek veya mevcut grupları birbirinden ayıracak en iyi fonksiyonu bulmak için kullanılan çok değişkenli istatistik yöntemlerinden biridir (Çamdeviren 2000). Genelde birimlerin gruplanmasında bazı matematiksel eşitliklerden faydalanılır. Diskriminant fonksiyonu olarak adlandırılan bu eşitlikler birbirine en çok benzeyen grupları belirlemeye olanak sağlayacak şekilde grupların ortak özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Grupları ayırmak için kullanılan karakteristikler ise diskriminant değişkenleri olarak adlandırılmaktadır. Kısaca, iki veya daha fazla sayıdaki grubun farklılıklarının diskriminant değişkenleri aracılığıyla belirlenmesidir (Klecka 1980). Araştırmacı hatalı sınıflandırma ihtimalini en aza indirgeyerek gözlemleri ait oldukları gruplara ayırmak veya bu gözlemlerin çekilmiş oldukları grupları belirlemek ister (Johnson ve Wichem 1998). Belirlenecek grupların ortalamaları arasındaki farklılığın maksimum olması istenmektedir.

Lineer diskriminant analizi, önceden belirlenmiş olan kriterlere ait grupların birbirleri ile olan korelasyonlarının incelenmesi amacı ile kullanılan bir istatistik yöntemi olup, grupların birbirinden ayırt edilememesi konusunda bir bilgi sahibi olunması adına kullanılmaktadır.

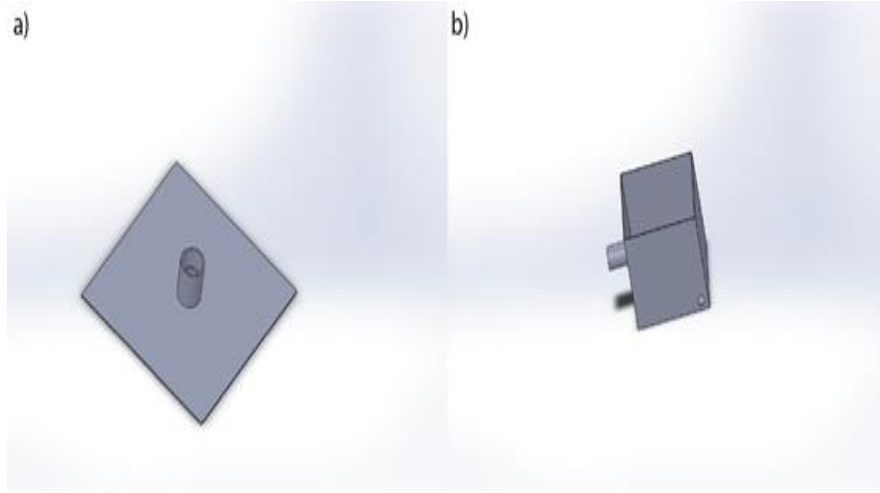
Nefes örneklerinden elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, her bir bireye ait nefes örneklerinde elde edilen sinyallerin şiddetlerinin farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel olarak daha anlamlı hale getirilmesi amacı ile lineer diskriminant analizi gerçekleştirilmiştir.

4. YÖNTEM

Bu çalışmada, kanserli hastalardan ve kontrol grupları olarak sağlıklı kişilerden toplanacak nefes örneklerindeki VOC'lerin SPME fiberi üzerinde zenginleştirilerek toplandıktan sonra GC-MS ile tayinleri sonucu elde edilecek kromatografik VOC profillerinin karşılaştırılarak kanser türlerinin belirlenmesi ve erken teşhisi için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, yöntemin geliştirilmesi ve tezin amaca hizmet edebilmesi için tezde nefes örneklerinin toplanması, VOC'lerin örnekleme için bir nefes toplama düzeneği prototipinin tasarlanması ve üretilmesiyle SPME fiberinin üzerinde örneklerin toplanması sonrasında VOC'lerin tayini için GC-MS analizleri yapılması gereklidir. GC-MS analizi ile oluşturulacak VOC profillerinin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesi, yani verilerin işlenmesi ve elde edilecek bilgilerin hastane ile entegrasyonunu içeren deneysel basamaklarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu deneysel basamaklar aşağıda açıklanmıştır. Çalışma Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

4.1 3D yazıcı ile nefes toplama düzeneğinin hazırlanması

Şekil 4.1'de SOLIDWORKS programı kullanılarak çizilmiş olan nefes örnekleme kapları, 3D yazıcı sistemi kullanılarak basımları yapılmıştır. 3D yazıcı sisteminde polilaktik asit kullanılarak baskılar alınmıştır. Toplanacak nefes örneklerinin GC-MS ile VOC analizinde en iyi duyarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirliğin yanında yüksek seçiciliğe ulaşması için farklı boyutlarda baskılar yapılmış ve bu farklı boyutların her birindeki sonuçlara, nem oluşumuna, SPME fiberinde tutunan VOC sayılarına göre en uygun olan kap seçilerek kullanılmıştır.



Şekil 4.1: Nefes toplama düzeneği prototipinin a) üst kapak resmi b) alt platform resmi

4.2 SPME fiberlerinin seçimi

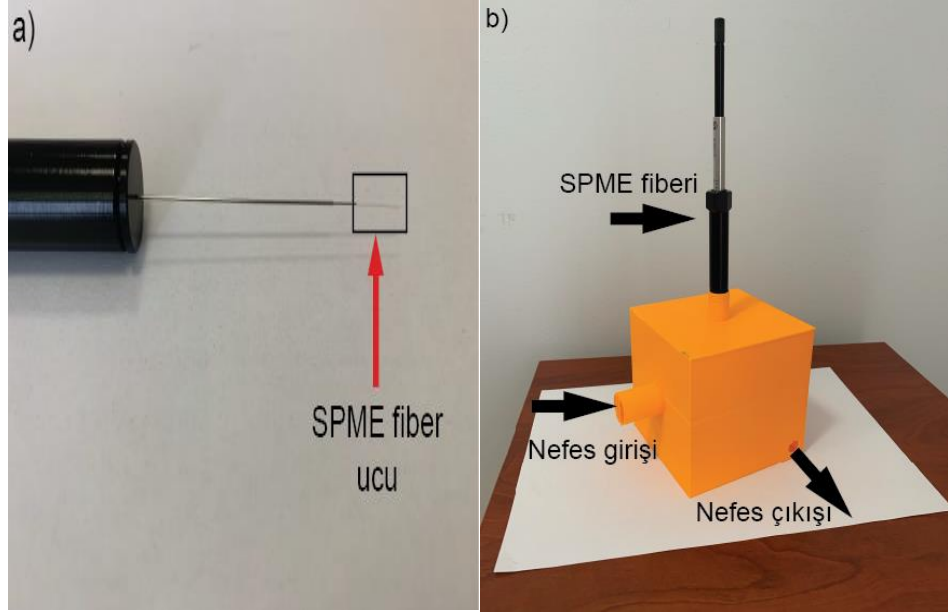
Farklı polariteye sahip uçucu organik bileşiklerin nefesten SPME fiberi üzerinde en iyi verimlilikle toplanabilmesi ve kanser çeşitlerinin sınıflandırmasının başarılı bir şekilde yapılabilmesi açısından, piyasada satılan Tablo 4.1’de belirtilen SPME fiberleri temin edilip, seçmiş olduğumuz uçucu organik bileşiklerin taraması yapılmıştır. Başlangıç olarak PDMS SPME fiberi kullanılmıştır. Çünkü literatürde, PDMS fiberinin çok sayıda uçucu organik bileşiği tutabildiğini gösterilmektedir. PDMS fiberinin yanı sıra PDMS-DVB ve Carbowax SPME fiberleri tez kapsamında incelenmiştir. Bu iki farklı SPME fiberi, PDMS’ye benzer şekilde uçucu organik bileşiklerin toplanmasını sağladığı gibi farklı karakterdeki bileşiklerin tutulmasını sağlayarak daha çok sayıda bileşiğin bu tez kapsamında incelenmesinin önünü açacağı düşünülmüştür.

Tablo 4.1: SPME fiberlerinin çeşitleri ve tutunan VOC'lerin özellikleri

| SPME fiberinin cinsi | Tutunan moleküllerin özellikleri |
|--|---|
| (Polydimethylsiloxane-PDMS) Fiber | Apolar karakteristiğe sahip organik bileşikler |
| (Polydimethylsiloxane PDMS-Divinilbenzene DVB) Fiber | Apolar ve polar karakteristiğe sahip uçucu organik bileşikler |
| Carbowax Fiber | Yarı uçucu özelliğe sahip organik bileşikler |

4.3 Nefes örneklerinin toplanması

3D yazıcı ile yazdırılmış olan nefes toplama kabının üst tarafından (Şekil 4.2a) SPME fiberleri yerleştirilecek olup, ağızlık kısmından hava üflenmesi suretiyle (Şekil 4.2b), hasta bireylerin nefeslerinde bulunan uçucu organik bileşiklerin fiber üzerinden toplanması sağlanmıştır. Hasta bireylerden örnek toplanmasına başlanmadan önce, bu basamakta, sağlıklı bireyler kullanılarak, nefes verme süresi optimize edilip nefeslerin daha güvenilir ve sorunsuz bir şekilde toplanması sağlanmıştır. Tablo 4.2'de yer alan VOC'lerin nefes içerisinde yer aldığı bilinmekte olup, incelenen nefes örneklerinde gözlemlenmesi öngörülmektedir. Ayrıca, tabloda yer alan bazı VOC'lerin nefesten kanser tespitinde biyobelirteç olarak kullanımları da literatürde incelenmektedir.



Şekil 4.2: a) SPME fiberinin görüntüsü, b) SPME fiberi yardımı ile nefes örneğinin toplanmasının şematik gösterimi

Tablo 4.2: Nefes içerisinde yer alan VOC'lerin listesi

| | | |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| Stiren | Tolüen | 2-metil heptan |
| Dekan | n-Heptan | Etanol |
| o-Ksilen | m-Ksilen | p-Ksilen |
| Propil benzen | Heptan,2,2,4,6,6-pentametil | 1,2,4-trimetil benzen |
| Undekan | Metilsiklopentan | 2-metil-1,3-bütadien |
| 1-hekzen | Mesitilen | 1-hepten |
| Hekzanal | Heptanal | 2-metil pentan |
| Oktan | 3-hidroksi-2-butanon | Aseton |
| Benzen | Sikloheksan | Pentan |
| Etilbenzen | 2,4-dimetil heptan | Nonan,3-metil- |
| Oktan,3-metil- | Metan,triklorofloro- | Siklopropan,1-metil-2-pentil |

4.4 Nefes Örneklerinin Analizi

SPME üzerinde toplanan hasta ve sağlıklı bireylerin nefesi içerisinde yer alan uçucu organik bileşiklerin analizi GC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GC-MS çalışma koşulları (fırın sıcaklığı, sıcaklık programı, enjektör sıcaklığı, gaz akış hızı) SPME seçimi ve tutunan VOC'lerin cinsine göre optimize edilmesi gerekmekte olup, bu işlemler gerçekleştirilmiştir ve GC-MS sisteminde kullanılan koşullara bulgular kısmında yer verilmiştir. Çalışmanın geri kalanında bu koşullar kullanılarak analizler yapılmıştır.

5. BULGULAR

Yöntem kısmında belirtilmiş olan basamaklar tek tek incelenmiş ve elde edilmiş olan optimum koşullar kullanılarak, sağlıklı bireylerin nefes örnekleri incelenmiştir. Bu amaçlar, sırasıyla, nefes verme süresi, nefes toplama düzeneğinin boyutu, fiber karşılaştırması ve basitçe optimum koşulların bir erkek ve bir kadın olmak üzere iki farklı kişiden alınmış nefes örneklerinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır. Daha sonra, sigara kullanan ve kullanmayan erkek ve kadın bireylere ait nefes örnekleri topluca karşılaştırılmıştır.

5.1 Nefes Toplama Düzeneğinin Boyutunun Seçimi

Nefes toplama düzeneğinin içerisinde nem toplanmaması en önemli kritik noktalardan bir tanesi olup, bu amaçla farklı boyutlara sahip nefes toplama düzenekleri basılarak, çeperlerinde nem oluşumu nitel olarak gözlemlenmiştir. 6, 8 ve 10 cm boyutlarındaki küpler şekilde basılmış olan nefes toplama düzenekleri içerisine 10 dk boyunca nefes üflenmiş olup, bu süresinin sonunda küplerin kapakları açılarak çeperlerde nem oluşumları bir peçete yardımı ile bakılmıştır. 8 ve 10 cm boyutlarındaki küplerin çeperlerinde nem oluşumuna rastlanmaz iken, 6 cm boyutundaki küplerin duvarlarında nemin olduğu görülmüştür. Bu oluşan nem miktarlarının az olması nedeniyle, içerisinde herhangi bir VOC'nin tutulup tutulmadığı konusunda bir öngörü yapmak mümkün değildir. Ayrıca, örnek miktarı olarak çok az olması, içeriklerinin SPME fiberleri yardımı ile GC-MS ile incelenmesi de mümkün değildir. 8 ve 10 cm boyutlarındaki küplerden, basım hızı ve maliyetin düşürülmesi amacıyla, 8 cm boyutundaki küp seçilmiş olup, deneylerin geri kalanında bu boyutta basılmış olan nefes toplama düzenekleri kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

5.2 GC-MS sisteminin çalışma koşulları

Tablo 5.1 içerisinde analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan cihaza ait akış parametreleri ile sıcaklıklar gösterilmekte olup, tüm analizlerde bu değerler kullanılmıştır.

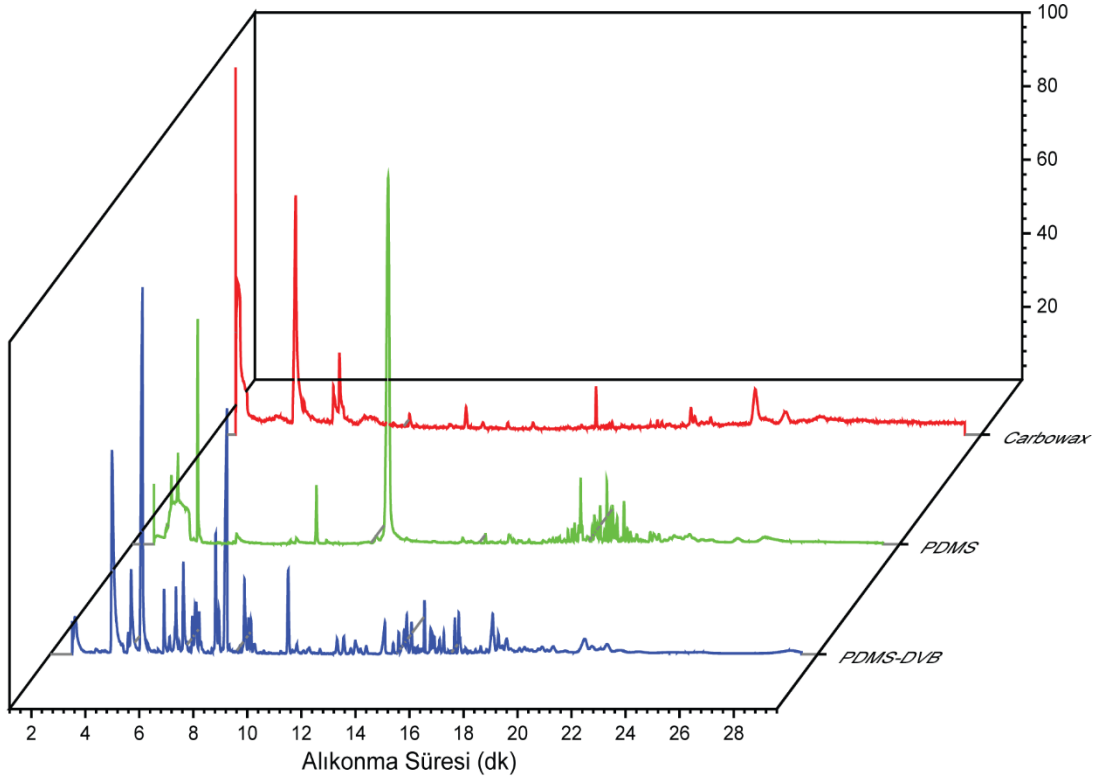
Tablo 5.1: GC-MS cihazı ölçüm parametreleri

| | |
|----------------------|-----------|
| Kolon Sıcaklığı | 35.0 |
| Enjeksiyon Sıcaklığı | 250.0 |
| Örnekleme Süresi | 1 dk |
| He gazı akış hızı | 1.0 mL/dk |
| Split modu | Splitless |
| Kolon tipi | 5MS |

Cihazdaki analizlerin gerçekleşmesi sırasında kullanılan sıcaklık programı, 5 dk boyunca 35 °C sıcaklıkta fırın sabit tutulup sonrasında 5 derecelik artışlarla önce 115°C 'ye daha sonra 20 derecelik artışlarla 250°C 'ye çıkarılarak toplamda 27.75 dk olacak şekilde kullanılmıştır. Fiberden elde edilmiş olan sonuçların analizlerinde bu sıcaklık programı ve değerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5.3 SPME fiber seçimlerinin karşılaştırılması

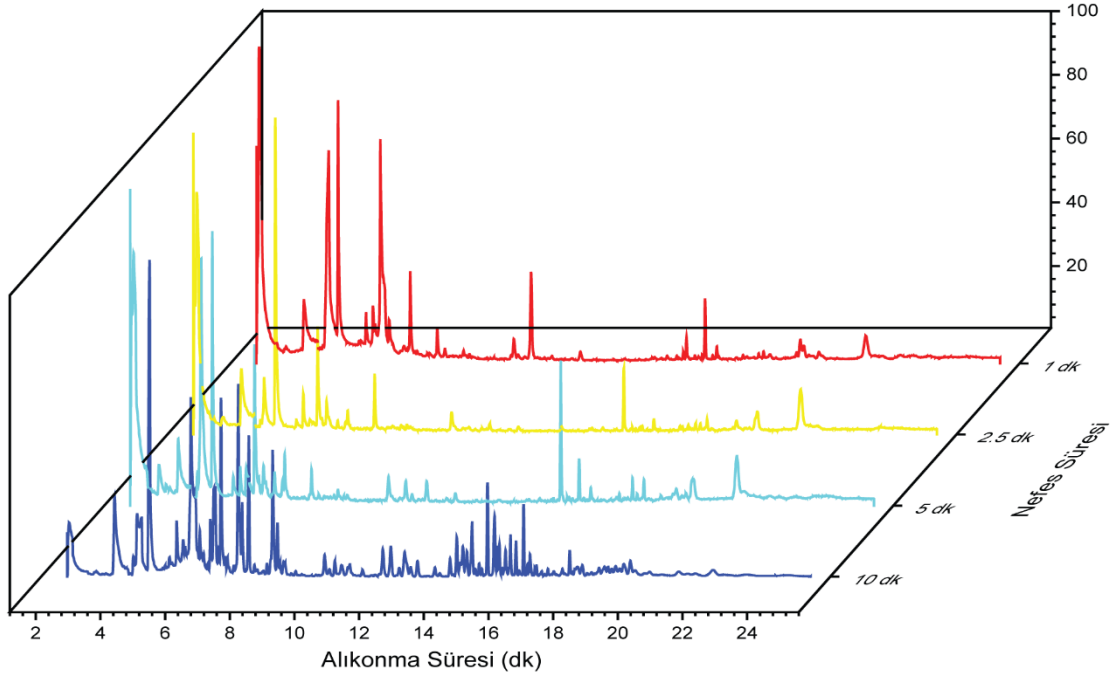
İlk olarak farklı kaplamalara sahip SPME fiber örnekleri karşılaştırılmış ve bu fiberler üzerinde tutulan VOC'lerin neler olduğu, GC-MS sistemine ait yazılımın kütüphane taraması yardımı ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, PDMS-DVB fiberi üzerinde diğer iki sisteme oranla daha fazla sayıda VOC'nin tutulduğu gözlemlenmiş ve sonraki tüm ölçümler bu fiber kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.1'de bu 3 farklı fiberin incelenmesi sonucunda elde edilmiş olan kromatogramlar gösterilmektedir.



Şekil 5.1: 3 farklı fiber üzerinde tutulan nefes profillerine ait kromatogramların karşılaştırılması

5.4 Nefes Verme Süresi

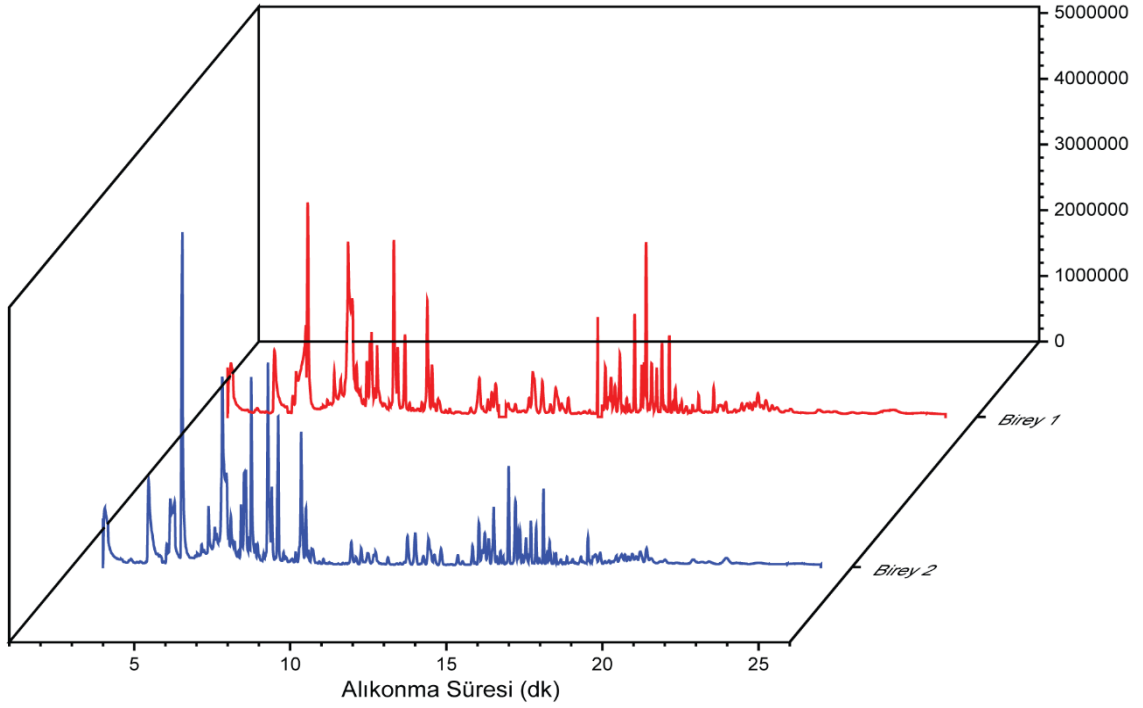
Kişilerden toplanan nefesler için, nefes verme süresinin optimizasyonu için, 1 dk ile 10 dk arasında değişen sürelerde, PDMS-DVB SPME fiberi üzerinde VOC'lerin birikimi incelenmiş olup, elde edilen kromatogramlara bakıldığında, 10 dk'lık bir nefes verme süresi sonucunda, fiber üzerinde maksimum sayıda, pik elde edilmiş, bu piklere karşılık gelen VOC çeşitleri GC-MS sistemine ait yazılım ile kütüphane taraması yapıldığında, en fazla sayıda VOC'nin de 10 dk lık bir nefes verme işleminden sonra ortaya çıktığı bulunmuştur. Farklı nefes verme sürelerine ait elde edilen kromatogramlar karşılaştırmalı olarak Şekil 5.2'de gösterilmektedir.



Şekil 5.2: Nefes verme sürelerinin karşılaştırılması

5.5 Nefes örneklerine ait profillerin karşılaştırılması

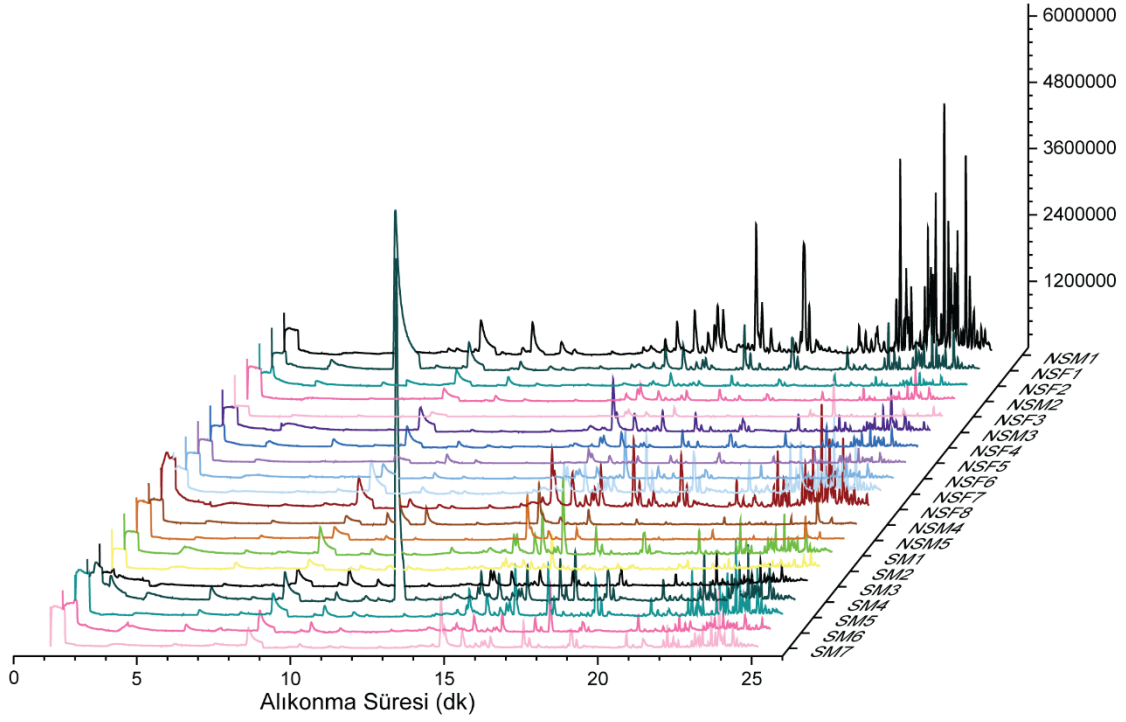
GC-MS analizinde kullanılan sıcaklık programları ve bununla beraber, nefes örnek kabı boyutu ve nefes verme süresinin optimizasyonu ve fiber seçimi sonrasında oluşturulan sistem ile ilk etapta sağlıklı bir kadın ve bir erkekte alınmış olan nefes örnekleri alınmış olup, kişilerin nefesleri arasında VOC sayısı ve çeşitleri arasında bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Bu bağlamda alınan iki kromatogram Şekil 5.3'te gösterilmiş olup kişilerden elde edilen sonuçlarda ciddi bir farklılık olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 5.3: Kadın ve Erkek bireylerden alınmış olan sonuçların karşılaştırılması (Birey 1: Erkek, Birey 2: Kadın).

5.6 Sağlıklı kişilerden toplanan nefes örneklerinin karşılaştırılması

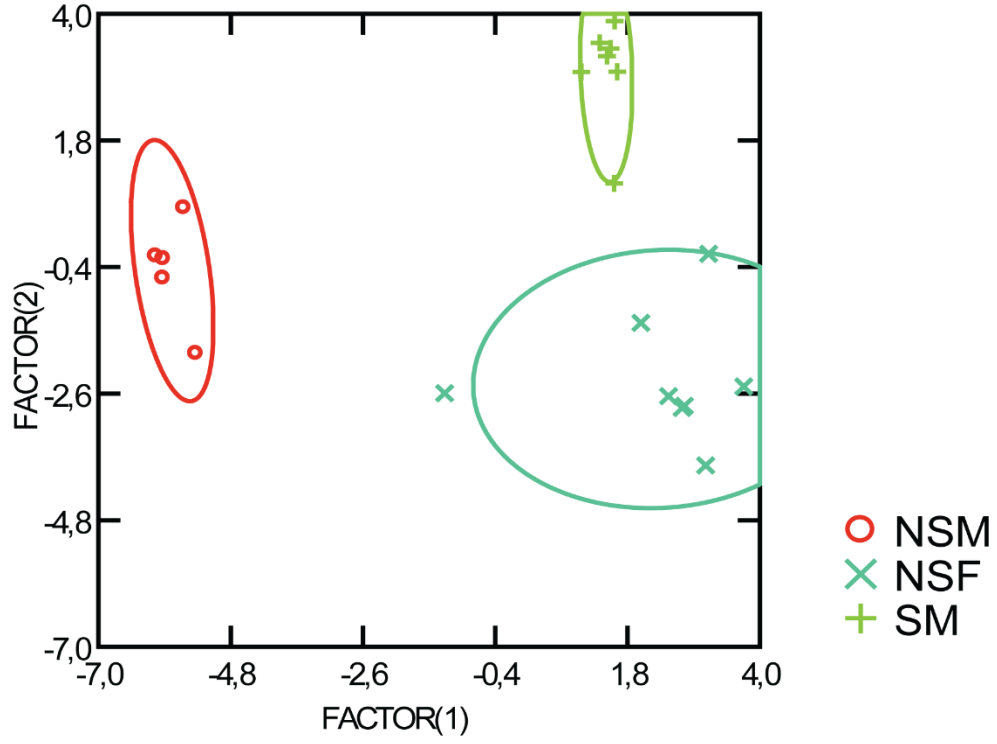
Toplamda 20 kişiden oluşan bir grup sağlıklı gönüllü bireylerden, cinsiyet ve sigara kullanıp kullanmama durumları gibi bilgileri toplanmış ve bu bilgiler kullanılarak nefes örneklerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 7 sigara kullanan erkek, 5 sigara kullanmayan erkek ve 1 sigara kullanan kadın, 7 sigara kullanmayan kadından oluşan örnekler yukarıdaki optimizasyonların yapılması sonrasında incelenmiş ve her bir bireye ait olan kromatogramlar, Şekil 5.4'te gösterilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde, her bir bireye ait nefes örneklerinde elde edilen sinyallerin şiddetlerinin farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel olarak daha anlamlı hale getirilmesi amacı ile lineer diskriminant analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.4: 20 kişilik gruptan elde edilmiş olan sonuçlara ait kromatogramlar

Lineer diskriminant analizi, önceden belirlenmiş olan kriterlere ait grupların birbirleri ile olan korelasyonlarının incelenmesi amacı ile kullanılan bir istatistik yöntemi olup, grupların birbirinden ayırt edilememesi konusunda bir bilgi sahibi olunması adına kullanılmaktadır. Şekil 5.4'te bu 20 kişiye ait olan örnekler, sigara içip içmeme ve cinsiyet durumlarına göre sınıflandırılmış ve bu sınıfların birbirleri ile herhangi bir ilişki içerisinde olup olmadıklarına bakılmıştır.

Ayrıca elde edilmiş olan sonuçlardan sağlıklı ve sigara içen bireylerin nefeslerinde yer alan VOC'ler listelenerek ekler kısmında Tablo A.1. ve Tablo A.2.'de gösterilmiştir. LDA karşılaştırılmalarında bu listede yer alan VOC'lerin alıkonma sürelerine karşılık gelen alan değerleri kullanılarak sınıflandırmalardaki farklılıklar incelenmiştir. Toplamda 50 farklı VOC'ye ait veri kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucunda, Şekil 5.5'teki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 5.5: 20 kişiye ait nefes örneklerinin lineer diskriminant analizi ile incelenmesi (NSM: Sigara kullanmayan erkek bireyler, NSF: Sigara kullanmayan kadın bireyler, SM: Sigara kullanan erkek bireyler)

6. TARTIŞMA

Literatür bilgileri PDMS fiberin çok sayıda uçucu organik bileşiği tutabildiğini göstermektedir. PDMS fibere tutunan moleküller apolar karakteristiğe sahip organik bileşiklerdir. PDMS fiberi dışında piyasada farklı fiberler de bulunmaktadır. Poliakrilat (PA) fiber polar karakteristiğe sahip organik bileşiklerin toplanmasında, karbon wide range fiber ise gazlar ve yüksek uçuculuğa sahip organik bileşiklerin toplanmasında kullanılır.

SPME fiberleri üzerindeki adsorpsiyon etkinlikleri, tespit edilen bileşiklerin sayısı ve pik alanları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Fiberler arasındaki en yüksek verim polidimetil siloksan divinilbenzen (PDMS-DVB) kullanılarak elde edilmiştir. PDMS-DVB fiberde aseton, izopropanol, etil asetat, n-heptan, toluen, bütül asetat, n-oktan, etilbenzen, m+p-ksilen, stiren, o-ksilen, n-nonan, α -pinen, 1,3,5-trimetilbenzen, 2-etiltoluen, β -pinen, 1,2,4-trimetilbenzen, n-dekan, 1,4-diklorobenzen, limonen, n-undekan, n-dodekan, n-tridekan, n-tetradekan bileşikleri tanımlanmıştır (Garcia ve diğ. 2013). Bu tez çalışmasında da analiz edilen nefes örneklerinde n-heptan, n-oktan, m+p-ksilen, o-ksilen, n-nonan, α -pinen, β -pinen, n-dekan, limonen, n-dodekan, n-tridekan, n-tetradekan bileşiklerine rastlanmıştır.

Bu çalışmada polidimetilsiloksan divinilbenzen (PDMS-DVB) fiber tercih edilmiştir. 20 sağlıklı bireyden alınan nefes örneklerine ait verilerde de apolar özellikte olan hidrokarbonların, PDMS-DVB fibere tutunduğu gözlemlenmiştir.

Literatürde yaygın olarak nefes toplamada tedlar torbası kullanılmıştır. Bu tedlar torbaları temizlik için nitrojenle yıkanmıştır. Bu çalışmada 3 boyutlu yazıcıdan baskı alınan nefes toplama düzeneği kullanılmıştır. Nefes toplama düzenekleri kişiye özel basılmıştır. Nefes örnekleme yapılmadan önce herhangi bir kontaminasyon oluşmaması adına nefes örnekleme düzenekleri ultraviyole (UV) ışık altında 10 dk bekletilmiştir.

Kromatografik ölçümler, sigara içenlerin ve pasif içicilerin nefeslerinde birçok ekzojen bileşiğin tanımlanabileceğini göstermiştir (Buszewski ve diğ. 2008). En yaygın tanımlanan ekzojen bileşikler benzen, ksilen izomerleri, stiren, etilbenzen,

asetonitril ve furan türevleridir. Bu maddeler sigara dumanından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, sigara içenlerin ve pasif içicilerin nefesinde, sigara içmeyenlerin soluduğu havaya göre daha sık tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da sigara içen kişilerin nefesinde benzen, ksilen izomerlerine rastlanmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda da olduğu gibi elde edilen analiz sonuçlarını değiştirebilecek yiyecek veya içecek alımından kaynaklanan VOC sayısını en aza indirmek için en az 8 saatlik açlıktan sonra numuneler alınmıştır.

Havada bulunan maddelerin fibere tutunmaması için nefes örnekleri mümkün oldukça açık havada alınmıştır fakat havada veya kıyafetlerde bulunan bazı maddeler yine de fibere tutunmuştur. Veriler incelendiğinde PDMS-DVB fibere tutunan maddelerin sadece insan nefesine ait olmadığı gözlemlenmiştir. Örneğin D-limonen parfümeride kullanılan kimyasal bir maddedir. Toplanan çoğu nefes örneğinde bu maddeye rastlanmıştır.

Nefes örneklerinde bulunan maddelerin farklılaşmasında nefes örneğinin alındığı ortam dışında birçok faktör etkili olmaktadır. Yaş, cinsiyet, sigara içip/içmeme durumu, sigara içme sıklığı, nefes örneği alınmadan önce tüketilen yiyecekler bu faktörlerdendir.

Nefes örneği alınan sağlıklı bireylerin yaş aralığı genel olarak 20-35 yaş aralığındadır ve bu kişilerin verilerinde benzer maddelere rastlanmıştır. Bu maddeler hidrokarbonlar, alkoller, aminler ve nitro-aromatik bileşenlerdir. Yaş aralığı 40-55 olan sigara içen bireylerde bu maddelere ek olarak sigarada bulunan titanyum gibi farklı maddelere de rastlanmıştır. 40 yaş üstü sigara içen kişilerde sigara tüketiminin fazla olması ile daha yüksek yoğunluklar elde edilmiştir.

PDMS-DVB SPME fiberi GC-MS cihazına verildikten sonra analiz 25 dk sürmüştür. Bu analiz süresince fibere tutunan maddeler 5-7. dakikadan itibaren kromatogramlarda görülmeye başlanmıştır. Kromatogramlarda görülen maddelerin bazılarının fiberin kendisinden geldiği görülmüştür. İlk 7-8 dakika içerisinde gözlenen silan, siklotrisiloksan gibi maddeler SPME fiberine aittir.

Nefes örneği alınmadan önce tüketilen yiyecekler de yine kromatogramlarda görülmüştür. Diş macununda bulunan florür nefes örneklerinde gözlenmiştir.

7. SONUÇ

Optimum nefes toplama düzeneğinin baskı sisteminin ve basımlarının gerçekleşmesinin ardından sırası ile 20 sağlıklı bireye ait nefes örneklerinin toplanabilmesi adına, SPME fiber türü ve nefes örnekleme süresi incelenerek en uygun fiber ve nefes verme süresi belirlenmiştir. Bu amaçla 10 dk süre ile burundan nefes alınıp ağızdan verilecek şekilde bir nefes verme şekli ile fiber üzerinde toplanan VOC'lerin incelenmesi gerçekleştirilebilmektedir. En fazla sayıdaki VOC'nin alınabilmesi adına, SPME fiberi üzerindeki kaplamalar incelenmiş ve burada elde edilen sonuçlarda, Tablo A.1 ve Tablo A.2'de görülebilecek olan VOC'lerin hepsinin ölçümlerinin yapılabilmesi PDMS-DVB sistemi ile mümkün olabilmektedir.

Bireylerden nefes örneklerinin toplaması işlemine bu aşamalar sağlandıktan sonra başlanmış ve 20 kişilik sigara içen ve içmeyen bireylerden oluşan ve farklı cinsiyetleri içeren küçük bir grup üzerinde denemeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, her bir kişiye ait olan nefes profillerinin farklılık gösterdiği görülmüş ve ayrıca, bu farklılıklar istatistiksel olarak incelemeler ile de desteklenmiştir. Sonuç itibari ile, LDA analizlerinden kişilerin nefes profilleri kullanılarak, bireylerin sigara içip içmediği ve cinsiyetleri hakkında bir ayrışım yapılabileceği ve bu sistem ile mümkün olduğu sonucuna varılmıştır.

Pandemi koşullarının devam etmesi nedeniyle, tezin ana içeriğinde yer alan kanserli bireylere ait nefes örneklerinden kanser çeşitlerinin anlaşılabilmesi, örnekleme yapılamaması nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Pandemi koşullarının sona ermemesi nedeniyle de tezin kapanış tarihi itibari ile de yapılamayacaktır. Pandeminin bitişini takiben elde edilmiş olan bu optimum koşullar, kanserli bireylerin nefes örneklerinin alınması ile denenerek, sistemin kanseri ayırt etmedeki becerisi de incelenecektir.

Sonuç itibari ile SPME-GC-MS sistemi ve 3 boyutlu yazıcıdan baskılanmış olan bir nefes toplama düzeneği yardımı ile 10 dk nefes toplama ve 30 dk analiz

süresince toplamda 40 dk lık bir sürenin sonunda alınan verilerden nefes örneklerine ait profiller elde edilerek tanı konulabilmesi mümkün olabilmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abdel-Rehim, M., "Method and device for analyte sampling and analyte concentration determination from exhaled breath", patent US2016159863 A1, (2016).

Altomare, D.F., "Breath analysis for colorectal cancer screening", *Int. J. Colorectal Dis.*, 18, 1127-1128, (2016).

Aprea, E., Cappellin, L., Gasperi, F., Morisco, F., Lembo, V., Rispo, A., Tortora, R., Vitaglione, P., Caporaso, N., Biasioli, F., "Application of PTR-TOF-MS to investigate metabolites in exhaled breath of patients affected by coeliac disease under gluten free diet", *J. Chromatogr. B*, 966, 208-213, (2014).

Aydın, L., Küçük, S., "Üç boyutlu yazıcı-tarayıcı ile hastaya özel medikal ortez tasarımı ve geliştirilmesi", *Journal of Polytechnic*, 20 (1), 1-8, (2017).

Baykara, O., "Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar", *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2146-9601, (2016).

Bikov, A., Lázár, Z., Horvath, I., "Established methodological issues in electronic nose research: how far are we from using these instruments in clinical settings of breath analysis?", *J. Breath Res.*, 9, 034001, (2015).

Buckley, T., Gordon, C., "The effectiveness of high fidelity simulation on medical surgical registered nurses' ability to recognise and respond to clinical emergencies", *Nurse Educ Today*, 31 (7), 716-721, (2011).

Buszewski, B., Ulanowska, A., Ligor, T., Denderz, N., Amann, A., "Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid- phase microextraction gas chromatography/ mass spectrometry", *Biomedical Chromatography*, 23(5), 551-556, (2008).

Capone, S., Tufariello, M., Forleo, A., Casino, F., Siciliano, P., "Breath Analysis by a GC/MS Coupled to a Gas Sensor Detector", *Sensors. CNS*, 431, 267-275, (2016).

Costa, B.R.B., Martinis, B.S., "Analysis of urinary VOCs using mass spectrometric methods to diagnose cancer", *Clinical Mass Spectrometry* 18, 27–37, (2020).

Çamdeviren, H., "Lojistik Regresyon ve Diskriminant Analizi", Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 89-91, (2000).

Dallinga, J.W., et al., "Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children", *Clinical & Experimental Allergy*, 40, 68-76, (2009).

David, S., et al., "Mass spectrometer for real-time quantitative breath analysis", *J. Breath Res.*, 8 (2), (2014).

De Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., Clifford, GM., "Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis", *Lancet Glob Health*, 8(2),180-190, (2019).

Di Gilio, A., Palmisani, J., Ventrella, G., Facchini, L., Catino, A., Varesano, N., "Breath Analysis: Comparison among Methodological Approaches for Breath Sampling", *Molecules*, 25(24), (2020).

Dumlao, M.C., Xiao, D., Zhang, D., Fletcher, J., Donald, W.A., "Effects of Different Waveforms on the Performance of Active Capillary Dielectric Barrier Discharge Ionization Mass Spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 28, 575-578, (2017).

Einstein, A.J., Henzlova, M.J., Rajagopalan, S., "Estimating risk of cancer associated with radiation exposure from 64-slice computed tomography coronary angiography", *Jama*, 298, 317-323, (2007).

Del Río, R.F., O'Hara, M., Pemberton, P., Whitehouse, T., Mayhew, C., "Elimination characteristics of post-operative isoflurane levels in alveolar exhaled breath via PTR-MS analysis", *J. Breath Res.*, 10, 046006, (2016).

Ferlay, J., Colombet, M., Piñeros, M., et al., "Cancer statistics for the year 2020: An overview", *Int. J. Cancer*, (2021).

Fink, T., Baumbach, J.I., Kreuer, S., "Ion mobility spectrometry in breath research", *J. Breath Res.*, 8, 027104, (2014).

Fink, T., Wolf, A., Maurer, F., Albrecht, F.W., Heim, N., Wolf, B., Hauschild, A.C., Bödeker, B., Baumbach, J.I., Volk, T., Sessler, D.I., Kreuer, S., "Volatile organic compounds during inflammation and sepsis in rats: a potential breath test using ion-mobility spectrometry", *Anesthesiology*, 122, 117-126, (2015).

Fu, X., Nantz M., Bousamra M., Van, B.V. "Noninvasive detection of cancer originating in tissue outside of the lung using exhaled breath", patent WO 2017023768 A1, (2017).

García, R. A., Morales, V., Martín, S., Vilches, E., Toledano, A., "Volatile Organic Compounds Analysis in Breath Air in Healthy Volunteers and Patients Suffering Epidermoid Laryngeal Carcinomas. Chromatographia", *Springer*, 77(5-6), 501–509, (2013).

Haick, H., Broza, Y.Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A., "Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers", *Chem. Soc. Rev.*, 43, 1423- 1449, (2014).

Haick, H. , Peled, N., "Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules", *J Thorac Oncol.*,7: 1528-1533, (2012).

Hanna, G.B., Boshier, P.R., Markar, S.R., Romano, A., "Accuracy and Methodologic Challenges of Volatile Organic Compound-Based Exhaled Breath Tests for Cancer Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis", *JAMA Oncol.*, e182815, (2018).

Johnson, R. A., Wichern, D. W., “Applied Multivariate Statistical Analysis”, Prentice Hall, USA:Prentice Hall, (1998).

Kabir, K. M. M., & Donald, W. A., “Cancer breath testing: a patent review”, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(3), 227–239, (2018).

Klecka, W. R., “Discriminant Analysis”, *Beverly Hills:Sage Pub*, (1980).

Kumar, S., Huang, J., Abbassi-Ghadi, N., Španěl, P., Smith, D., Hanna, G.B., "Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of exhaled breath for volatile organic compound profiling of esophago-gastric cancer", *Anal. Chem.*, 85, 6121-6128, (2013).

Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C., Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 9th Edition, Philadelphia, *Elsevier*, (2015).

Linn-Watson, T., Radiographic Pathology., 2nd Edition, Philadelphia-New York-London-Sydney, Wolters Kluwer, (2014).

Lizama, A., “Tedlar® gas sampling bag”, (01 January 2019), <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/supelco/30289u> , (2019)

Lord, H., Yu, YF., Segal, A. and Pawliszyn, J., “Breath analysis and monitoring by membrane extraction with sorbent interface”, *Analytical Chemistry*, 74 (21), 5650 – 5657, (2002).

Malik, H., Darwood, R., Shaunak, S., Kulatilake, P., Abdulrahman, A., Mulki, O., Baskaradas, A., “Three-dimensional printing in surgery: A review of current surgical applications”, *J Surgic Res*, 199(2), 512-522, (2015).

Marzorati, D., Mainardi, L., Sedda, G., Gaspari, R., Spaggiari, L., Cerveri, P., “A review of exhaled breath: a key role in lung cancer diagnosis”, *IJSR*, 13(3), (2019).

Mazzone, P.J., “Analysis of volatile organic compounds in the exhaled breath for the diagnosis of lung cancer”, *J Thorac Oncol.*, 3(7), 774-80, (2008).

Miekisch, W., Schubert, J.K., Noeldge-Schomburg, G.F.E., “Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds”, *Clinica Chimica Acta* 347,25 – 39, (2004)

Mochalski, P., Rudnicka, J., Agapiou, A., et al., “Near-real-time VOC analysis using an aspiration ion mobility spectrometer”, *Journal of Breath Research*, 7(2), (2013).

Oakley-Girvan, I., Davis, S.W., “Breath based VOCs in the detection of breast, lung, and colorectal cancers”, *Cancer Biomarkers-1*, 1–11, (2017).

Ochiai, N., Takino, M., Daishima, S., Cardin, D.B., "Analysis of volatile sulphur compounds in breath by gas chromatography–mass spectrometry using a three-stage cryogenic trapping preconcentration system”, *J. Chromatogr. B*, 762, 67-75, (2001).

Pauling, L., Robinson, A.B., Teranishi, R., Cary, P., “Quantitative analysis of urine and breath by gas-liquid partition chromatography”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68, 2374 – 2376, (1971).

Philips, M., Gleeson, K., Hughes, M., Greenberg, J., Cataneo, R., Baker, L., McVay, P., "Volatile organic compounds that breathe as markers of lung: a cross-sectional study", *The Lancet*, 353(9168), (1930-1933)

Phillips, M., Altorki, N., Austin, J.H., Cameron, R.B., Cataneo, R.N., Kloss, R., Maxfield, R.A., Munawar, M.A., Transition, H.I., Rashid, A., Rom, W.N., Schmitt, P., Wai, J., "Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers", *Clin. Chim. Acta*, 393, 76-84, (2008).

Phillips, M., et al., “Detection of lung cancer with volatile markers in the breath”, *Chest*, 123(6), (2003).

Queralto, N., Berliner, A.N., Goldsmith, B., Martino, R., Rhodes, P., Lim, S.H., "Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors" , *J. Breath Res.*, 8, 027112, (2014).

Riess, U., et al., “Experimental setup and analytical methods for non-invasive determination of volatile organic compounds, formaldehyde and NO_x in exhaled human breath”, *Anal. Chim. Acta*, 669(1-2), 53 – 62, (2010).

Robroeks, CM., et al., “Exhaled volatile organic compounds predict the exacerbation of childhood asthma in a 1-year prospective study”, *European Respiratory Journal*, 42(1), 98-106, (2013).

Rovira, N.L., Fuentes, A.H., Escorza, J.A.V., Samaniego, N.F.R. "Optoelectronic Device for The Detection of Uterine Cervical Cancer, Comprising A Self-Positioning Attachment”, Patent US 20120253202 A1, (2015).

Schubert, J.K., Miekisch, W., Geiger, K., Noldge-Schomburg, G.F.E., "Breath analysis in critically ill patients: potentials and limitations", *Expert Rev Mol Diagn*, 4, 619-629, (2004).

Selyanchyn, R., Wakamatsu, S., Hayashi, K., Lee, S.-W., "A Nano-Thin Film-Based Prototype QCM Sensor Array for Monitoring Human Breath and Respiratory Patterns", *Sensors*, 15, 18834-18850, (2015).

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., “Cancer statistics, 2017”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 7-30, (2017).

Smith-Bindman, R., Lipson, J., Marcus, R., Kim, K.-P., Mahesh, M., Gould, R., Berrington de González, A., Miglioretti, D.L., "Radiation dose associated with common computed tomography examinations and the associated lifetime attributable risk of cancer", *Arch. Intern. Med.*, 169, 2078-2086, (2009).

Stein, VB., Narang, RS., Wilson, L. and Aldous, KM., “A simple, reliable method for determining human breath and chlorinated volatile organics in the air using glass sampling tubes”, *Journal of Analytical Toxicology*, 20(3), 145-150, (1996).

Szabó, A.H., Podolec, P., Ferenczy, V., Kubinec, R., Blaško, J., Soják, L., Górová, R., Addová, G., Ostrovský, I., Višňovský, J., Bierhanzl, V., Čabala, R.,

Amann, A., "The analysis of linear and monomethylalkanes in exhaled breath samples by GC× GC-FID and GC–MS/MS", *J. Chromatogr. B*, 978, 62-69, (2015).

Taivans, I., Bukovskis, M., Strazda, G., Jurka, N., "Breath testing as a method for detecting lung cancer", *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 14, 121-123, (2014).

Van der Schee, M.P., Fens, N., Brinkman, P., Bos, L.D., Angelo, M.D., Nijssen, T.M., Raabe, R., Knobel, H.H., Vink, T.J., Sterk P.J., "Effect of transportation and storage using sorbent tubes of exhaled breath samples on diagnostic accuracy of electronic nose analysis", *J. Breath Res.*, 7, 016002, (2012).

Van Rossum, L.G., van Rijn, A.F., Laheij, R.J., van Oijen, M.G., Fockens, P., van Krieken, H.H., Verbeek, A.L., Jansen, J.B., Dekker, E., "Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population", *Gastroenterology*, 135, 82-90, (2008).

Wallace, M.A.G., Pleil, J.D., "The history of health practices in the clinical and treatment of breathing research to breathe: for gas phase, condensate and aerosols", *Anal. Chim. Acta*, 1024, 18-38, (2018).

Williams, H., Pembroke, A., "Sniffer dogs in the melanoma clinic?", *The Lancet*, 333(8640), 683-742, (1989).

Zhang, X., Zou, Y., An, C., Ying, K., Chen, X., Wang, P., "Sensitive detection of carcinoembryonic antigen in exhaled breath condensate using surface acoustic wave immunosensor", *Sensor Actuat. B-Chem.*, 217, 100-106, (2015).

Zhou, J., Huang, Z.-A., Kumar, U., Chen, D. D., "Review of recent developments in determining volatile organic compounds in exhaled breath as biomarkers for lung cancer diagnosis", *Anal. Chim. Acta*, 996, 1-9, (2017).

EKLER

9. EKLER

EK A

Tablo A.1. Sigara içmeyen bireyde yer alan VOC'lerin listesi

| Bileşen | Alıkonma Süresi | Benzerlik Oranı (%) |
|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| Siklotrisiloksan | 8.449 | 97 |
| Fenol | 14.701 | 96 |
| 6-metil-5-hepten-2-on | 14.819 | 83 |
| Undekan | 15.818 | 82 |
| Nonan | 16.026 | 84 |
| Heptan | 16.132 | 77 |
| d-Limonen | 16.311 | 96 |
| d-Limonen | 20.728 | 89 |
| Dodekan | 21.930 | 90 |
| 2-Decen-1-ol | 22.056 | 89 |
| Heptadekan | 22.248 | 88 |
| 9-metilheptadekan | 22.416 | 87 |
| Nonadekan | 22.849 | 87 |
| Heneikosan | 22.956 | 91 |
| Sülfüröz Asit | 23.050 | 81 |
| Sülfüröz Asit | 23.114 | 85 |
| Dokazan | 23.205 | 88 |
| Dodekan | 23.481 | 90 |
| İndol | 23.739 | 95 |
| Tetradekan | 23.909 | 84 |
| Dodekan | 24.179 | 87 |
| 2-metiltetrakozan | 24.315 | 84 |
| Hekzadekan | 24.405 | 73 |

| | | |
|-----------------------------------|--------|----|
| Okzalik asit | 24.550 | 75 |
| 4-tert-butilsikloheksil asetat | 24.809 | 89 |
| Alfa-kopaen | 24.940 | 76 |

Tablo A.2. Sigara içen bireyde yer alan VOC'lerin listesi

| Bileşen | Alınma Süresi | Benzerlik Oranı (%) |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Benzen | 6.034 | 85 |
| Siklotrisiloksan | 8.416 | 88 |
| Benzen | 10.102 | 92 |
| 1,5-dekadin | 10.195 | 82 |
| Titanyum | 10.969 | 80 |
| Sikloheksanol | 11.070 | 82 |
| 2-siklopent-1-on | 11.634 | 89 |
| Sikloheksen | 12.896 | 80 |
| Triplal 2 (IFF) | 13.206 | 83 |
| Penilla Alkol | 13.617 | 80 |
| Anilin | 14.711 | 87 |
| 6-metil-5-hepten-2-one | 14.811 | 89 |
| Megastigma-3,7(E), 9 trien | 14.982 | 77 |
| (E)-beta-Famesen | 15.069 | 74 |
| Benzen | 15.640 | 89 |
| Triplal 2 (IFF) | 16.043 | 82 |
| d-limonen | 16.305 | 96 |
| 2-siklopent-1-on | 16.661 | 87 |
| 1H-inden | 16.822 | 79 |
| Fenol | 17.309 | 86 |
| 3-etil-3-metilheptan | 17.361 | 81 |
| Fenol | 18.021 | 82 |
| Siklopentankarboksialdehit | 18.451 | 71 |
| Cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol | 18.539 | 75 |
| Oktadekan | 18.821 | 81 |
| Fitol | 18.912 | 77 |
| Nonanal | 18.959 | 88 |
| Silan | 20.725 | 79 |
| Azulen | 21.532 | 82 |
| Dodekan | 21.923 | 83 |

| | | |
|------------------|--------|----|
| Dekanal | 22.058 | 91 |
| Undekan | 22.242 | 84 |
| Etil-iso-alkokat | 22.417 | 72 |
| d-nerolidol | 22.851 | 73 |
| Dotriakontan | 22.948 | 83 |
| Dotriakontan | 23.479 | 83 |



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu

Sayı :60116787-020/33135

13/05/2019

Konu :Başvurunuz hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Gökhan ELÇİ

İlgili dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Kanser Çeşitlerinin Nefes Analizi ile Ayırt Edilmesi**" konulu çalışmanızda sorumlu yürütücü değişikliği talebiniz **07.05.2019 tarih ve 09 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmada sorumlu yürütücüsü olarak görevlendirilmenizde **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN

Evrak Tarih ve Sayısı: 20/03/2019-E.20658



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu

Sayı :60116787-020/20658
Konu :Başvurunuz hak.

20/03/2019

Sayın Prof. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU

İlgi : 14.03.2019 tarihli dilekçeniz.

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Kanser Çeşitlerinin Nefes Analizi ile Ayırt Edilmesi**" konulu çalışmanız **19.03.2019 tarih ve 06 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN

Tıp Fakültesi Dekanlığı Kınıklı/Denizli
Tel: 0 258 296 16 04
E-Posta: tibbietik@pau.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Aysel ÖZKAN
Faks: 0 (258) 296 17 65
Elektronik Ağ: <http://www.pau.edu.tr>

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

| | | | |
|------------------------|------------|-----------------------|----------|
| Toplantı Tarihi | 19.03.2019 | Karar | 09 |
| Toplantı Sayısı | 2019/06 | Toplantı Saati | 15:00 |
| Toplantı Günü | Sah | Toplantı Yeri | Dekanlık |

Karar 09- Üniversitemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Gamze Gököz Doğu'nun yürütücüsü olduğu “**Kanser Çeşitlerinin Nefes Analizi ile Ayırt Edilmesi**” konulu çalışması görüşülmüş olup.

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Etik Kurula bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Raportör.~~Dr.S.PEKCAN~~

Prof. Dr. Tahir TURAN
Başkan

Prof.Dr. Beyza ŞAHİN

Prof.Dr.Sibel PEKCAN

Prof.Dr.Dolunay GÜRSES

Prof.Dr.Hülya ÇETİN

Doç.Dr.Duygu HEREK

Doç.Dr.Türkan TURAN

Doç.Dr.Aylin KÖSELER

Doç.Dr.Nihal BÜKER

Doç.Dr.Murat ÖZBAN

Dr.Öğr.Üyesi Sibel ÖNER YALÇIN

Doç.Dr.Nilgün AKGÜL