

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALAR**

Uzm. Kim. Ozan KAPLAN

Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALAR

Uzm. Kim. Ozan KAPLAN

Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER

ANKARA
2024

ONAY SAYFASI

**MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALAR****Dr. Kim. Ozan KAPLAN****Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER**

Bu tez çalışması 05.06.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ</i> <i>Başkent Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Bekir SALİH</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Uğur TAMER</i> <i>Gazi Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Nursabah E. BAŞCI AKDUMAN</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Temmuz 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN**Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

04/07/2024

Ozan KAPLAN

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ozan KAPLAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sağladığı olanaklarla bana sürekli destek olan, bilgi birikimi ve yol göstericiliğiyle ufkumu genişleten çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Çelebier'e,

Doktora tezimde kullandığım örneklerin hazırlanmasında sağladığı katkılardan dolayı Prof. Dr. Erem Bilensoy Hocama ve Dr. Cem Varan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımı gerçekleştirmek üzere bana laboratuvarının kapılarını açan Prof. Dr. Tuulia Hyötyläinen ve Örebro Üniversitesi Metabolomik Laboratuvarında başta Dr. Victor Castro Alves ve Daniel Düberg olmak üzere tüm diğer çalışma arkadaşlarıma metabolomik analizler konusunda öğrettikleri ve gösterdikleri yakınlık için teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca teorik ve pratik derslerde aktardıkları eşsiz bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca bana destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

2214-A programı ile yurtdışı doktora tez çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

ÖZET

KAPLAN, O., Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında LC/MS Temelli Metabolomik Ve Lipidomik Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu tez çalışmasında beş farklı ilaç taşıyıcı nanopartikülün paklitaksel yüklü ve yalın hallerinin MCF-7 kanser hücre hatları üzerindeki etkileri sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC/MS) temelli metabolomik, lipidomik ve kısa zincirli yağ asitleri yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışmaların ilk basamağında iki farklı hücre liziz yönteminin karşılaştırılması amacıyla MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı örneklerinden elde edilen lizatlar metabolom düzeyinde incelenmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında metabolomik veri işleme yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla homojen bir biyolojik materyal olarak insan kan plazmasından yararlanılmış ve model bir hastalık (ektopik gebelik) seçilerek hastalarından toplanan plazma örneklerinde gerçekleştirilen metabolomik çalışmadan elde edilen deneysel veriler iki farklı veri işleme modeli kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır. İlk iki basamaktan elde edilen bilgiler ışığında çalışmanın üçüncü basamağında paklitaksel yüklü ve paklitaksel yüklenmemiş beş farklı nanopartikülün MCF-7 kanser hücre hatları üzerine tatbiki gerçekleştirilmiş ve elde edilen lizatlar arasındaki farklılıklar LC/MS temelli omik yaklaşımlar ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular, farklı nanopartiküllerin paklitaksel yüklü ve yüklü olmayan hallerinin farklı biyokimyasal süreçleri aktive ettiği ve de ilaç taşıyıcı nanosistemler için etkin maddenin biyokimyasal aktivitesinin taşıyıcı sistemden bağımsız olarak değerlendirilmemesi gerektiğini göstermiştir. Bu çalışmada geliştirilen LC/MS temelli metabolomik ve lipidomik yaklaşımlar ileride gerçekleştirilecek olan biyolojik materyal analizlerine kolaylıkla aktarılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: metabolomik, lipidomik, kütle spektrometrisi, ilaç taşıyıcı sistemler, kanser

ABSTRACT

KAPLAN, O., Metabolomics and Lipidomics Studies based on LC/MS in breast cancer (MCF-7) cancer cell line, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Ph.D. Thesis of Analytical Chemistry, Ankara, 2024. In this thesis, the effects of five different drug carrier nanoparticles, both loaded and unloaded with paclitaxel, on MCF-7 cancer cell lines were investigated using liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS)-based metabolomics, lipidomics, and short-chain fatty acids comparison methods. In the first stage of the study, lysates obtained from MCF-7 human breast cancer cell line samples were examined at the metabolome level to compare two different cell lysis methods. In the second stage of the study, metabolomic data processing methods were compared using human blood plasma as a homogeneous biological material, and experimental data obtained from a metabolomic study conducted on plasma samples collected from patients with a model disease (ectopic pregnancy) were evaluated using two different data processing models, and the results were discussed. Based on the information obtained from the first two stages, in the third stage of the study, the application of five different nanoparticles, both loaded and unloaded with paclitaxel, on MCF-7 cancer cell lines was carried out, and the differences between the obtained lysates were examined using LC/MS-based omics approaches. The findings showed that different nanoparticles, both loaded and unloaded with paclitaxel, activated different biochemical processes and that the biochemical activity of the active ingredient should not be evaluated independently of the carrier system in drug carrier nanosystems. The LC/MS-based metabolomic and lipidomic approaches developed in this study can be easily transferred to future biological material analyses.

Keywords: metabolomics, lipidomics, mass spectrometry, drug delivery systems, cancer

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Metabolomik Çalışmalar Hakkında Genel Bilgiler	6
2.2. Kanser ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	10
2.3. Metabolomik Çalışmalarda Deneysel Yöntemler	13
2.3.1. Tüm Metabolomu Profillemenin Zorlukları	13
2.3.2. Metabolomik Çalışmalarda Numune Hazırlama Yöntemleri	16
2.3.3. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Analitik Yöntemler	20
2.3.4. Metabolomik Çalışmalarda Veri İşleme Yöntemleri	25
2.3.5. Metabolomik Çalışmalarda Hata Kaynakları	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Hücre Lizizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması	41
3.1.1. Kimyasal Parçalama	41
3.1.2. Fiziksel Parçalama	41
3.2. Veri İşleme Yöntemi Denemeleri	42
3.2.1. Ardışık dilüsyon ve Putative Nitel Analiz	42
3.2.2. Ekstraksiyon Kör Çözeltileri ve Kütüphane Destekli Nitel Analiz	43
3.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar	43
3.3.1. Örnek Hazırlama Çalışmaları	44
4. BULGULAR	52
4.1. Hücre Lizizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması	52

4.2. Veri İşleme Yöntemlerine Dair Bulgular	52
4.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar	54
4.3.1. Metabolomik Analizler	54
4.3.2. Lipidomik Çalışmalara ait bulgular	58
4.3.3. SCFA Metoduna Dair Bulgular	64
4.3.4. Gruplar Arasında Değişen Metabolitler ve Yolak Analizleri	67
5. TARTIŞMA	79
5.1. Hücre Lizi Tekniklerinin Karşılaştırılması	79
5.2. Veri İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması	81
5.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar	84
6. SONUÇ	92
7. KAYNAKLAR	95
8. EKLER	108
Ek-1: Tezde kullanılan plazma numuneleri için etik kurul belgesi	108
Ek-2: Orjinallik Belgesi	109
Ek-3: Dijital Makbuz	110
9. ÖZGEÇMİŞ	111

SİMGELER ve KISALTMALAR

• PCX	Paklitaksel
• PLA	Polilaktik asit
• PGA	Poliglikolik asit
• PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
• PCL	Polikaprolakton
• PEG	Polietilenglukol
• CFL	Hücreden arındırılmış lizat
• HSA	İnsan serum albümin
• LC/MS	Sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi
• GC/MS	Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi
• FC	Değişim katsayısı
• SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
• OA	Organik Asitler
• PCA	Temel Bileşenler Analizi
• PLS/DA	Kısmi en küçük karelerin farklılaştırma analizi
• QC	Kalite kontrol

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. PCA grafiği solda, PLS-DA grafiği sağda	27
3.1. Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar	40
3.2. Protein miktar tayininde kullanılan yöntem	44
4.1. Deterjan bazlı liziz yöntemi (üstte) ve fiziksel parçalama ile liziz (altta) yöntemlerine ait temel pik kromatogramları	52
4.2. Veri değerlendirme basamağında kullanılmak üzere gerçekleştirilen çalışmaya ait temel pik kromatogramları	53
4.3. İki farklı veri işleme tekniğine ait veri değerlendirme sonuçları, solda ardışık dilüsyon ve kör çözelti filtrelemelerini, sağda putative nitel analiz ve kütüphane eşleşmelerini gösteren PCA grafikleri.	54
4.4. Metabolomik analizlere ait temel pik kromatogramı	55
4.5. Metabolomik çalışmada kullanılan iç standartlara ait temel pik kromatogramları	56
4.6. Eşleşen metabolitlere ait molekül grupları	58
4.7. Lipidomik çalışmalara ait temel pik kromatogramları	59
4.8. Lipidomik çalışmalara ait temel pik kromatogramları	60
4.9. Eşleşen lipidlerin lipid alt gruplarına göre dağılımı	64
4.10. SCFA yöntemine ait temel pik kromatogramları	65
4.11. SCFA yöntemine ait temel pik kromatogramları	66
4.12. Eşleşen metabolitlerin (SCFA dahil, lipidler hariç) görev aldığı yollar	67
4.13. PCX (kırmızı), NNP (yeşil) , NNP-PCX grupları (mavi) ile oluşturulan PCA grafiği	68
4.14. Kontrol grubuna karşılık PCX grubunda farklılaşan metabolitler	69
4.15. NNP-PCX (yeşil) ve NNP (kırmızı) gruplarına ait PCA grafiği	69
4.16. NNP-PCX ve NNP grupları arasında farklılaşan metabolitler	70
4.17. MCF-7 grubuna (kırmızı) NNP grubundan (yeşil) oluşan PCA grafiği	71
4.18. MCF-7 ve NNP grupları arasında farklılaşan metabolitler	72
4.19. NNP, PCX ve kontrol grupları arasında farklılaşan metabolitlere ait ısı haritası grafiği	73
4.20. İlaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) ve paklitaksel (PCX) grubu arasında metabolom düzeyinde farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği	74

4.21. İlaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) boş nanopartikül (NNP) grubu arasında farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği	75
4.22. NNP, PCX ve kontrol grupları arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları	76
4.23. İlaç yüklü nanopartiküller (NNP-PCX) ve paklitekasel (PCX) grubu arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları.	77
4.24. İlaç yüklü nanopartikül grubu (NNP-PCX) ve NNP arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları.	78



TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Metabolomik çalışmalarda işlem basamakları	16
2.2. Örnek hazırlama basamağında kullanılan yöntemler	18
3.1. Metabolomik çalışmalarda kullanılan iç standartlar ve derişimleri.	45
3.2. Lipidomik çalışmalarda kullanılan iç standartlar ve derişimleri.	46
3.3. SCFA, TCA ve OA çalışmalarda kullanılan iç standartlar ve derişimleri.	48
4.1. Kullanılan iç standartların m/z değerleri ve alıkonma zamanları ve enjeksiyonlar arasında yüzde bağıl standart sapmaları	55
4.2. Kütüphane eşleşmesi sonrası tanımlanan metabolitler, sinyal/gürültü oranları ve pool örneklerde bağıl standart sapmaları	56
4.3. Lipidomik metoda ait iç standartların %BSS değerleri	59
4.4. Lipidomik çalışmalarda eşleşen lipidler	60
4.5. SCFA metodunda kullanılan iç standartlar	65
4.6. SCFA metoduna ait eşleşen metabolitler listesi	66

1. GİRİŞ

Metabolizmada çeşitli biyolojik yollara katılan veya ürün olarak ortaya çıkan düşük molekül ağırlıklı (<1500 Da) lipidler, aminoasitler, peptidler, nükleik asitler, şeker, alkol, organik asit türevleri ve diğer birçok molekül grubu biyomoleküllere genel olarak metabolit denir. Organizmada bulunan tüm metabolitlerin oluşturduğu bütüne ise metabolom adı verilir. Metabolom; genom, transkriptom, proteom gibi diğer biyomoleküllerin son ürünü olarak bu biyomoleküllerin etkisi altında olmakla beraber hastalık, yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı gibi dış etmenlerden de doğrudan etkilenen iki yüz binden fazla metabolitin oluşturduğu bir bütündür. Metabolomik, profillemeye çalışmaları aracılığı ile biyolojik materyalin metabolomunun ileri analitik teknikler ve istatistiksel yöntemler kullanarak tanımlanması, karşılaştırılması ve metabolizmadaki fonksiyonlarının incelenmesi, diğer bir deyişle kimyasal fenotipinin aydınlatılması çalışmalarıdır (1).

Omik çalışmalar, biyolojik sistemlerin kapsamlı ve sistematik analizini hedefleyen çeşitli disiplinleri içerir. Genomik, organizmaların DNA'sını incelerken, transkriptomik hücrelerdeki RNA transkriptlerini analiz eder. Proteomik, hücrelerdeki proteinlerin yapısını ve işlevini incelerken, metabolomik metabolitleri ve aktivitelerini analiz eder. Metabolomik çalışmalar sayesinde moleküler seviyede çok çeşitli bulgulara ulaşmak mümkündür. Bu çalışmalar, hücrelerin ve dokuların metabolik profillerini detaylı bir şekilde analiz ederek, hastalıkların erken teşhisi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bilgiler sağlar. Metabolizmada meydana gelen olayların, örneğin bir hastalık durumunun metabolomdaki yansımaları ya da ilaçların biyokimyasal etkileri analiz edilerek, daha güvenli ve etkili tedavi yöntemleri geliştirilebilir. Beslenme ve yaşam tarzının metabolik etkileri incelenerek, bireylerin sağlık durumları ve diyetlerinin optimize edilmesi sağlanabilir. Metabolomik çalışmalar aynı zamanda çevresel etkilerin ve genetik faktörlerin metabolik süreçler üzerindeki etkilerini de aydınlatır, bu da kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında önemli bir rol oynar. Metabolomik analizler, biyolojik sistemlerin kompleks yapısını

anlamamıza ve hücrel metabolizmanın dinamiklerini çözmemize yardımcı olarak, sağlık bilimleri ve tıbbi araştırmalarda çok önemli bulgular sunar.

Metabolomik çalışmalar hedeflenmiş ve hedeflenmemiş çalışmalar olarak ikiye ayrılırlar. Hedeflenmiş metabolomik, belirli bir metabolit grubunu veya bilinen metabolitleri analiz etmeye odaklı yöntemlerdir. Bu yöntemler, hedeflenen metabolitlerin derişimlerinin hassas ve tekrarlanabilir şekilde ölçülmesini sağlar ve genellikle önceden belirlenmiş biyokimyasal yolların veya metabolitlerin analizi için kullanılır. Hedeflenmemiş metabolomikte ise biyolojik örnekteki tüm metabolitlerin profilini çıkartmak amaçlanır ve çalışma kapsamında belirlenen değişkenin etkileri belirlenmeye çalışılır. Hedeflenmiş metabolomik, kesin ve tekrarlanabilir ölçümler sağlarken, hedeflenmemiş metabolomik daha geniş bir keşif alanı sunar ve etkilenen metabolitlerin ve biyokimyasal yolların tanımlanmasına olanak tanır.

Metabolomik çalışmalarda seçilen analitik yöntemler, elde edilen sonuçları doğrudan etkiler. Yöntem seçimi, çalışmanın hedeflerine, analiz edilecek metabolit türlerine ve biyolojik örneğin özelliklerine göre farklılaşır. Metabolomik çalışmalarda uygun yöntemlerin seçilmesi ve hata kaynaklarının minimize edilmesi, elde edilen sonuçların doğruluğunu ve biyolojik anlamını artırarak, araştırmaların güvenilirliğini sağlar.

Bu tez çalışmasında, örnek hazırlama basamağının optimizasyonu amacıyla kimyasal ve fiziksel parçalama ile liziz tekniklerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Liziz basamağı örnek hazırlama işlemlerinin ilk basamağı olarak ekstraksiyonda elde edilecek metabolitleri doğrudan etkiler. Çalışmaların ikinci bölümünde metabolomik çalışmalarda kullanılan veri işleme yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla ektopik gebelik tanısı konmuş hastalardan toplanan plazma numunelerinde yapılan metabolomik çalışma ile veri işleme stratejileri karşılaştırılarak optimum koşulların bulunması amaçlanmıştır. Tez çalışmalarının son bölümünde bu yöntemler kullanılarak nano ilaç taşıyıcı sistemlerin ve paklitaksel anti kanser ajanının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine etkilerinin metabolom düzeyinde araştırılması hedeflenmiştir.

Nano ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçların vücutta hedeflenen bölgelere daha etkili bir şekilde ulaşmasını sağlamak amacıyla kullanılan taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler, genellikle nanometre ölçeğinde yapılandırılmış ve aktif ilaç bileşenlerini taşıyan nanopartiküller, lipozomlar ve polimerler gibi çeşitli nanomateryallerden oluşur. Nano ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçların biyoyararlanımını artırarak, yan etkilerini azaltarak ve spesifik hücre veya dokulara yönelik hassas dağılım sağlayarak geleneksel tedavilere göre önemli avantajlar sunar. Bu sistemler, özellikle kanser tedavisinde, nörolojik hastalıklarda ve enfeksiyon hastalıklarında kullanılarak tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, ilaçların kontrollü ve sürekli salınımını sağlayarak hastaların tedavi sürecini daha yönetilebilir hale getirir. Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve klinik uygulamalarda kullanılması, modern tıpta önemli bir araştırma alanıdır ve hastalıkların daha etkili ve güvenli bir şekilde tedavi edilmesine olanak tanır (2).

Nano taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan malzemeler oldukça çeşitlidir ve her biri belirli avantajlar sunar. Polimerler arasında doğal polimerler (kitin, kitosan, jelatin, alginat) ve sentetik polimerler (polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polietilen glikol (PEG) bulunmaktadır. Bu sistemler, ilaçların belirli hücre veya dokulara hedeflenerek tedavinin etkinliğini artırır ve sağlıklı hücrelere zarar verme riskini azaltır. Ayrıca, ilaçların vücutta daha iyi metabolize olmasını sağlayarak biyoyararlanımı artırır ve tedavinin etkinliğini maksimize eder. Kontrollü ve sürekli ilaç salınımı sağlayarak tedavi sürecini optimize eder ve dozaj sıklığını azaltır. Bununla birlikte, sistemik yan etkileri azaltır ve tedavi sürecini daha tolere edilebilir hale getirir. Nano taşıyıcılar, birden fazla ilacı veya tedavi yöntemini aynı anda taşıyabilir, böylece kombine tedavi yaklaşımlarını mümkün kılar. Özellikle zor çözünen veya biyoyararlanımı düşük olan ilaçların kullanımını artırır. Hücre içine taşıma yetenekleri sayesinde ilaçların hedef hücrelerde daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar. Ayrıca, kan-beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde önemli bir rol oynar.

Kanser hücre hatları, kanser araştırmalarında ve ilaç geliştirme süreçlerinde önemli bir rol oynayan insan veya hayvan kökenli kanser hücrelerinin kültüre alınmış ve sürekli olarak üretilmiş popölasyonlarıdır. Bu hücre hatları, hastalığın temel mekanizmalarını ve ilaçların etkinliğini belirlemede kullanılır. Kanser hücre hatları, heterojen bir yapıya sahiptir ve kanser türlerinin çeşitliliğini yansıtır. Her hücre hattı, farklı tümör özelliklerine, genetik yapıya ve duyarlılığa sahip olabilir. Bu nedenle, çeşitli kanser hücre hatları kullanılarak yapılan deneyler, kanser biyolojisi, tedavi stratejileri ve ilaç keşfi konularında önemli bilgiler sağlar. Kanser hücre hatları, hücresel düzeyde hastalığın anlaşılmasına ve tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunur. MCF-7, insan meme kanseri hücrelerinden izole edilmiş ve kültüre alınmış bir kanser hücre hattıdır. Özellikle hormon reseptörü pozitif meme kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir modeldir.

Çalışmalarda paklitakselin enkapsüle edilmesinde PCL, HSA, PEG-PCL, PLA, PLGA nano ilaç taşıyıcı sistemleri kullanılmıştır. Bu sistemler, paklitaksel ile yüklenmiş ve yüklenmemiş halleriyle MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Kanser hücrelerinden sitozolik fraksiyonlar elde edilerek, bu fraksiyonlar ilaç yüklü ve yüklü olmayan sitozolik fraksiyonlarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser hücrelerine etkisini ve paklitaksel yüklü sistemlerin tek başına paklitaksel ile karşılaştırıldığında sağladığı avantajları moleküler düzeyde ortaya koymaktadır. Literatürde, nanoilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde kullanılmasının yaygın olarak araştırıldığı görölmektedir (3). Bu sistemler, ilaçların hedef hücrelere daha etkili ve kontrollü bir şekilde ulaşmasını sağlamakta, yan etkileri azaltmakta ve tedavi etkinliğini artırmaktadır. Çalışmalar, çeşitli nanomateryallerin (lipid nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, metal nanopartiküller) farklı kanser türlerinde kullanıldığını ve bu materyallerin hücre içi alım, biyoyararlanım ve toksisite profillerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirildiğini göstermektedir. Ayrıca, nanoilaç taşıyıcı sistemlerin kombinasyon tedavilerinde kullanımı ve ilaç direncinin üstesinden gelme potansiyeli de literatürde dikkat çekici konular arasında yer almaktadır. Bu bağlamda, tez çalışması, mevcut literatüre önemli katkılar sağlayarak nanoilaç taşıyıcı sistemlerin moleküler etkilerini ve paklitakselin etkinliğini detaylı bir şekilde ve ilk kez

karşılaştırmalı olarak metabolom düzeyinde ortaya koymaktadır. Bu tür çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ve daha etkili stratejilerin geliştirilmesine ışık tutmaktadır.

Bu çalışma ile geliştirilen, metablomik ve lipidomik çalışmalarda kullanılan LC/MS temelli analitik strateji, ileride gerçekleştirilecek olan biyolojik materyalde metabolik profillemeye ve lipidomik çalışmalara rahatlıkla aktarılabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolomik Çalışmalar Hakkında Genel Bilgiler

Metabolomik, metabolit olarak adlandırdığımız küçük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerin ileri analitik yöntemler kullanılarak tespit edilmesi, tanımlanması, miktarının belirlenmesi ve çalışma kapsamında belirlenen değişkenlerin metabolitler ve metabolom üzerinde yarattığı etkilerin incelenmesi çalışmalarıdır. Metabolitler amino asitler, peptitler, lipidler, nükleik asitler, karbonhidrat türevleri, organik asitler, vitaminler gibi çok geniş ölçekte molekül gruplarını kapsar ve primer-sekonder, endojen-eksojen, suda çözünen-çözünmeyen gibi bir çok farklı düzlemde sınıflandırılabilirler. Lipidler, amino asitler, şeker türevleri gibi bir çok metabolit grubu gen düzeyinden başlayan süreçlerle metabolizmada sentezlenirler ve endojen metabolitler olarak adlandırılırlar, yine metabolizmada kritik yollarda yer alan vitaminlerin veya amino asitlerin bazı türleri, canlı evrimi sürecinde endojen niteliğini kaybetmesine rağmen besin ve çevresel faktörlerle vücuda alınarak metabolizmaya katılmaya devam ederler ve eksojen metabolitler olarak sınıflandırılırlar (4). İlaç metabolitleri, fitokimyasallar, yiyecek/içecek katkı maddeleri, kozmetikler, çevre kirliliği gibi sayısız neden eksojen metabolitlerin metabolizmaya girmesinin yolunu açarlar.

Metabolitlerin rutin analizleri uzun zamandır uygulanırken, metabolomik çalışmalar ise sistemler biyolojisi olarak adlandırılan biyomoleküllerin aynı anda analizi, metabolizmada oynadığı rol ve miktarlarındaki değişimin bütünlükçü bir bakış açısıyla ele alındığı çalışmalardır. Metabolomik çalışmalar hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik olarak ikiye ayrılırlar. Hedeflenmemiş çalışmalar belirlenen değişkenler doğrultusunda hazırlanan gruplarda metabolomda meydana gelen değişiklikleri ve bunların yol açtığı biyolojik aktiviteleri inceler. Hedeflenmiş metabolomik, belirli hipotezlerin test edilmesi veya belirli metabolitlerin izlenmesi için kullanılırken, hedeflenmemiş metabolomik daha geniş keşif ve sistemlerin genel metabolik profilini çıkarma amacı taşır. Hedeflenmemiş çalışmalarda mümkün olan en fazla sayıda metabolitin aynı anda analiz edilip çalışma kapsamında belirlenen

değişkenler üzerinden karşılaştırılması amaçlanır. Genellikle, hedeflenmiş çalışmalarda kantitatif sonuçlar elde edilirken, hedeflenmemiş çalışmalarda yarı kantitatif sonuçlar değerlendirilir. Geleneksel hedeflenmiş metabolit analizleri, hassas ve tekrarlanabilir yöntemler sunar, ancak genellikle önceden belirlenmiş bir veya birkaç metabolitin analizini kapsar ve bu nedenle bilgi sağlayıcı kapsamı bunlarla sınırlıdır. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar ise örneklerden mümkün olduğu kadar fazla sayıda metabolitin keşfi ve profilini çıkarmayı amaçlar. Canlı metabolizmasının karmaşık ve kompleks yapısı metabolomik ya da metabolit profillemeye gibi farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyar, metabolomik çalışmalar sayesinde daha geniş bir metabolit yelpazesi üzerinde çalışılır ve yeni veya bilinmeyen metabolitleri keşfetme, biyolojik sistemlerin genel metabolik durumunu anlama ve yeni biyobelirteçler keşfetme olanağı sağlar.

Metabolomik çalışmalar görece yeni alanlar olmakla beraber, vücutta bulunan kimyasalların hastalıklarla ilişkisi üzerine düşünceler kökeni antik çağlara dayanan ilkel analitik yöntemlere kadar uzanabilmektedir. İdrar örneklerinde şeker miktarını belirlemek amacıyla karıncaları kullanmak gibi yöntemlerin milattan önceki yıllarda dahi kullanıldığı bilinmektedir (5). Laktik asit, üre, sitrik asit gibi bazı metabolitlerin analizi Boerhaave ya da Lavoisier gibi bilim insanlarının yöntemleriyle 1700'lü yıllara kadar dayanır. 1800'lü yıllarda limondan sitrik asit eldesi, sütte laktik asit eldesi gibi distilasyon yöntemleri geliştirilmiştir (6). 1843 yılında Liebig "Animal Chemistry (Die Thier-Chemie)" kitabıyla küçük organik moleküllerin metabolizmadaki rolleriyle alakalı bir kitap yazmıştır (6). 1940'ların sonlarında Roger J. Williams çalışmasında psikiyatri hastaları ile yaptığı çalışma ile bireylerin fenotiplerinde hastalık durumlarıyla beraber değişiklikler olduğunu göstermiştir. 28 farklı endojen metabolitin kağıt kromatografisi kullanılarak çıkartılan profilleri ile farklı psikolojik hastalıklarda bu metabolitlerin miktarının nasıl değiştirildiği araştırılmıştır (7). 1966 yılında Dalgiesh ve ark. gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi (GC/MS) kullanarak geniş ölçekli metabolit analizi gerçekleştirmiş ve nitel analiz için ilk veribankasından söz etmiştir (8). 1970'li yıllarda Horning ve ark. metabolit profillemeye terimini literatüre sokmuşlardır (9). 1989 yılında elektrosprey iyon kaynaklarının kütle

spektrometrelerinde kullanılmaya başlanması, 2000'li yıllarla beraber yazılım teknolojilerinin biyoinformatik çalışmalara dahil oluşu ile metabolomik çalışmalar ivme kazanmıştır (10). Bugün klinik araştırmalardan beslenme alışkanlıklarına, ilaç araştırmalarından bitki metabolomiğine kadar yüzlerce farklı alanda metabolomik çalışmaya rastlamak mümkündür (11).

Metabolomik çalışmaların henüz başlangıç evrelerinde Goffeau ve ark. maya hücrelerinde yaptıkları çalışmada 5885 proteine karşılık yaklaşık 600-700 adet metabolit bulunduğunu, bu sebeple genomik ve proteomik çalışmaların aksine metabolit düzeyinde fonksiyonel analizlerin daha kolay uygulanabileceğini ileri sürmüştür (12). İlerleyen süreç içerisinde bu öngörünün çok daha üzerinde bir sayıda metabolitin söz konusu olduğu ortaya konulmuştur. 2024 yılı itibariyle insan metabolit veribankası HMDB'ye kayıtlı 222.860 metabolit bulunmaktadır (13). Bory ve ark. 1990'ların başında yayınladıkları çalışmada, bazı durumlarda DNA düzeyinde tek bir nükleotid farklılığının metabolit seviyesinde 10000 katlık bir değişime sebep olabildiğini bildirmişlerdir (14). Palsson, 2006 yılında yayınladığı ve modern metabolomik yolak analizleri için öncü sayılabilecek çalışmasında, gen düzeyindeki farklılıkların metabolit derişimlerinde önemli değişikliklere sebep olmasına rağmen metabolitlerde kimyasal olarak çeşitliliğe yol açmadığını göstermiştir (15). Metabolomdaki farklılık genetik varyetelerden kaynaklı olabileceği gibi çevresel koşullardan kaynaklı da meydana gelebilir. Sebep ister genetik düzeyde bir varyasyon olsun, ister çevresel koşullardan dolayı olsun, oluşan her etki metabolitlerde ve bütün olarak metabolomda bir değişikliğe sebep olur ancak bu değişiklikler yeni metabolitlerin ortaya çıkmasından ziyade mevcut metabolitlerin miktarlarında değişikliğe yol açar ve bu durum metabolomik profillemenin ve yolak analizlerinin yolunu açar. Metabolitler bu farklılıklarla beraber organizmaya özgü bir fenotip oluştururlar ve gen düzeyinden bir bakış açısıyla oluşturulan genotip kavramı, metabolizmada neler olabileceğini ifade ederken, metabolit düzeyinden oluşturulan fenotip anlık olarak neler olduğunu anlamamıza olanak sağlar. Metabolitlerin gen transkriptomları ve protein translasyonlarının ardından son ürün olarak ortaya çıkması genotip-çevre ilişkilerinde bir köprü işlevi görür ve olası etkilerin fenotipteki

karşılıklarını anlamamıza yardımcı olur (16-19). Chen ve ark. yayınladıkları çalışmada 109 metabolitin doğrudan, 48 metabolitin ise kendi içlerindeki değişim oranlarından yola çıkarak 94 farklı gen ile ilişki kurulabildiğini göstermişlerdir (20). Genetik varyatelerden, çevresel koşullara kadar metabolizmada meydana gelen değişiklikler ya da geç bu durumun ilgili metabolitlere yansımaya sebep olur (21-24). Bununla beraber metabolomda meydana gelen değişikliklerin genom veya transkriptomda her zaman yansımaya olmayabilir (25). Genom ya da transkriptomun aksine metabolomun bu anlık durumu yansıtabilme kapasitesi, örneğin bir hastalık durumunun güncel halini anlamayı sağlar. Hastalık durumunda miktarı anlamlı olarak değişen metabolitler saptanabilirse bu metabolitlerin hastalığa ait tanı, teşhis ve tedaviye yönelik biyobelirteç olarak değerlendirilme imkanı ortaya çıkabilir. Tavares ve ark. yayınladıkları çalışmada diabete bağlı böbrek yetmezliği yaşayan hastalarda 1,5-anhidroglukitol, norvalin ve L-aspartik asit miktarının hastalığın seyri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (26). Guan ve ark. yayınladıkları çalışmada gliserofosfokolin, rosteron sülfat ve karnitin miktarının 0.933, 0.941 ve 0.933 doğrulukla polikistik over sendromunun teşhisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (27). Klatt ve ark. beta-alanin, homoserin, 3-hidroksikinurin, aspartat, tayrosin ve ornitin metabolitlerinden oluşturulan altı molekülü bir metabolit panelinin parkinson hastalığında tanı ve prognoz amacıyla kullanılabileceğini göstermişlerdir (28). Metabolomik yaklaşımlarla hastalık durumunda aktiveleşen yollar da tespit edilebilir ve hastalığın moleküler mekanizması ilaç hedeflerinin belirlenmesinde kullanılabilir (29-33). Akamprosate, bir amino asit türevidir ve alkol kullanımına bağlı bozuklukların tedavisinde kullanılır. Katılımcıların 12 haftalık akamprosate kullanımı öncesi ve sonrası serum metabolit profilleri LC/MS kullanılarak incelendiğinde, akamprosate'in glutamin ve amonyak yollarını aktive ederek kandaki serbest glutamat miktarını arttırdığı gösterilmiştir (34). Varfarin oral yolla alınan antikoagulan bir moleküldür ve S(-) ve R(+) olmak üzere iki farklı enantiomeri vardır ve Bai ve ark. yaptıkları metabolomik çalışma sonucunda S(-) formunun R(+) formundan belirgin seviyede daha aktif olduğunu göstermiştir (35). Metabolomik temelli yaklaşımlar sayesinde, metabolit düzeyinde biyobelirteçler de bulunabilir ve hastalıklara ait moleküler mekanizmaların anlaşılması olanaklı hale

gelebilir. Eva ve ark. glutamin, tayrosin, pirolin, histidin, alanin ve sitrat miktarlarının meme kanseri hastalarında tümör prognozunun takibinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (36). Biyolojik sistemdeki metabolitlerin sağladığı veriler hastalığın seyri ve tedaviye dair yanıtlarda fenotiple alakalı farklılıklara cevap bulmak amacıyla da kullanılabilirler (37-40). Metabolomik çalışmalar sayesinde yeni metabolitler tanımlanabilir ve bu yeni moleküllerin hastalıkların tanı, teşhis, tedavi ve ilaç çalışmalarında kullanılması söz konusu olabilir (41-43). Endojen metabolitler biyolojik süreçlerin her anında eşsiz bilgi kaynakları olabilirler.

2.2. Kanser ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı nanopartiküller (NNP) doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan, boyutları 10 – 1000 nm arasında değişebilen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan, taşınması istenen molekülün partikül içine veya yüzeyine adsorbe edildiği sistemlerdir. Bu nanopartiküller kullanılarak ilacın doğrudan belirli bir hedefe (örneğin hastalıklı bir dokuya) taşınması sağlanabilir, böylece istenmeyen yan etkilerin azaltılmasını ve ilaç etkinliğinin artmasını sağlayabilirler (44). Nanopartiküller hem yağda hem suda çözünebilecek yapılarda olabilirler. Bu sayede ilaçların çözünürlük problemlerini aşması sağlanabilir. Kontrollü salım sağlayabilirler, bu sayede ilacın terapötik etkisi uzatılabilir. İlaçların biyodağılım özellikleri değiştirilebilir ve bu sayede serbest ilacın diğer organ sistemlerine, yani hedef olmayan organlara yönelik toksisiteyi azaltması söz konusu olabilir. Nanopartiküller polimer formlarda ya da lipid, peptit gibi biyomateryaller kullanılarak hazırlanabilir ve çözünürlük, biyoyumluluk, stabilite, biyobozunurluk gibi bir çok özellik bakımından farklılık gösterirler (45). Bu farklılık nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı görevlerinin yanında, metabolizmayla etkileşerek bir çok etkileşime girmesine sebep olur.

İnsan serum albumin (HSA) nanopartiküller, kanda en yüksek oranda bulunan albümin proteininden türetilirler. HSA nanopartiküller biyoyumlu ve biyobozunur özellikte kabul edilir ve kimyasal yapısında ilaçları enkapsüle veya absorbe edebilmek için uygun birçok aktif grup bulunur (46). Bir diğer biyomalzeme nanopartikül olan

polilaktik asit (PLA) laktik asit türevlerinden üretilir. Bozunma sonucu laktik asit halinde parçalanarak vücuttan atılır. Poliglikolik asit (PGA) ve kopolimeri olan Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ilaç ve kozmetik araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (47). PLGA kopolimeri, monomerlerinin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlığı, farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerde sentezlenebilir. Bunun yanı sıra PLGA, fizyolojik ortamda inert, biyolojik olarak yıkılabilen, biyouyumlu, toksik olmayan ürünlere parçalanabilen ve ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan FDA (The Food and Drug Administration) onaylı bir biyopolimerdir. Biyomateryal oluşları sebebiyle HSA, PLA ve PLGA partiküllerin boyutu, bağlanma kapasiteleri gibi özelliklerinde farklılıklar gözlemlenebilir ve büyük ölçekli üretiminde sorun yaşanabileceği ihtimali söz konusu olabilir.

Polikaprolakton (PCL), biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, polilaktik ve poliglikolik asitlerle aynı kimyasal grupta yer alan poli-a-hidroksi asit grubuna ait bir alifatik poliesterdir. İlk olarak 1930'ların başında β -kaprolaktonun monomerinin halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenmiştir ve 70 yılı aşan bir süredir biyomedikal uygulamalarda kullanılan bir polimerdir (48). Bozunma hızı diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha uzundur bu sebeple kontrollü ilaç salım sistemlerine çok uygundur. Nanopartiküller kimi zaman polietilenglikol (PEG) gibi malzemelerle kaplanarak fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilebilir. PEG-PCL ile yüklenmesiyle paklitaksel'in çözünürlüğünde %90'a varan artışlar olduğu bildirilmiştir (49, 50).

Kanser halen dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne sebep olan bir hastalıktır. Geleneksel kanser tedavileri, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi yöntemleri içerir. Bu tedaviler tümör hücrelerini öldürmekte etkili olsa da, sağlıklı dokulara da zarar verebilirler, bu da yan etkilere yol açar. İlaç taşıyıcı nanopartiküller, bu sorunların üstesinden gelmek için umut verici bir çözüm sunmaktadır. Bu nanopartiküller, ilaçları doğrudan tümör hücrelerine taşımak ve sağlıklı dokulara zarar vermeden serbest bırakmak için tasarlanmıştır. Bu sayede kanser tedavisinin etkinliği artırılabilir ve yan etkileri azaltılabilir.

Kanser hastalığında nanotıp uygulamaları hastalığın teşhis ve tedavi süreçlerinde yaygın olarak kullanılır. Paklitaksel, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu bir kemoteröpatik bir ajandır. Özellikle meme kanseri, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Yan etkileri arasında saç dökülmesi, kemik iliği baskılanması, nöropati ve alerjik reaksiyonlar yer alır. Tedavi sırasında hastalar genellikle yakın tıbbi gözetim altında tutulur ve yan etkilerin yönetimi için ek tedaviler gerekebilir. Paklitakselin sudaki düşük çözünürlüğü teröpatik etkisini sınırlar. Paklitakselin sudaki çözünürlük problemi sonucu polioksietillenmiş yağ asidi türevleri kullanılarak çözünürlüğünün artırıldığı formülasyonlar geliştirilmiştir. Ancak kullanılan yardımcı maddelerin toksisite ve yan etkileri söz olabilir. Paklitakselin bu çözünürlük ve yan etki problemlerini azaltmak amacıyla 2005 yılında albumin nanopartiküller kullanılarak geliştirilen formülasyon FDA'den onay almıştır. 2007 yılında ise PEG-PLC nanopartiküller kullanılarak hazırlanan formülasyon piyasaya sürülmüştür. Bugün piyasada 50'den fazla nanopartikül bazlı farklı ilaç formülasyonu bulunmaktadır.

İlaç taşıyıcı sistemlerin birçok biyomedikal uygulaması olmakla beraber, metabolizmaya etkileri hakkında bilgilerimiz hala sınırlı konumdadır. Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal açıdan birbirlerinden farklılık gösteriyor oluşu, etkileşime girdikleri protein, lipid yada metabolitlerde de farklılık oluşturması, doğal olarak farklı metabolik yollarla etkileşim haline gelmeleri sonucunu doğurur. Kaplan ve ark. yayınladıkları siklodekstrin nanopartiküllerin MCF-7 kanser hücre hatları üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, boş nanopartiküllerin serin, glisin, fosfolipid biyosentezi gibi bir çok yolda değişikliklere yol açtığını göstermişlerdir (51). Metabolomik yaklaşımlar kullanılarak nanopartiküllerin metabolizmaya etkileşimleri, ilaç etkinlikleri, beklenmeyen etkileri araştırılabilir ve moleküler mekanizmaları hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabilir.

2.3. Metabolomik Çalışmalarda Deneysel Yöntemler ve Güncel Durum Tespiti

2.3.1. Tüm Metabolomu Profillemenin Zorlukları

1955 yılında Nicholson o zamana dek bilinen metabolik yolları tek bir tabloda gösterdiğinde tablo sadece 20 metabolik yoldan oluşmaktaydı (52). İnsan metabolom projesi ve bu proje ile oluşturulan “İnsan Metabolom Veri Bankası (HMDB)” 2008 yılında ilk sonuçlarını yayınlamaya başladıktan sonra ortaya çıkan ilk sonuç henüz insan metabolomunun çok küçük bir kısmını aydınlatabildiğimizdir (53). HMDB ilk yayınlandığında 2180 endojen metabolit kaydı içerirken, 2022 yılında 222.860 kayda ulaşmıştır ve bu sayı her geçen gün artmaktadır.

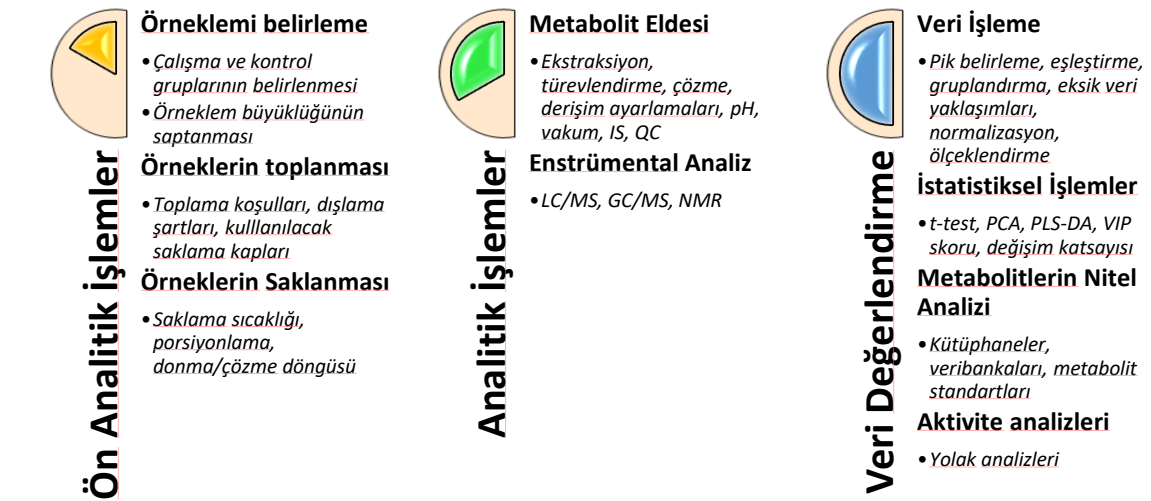
Herhangi bir metabolomik çalışmada deney tasarımı, çalışmada cevabı aranan sorularla doğrudan ilgilidir. Çalışma grubunun olası alt grupları, örneklerin nasıl toplanacağı ve saklanacağı, kontrol grubunun nasıl belirleneceği, doz, tedavi süreci, zamanın etkisi gibi varyasyonlar, deney tasarımını etkileyen temel unsurlardır. Metabolomik çalışmaların bu çok değişkenli doğası gereği çalışma tasarlanırken grupların doğal varyasyonları azaltacak büyüklükte olması gerekir. Dunn ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yaş gruplarını, cinsiyet farklılıklarını, vücut kitle endekslerinin tamamını aynı anda kapsayabilecek bir kontrol grubunun en az 600 katılımcıdan oluşması gerektiğini, eğer bu değişkenler azaltılabilirse sayının da azalabileceğini söylemiştir (54). Bu açıdan geleneksel tek değişkenli güç hesaplama yöntemleri metabolomik çalışmalarda istenilen sonucu vermemekle birlikte, çok değişkenli çalışmalar için geliştirilen güç analizi yöntemleri literatürde mevcuttur (54-56).

Metabolitler molekül ağırlığı, polarite, çözünürlük gibi temel kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından birbirlerine göre çok büyük farklılıklar gösterebilirler. Tüm metabolom fiziksel ve kimyasal olarak hem birbirine çok yakın özellikler gösteren, hem de birbirinden çok farklı özellikler gösteren metabolitlerin bir toplamıdır (57). Hedeflenmemiş çalışmalarda kullanılacak bir metabolit ekstresinde, glukoz ya da amino asitler gibi polar metabolitlerle beraber, lipid metabolitleri gibi

daha apolar metabolitler birlikte bulunurlar. Bu durumun metabolit analizlerini nasıl zorlaştırdığını göstermek için bir örnek vermek gerekirse, glukoz metaboliti ve türevlerinin metabolizmadaki rollerini araştırmak isteyen bir araştırmacı KeGG metabolit veribankasında 112 farklı glukoz molekülü türevi ile karşılaşır. Glukoz (C00031) 180.0634 g/mol molekül ağırlığına sahipken, bitkisel türevlerinden Pentagaloilglukoz (C04576) 940.1182 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Bu iki metabolitin molekül ağırlığı arasında böylesine bir fark varken diğer yanda tam olarak 260.029718526 g/mol molekül ağırlığına sahip 26 farklı glukoz türevi (C00085, C00446, C03862, C01094, C00275, C03546, C00092, C00103, HMDB0002985, C01172, C05345, HMDB0006328, C00636, C02888, C03267, C04006, C01097, HMDB0060467, HMDB0243608, C02965, C01002, C00275, C01177, HMDB0242558, HMDB0243977, HMDB0252488) metabolit vardır. D-glukoz (C00221) kimi durumlarda vücutta 69000 μ M derişimde bulunabilirken, glukoz 6-fosfat (C00092) yaklaşık 10000 katlık bir farkla 6.88 μ M derişime kadar düşebilmektedir (58, 59). Aynı çalışmada kontrol grubu örneklerinde D-glukoz derişimi varyasyonunun %100'ün üzerinde (3300-6900 μ M) olduğu da göze çarpmaktadır. Bu metabolitlerin çözünürlük, polarite, uçuculuk gibi kimyasal veya fiziksel parametrelerinde de kimi zaman çok büyük farklar olması kimi zaman da çok büyük benzerlikler olması aynı analitik yöntemde ölçümelerini zorlaştırır. Analitik yöntem bu farklılıklar yüzünden hem mümkün olan en geniş çalışma aralığını kapsamalı, hem de benzerlikler sebebiyle yüksek seçiciliğe sahip olmalıdır. GC/MS kullanarak uçucu olmayan metabolitlerden, LC/MS kullanarak ise uçucu metabolitlerden vazgeçmek söz konusu olabilir. Pozitif veya negatif iyon modu farklı moleküllerin iyonlaşmasını sağlayabilir. Her yöntem farklı molekül gruplarına avantaj veya dezavantajlı durumlar yaratabilir. Tipik bir ters faz kromatografisi yönteminde, polar metabolitlerin birçoğu kolonda çok az tutunarak yöntemin ölü zaman değerine yakın alıkonma zamanlarında kolondan ayrılır. Bunun sonucu ESI iyon kaynaklarında iyonlaşma verimi düşer, kütle dedektörlerinde seçicilik problemleri ortaya çıkar ve yöntemin hassasiyeti bu metabolitler için belirgin şekilde düşebilir. Bu sorunu aşmak için kullanılabilecek olası çözümlerden birisi olarak HILIC kolon kullanmayı düşünen araştırmacı, bu sefer aynı

sorunu polaritesi düşük metabolitler için yaşayacaktır. Hareketli faza eklenecek iyon çifti ajanları kromatografik ayrımı daha iyi hale getirebilirken, iyon kaynağında oluşacak baskılamadan dolayı iyonlaşma veriminin düşmesi söz konusu olabilir. Araştırmacı kimyasal türevlendirme yaparak bu metabolitlere polaritesini düşürecek fonksiyonel gruplar bağlayabilir. Bu durumda da veri değerlendirme basamağında yeni m/z değerleri, yeni parçalanma ürünleri ortaya çıkarabilir ve zaten karmaşık olan veri setini daha da karmaşık hale getirebilir.

Çok farklı alanlarda ve disiplinlerde metabolomik çalışmalar gerçekleştirmek mümkündür. Beslenme ve diet çalışmaları (60), çevre kirliliği çalışmaları (61), bitki metabolomik araştırmaları (62) gibi bir çok alt alanda metabolomik çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Metabolitlerin bu çok yönlü işlevleri, kimyasal ve fiziksel çeşitliliklerine de yansır. Metabolitler çok farklı molekül ağırlıklarına, polaritelere, derişimlere, çözünürlüklere sahip olabilirler ve bu durum ekstraksiyon, enstrümental analiz ve veri işleme basamaklarının her birinde metabolomik çalışmalara özel yaklaşımlar gerekliliği doğurur. Metabolomik çalışmalar örneklemin toplanması, örnek hazırlanması, enstrümental analiz, istatistiksel ve bioinformatik basamaklarından oluşur. Gaz ve sıvı kromatografileri ile kombine edilmiş kütle spektrometresi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) metabolomik çalışmalarda başlıca kullanılan analitik yöntemlerdir. Tablo 2.1.'de metabolomik çalışmalarda kullanılan işlemlere ait genel bir tablo verilmiştir.

Tablo 2.1. Metabolomik çalışmalarda işlem basamakları

2.3.2. Metabolomik Çalışmalarda Numune Hazırlama Yöntemleri

Metabolomik çalışmalarda çok farklı numune tiplerinde uygulanabilir; serum, plazma, bitki, hücre hattı, idrar, gözyaşı, anne sütü, doku gibi hemen hertürlü biyolojik materyalden çalışmalarda yapılabilir, tüm organizmadan tek hücrelik örnekler kadar bütün boyutlarda metabolomik analiz gerçekleştirilebilir (63-65). Örnek hazırlama metodolojisinin seçimi ve optimizasyonu, elde edilen sonuçlar üzerinde doğrudan etkilidir. Canelas ve Duportet yayınladıkları çalışmalarda metabolit miktarlarındaki artış veya azalışların örnek hazırlama basamağından ve ekstraksiyon yönteminden nasıl etkilendiğini göstermiştir (66, 67). Genel çerçevede örnek hazırlama basamağı olası girişim ve matris etkilerini azaltmalı, analiti hedef derişim aralığında tutmalı, analiti stabil koşullarda analize hazır hale getirebilmelidir. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda örnek hazırlama prosedürü mümkün olan en fazla sayıda metabolitin ekstraksiyonu için seçici olmamalı, varyasyonu minimum seviyede tutmak için uygulamada kolay, az basamaklı ve tekrarlanabilir olmalıdır.

Metabolik Aktiviteyi Durdurma

Numune hazırlama basamağında ilk adım metabolik aktiviteyi durdurmaktır. Metabolitlerin stabilitesinde kimyasal ve fiziksel stabiliteleri kadar, enzimatik aktivite sonucu miktarlarındaki değişimler de göz önüne alınmalıdır. Plazma veya serum gibi

biyolojik materyaller ya da hücre ortamı içerisinde bekletilen hücre kültürü örnekleri, metabolitlere enzimatik ve kimyasal aktivitelere devam edebilmek için çok uygun ortamlar sağlar. Metabolitlerin çoğu - 80°C 'de uzun süreli stabildir (68, 69). Orta vadeli saklamalarda (6-12 ay) metabolitlerin çok az bir kısmı - 20°C ile - 80°C 'de farklılaşma göstermiştir (70). Bunun yanında bazı metabolit gruplarının stabilitelerinin - 80°C 'de dahi değişebildiği gösterilmiştir (71). Metabolik aktiviteyi durdurmanın hızlı ve kolay yolları ortamın pH'sını veya sıcaklığını değiştirmektir. Bu işlem ekstraksiyon aşamasıyla beraber gerçekleştirilirse hücre içi ve hücre dışı metabolitler beraber elde edilmiş olur. Soğuk metanol yöntemi hızlı ısı transferi sayesinde aktiviteyi hızlıca durdurur, birebir oranda sulu çözeltisi şekilde hazırlanırsa hücre duvarının parçalanmasını engelleyip hücre içi ve dışı metabolitlerin analizine olanak sağlar (72). Sıvı azot -196°C'ye kadar düşen sıcaklığı sayesinde metabolik aktiviteyi çok çabuk durdurur, hücre duvarının parçalanmasını sağlar ve örnekten kolayca uzaklaştırılabilir. İşlemin yavaşlığı uygulama süresini uzatır ve dondurma işleminin homojen olmasına ekstra dikkat etmek gerekir (73). Tablo 2.2.'de örnek hazırlama basamağında kullanılan yaygın yöntemler gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Örnek hazırlama basamağında kullanılan yöntemler

- **Örneklemin Toplanması**

- Uygun numune kapları
- Uygun saklama koşulları

- **Metabolik aktivitenin durdurulması**

- Sıvı azot
 - Asitlendirme/alkillendirme
 - Hücre Lizizi
-

- **Metabolit Ekstraksiyonu**

- Organik çözücülerle protein çöktürme
 - Hedef metabolit gruplarına göre metanol, kloroform, asetonitril ve diğer organik çözücüler
- Katı faz tüketme
- Ultrafiltrasyon
- Katı örneklerde sıvı azot ile parçalama ve homojenizasyon
- İç standart
 - Ekstraksiyon verimini/tekrarlanabilirliğini takip edebilmek amacıyla iç standart kullanımı
- Derişim
 - Vakum santifrüjle ekstraksiyon çözeltisini uzaklaştırma
 - Yönteme uygun çözücülerle yeniden çözme
- Çözünürlük
 - Polar metabolitler için polar çözücüler, apolar metabolitler için apolar çözücüler.

Metabolit Ekstraksiyonu

Metabolomik çalışmalarda tek bir evrensel numune hazırlama prosedürü yoktur ve çalışmanın amaçlarına ya da örnek tipine göre değişik örnek hazırlama prosedürleri gerekli olabilir. Örnek hazırlama prosedürünün seçici olmaması, olası metabolit gruplarının kaybına yol açabilir. Ancak her durumda kullanılan yöntemle göre bazı metabolit gruplarının ekstraksiyon veriminin daha yüksek veya düşük olması kaçınılmaz olarak karşımıza çıkar. Sıvı-sıvı ekstraksiyon veya organik bir çözücü

kullanarak proteinlerin çöktürölüp uzaklaştırılması yöntemleri en sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (74, 75). Metanol veya asetonitril gibi polar çözücüler polar metabolitlerin ekstraksiyonu için kullanılırken, hekzan, kloroform gibi daha apolar çözücüler lipid türevleri gibi apolar metabolitlerin ekstraksiyonunda kullanılır (76, 77). Metanol-su-kloroform gibi üçlü karışımlar polar ve apolar metabolitlerin tek basamakta ekstraksiyonunu gerçekleştirmekte kullanılabilir (78). Doku örneklerinde sıvı azot kullanılarak homojenizasyon sıklıkla uygulanan yöntemlerdendir (73). Literatürde ultrafiltrasyon ve katı faz ekstraksiyon ile yapılmış metabolomik çalışmalar da mevcuttur (79, 80). Bu yöntemler genellikle doku veya bitki örneklerinde tercih edilirler. Hedef metabolitlere göre yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyon veya asidik ya da bazik ortamlarda ekstraksiyonlar uygulanabilmektedir (81). Kaplan ve ark. farklı örnek hazırlama protokollerinin sonuçlarını karşılaştırdığı çalışmalar yayınlamıştır (79, 82).

Hücre kültürü örnekleri ile çalışılırken hücre içi veya hücre ortamı metabolitlerine göre yöntem değişiklik gösterir (80). Hücre dışı kültür ortamında bulunan metabolitler, liziz işlemi yapılmadan seyreltme ve santifrüj işlemleri sonrası enjeksiyon edilebilir (83). Hücre içi metabolitelerde hücre liziz ve peletlerden metabolit ekstraksiyonu basamakları da prosedüre eklenir. Sadece hücre içi metabolitlerle ilgileniyorsa, hücre ortamı dikkatli bir şekilde yıkanmalıdır. Hücre ortamının yıkanması hassasiyet ve iyon baskılama açısından iyi sonuçlar vermekle beraber, hücrelerin zarar görüp hücre içi metabolitlerin de kaybolmasına sebep olabilir. Lorenz ve arkadaşları yıkama işlemi sonucunda 2 ile 22 kat arasında değişen oranda pik şiddetlerinde iyileşme ve tanımlanan metabolit sayısında 1.5 kat artış görüldüğünü yayınlamışlardır (84, 85). Hücre lizizi ve metabolit ekstraksiyonunun beraber yürütüldüğü yöntemler de literatüre yansımıştır. Sheikh ve arkadaşları tekrarlı bir donma çözülme basamakları içeren önermişlerdir (86). Dietmair ve arkadaşları hücre hatları için 12 farklı ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmışlardır (87). Kaplan ve ark. iki farklı liziz tekniğini farklı analitik yöntemlerde karşılaştırmışlardır (88).

Ekstraksiyon işleminde kullanılan ekstraksiyon çözücüsü numuneye göre 1:1'den 1:20'ye kadar değişen oranlarda olabilir. Çözücü tipi, kullanılan tampon gibi özellikleri yüzünden kullanılan analitik yöntemle girişim söz konusu olabilir. Bu durumlarda çözücüyü uzaklaştırmak için rotavapor ya da vakumlu sentrifüj gibi işlemler uygulanabilir.

Tüm örnek tiplerinde, ekstraksiyon verimini ve diğer olası hataları tespit etmek için, ekstraksiyon çözeltisine iç standart(lar) eklenmesi gereklidir. Kullanılan iç standartlar, numune matrisine benzer metabolitlerden seçilmelidir. Örnekten gelen piklerden ayırmak amacıyla izotop işaretli standartlar kullanılmalıdır. İç standartlar genelde matrise uygun izotop işaretli metabolitler veya hedef metabolitin benzerlerinden seçilir. İç standartın fazlası iyon baskılamaya sebep olabileceğinden, derişimini optimize etmek gereklidir. Enzimatik reaksiyonları hücre hatlarında takip edebilmek amacıyla hücre kültürü ortamına izotop işaretli standartlar eklenebilir (89).

2.3.3. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Analitik Yöntemler

Metabolomik çalışmalarda metabolitlerin tespit edilmesi ve miktarlarının belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemler kullanılır. Sıvı-gaz kromatografileri ile kombine edilmiş kütle spektrometresi (LC/GC-MS), nükleer manyetik rezonans (NMR) başlıca kullanılan yöntemlerdir. NMR örnek hazırlama basamağının basitliği, örneklerin tekrar kullanılabilir olması, metabolitlerin kimyasal yapıları hakkında detaylı bilgi sunması gibi avantajlar sağlar ve MS yöntemlere göre tekrarlanabilirlik açısından daha iyi sonuçlar verirken, duyarlılık açısından daha düşük duyarlılığa sahiptir.

Kromatografik Yöntemler

Biyolojik örnekler doğası gereği kompleks bir matrise sahiptir. Metabolitler çok farklı kimyasal özelliklerde olabileceği gibi, derişimleri arasında da çok büyük farklılıklar söz konusudur. Bu durum metabolomik çalışmalarda kromatografik bir ayırım gerekliliğine sebep olur.

Gaz kromatografisi moleküllerin gaz fazındaki hareketliliğine dayanır, bu sebeple uçucu metabolitler veya kimyasal türevlendirmeyele uçucu hale gelebilen metabolitler için uygun bir yöntemdir. GC yüksek ayırım gücü sayesinde karmaşık biyolojik matrislerden metabolit analizinde geçmiş yıllardan beri önemli bir yere sahiptir. Literatürde tek seferde yüzden fazla metabolitin miktar tayininin yapılabildiği çalışmalar söz konusudur (90, 91). GC kullanılarak uçucu ve yarı uçucu türde alkoller, şeker türevleri, lipidler, organik asitler, fosfor bileşikler ve daha bir çok molekül grubuna ait metabolitlerin analizi mümkündür. Genellikle 300°C ve altı kaynama noktasına sahip bileşikler uçucu bileşikler olarak kabul edilirler ve doğrudan analizleri gerçekleştirilebilir. Diğer metabolitler uygun türevlendirme ajanları kullanılarak kimyasal reaksiyonlara sokulurlar ve kaynama noktaları düşürülür. Türevlendirme işlemi moleküllerin termal stabilitelerini arttırmak amacıyla da kullanılabilir (92).

Sıvı kromatografisi katı sabit faz üzerinde hareket eden sıvı hareketli fazdan oluşan bir sistemdir. Analit hareketli fazla beraber sürüklenirken, sabit fazla etkileşime geçer ve kolon içindeki hareketliliği farklılaşır. Bu farklılaşma sayesinde analiz edilen maddeler birbirlerinden ayrılır ve kromatografik bir ayırım oluşur. Analitin hareketli ve sabit fazla etkileşimi kullanılan yöntemle bağlı olarak değişir. Ters faz kromatografisi (RP), apolar bir sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşur ve metabolomik çalışmalarda en sıklıkla kullanılan kromatografik yöntemdir (93). Yöntem alıkonma zamanında sağladığı yüksek tekrarlanabilirlik, maliyet ve daha yeşil analizler sağlaması sebebiyle öne çıkar. RP geniş bir ölçekte metabolit türlerinin analizini mümkün kılmakla beraber orta ve düşük polaritedeki metabolitlerin analizinde sıklıkla kullanılır, karboksilik asit türevleri ya da şeker türevleri gibi polarlığı yüksek metabolitlerin analizinde yetersiz kalabilir. *Escherichia coli* bakterisinde yapılan bir çalışma, metabolomunun neredeyse yarısının suda çözünen yüksek polariteli metabolitlerden oluştuğunu göstermiştir (94). Bu durum polar metabolitler için araştırmacıların alternatif yollar aramasına sebep olmuştur. Polar metabolitlerin analizlerinde hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC), normal faz kromatografisi, iyon kromatografisi ya da kimyasal türevlendirme gibi seçenekler söz konusu

olabilirler (95). Yeni nesil ultra performanslı sıvı kromatografisi cihazları (UPLC) daha yüksek geri basınç altında ve daha düşük partikül çaplı (<2.1 μm) kromatografi kolonları ile çalışmaya olanak sağlayarak, daha iyi ayırım ve daha yüksek hassasiyet sağlamaktadır (93).

Kromatografik ayırımın kütle spektrometreleri ile kombine edilmesi durumunda elde edilen alıkonma zamanı verisi sayesinde nitel analiz için kütle verisine ek olarak alıkonma zamanı (t_R) verisi de elde edilmiş olur. Alıkonma zamanı hem nitel analiz için tanımlayıcı verilerden biriyken, hem de örnekler arasında piklerin birbiri ile eşleştirilmesi için kullanılan temel parametrelerden biridir. Ayrıca kullanılan kromatografik yöntemle göre kolondan sırayla elüe olan metabolitler, iyon kaynağında anlık olarak analit derişimini düşürür ve iyon baskılamanın etkisini azaltarak yöntemin hassasiyetini artırır. Yine metabolit tanımlamada sıklıkla başvuru olan yöntemlerden birisi de metabolitin MS/MS spektrumları üzerinden tanımlanmasıdır. Parçalanma iyonlarının diğer analitlerle sinyallerinin karışmaması ve MS/MS taramasına gerekli zaman aralığını kazandırabilmek için, kromatografik ayırımla analitin matristen ayrılmış halde sırayla kütle dedektörüne gelmesi gerekir.

Kütle Spektrometrisi

En genel anlamda MS'in çalışma prensibi, negatif veya pozitif yükü iyonlaşmış haldeki molekülün elektrik alan altında hareket ettirilerek kullanılan dedektöre göre değişen bir elektrik sinyaline dönüştürülmesidir. Her tarama aralığında bu sinyallerden kütle/yük (m/z) ve pik şiddetini içeren sinyaller kaydedilir ve kütle spektrumunu oluşturur. Sıvı kromatografisi (LC-MS), gaz kromatografisi (GC-MS), kapiler elektroforez (CE-MS) veya iyon mobilite (IMS-MS) gibi farklı ayırım sistemlerinde metabolomik çalışmalar yapmak mümkündür. Eğer kütle spektrometresi sıvı veya gaz kromatografisi ile kombine olarak kullanılırsa, bu spektrumlar alıkonma zamanlarına göre, kapiler elektroforez yöntemi ile kullanılırlarsa elektroforetik hareketliliğine göre, iyon mobilite sistemleri ile kullanılırlarsa iyonik hareketliliğine göre metabolitlerde m/z değerine ek olarak bir ayırım vektörü daha sağlar.

Örnek girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektörü tüm kütle spektrometrelerinde ortak bileşenler olarak bulunurlar. Örnek girişinden analit sisteme girer, iyon kaynağında iyonlaştırılır, kütle analizöründe m/z değerlerine göre ayırım sağlanır ve iyon dedektöründe sinyalleri kaydedilir. Yine tüm kütle spektrometre yöntemleri molekülün elektrik alan altındaki hareketliliği prensibinde çalıştığından, sistemler yüksek vakum altında kullanılır.

Kromatografik ayırmadan veya doğrudan enjeksiyon sonucu sisteme giren analitler ilk olarak iyonlaşma işlemine maruz kalırlar. Bir çok farklı tür ve prensiple çalışan iyon kaynağı bulunmakla beraber, elektrosprey iyon kaynakları (ESI) biyomolekül analizlerinde en sıklıkla kullanılan iyon kaynağıdır (96). Elektrosprey iyonlaştırıcıda elektrik potansiyeli altındaki spreyye analit iyonlaştırılır ve gaz fazına geçirilir. Bu iyonlaşma sırasında moleküle ait birçok farklı formda kimyasal yapılar oluşabilir. Proton alıp $[M+H]^+$ formuna gelirse, +1 yüklü halde iyonlaşır ve molekül kütlesi buna göre hesaplanır. $[M-H]^-$ gibi bir proton kaybettiği ya da $[M+Na]^+$ gibi ortamdaki katyon veya anyonlarla etkileşebildiği birçok form oluşturabilir. Metanol, su, asetonitril gibi protik çözücüler ESI kaynaklarda hassasiyetin artmasını sağlarken, DMSO gibi aprotik çözücüler hassasiyet kaybına yol açabilirler. Na^+ , K^+ gibi inorganik tuzlar iyonlaşma verimini düşürebilirler bu sebeple formik asit, asetik asit gibi uçucu tamponlar tercih edilirler. Organik molekülleri parçalamadan iyonlaştırabilmesi, geniş molekül aralığında çalışabilmesi, hem pozitif hem negatif iyonlaşmaya olanak sağlaması üstünlükleridir. ESI kaynaklar geniş derişim aralığına sahiptir bu sayede nicel analiz çalışmalarında kullanılabilir. Yüksek derişimlerde doğrusallıktan sapmalar, düşük derişimlerde ise tekrarlanabilirlik problemleri söz konusu olabilir (97).

İyonlaştırma basamağından sonra moleküller kütle tespiti basamağına geçerler. Kütle spektrometreleri genellikle kullanılan kütle dedektörüne göre sınıflandırılırlar. Kuadropol (Q), uçuş zamanlı dedektör (TOF), iyon tuzaklı, orbital tuzaklı gibi bir çok farklı dedektör tipi bulunmaktadır. Dedektörler seçicilik, tarama hızı ve hassasiyet bakımından ayrılarak çalışmanın amacına göre kullanılırlar. Örnek olarak kuadropol dedektörler seçicilik yönünden avantaj sağlarken, uçuş zamanlı

analizörler kütle çözünürlüğü yönünden avantaj sağlar. Uçuş zamanlı analizörler iyonların kinetik enerji altındaki hareketliliğinden faydalanırlar. Dedektöre ulaşan analitler aynı anda aynı enerjiye maruz bırakılıp hareketlendirilirler ve iyonlar aynı enerjiyle yüklenmelerine karşılık farklı kütlelerde olmasından dolayı hızları ve dedektöre ulaşma süreleri farklılaşır. Uçuş zamanlarındaki bu farklılıktan yararlanarak iyonların kütle değerleri belirlenir. Dedektörlerin kombine halde kullanılması da yaygın olarak karşımıza çıkar. Örneğin kuadrapol analizörle kombine edilen TOF dedektörlerde, yöntemin seçiciliği arttırılır ve MS/MS tekniğini mümkün hale getirir.

Metabolitler iyon kaynağında negatif veya pozitif olarak iyonlaşabilirler ve MS'in çalışma moduna göre pozitif veya negatif metabolitler dedektöre ulaşır. Hedeflenmemiş çalışmalarda MS kütle tarama modunda kullanılır, burda TOF gibi yüksek tarama hızına sahip dedektörler gereklidir. Hedeflenmiş çalışmalarda hassasiyet ve seçicilik önem kazanır, bu çalışmalarda kuadrapol gibi dedektörler tercih edilir. Taramalar MS^1 şeklinde moleküler iyon kütlesi veya MS^n (MS/MS) şeklinde, moleküllerin elektrik enerjisi kullanılarak parçalandığı ve fragment iyon kütlelerinin tarandığı modlar kullanılarak yöntemin seçiciliği arttırılabilir. Kütle spektrometrelerinde doğruluk kütle ölçümündeki hata payına bağlı olarak ifade edilir. %0.001 hata payıyla ölçüm yapan bir cihazda 10.000 Da boyutundaki bir molekülde ± 0.1 Da'luk bir hata olasılığı doğar ki bu da 10 ppm olarak ifade edilir. Doğruluk değeri kütle dedektörünün çözünürlüğüyle de orantılıdır. Kütle spektrometrelerinde çözünürlük iki kütleyi (m/z) birbirinden ayırabilme kapasitesinin bir ifadesidir (M_1/M_1-M_2). Kütle spektrometresinin türüne ve çözünürlük kapasitesine bağlı olarak kütleler 0.1 ppm seviyesine kadar hassasiyetle ölçülebilir veya parçalanma iyonlarından yola çıkılarak nitel analiz gerçekleştirilebilir. Ölçülen kütleler cihazın çözünürlüğüne göre de farklı şekilde ifade edilir. Monoizotopik kütle molekülün izotop pikleri hesaba katılmadan ölçülen kütlesini ifade eder. Yüksek çözünürlüklü cihazlarda izotop pikleri ayrılırlar ve monoizotopik kütleler elde edilirler. Çözünürlük düştükçe izotop pikleri de kaybolur bu durumda ortalama kütle elde edilmiş olur. Örnek olarak $C_{18}H_{35}NO$ formulündeki bir molekül 281.2718 Da monoizotopik kütleyle sahipken, 281.4858 Da ortalama kütleyle sahiptir. Cihaz tarama

modunda veriye bağımlı (data dependent) ya da veriden bağımsız (data independent) taramalar yapabilir. Veriye bağımlı taramalarda hedef kütleler önceden belirlenir ya da yüksek pik şiddetli pikler cihaz tarafından seçilir (98, 99). Daha geniş metabolom analizleri için örnekler farklı kütle dedektörleriyle tekrar analiz edilebilirler.

Kütle Spektrometresinde İyon Baskılama Etkisi

Kütle spektrometreleri iyonik haldeki moleküllerin elektrik alan altındaki hareketliliği prensibi üzerinden çalışmaktadır. Kromatografi kısmından ya da doğrudan enjeksiyon yoluyla gelen örnek, iyon kaynağında iyonlaştırılır. Biyomolekül analizlerinde sıklıkla kullanılan ESI kaynakları iyon baskılamadan en çok etkilenen iyon kaynaklarından birisidir (100). İyon baskılama, spreyde oluşan aerosollerle taşınan moleküllerin birbirleri arasındaki etkileşimler sonucu uçuculuk veya iyonlaşma kabiliyetlerinin değişmesi olarak tanımlanır (100). Bu değişiklik sonucu molekülün iyonlaşma etkinliğinde düşme hatta hiç iyonlaşamaması, dimer veya fragmentlerinin oluşması gözlemlenebilir (97). İyon baskılama sonucunda yüksek kütleli moleküllerin daha küçük kütleli molekülleri baskılaması, analitin polarlığının artması sonucu daha fazla baskılama gözlemlenmesi de literatürde karşılaşılan durumlardır (101, 102). İyon baskılama etkisini gözlemlemek ve hangi pikleri etkilediğini tespit edebilmek amacıyla farklı ekstrelerdeki örnekler karıştırılıp pik şiddetlerindeki değişimler takip edilebilir (103). İyon baskılama etkisini tamamen ortadan kaldırmak için bir yol olmamakla beraber daha uzun kromatografik ayrımlarla veya örnek hazırlama yöntemlerinde modifikasyona giderek bu etki azaltılabilir (104, 105).

2.3.4. Metabolomik Çalışmalarda Veri İşleme Yöntemleri

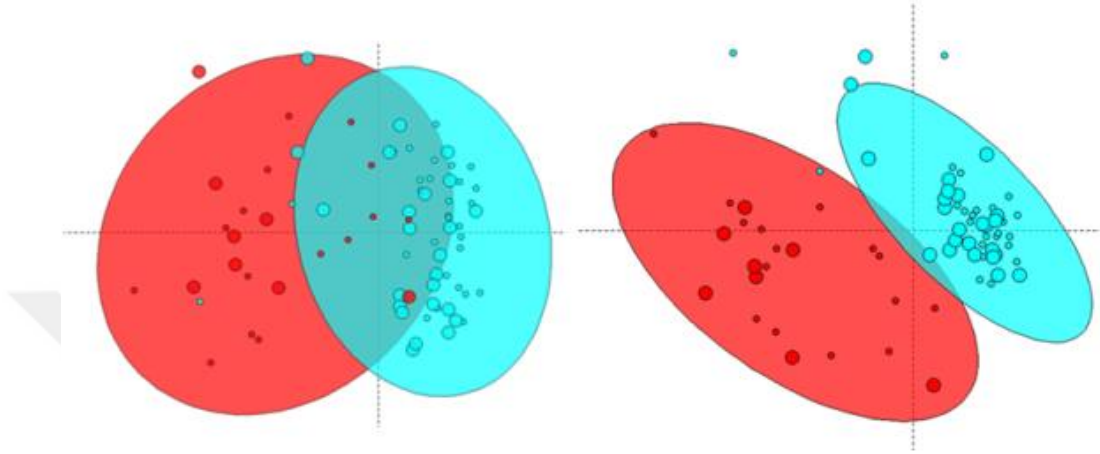
Metabolomik çalışmalarda deneysel veriler biyoinformatik ve istatistiksel yaklaşımlar kullanılarak biyolojik bilgiye dönüştürülür. Çalışmalarda sayısı binleri aşabilecek sayıda metabolitlerin bir veya daha fazla gruplar arasında karşılaştırılması söz konusu olabilir. Bu durum metabolomik çalışmalara özgü olarak istatistiksel yaklaşımlar kullanılmasını gerektirir. En genel anlamda bu işlemler metabolitlerin nitel ve nicel yönden analizleri, çalışma kapsamında belirlenen değişken üzerinden

farklılıkları, etkilediği yolların tespit edilmesi, metabolitlerin birbirleri arasındaki bağlantılar ve korelasyonların araştırılması çalışmalarıdır (106). Metabolomik çalışma sonuçları biyolojik ve deneysel varyasyonları içeren sonuçlardır. Her pik farklı kaynaklardan gelen varyasyonları içerir ve yapılan istatistiksel çalışmalar bu varyasyonların etkisinin azaltılması amacı taşır.

Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar genellikle yarı kantitatif sonuçlar üzerinden değerlendirilir ve çalışma grupları arasında kütle dedektöründe ölçülen pik alanları/yükseklikleri karşılaştırılır. Özellikle biyolojik kaynaklı örnekler ve dokular olmak üzere, örnek hazırlama basamağında alınan örnekler biyolojik varyasyonlardan kaynaklı olarak birbirlerinden farklıdır. İki farklı örneği, aynı çalışma grubunda olsalar dahi, birbiri ile karşılaştırmak için kendi içinde standardize/normale etmek gereklidir (107).

Metabolomikte normalizasyon, biyolojik örneklerdeki metabolit seviyelerinin karşılaştırılabilir ve güvenilir hale getirilmesi amacıyla kullanılan bir veri işleme yöntemidir. Normalizasyon yönteminde amaç deneysel yöntemden kaynaklı varyasyonları ortadan kaldırıp, biyolojik varyasyonu gösterebilmesidir. Literatürde karşılaşılan çok sayıda normalizasyon metodu vardır ve hangi metodun uygun olduğu birden fazla değişkene bağlıdır. İç standartlara, pik ortalamasına, pik ortanca değerine, ya da ölçeklendirmeye (scaling) bağlı normalizasyon yöntemleri literatürde mevcuttur (108). Pik ortalaması ya da ortancası gibi yöntemler, uygulaması basit ve varyasyonun düşük olduğu örneklerde yeterli etkiyi gösterir, ancak uzun soluklu ve örneklem sayısının büyük olduğu çalışmalarda etkinliği düşer (109). İç standart kullanılarak normalizasyon yönteminde, ekstraksiyon öncesinde veya sonrasında eklenen standartlar takip edilerek, bu standartların pik şiddetlerine göre geri kalan pikler normalize edilir. Yöntemde birden fazla iç standart kullanılabilir, kullanılan iç standartların metabolit standartları olması tercih edilir, endojen metabolit pikleri ile girişim olmaması için izotop işaretli iç standartlar kullanılır (110-112). İç standart yöntemi yüksek derişimlerde iyon baskılamaya sebep olabilir ve yeterli kromatografik ayırım olmaması durumunda hatalı sonuçlar verebilir (113). Ölçeklendirme (scaling)

pik şiddeti değerlerinin istatistiksel olarak dönüştürülmesi işlemidir. Pikler arasında büyük farklar olduğu zaman, yüksek pik şiddetine sahip pikler ve düşük pik şiddetine sahip piklerin daha düşük ölçeklerde görülebilmelerini sağlar. Bu ölçeklendirme işleminde düşük şiddetli piklerde hassasiyet kaybı problemleri oluşabilir (110).



Şekil 2.1. PCA grafiği solda, PLS-DA grafiği sağda

Metabolomik çalışmalarda çıkan sonuçlar hem tek tek, hem örnekler arası, hem de gruplar arasında ayrı ayrı düzlemlerden değerlendirilir. Bu durum birden fazla sayıda istatistiksel yaklaşım gerekliliği ortaya çıkarır. Gözetimli (supervised) metodlar olarak değişim katsayısı (FC) ve t-testi sonuçları (p) metabolomik çalışmalarda standartlaşmış sonuçlardandır. Tek değişkenli analizlerin yanı sıra çok değişkenli analizler de birlikte değerlendirilmelidir. Gözetimsiz (unsupervised) olarak temel bileşenler analizi (PCA) ham verinin grup içindeki dağılımını ve grupların birbirinden ne kadar farklılaştığını göstermek amacıyla sıklıkla kullanılır. PCA örnekler arasındaki varyasyonları çok boyutlu (multi dimension) veriden dönüştürerek tek boyutlu (single dimension) görünümü hale getirir (114). PCA, varyansı açıklayan bileşenleri bulmak için kullanılır ve gözetimsizdir, veri setindeki desenleri ve yapılarını anlamaya yöneliktir. Kısmi en küçük karelerin farklılaştırma analizi (partial square discriminant) analizi (PLS-DA) gruplar arasındaki ayrımı belirlemek için kullanılır ve gözetimlidir. PLS-DA yöntemi farklılaşan piklerin tespiti için sıklıkla kullanılır (115). Şekil 2.1.'de PCA ve PLS-DA arasındaki farklılıkları gösteren temsili bir görsel verilmiştir. İki'den fazla grubun karşılaştırılması söz konusu olduğunda ANOVA testi kullanılabilir. Örnek

dağılımını ve birbirleri arasındaki korelasyonu göstermek amacıyla gruplama (cluster) yöntemleri de kullanılabilir (116). Bu gruplamalar kullanılarak veride örnekler veya metabolitler arasında istatistiksel bir trend olup olmadığı anlaşılabilir. Benferroni ve benzeri düzeltmelerle yanlış tahmin oranı (FDR) hesaplanması mümkündür (117).

Gelişen bilimsel ve teknolojik yöntemlerin çerçevesinde, yapay zeka ve makine öğrenme destekli algoritmalar metabolomik çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Makine öğrenmesi yöntemleri, örnek veriden matematiksel modellemeler ortaya çıkararak, bu modelin diğer verilere uygulanabilmesini sağlar (118). Makine öğrenmesi yöntemleri metabolomik veride regresyon, korelasyon, kümeleme, tanımlama, farklılaşmayı bulma gibi bir çok veri değerlendirme basamağında kullanılabilecek yöntemler içerir. Wang ve arkadaşları lipidomik çalışmadan elde ettikleri verilerin SVM makine öğrenmesi modeli kullanarak %90 hassasiyet ve %92 seçicilikle akciğer kanseri hastalarında erken tanı için kullanılabileceğini bildirmiştir (119).

Metabolitlerin Nitel Analizi veya Tanımlanması

1968 yılında Crawford ve Morrison yayınladıkları makale ile kütle spektrometri analizlerinde bilinmeyen piklerin analizi ve normalizasyon yöntemlerine dair bilgisayar destekli ilk programı geliştirmişlerdir (120). Makalenin sonuç bölümünde geçen cümlede “gelecek yıllarda eğer her molekülün kütle spektrumunu saklayabildiğimiz bir veri bankası geliştirilebilirse, molekül tanımlama önemsiz bir sorun haline gelecektir” ifadesini kullanırlarken, son yıllarda yaşanan ilerlemelere rağmen metabolomik çalışmalarda bilinmeyen metabolitlerin tanımlanması, metabolit standartlarının ve veribankalarının geliştirilmesi, veri işleme basamaklarının optimize edilmesi araştırmacıların üzerinde durdukları başlıca konulardır.

Hedeflenmiş çalışmalarda analit çalışmanın başında belirlenir ve referans standartlar kullanılarak analitik yöntem geliştirilirken, hedeflenmemiş çalışmalarda nitel analizi yapılan metabolitler çalışmanın veri değerlendirme basamağında ortaya

çıkarlar. Bir metabolomik çalışmada elde edilen pikler onbinlerle ifade edilebilecek sayılara ulaşabilir, elde edilen piklerin çok büyük bir çoğunluğu zemin gürültüsünden, kirlilikten, metabolitlerin izotop piklerinden, farklı “adduct” oluşumlarından, dimerleşmelerinden, iyon kaynağında meydana gelen parçalanmalarından kaynaklı pikler olur ve çeşitli istatistiksel yaklaşımlarla bu pikler filtrelenebilir (121). Bu durum nitel analizde birden fazla yaklaşımı söz konusu hale getirir.

Metabolit veribankaları bu sebeple metabolomik nitel analizde kritik bir rol oynar. Uzun yıllar boyunca organik molekül analizlerinde birincil seçenek durumunda GC/MS yöntemler bulunmaktaydı ve Amerikan Ulusal Standartlar Enstitüsü (NIST)’de gaz kromatografisinden elde edilmiş 300.000’in spektrum bulunmaktadır. 2000’li yıllarda ESI tekniğinin organik moleküllerde yumuşak iyonlaşma sağlayabilmesi ve sıvı kromatografisi ile uyumlu çalışabilmesi LC-ESI-MS yöntemlerin yaygınlığının önünü açmış oldu ve LC/MS veribankaları hızla gelişmeye başladılar. İnsan metabolom projesi veri bankası (HMDB), KeGG, Lipid Maps, METLIN en sıklıkla kullanılan metabolit veribankalarındandır. LC/MS bazlı bir metabolomik çalışmada nitel analiz için kullanılan iki temel veri kütleli ifade eden m/z değeri ve alıkonma zamanını ifade eden (t_R) değerleridir ve veri bankaları LC/MS spektrumları, metabolitlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri, etkin oldukları yollar, metabolit bilgileri gibi metabolitler hakkında ihtiyaç duyulan bilgileri sağlarlar.

Metabolomik çalışmalarda hedef analitlerin çalışmanın sonunda belirlenmesi, nitel analiz tanımlamalarında da kendine özgü yaklaşımlar ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Metabolomik standartları girişimi metabolomikte nitel analiz için 4 farklı seviye belirlemiştir (122). Seviye 4 en düşük tanımlama seviyesi, seviye 1 ise en yüksek tanımlama seviyesi olarak belirtilmiştir. Seviye 4, kütlesi bilinen ama tanımlanmamış pikleri, seviye 3, kütlesi ve izotop dağılımı kullanılarak veri bankalarındaki eşleşmeleri (putative identification), seviye 2, kütlesi, izotop dağılımı ve bir diğer kimyasal parametrenin (pikin alıkonma zamanı veya parçalanma ürünü eşleşmesi) bir referans veri bankası ile eşleşmesi, seviye 1 ise kütlesi, izotop dağılımı ve bir diğer kimyasal parametrenin (örneğin alıkonma zamanı veya parçalanma iyonu eşleşmesi), aynı

laboratuvarında aynı deneysel koşullar altında yapılan referans standart ile eşleşmesi şeklinde sınıflandırmışlardır. Avrupa ilaç ajansı, 2002/657/EC numaralı komisyon kararında biyobelirteç değerlendirmelerinde seviye 1 tanımlamayı şart koşmaktadır. Metabolitlerin referans standartları olmaması durumunda seviye 2 tanımlama kabul edilebilir duruma gelebilmektedir. Fiehn ve ark. 1000 Da'dan büyük ağırlıklı moleküllerde kütle dedektöründe 1 ppm'lik bir sapmanın bile yanlış sonuç verebileceğini göstermiştir (123). Kodra ve ark. metabolomik çalışmaların sadece %20'sinde seviye 1 tanımlama yapıldığını bildirmişlerdir (124). Evans ve ark. metabolomik çalışan laboratuvarların sadece %32'sinde referans standartlar kullanıldığını yayınlamıştır (125). İki boyutlu sıvı kromatografisi (2D) veya iyon mobilite verileri tanımlamada seçiciliği arttırmak için kullanılabilir. MS/MS verilerini MassBank, HMDB, Metlin gibi veri bankaları ile karşılaştırarak 2. seviye tanımlama elde edilebilmektedir. Metabolit tanımlama işleminde laboratuvarında kullanılan kalite kontrol örnekleri uzun vadeli olarak tanımlama performansını takip etmede kullanılabilir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometreleri (HRMS) kullanılarak daha fazla sayıda metabolit piki taranıp daha çok tanımlama ihtimali ortaya çıkabilir. İzotop işaretli standartlar, hem metabolit tanımlamada hem de metabolik aktiviteyi takip etmede kullanılabilir. Çalışma sonunda önemli görülen pikler, daha yüksek seviye tanımlama için tekrar analiz edilebilir ve dataya bağlı yöntemler tercih edilebilir (126). Nitel analiz çalışmalarında iyon kaynağında parçalanma, dimerleşme, farklı adduct'ların oluşması ihtimalleri göz ardı edilmemelidir. Metabolit kütüphaneleri kullanılırken sentetik veya örnek metabolizmasında olmayan metabolitlerin eşleşmeleri sıklıkla karşılaşılan bir başka hatadır (127). Araştırmacılar sonuçları değerlendirirken metabolitleri örneklerle ilişkilendirebilmelidir. Yolak analizleri metabolit aktivitesini göstermekle beraber bilinmeyen piklerin tanımlanmasında da kullanılabilir. Mummichog ve PIUMet yaklaşımları, yolaklardan yola çıkarak metabolit tanımlanması amacıyla geliştirilmiş yaklaşımların ikisidir (128, 129). İyon mobilite MS sistemler, m/z ve t_R değerlerine ek olarak sağladığı çaprazlama çarpışma kesitleri CSS değerleri özellikle izomerik yapılarda metabolit tanımlamada kullanılan ek bir veridir. İyon kaynağında

parçalanma(In-silico fragmentation) kütlelerini metabolit tanımlamada kullanmak üzere geliştirilen veribankaları vardır. Benzer kromatografik koşullardan yola çıkarak metabolitlerin alıkonma zamanlarını tahmin etmeye yönelik algoritmalar geliştirilmiştir.

Tüm bu işlemlerin ardından istatistiksel olarak güvenilir, analitik açıdan anlamlı görünen bir pik, hiç bir metabolitle aday olarak bile eşleşemeyebilir. Bu pikler araştırmacılar tarafından “bilinmeyen bilinmeyenler” olarak sınıflandırılır ve etiketlenirler. Metabolomik çalışmalar sayesinde binlerce sayıda metabolit ilk defa tanımlanmış ve adlandırılmış konumdadır.

Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Yazılımlar

Bir pikin hangi metabolite ait olduğunu belirlemek, o pikin pik şiddetini hesaplamak, bütün numunelerde eşleştirmek ve bu işlemi onbinlerce kere tekrarlamak bir araştırmacının yapabileceklerinin ötesinde bir işlemdir. Kullanılan cihaza ve yöntemle bağlı olarak bir metabolomik çalışmadan örnek başına 1-2 gb boyutunda veriler çıkabilir. Bu sebepler metabolomik veri işleme basamaklarında yardımcı yazılımların kullanılmasına sebep olur.

Metabolomik çalışmalarda yazılımlar ilk basamakta piklerin belirlenmesi işlemini gerçekleştirirler. Bu aşamada örneklerdeki her MS taramasındaki pikler teker teker ayrılırlar ve her pik m/z ve t_R değerlerine göre isimlendirilerek belirlenirler. Pikler izotop dağılımları, adduct oluşumları, farklı yük değerleri ve fragmentlerine göre ayrıca taranır ve bu yöntemler için geliştirilen istatistik yaklaşımlar uyarınca aynı pik altında toplanırlar (130, 131). Pik belirleme basamağının diğer işlemi ise belirlenen değere göre gürültü piklerinin filtre edilerek verilerden atılmasıdır. Tespit edilen her pik, 0.1 m/z değerinde parçalara ayrılır ve pik şeklinin normal dağılıma uygunluğu yazılım tarafından kontrol edilir. Bu her parçanın S/G oranı belirlenerek değerlendirilmeye alınır. Gürültü piklerinin eşik değeri QC örnekleri kullanılarak belirlenebilir. Belirlenen pikler tüm örneklerde belirlenen m/z ve t_R sapma değerleri çerçevesinde eşleştirilir ve gruplanır.

Metabolomik yazılımlar piklerin belirlenmesi, eşleştirilmesi, pik alanlarının hesaplanması, metabolit tanımlama gibi temel veri işleme fonksiyonlarının yanı sıra, istatistiksel analizler, yolak analizleri ve görselleştirilmesi, yolak zenginleştirme analizleri, multi-omik veri analizi gibi ek veri işleme seçenekleri de sunabilirler. MzMine, XCMS ve MS-DIAL yazılımları hedeflenmemiş analizlerde en sıklıkla kullanılan, farklı metabolomik çalışma gruplarının geliştirdiği yazılımlardır (132-134). XCMS, ham MS verilerini işlemek için yaygın olarak kullanılan bir R paketi ve yazılım aracıdır. Özellikle LC/MS ve GC/MS verileri için uygundur. XCMS, pik tanımlama, pik hizalama ve pik entegrasyonu gibi görevleri gerçekleştirir. MzMine, açık kaynaklı bir yazılım platformudur ve kütle spektrometri verilerinin işlenmesi ve analiz edilmesi için kullanılır. Kullanıcı dostu bir arayüze sahip olan MZmine, pik algılama, pik hizalama, normalizasyon ve veri görselleştirme gibi birçok özellik sunar. Hem LC/MS hem de GC/MS verileri ile uyumludur. Ayrıca gelişen bilimsel ve teknolojik yöntemlerin çerçevesinde, yapay zeka ve makine öğrenme destekli algoritmalar metabolomik çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Makine öğrenmesi yöntemleri, örnek veriden matematiksel modellemeler ortaya çıkararak, bu modelin diğer verilere uygulanabilmesini sağlar (118).

Metabolomik Yolak Analizleri

Yolak analizleri metabolomik verilerinden yola çıkarak, metabolizmaya metabolitlerin tekil etkileri dışında, ortak etkileri üzerinden de değerlendirme imkanı sunar. Bir metabolitin miktarındaki değişim, onun etkileşim halinde olduğu diğer metabolitler, proteinler ve genlerle de ilişkilidir. Metabolomik yolak analizleri, metabolitlerin yol açtıkları değişimin metabolizmada etkilediği biyolojik yolları incelemeyi sağlar. Bu sayede etkilenen metabolitlerin metabolik haritalanması ve gösteriminin yanı sıra, istatistiksel yaklaşımlar sayesinde hangi yolağın ne kadar etkilendiği de incelenebilir.

Metabolomik yolak analizlerinde KeGG, HMDB gibi metabolit veri bankaları aracılığıyla metabolit yolak zenginleştirme analizleri (MSEA), gen metabolit etkileşimleri (GSEA) ve yolak temsiliyet analizleri (ORA) gibi biyoinformatik

yaklaşımlar kullanılır (129). Veribankaları üzerinden yollarla eşleştirilen metabolitler görselleştirilir, birbirleri ile ilişkilendirilir, metabolitlerin değişimleri kullanılarak yolların etkinlik değerleri hesaplanır. Bu yaklaşımlarla metabolitlerin kimyasal sınıflandırılmaları, hangi doku veya organda bulundukları ve toplamda fenotip üzerindeki etkileri hesaplanabilir (135).

Yolak analizleri bütüncül bir bakış açısı sayesinde metabolitlerin işlevleri, hastalıkların moleküler mekanizmasının anlaşılması, ilaç hedeflerinin belirlenmesi gibi bir çok amaçla kullanılabilir. Metabolitlerin farklılaşması diğer biyokimyasal süreçlerle beraber rol aldıkları biyolojik yolların da daha aktif olduğuna işaret eder. Shao, F. ve ark. hipotiroid hastalarında steroid hormon biyosentezi, safra asiti sentezi, lizin yıkım yolağı ve purin metabolizmasında değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (136). Bir diğer çalışmada diyabetik retinopati hastalarında yapılan bir çalışmada arginin biyosentezi, glutamin ve glutamat metabolizmalarının etkilendiğı gösterilmiştir (137). Metabolomik yolak analizleri ilaç etken maddelerinin metabolizmada ne gibi değişikliklere sebep olduğunu takip etmek amacıyla da kullanılabilir.

2.3.5. Metabolomik Çalışmalarda Hata Kaynakları

1947 yılında William P. Belk ve F. William Sunderman tarafından yayınlanan "A Survey of the Accuracy of Chemical Analyses in Clinical Laboratories" başlıklı makale ile başlayan süreçle beraber araştırmacılar biyomolekül ölçümlerinde hata miktarlarını ve olası yaygın hata kaynaklarını araştırmaya başladılar (138). Bu tarihten itibaren analitik ölçümlerde olası hata kaynakları ve varyasyonların etkisini azaltmak amacıyla bir çok farklı yaklaşım geliştirilmiştir. Bir metabolomik çalışmanın hedefine ulaşabilmesi güvenilir bir analitik verinin elde edilebilmesine doğrudan bağlıdır. Fenotipin ve metabolomun dış etkenlerden doğrudan etkileniyor oluşu, özellikle biyolojik numunelerde doğal bir varyasyon kaynağı olarak ortaya çıkar. Roger J. Williams ve ark. yukarıda da sözünü ettiğimiz çalışmasında oluşan farklılığın ilk olarak hastalıktan değil hastane yemeklerinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir (139). Yine örnek toplama, örnek hazırlama, analitik varyasyonlar, cihaz kaynaklı varyasyonlar,

ölçüm belirsizlikleri, veri işleme basmağında yapılan işlemlerin hepsi birer varyasyon kaynağıdır ve sonuçlar üzerinde ufak ya da büyük etkileri olurlar. Metabolomik çalışmalar uzun vadeli zaman süreçlerine yayılabilir, bazı durumlarda çalışma yıllar sürebilir. Yine çok merkezli çalışmaların birden farklı cihazla yürütölmesi söz konusu olabilir. Çalışma tek merkezde yürütölüyor olsa dahi, kullanılan kimyasallarda, laboratuvar malzemelerinde zaman içinde farklılıklar oluşabilir. Analitik cihazların performansı ve hassasiyeti analitik yöntem kadar, cihazın mekanik ve dijital donanımındaki performansına da bağılıdır ve değışkenlik gösterebilir. Bütün bu durumların hepsi birer varyasyon kaynağıdır ve çeşitli analitik ya da istatistiksel yaklaşımlarla üstesinden gelinmeye çalışılır.

Ön Analitik İşlemlerden Kaynaklı Hatalar

Herhangi bir bilimsel çıktının geçerliliğı onun tekrar edilebilirliğı ve tekrar üretilebilirliğı ile ölçölür. Bu tekrar edilebilirlik, ilk basamak olarak, yayınlanan çalışmanın örneklem oluşturma ve örnek toplama basamağının yeterli tanımını gerektirir. In vitro çalışmalarda, deneysel koşullar ve kullanılan kimyasallar yeterli seviyede açıklanmalıdır. Klinik çalışmalarda toplanan örneklerde biyolojik varyasyona sebep olabilecek dış etkiler belirtilmelidir. Ön analitik işlemler, örneklerin toplanması, saklanması ve transfer koşullarıdır ve örneklerin nasıl elde edildiğı, hangi koşullarda saklandığı belirtilmelidir. Uzun süreli ya da birden fazla merkezde yürütölün çalışmalarda olası varyasyon kaynakları belirtilmelidir. Numune saklama kapları türlerine hatta markalarına göre bile sonuçlar üzerinde değışiklik gösterebilir. Kan tüplerinde bulunan EDTA gibi anticoagulantlar, plastik malzemedenden gelen polimerik kalıntılar varyasyona sebep olabilir (140, 141).

Klinik çalışmalarda, örneğın hastane koşullarında toplanan numunelerin toplanma ve saklanma koşulları farklılık gösterebilir. Hemolize örnekler dışlanmalı, kan örnekleri aynı koşullarda sentrifröl edilmelidir. Donma-çözölme döngüsünden örnekler korunmalıdır. Metabolomik çalışmalarda genellikle örneklerin laboratuvara gelene kadar olan kısmına araştırmacının dahil olmadığını ve hataların önemli bir kısmının bu sırada ortaya çıktığını unutmamak gerekir (142).

Bir çok metabolitin -80°C 'de stabil olduğu düşünölmekle beraber, bir kaç dakikada bozunabilen molekülölerden, aylarca stabil kalan molekülölere kadar farklılık gösterebilirler. Pinto ve ark. dört donma çözünme döngüsü sonrası L-karnitin, alanin, glukoz, aseton ve bazı lipid türlerinde anlamlı değışimler meydana geldiğini bildirmiştir (143). Aynı çalışmada toplam bilirubin ve ürik asit miktarının tek donma çözünme döngüsünde dahi değıştiğı gösterilmiştir. Buna karşılık Comstock ve ark. kolesterol ve bazı hormonların birçok donma çözünme döngüsünden etkilenmediğini göstermiştir (144). Donma çözünme döngüsüne uğratmamak için numuneler küçük hacimli porsiyonlar halinde saklanabilirler.

Hayvan deneylerinde minimum sayıda hayvan kullanılmalıdır. Kontrol ve çalışma gruplarından örnekler çapraz validasyon için ayrıca gruplandırılabilir. Hücre hattı örnekleri, sıkı laboratuvar koşullarında hazırlanan ve aynı kaynaktan gelen örnekler olduğı için varyasyonu daha düşüktür. Gerçek biyolojik varyasyon, hücre hattı örnek varyasyonuna göre daha fazla olması, in-vivo koşullarda elde edilen sonuçların klinik çalışmaları desteklenmesi gerekliliğini doğurur. Ancak in-vivo koşullar doğrudan etkinin sonuçlara yansıyabilmesi sebebiyle, klinik çalışmalarda varyasyondan kaynaklı olarak gözden kaçabilecek etkilerin görünür olmasını da sağlayabilir.

Örnek Tekrarlılığı ve Rastgeleliliğı

Metabolomik çalışmalarda biyolojik örnek tekrarı ve analitik örnek tekrarı ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Analitik tekrar aynı örneğin aynı numune hazırlama ve analiz koşullarıyla tekrar analizini ifade ederken, biyolojik tekrar ise aynı kaynaktan gelen ve aynı koşullarda analiz edilen farklı örneğı ifade eder. Analitik tekrar numunesi sayesinde örnek hazırlama veya cihaz performansı tekrarlanabilirliği takip edilebilir ve bu basamaklardan kaynaklı yanıltıcı pozitif veya negatif sonuçlar önlenabilir. Biyolojik tekrar numunesi ise, biyokimyasal aktivitenin tekrarlı ölçümlerde tekrar gösterilebilmesinin yoludur. Bu anlamda kontrol veya çalışma grubunun kaç örnekten oluşacağını istatistiksel olarak göz önünde bulundurmak gerekir.

Metabolomik çalışmalar genellikle örnek sayısı fazla çalışmalardır. Bazı durumlarda tüm örnekleri aynı anda hazırlamak mümkün olmayabilir. Ayrıca LC/MS analizlerinde ilk numune enjeksiyonu ile son enjeksiyon arasında günler belki haftalar söz konusu olabilir. Belirli bir sırada, örneğin bir çalışma grubunu en başta diğer çalışma grubunu en sonda analiz etmek, bu bekleme süresinden kaynaklı olarak bir trende ya da varyasyona sebep olabilir. Bu durum göz önüne alınarak tüm örneklem karışık bir sırada hazırlanmalı ve analiz edilmelidir. Kalite kontrol numuneleri aracılığı ile analiz blokları arasındaki varyasyonlar takip edilmeli ve gerekirse istatistiksel düzeltmelere gidilmelidir. Olası taşınma veya bulaşma etkilerini gidermek için ekstraksiyon kör çözeltisi kullanılmalıdır. Ekstraksiyon kör çözeltileri numune içermeyen kör çözeltilerdir ve hazırlanan her örnek bloğu için ayrı olarak hazırlanır.

Kütle spektrometrelerinde pikten alınan sinyalin metabolit derişimine oranı örneğin kendisine, ekstraksiyon verimine, matrise, metabolitin iyonlaşma etkinliğine, kullanılan kromatografik yöntemle bağlı olarak değişebilir. Aynı yöntemle hazırlanmış ve analiz edilmiş örneklerin birbirlerine oranı, yarı kantitatif sonuç olarak metabolomik çalışmalarda en çok kullanılan sonuç biçimidir. Yarı – kantitatif sonucun doğruluğu metabolitin cihazdan alınan sinyalinin derişimle beraber doğrusal olarak değişmesine bağlıdır. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda aynı anda binlere ulaşan sayıda metabolitin ölçülmesi söz konusu olduğundan pratikte çok mümkün gözükmemekle beraber, araştırmacının en azından anlamlı olarak farklılaşan metabolitlerin uygulanan deneysel koşullarda pik şiddetlerinin derişime bağlı olarak doğrusal şekilde değiştiğini gösterebilmesi, yöntemin doğruluğunu arttırır (145, 146).

Enstrümental Analiz Basamağında Olası Hata Kaynakları

Enstrümental analiz çalışmaları sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresinin kombine kullanıldığı çalışmalardır. Alıkonma zamanı, sıvı kromatografisinde analitin kolondan elue olana kadar geçen zamanı ifade eder ve pikin kromatografi kolonunda ne kadar tutunduğunun bir ölçüsüdür. Bu süre kolonun türü, boyu, iç çapı, tanecik büyüklüğü, kolon teknolojisi, hareketli fazın türü ve akış hızı, pH'sı, sıcaklığı, örneğin toplam derişimi, matrisi gibi sayısız parametreden etkilenir. Tüm değişkenler sabit

tutulsa dahi, kromatografi kolonunun kullanım ömrü içerisinde piklerin alıkonma zamanlarında kaymalar, pik şekillerinde bozulmalar gözlemlenebilir. Kromatografik koşullarda meydana gelen dalgalanmalar moleküllerin iyonlaşma verimi ve kütle tespitini de etkiler. Kütle dedektöründe meydana gelen varyasyonlar, düşük pik şiddetine sahip pikleri daha fazla etkiler (147). En hassas kütle spektrometrelerde dahi kütle dedektöründen kaynaklı bir ölçüm belirsizliği söz konusudur ve sonuçlar aralık (+/- ... ppm) olarak verilir (148).

Alıkonma zamanı kaymaları ve sinyal varyasyonları, kalite kontrol (QC) olarak adlandırılan, içeriği bilinen aynı örneğin belirli aralıklarla ölçülmesi ve bu örneklerdeki bileşenlerin alıkonma ve sinyal varyasyonlarının takip edilmesi ile cihaz performansını takip etmenin en yaygın yollarından birisidir (149-151). Bu amaçla ticari hazır karışımlar kullanılabilir ya da araştırmacı laboratuvar koşullarına göre yeni karışımlar hazırlayabilir. NIST SRM 1950 Amerika Ulusal Standartlar Enstitüsü tarafından piyasaya sürülen referans insan plazması olarak metabolomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bir çok metabolomik araştırmacısı uzun zamanlı cihaz ve yöntem performansını takip etmede kalite kontrol örneği olarak NIST plazmasını kullanmaktadır (152). Kullanılan QC örneği, çalışmanın başında diğer tüm örneklerle aynı işlem basamaklarından geçirilir ve aynı yöntemle yapılmış diğer analiz sonuçlarıyla karşılaştırılabilir (153).

Analizler, örnek sayısına bağlı olarak bir kaç gün ya da haftaları bulacak bir zaman aralığında gerçekleştirilebilir. Numune hazırlama ve cihaz analiz basamakları parça parça bölünerek yapılabilir. Bu durumda her analiz bloğu (batch) arasındaki olası varyasyonun da takip edilmesi gerekir. Tüm örnekleme yansıtan bir karışım (pool) örneği hazırlanır ve analiz blokları arasındaki farklılık bu örnekler üzerinden takip edilir.

Bu başlıca hata kaynağı iki durumda da varyasyonun büyüklüğüne bağlı olarak deneyin tekrarlanması ya da istatistiksel düzeltmeler yapılması söz konusu olabilir (154). San-Yuan Wang ve arkadaşları kalite kontrol numuneleri arasındaki bağlı standart sapma değerlerinden yola çıkarak farklı analiz blokları arasındaki varyasyon

için istatistiksel düzeltme yöntemi geliştirmiştir (155). Temel bileşenler analizi (PCA) kullanılarak da QC örneklerin tekrarlanabilirlikleri takip edilebilir. QC veya havuz örnekler seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanarak metabolitlerin doğrusallık aralığının takip edilmesinde kullanılabilir.

Veri Değerlendirme Basamağında Hata Kaynakları

Metabolomik verilerinde cihazdan alınan ham veriler, çalışmaya ve kullanılan yazılımlara bağlı olarak birden fazla dosya dönüştürme işlemine maruz kalabilir. Cihazlardan alınan veriler, markaya ve modele göre değişiklik gösterir ve bu dönüşümler sırasında veri kaybı olabileceği unutulmamalıdır. Onbinlerce sayıda pikin tespiti, pik dekonvolüsyonu, pik alanının hesaplanması ve örnekler arasında eşleştirme işlemleri ayrı ayrı istatistik yöntemlerdir ve farklılık gösterebilirler (156). Veri değerlendirme basamağında meydana gelebilecek olası bir hata da ölçülemeyen değerlerdir. Sonuçlarda bazı pikler bazı örneklerde sıfır pik şiddetinde görülmektedir. Bu durum o pikin o örnekte gerçekten olmaması sebebiyle olabileceği gibi, iyon baskılama, düşük pik şiddeti veya informatik yöntemdeki bir sorundan kaynaklı olabilir (147).

LC/MS temelli çalışmalarda kütle ayırıcılığının artması doğal izotop piklerinin verilere dahil olması sonucunu doğurur. Örnek olarak metabolitin C_{13} izotopları sabit kütle farkları ile farklı pikler olarak sonuçlara yansıyabilir. İyon kaynağında çözücülerden kaynaklı olarak $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ ve daha bir çok adduct formu oluşabilir. Metabolitler iyon kaynağında dimerleşebilirler veya parçalanıp fragment pikleri oluşturabilirler. Bu pikler sonuçlara farklı metabolit pikleri gibi yansıyabilirler. İzotop pikleri geliştirilen çeşitli istatistiksel yaklaşımlarla veri değerlendirme basamağında tespit edilebilir (131, 157). Farklı adductlar, homolog seriler ve dimerleşmeler, m/z değerlerinden yola çıkarak tespit edilebilir ve ana metabolit pikleriyle beraber tek bir pik haline getirilebilir (158, 159). Metabolitlerin kimyasal özelliklerinde farklılıklar sonucu aynı sayıdaki iki metabolit farklı pik şiddetleri verebilirler. Bu durum metabolitlerin doğrusallık aralığının değişmesine sebep olabilir. Metabolit profillemeye çalışmalarında derişim yerine bağıl derişim değerleri

kullanılır ve ölçülen pik şiddetleri doğrusallık aralığının dışında kalan bir değerse değişim oranları olduğundan fazla veya daha az (hatalı pozitif/negatif) değerler olarak karşımıza çıkabilir.

Metabolomik çalışmalar geniş zamanlara yayılabilir. Bu süre zarfında piklerin alıkonma zamanlarında farklılıklar meydana gelebilir. Kütle dedektörünün hata payı artabilir veya azabilir. Bu durum pik eşleştirme işlemlerinde aynı pikin farklı pikler gibi görünmesine sebep olabilir. Veri işleme basamağında kullanılan yazılımlar pik eşleştirme işleminde kütle ve alıkonma zamanları için aralıklar belirler. Bu aralıkların çalışma koşullarında optimize edilmesi gerekir. Aralıklar çok geniş tutulursa farklı pikler tek bir pik gibi görünebilir, çok dar tutulursa aynı pik farklı pikler gibi sonuçlara yansıyabilir (160).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

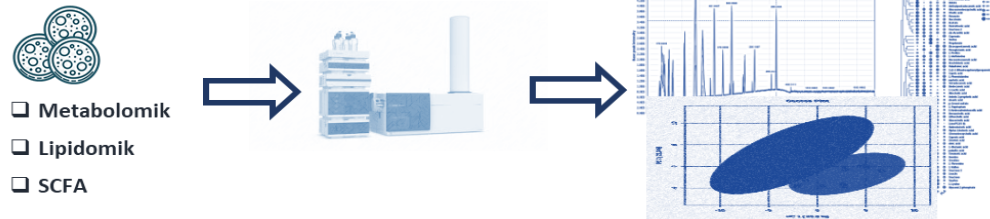
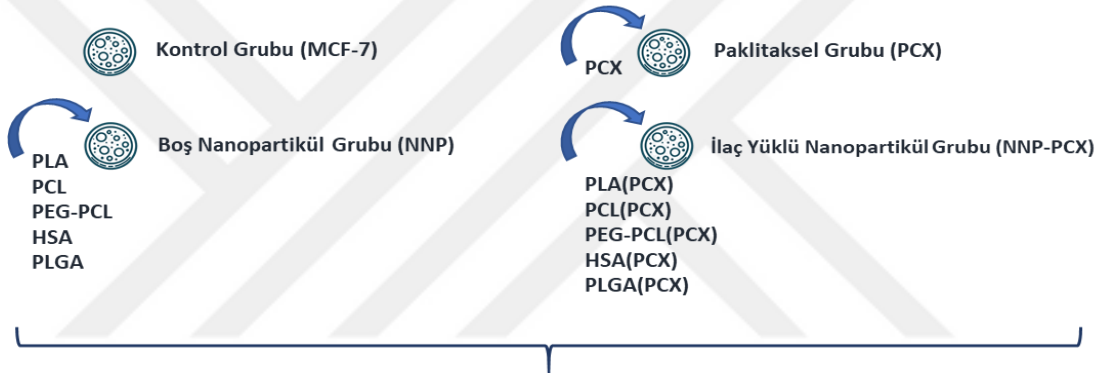
MCF-7 Hücre Hattı Örneklerinde Liziz Yöntemlerinin Karşılaştırılması



Veri İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması



MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar



Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar kapsamında (şekil3.1.) ilk olarak hücrelerden optimum sayıda metabolit elde etmek amacıyla fiziksel ve kimyasal parçalama yöntemleri kullanılarak iki farklı liziz tekniği karşılaştırılmıştır. Çalışmaların ikinci kısmında metabolomik veri işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla iki farklı veri işleme yöntemi karşılaştırılmıştır. Tez çalışmalarının son aşaması beş farklı ilaç taşıyıcı nanopartikülün yalın ve paklitaksel yüklenmiş hallerinin MCF-7 kanser hücre hattındaki etkileri metabolomik, lipidomik ve SCFA yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

3.1. Hücre Lizisi Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Hücre modellerinde iki farklı lizis yöntemi karşılaştırılarak sonuçlar karşılaştırıldı. Bu amaçla MCF-7 (ATCC® HTB-22™, ABD) kanser hücre hattı modeli kullanıldı. Hücre hattı örnekleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD.'nda Prof. Dr. Ayşe Ercan tarafından hazırlandı. Hücreler "Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)" ortamında 4.5 g/L glukoz, %1 penisilin (10,000 U/mL), %1 L-glutamin (200 mM), %10 HI-FBS kullanılarak 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ altında hazırlandı. Örnekler ultrasantifrüz kartuşu kullanılarak ekstre edildi. Analizlerde Agilent 6530 LC/MS Q-TOF cihazı Waters XSelect C18 3.5 µM, 100 × 4.6 mm kolonla beraber kullanıldı. Hareketli faz olarak ikisi de %0.1 formik asit içeren asetonitril ce su kullanıldı. (161).

3.1.1. Kimyasal Parçalama

Hücre büyümesi 5×10^7 sayısına ulaşınca hücreler PBS (Fisher Scientific, ABD) ile iki defa yıkandı. 3 mL %0.25 Trypsin-EDTA (Fisher Scientific, ABD) hücrelere eklendi. Hücreler 250 g' de 5 dakika sanifrüjlendi ve hücre pelletleri soğuk PBS'le yıkandı. 250 g 'de 1 saat daha sanifrüjlenen hücrelere, %4 NP-40 ve %3 Tween 20 (Sigma-Aldrich, ABD) içeren 1 mL proteaz inhibitör karışımı eklendi. Her 5 dakikada bir vorteksenerek 20 dk. buzda bekletildikten sonra homojenize edildi. Hücreler 14.000 g'de 4°C'de 20dk. sanifrüjlendi ve -80°C'de saklandı.

3.1.2. Fiziksel Parçalama

Hücre büyümesi 5×10^7 sayısına ulaşınca hücreler PBS (Fisher Scientific, ABD) ile iki defa yıkandı. 3 mL %0.25 Trypsin-EDTA (Fisher Scientific, ABD) hücrelere eklendi. Hücreler 250 g' de 5 dakika sanifrüjlendi ve hücre pelletleri soğuk PBS'le yıkandı. 250 g 'de 1 saat daha sanifrüjlenen hücrelere 1 mL proteaz inhibitör karışımı eklendi. Her 5 dakikada bir vorteksenerek 20 dk. buzda bekletildikten sonra

homojenize edildi. Hücreler 14.000 g'de 4°C'de 20dk. santifrüjlendi ve -80°C'de saklandı.

3.2. Veri İşleme Yöntemi Denemeleri

Veri işleme yöntemlerinin karşılaştırılması ve optimizasyonu amacıyla ektopik gebelik hastalığında metabolomik çalışmalar yapılarak iki farklı veri işleme yaklaşımı karşılaştırıldı. 80 plazma örneği kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 200 µL plazma örneği 600 µL soğuk MeOH ile çöktürüldü. Örnekler 9000 dev/dk'da +4°C'de santifrüj edildi. 300 µL santifugrat alındı ve +4 °C'de vakum altında kurutuldu. Numuneler 300 µL asetonitril:su 1:1 (v/v) karışımında çözöldü. Kütle spektrometre analizlerinde Agilent 6530 LC/MS Q-TOF (Agilent Technologies, 184 Santa Clara, CA) kullanıldı. Cihaz pozitif modda 100-1700 m/z aralığında çalıştırıldı. Kolon sıcaklığı 35 °C kurutucu gaz sıcaklığı 350 °C olarak ayarlandı. Kromatografik yöntemde C18 ters faz kromatografi kolonu (Agilent Zorbax 1.8 µM, 100 × 2.1 mm) kullanıldı. Akış hızı olarak 0.200 mL/dk belirlendi ve ikisi de %0.1 formik asit içeren asetonitril ve su kullanıldı. Yöntem %90 su ile başlayıp 10. dk'da %10 suya düşerek daha sonra tekrar başlangıç koşullarına dönecek şekilde ayarlandı. Örnekler havuz, kalite kontrol ve ekstraksiyon kör numuneleriyle birlikte enjekte edildi.

3.2.1. Ardışık seyreltme ve "Putative" Nitel Analiz

Havuz örnekler 6 farklı derişimde olacak şekilde (1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,1:6)(h/h) oranlarında harektli faz ile seyreltildi. Enjeksiyonlar sırasında her 6 enjeksiyonda bir kör çözelti, kalite kontrol ve havuz örnekler enjekte edildi. Veri işleme kısmında piklerin belirlenmesi, eşleştirilmesi ve gruplanması amacıyla XCMS yazılımı kullanıldı. Bu işlemlerde kullanılacak parametreler "Isotopolugue Parameter Optimization (IPO)" yazılımı ile blirlendi. Alınan pik listesinde seyreltme faktörüne göre R<0.90 olan pikler filtrelendi. Kalan pikler örnek ortalamasına göre normalize edildi. Değişim oranları ve t-test sonuçları belirlendi. Pik listesinin MetaboAnalyst yazılımı ile PCA, PLS-DA grafikleri çıkarıldı ve putative nitel analizleri yapıldı. Gruplar arasında değişen

pikler için $FC > 1.5$ ve $p < 0.05$ değerleri eşik değer olarak belirlendi. Putative nitel analiz için ± 5 ppm sapmada eşleştirme yapıldı.

3.2.2. Ekstraksiyon Kör Çözeltileri ve Kütüphane Destekli Nitel Analiz

Piklerin belirlenmesi, eşleştirilmesi ve gruplanması amacıyla MzMine yazılımı kullanıldı. Kullanılacak parametreler yazılımla optimize edildi. Alınan pik listesinde kör çözeltileri kullanılarak sinyal/gürültü oranı 3'ten küçük olan pikler filtrelendi. Havuz örneklerin bağıl standart sapma değerleri hesaplanarak %30'un üstünde olanlar filtrelendi. Kalan pikler örnek ortalamasına göre normalize edildi. Değişim oranları ve t-test sonuçları belirlendi. Pik listesinin MetaboAnalyst yazılımı ile PCA, PLS-DA grafikleri çıkarıldı ve putative nitel analizleri yapıldı. Gruplar arasında değişen pikler için $FC > 1.5$ ve $p < 0.05$ değerleri eşik değer olarak belirlendi. Kütüphane destekli nitel analiz işlemi için 399 adet endojen metabolitin alıkonma zamanları ve kütleleri kullanıldı. Kütüphane taramasında ± 0.1 dk alıkonma zamanı ve ± 3 ppm kütle aralığında eşleştirme yapıldı.

3.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar

Bu bölümde MCF-7 kanser hücre hatları üzerinde nanopartiküllerin etkisi incelemek amacıyla metabolomik çalışmalar yapılmıştır. MCF-7 hücre hatlarının hazırlanması ve nano ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre hatlarına uygulanması çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AbD.'nda Prof. Dr. Erem Bilensoy ve Dr. Cem Varan tarafından gerçekleştirildi. Nanopartiküller nano çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır ve önceki çalışmalarda kullanılan paklitaksel'in IC50 dozu (162) dikkate alınarak eşit miktarda PCX içeren (250 nM) ilaç yüklü ve ilaç yüklü nanopartiküllerle aynı miktarda polimer içeren boş nanopartiküller DMEM ile seyreltilerek hücreler üzerine eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir.

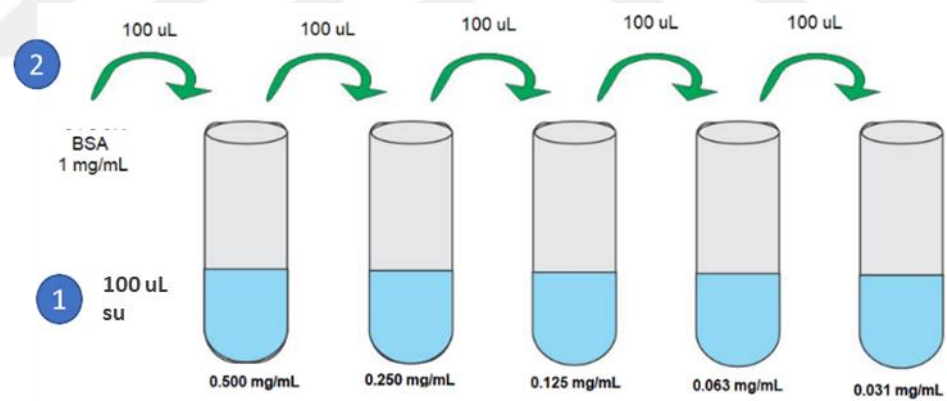
Çalışmalar sırasında kontrol grubu MCF-7 hücre hatlarından, PCX grubu paklitaksel tatbik edilmiş hücre hatlarından, NNP grubu PCL, PEG-PCL, PLGA, HSA ve PLA nanopartiküllerinin ilaç yüksüz halde hücre hatlarına tatbik edilmiş örneklerden, NNP-PCX grubu ise paklitaksel yüklenmiş nanopartiküllerden oluşturulmuştur.

Çalışmanın devamı İsveç Örebro Üniversitesi Metabolomik Araştırmalar Laboratuvarında sürdürülmüştür.

3.3.1. Örnek Hazırlama Çalışmaları

Protein Miktar Tayini

Hazırlanan hücre hatlarında toplam protein miktarını belirlemek amacıyla “Bio-Rad Protein Assay” kiti kullanıldı. Yöntemde referans olarak sığır serum albümin (BSA) çözeltisi kullanıldı. Stok çözelti kullanılarak sırasıyla 1.000 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.063 mg/mL ve 0.031 mg/mL derişimli çözeltiler hazırlandı. Boyar madde stok çözeltisi deiyonize su kullanılarak 1:4 (h/h) oranında seyreltilti. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinden ve örneklerden 10 µL alınıp ayrı ayrı mikropate’e aktarıldı ve üzerine 200 µL boyar madde eklenerek karıştırıcıda 15 dk. inkübe edildi. Devamında ölçümler 595 nm dalgaboyunda gerçekleştirildi ve absorbans değerleri kaydedildi.



Şekil 3.2. Protein miktar tayininde kullanılan yöntem

Metabolomik

Örneklerde metabolit ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla Tablo 3.1.’de verilen iç standartlar ayrı ayrı tartıldı ve 1 mg/mL (1000 ppm) derişiminde stok çözeltiler %0.1 formik asit içeren asetronitril çözeltilisinde hazırlandı. Daha sonra son

derişimleri tabloda belirtildiği kadar olacak şekilde 100 mL ekstraksiyon çözeltisi hazırlandı. Ekstraksiyon çözeltisi deneysel aşamaya gelene kadar -20 °C’de saklandı.

Ekstraksiyon çözeltisi hazırlandıktan sonra hücre hattı örnekleri üzerine 150 µL %0.9 NaCl çözeltisi eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslendi ve 5 dk. ultrasonik banyoda bekletildi. Bu örneklerden 80 µL alınarak yeni tüplere aktarıldı. Örneklerle 180 µL iç standartları içeren ekstraksiyon çözeltisi eklendi. Örnekler 30 sn. vortekslendi ve 3 dk. ultrasonik banyoda tutuldu. Daha sonra örnekler 10.000 dev/dk.’da 5 dk. santifrüj edildi. Her örnekten 180 µL alınarak viallere aktarıldı. Bu sırada hazırlanan her önekten 40 µL alınarak aynı vial koyuldu ve ayrı bir havuz (pool) örnek hazırlandı. Örneklerle paralel olarak, kalite kontrol (qc) örnekleri, NIST standart plazma örnekleri ve ekstraksiyon kör çözeltileri aynı yöntemle hazırlandı. Örneklerin +4 °C’de vakum santifrüjde çözücüsü uzaklaştırıldı ve 40 µL MeOH:H₂O (70:30, h/h) şözeltisinde tekrar çözüldü. Enjeksiyon gününe kadar örnekler -80 °C’de saklandı.

Tablo 3.1. Metabolomik çalışmalarda kullanılan iç standartlar ve derişimleri.

Metabolit	Derişim (ppm)
Heptadekanoik asit -C ₁₄	2.5
Indole-3-asetik asit-d ₃	3
Valin-d ₈	3
Triptofan-d ₅	3
Hekzanoik asit-d ₃	2.5
Glutamin-d ₅	2.5
TCA-d ₄	2.5
GUDCA-d ₄	2.5
GCA-d ₄	2.5
CA-d ₄	2.5
UDCA-d ₄	2.5
GCDCA-d ₄	2.5
CDCA-d ₄	2.5
GLCA-d ₄	2.5
LCA-d ₄	2.5

Lipidomik

Örneklerde lipid ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla Tablo 3.2. verilen iç standartlar ayrı ayrı tartıldı ve 1 mg/mL (1000 ppm) derişiminde CHCl_3 :MeOH (2:1, h/h) içinde çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra son derişimleri tabloda belirtildiği kadar olacak şekilde 100 mL ekstraksiyon çözeltisi hazırlandı. Ekstraksiyon çözeltisi deneysel aşamaya kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Hücre hattı örnekleri üzerine 150 μL %0.9 NaCl çözeltisi eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslandı ve 5 dk. ultrasonik banyoda bekletildi. Bu örneklerden 20 μL alınarak yeni tüplere aktarıldı. Örnekler 150 μL iç standartları içeren $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiş ekstraksiyon çözeltisi eklendi. Örnekler 30 sn. vortekslandı ve 30 dk. buz banyosunda bekletildi. Daha sonra örnekler 7.800 dev/dk.'da 5 dk. santifrüj edildi. Örneklerde oluşan 3 fazlı karışımdan, alt fazdan 60 μL alınarak viallere aktarıldı. Bu sırada hazırlanan her önekten 10 μL alınarak aynı vial koyuldu ve ayrı bir havuz örnek hazırlandı. Örnekler paralel olarak, QC örnekleri, NIST standart plazma örnekleri ve ekstraksiyon kör çözeltileri hazırlandı. Viallere 60 μL CHCl_3 :MeOH (2:1, h/h) eklendi ve enjeksiyon gününe kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Tablo 3.2. Lipidomik çalışmalarda kullanılan iç standartlar ve derişimleri.

Lipid	Derişim (ppm)
CE(d17:0)	2.5
Cer(d18:1/17:0)	2.5
LPC(d17:0)	2.5
PC(16:0/d30/18:1)	2.5
PC(17:0/d17:0)	2.5
PE(17:0/d17:0)	2.5
SM(d18:1/17:0)	2.5
TG(d15:0/15:0/15:0)	2.5
TG(d17:0/17:0/17:0)	2.5
TG(d19:0/19:0/19:0)	2.5

Kısa Zincirli Yağ Asitleri (SCFA), Enerji Metabolizması Metabolitleri (TCA) ve Diğer Organik Asitlerin (OA) Ekstraksiyonu ve Türevlendirilmesi

Örneklerde ekstraksiyonu gerçekleştirmek amacıyla Tablo 3.3.'de verilen iç standartlar stok çözeltilerinden alınarak son derişimleri tabloda belirtildiği kadar olacak şekilde 100 mL ekstraksiyon çözeltisi hazırlandı. Ekstraksiyon çözeltisi deneysel aşamaya kadar -20 °C'de saklandı.

Hücre hattı örnekleri üzerine 150 µL %0.9 NaCl çözeltisi eklendi. Örnekler 1 dk. vortekslendi ve 5 dk. ultrasonik banyoda bekletildi. Bu örneklerden 50 µL alınarak yeni tüplere aktarıldı. Örnekler 90 µL iç standartları içeren ekstraksiyon çözeltisi eklendi. Örnekler 30 sn. vortekslendi ve 3 dk. buz banyosunda bekletildi. Daha sonra örnekler 10.000 dev/dk.'da 5 dk. santifrüj edildi. Örneklerden 100 µL alınarak viallere aktarıldı. Bu sırada hazırlanan her önekten 10 µL alınarak aynı vial koyuldu ve ayrı bir havuz (pool) örnek hazırlandı. Örnekler paralel olarak, kalite kontrol (QC) örnekleri, NIST standart plazma örnekleri ve ekstraksiyon kör çözeltileri hazırlandı.

Türevlendirme basamağında kullanılmak üzere için 50 mM 3-NPH (3-Nitrofenilhidrazin), 50 mM EDC (N-(3-Dimetilaminopropil) -N'- etilkarbomid hidroklorik asit) ve %7 piridin çözeltisi H₂O: MeOH (3:7, h/h) içerisinde taze olarak ayrı ayrı hazırlandı. Örneklerin üzerine sırasıyla herbiri 50 µL olmak üzere 3-NPH, EDC ve piridin çözeltileri eklendi. Orbital karıştırıcıda oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi. Türevlendirme reaksiyonunu durdurmak için her örneğe 10 µL formik asit eklendi ve örnekler filtreden geçirilerek viallere alındı.

Tablo 3.3. SCFA, TCA ve OA çalışmalarında kullanılan iç standartlar ve derişimleri.

Metabolit	Derişim (ppm)
Asetat-d ₄	2
Bütrik asit-d ₈	2
Propanoat-d ₂	2
Hegzanoat-d ₃	1
Süksinat-d ₄	2

LC/MS Analizlerinde Uygulanan Metodoloji

Analizler Agilent (Santa Clara, Kaliforniya, ABD) firmasının 1290 Infinity II LC ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) ile kombineli 6545 iFunnel Q-TOF LC/MS uçuş zamanlı kütle spektrometresinde gerçekleştirildi. LC/MS her gün standart çözeltilerle kalibre edildi. Cihaz Agilent MassHunter B.10.1.48 yazılımı ile kontrol edildi.

Örnekler ilk önce enjeksiyon sıralamasından kaynaklı varyasyonu engellemek amacıyla karışık sıralı hale getirilip adlandırıldı. Analizler üç kör çözeltili enjeksiyonu, ekstraksiyon kör çözeltisi enjeksiyonu, QC örnekleri, NIST plazma örnekleri, havuz örnekleri ve numune örnekleri sırasıyla enjekte edildi. Her altı enjeksiyonda bir kör çözelti ve bir havuz örnek enjeksiyonu gerçekleştirildi. Analizlerde kromatografi kolonu olarak, Acquity UPLC BEH C18 2.1 mm x 100 mm, 1.7-µm (Waters Corporation) ters faz kromatografi kolonu ve aynı firmanın ön kolonu kullanıldı.

Metabolomik yönteminde hareketli faz olarak her ikisi de 2 mM NH₄Ac içeren H₂O:MeOH (7:3, h/h) ve MeOH kullanıldı. Akış hızı 0.4 ml/dk ve akış programı organik faz (B) başlangıçta %5, doğrusal artışla 0-1.5 dk. arasında %30, 1.5-4.5 dk. arasında %70, 4.5-7.5 dk. arasında %100, 7.5-13 arasında %100 ve 7 dk başlangıç koşullarına dönüş ve post-run şeklinde toplam her enjeksiyon 20 dk. olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlandı. Cihaz 75 - 3000 m/z değerleri tarama aralığında negatif

iyon modunda çalıştırıldı. Diğer parametreler, kapiler voltajı 4500 V, N₂ gazı basıncı 21 psi, akış hızı 11 L/dk ve sıcaklığı 379 °C olarak belirlendi.

Lipidomik yönteminde hareketli faz olarak her ikisi de 10 mM NH₄Ac ve %0.1 formik asit içeren H₂O ve ACN:IPA (1:1, h/h) kullanıldı. Akış hızı 0.4 mL/dk ve akış programı organik faz (B) başlangıçta %35, doğrusal artışla 2-7 dk. arasında %80, 7-14 dk arasında %100 ve 6 dakika başlangıç koşullarına dönüş ve post run şeklindedir. Kolon sıcaklığı 55 °C olarak ayarlandı. Cihaz 75 - 3000 m/z değerleri tarama aralığında pozitif iyon modunda çalıştırıldı. Diğer parametreler, kapiler voltajı 3650 V, N₂ gazı basıncı 21 psi, akış hızı 11 L/dk ve sıcaklığı 379 °C olarak belirlendi.

SCFA yönteminde hareketli faz olarak her ikisi de %0.1 formik asit içeren H₂O ve ACN kullanıldı. Akış hızı 0.5 ml/dk ve akış programı organik faz (B) başlangıçta %10, doğrusal artışla 2-6 dk arasında %90, 6-10 arası %90 ve 6 dakika başlangıç koşullarına dönüş ve post run olacak şeklindedir. Kolon sıcaklığı 50 °C olarak ayarlanmıştır. Cihaz 100 – 1200 m/z değerleri tarama aralığında negatif iyon modunda çalıştırıldı. Diğer parametreler, kapiler voltajı 3650 V, N₂ gazı basıncı 21 psi, akış hızı 11 L/dk ve sıcaklığı 379 °C olarak belirlendi.

Metabolomik Veri Değerlendirme Çalışmaları

Cihazdan “.mzdata” uzantısıyla ham veriler alındı. Piklerin belirlenmesi, eşleştirilmesi, tanımlanması, pik alanlarının tespit edilmesi işlemleri MzMine 2.53 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi (163). Veri değerlendirme işlemlerinde m/z tespiti, kromatogram oluşturma, kromatogram dekonvolüsyonu, piklerin oluşturulan kütüphane kullanılarak nitel analizleri, filtreleme, izotop eşleştirmesi, farklı yüklü iyonların takip edilmesi ve eşleştirme basamakları takip edildi. Gürültü eşiği 10000, m/z eşleşme aralığı 0.008 m/z, minimum alıkonma zamanı aralığı 0.2 dk, maksimum asimetri oranı 1.2, kütüphane eşleştirmelerinde maksimum 3 ppm ve 0.1 dk. aralık olarak parametreler belirlendi. Kütüphane eşleştirmeleri işlemi sırasında, iç standartlar kullanılarak alıkonma zamanı düzeltilmesi yapıldı. Alıkonma zamanları, m/z

değerlerini, eşleştirme sonuçlarını ve pik alanlarını içeren .csv uzantılı tablo, çıktı olarak programdan alındı.

Veri değerlendirme basamağında ilk olarak kalite kontrol ve havuz örneklerinde iç standartların bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Daha sonra örneklerde eşleşen metabolitlerin ekstraksiyon kör çözelti örnekleri ile karşılaştırılarak filtrelemesi yapıldı. Bulunan metabolitler alıkonma zamanına göre en yakın iç standart kullanılarak normalize edildi. Metabolit piklerinin havuz örneklerindeki bağıl standart sapma değerleri kullanılarak, bağıl standart sapma değerleri %30'un üzerinde olanlar filtrelendi. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında bu işlemler sonunda elde edilen pikler ve normalize pik değerleri kullanıldı.

Nitel Analiz

Metabolitlerin nitel analizinde, her biri metabolitlerin referans standartlarının tezde uygulanan yöntemle analiz edilip m/z değerleri, alıkonma zamanları, MS/MS spektrumlarını içeren metabolit kütüphaneleri kullanıldı. Yarı-polar metabolitlerin analizinde kullanılan kütüphane amino asitler, safra asitleri, yağ asitleri, organik asitler, lipidler gibi bir çok farklı molekül grubundan 387 metabolit içermektedir. Lipidlerin nitel analizinde CE, CER, LPC, PC, PE, SM, TG, DG, MG lipid altgruplarını içeren 696 lipid bulunmaktaydı. SCFA yönteminde kısa zincirli yağ asitlerini ve şeker türevlerini içeren 136 metabolit bulunmaktaydı. Böylece toplam 1219 metabolit örneklerde tarandı. Metabolitler ± 0.1 dk alıkonma zamanı ve ± 3 ppm kütle aralığında tarandı.

Gruplar Arasında Değişen Piklerin Belirlenmesi ve Yolak Analizleri

Kontrol grubu olarak boş MCF-7 hücre hatları kullanıldı. PCX grubu, MCF-7 hücre hattına paklitaksel uygulanan grup olarak belirlendi. İlaç yüklenmemiş haliyle hücrelere tatbik edilen PLA, HSA, PEG-PCL, PLGA ve PCL nanonartiküllerinden oluşan 5 farklı örnek NNP grubu olarak adlandırıldı. Bu nanopartiküllerin ilaç yüklü olanları ise PLA-PCX, PEG-PCL-PCX, PLGA-PCX ve PCL-PCX olarak NNP-PCX grubunu oluşturdu. Örnek gruplarının üç farklı açıdan hücrelere etkileri incelendi. Boş nanopartiküllerin

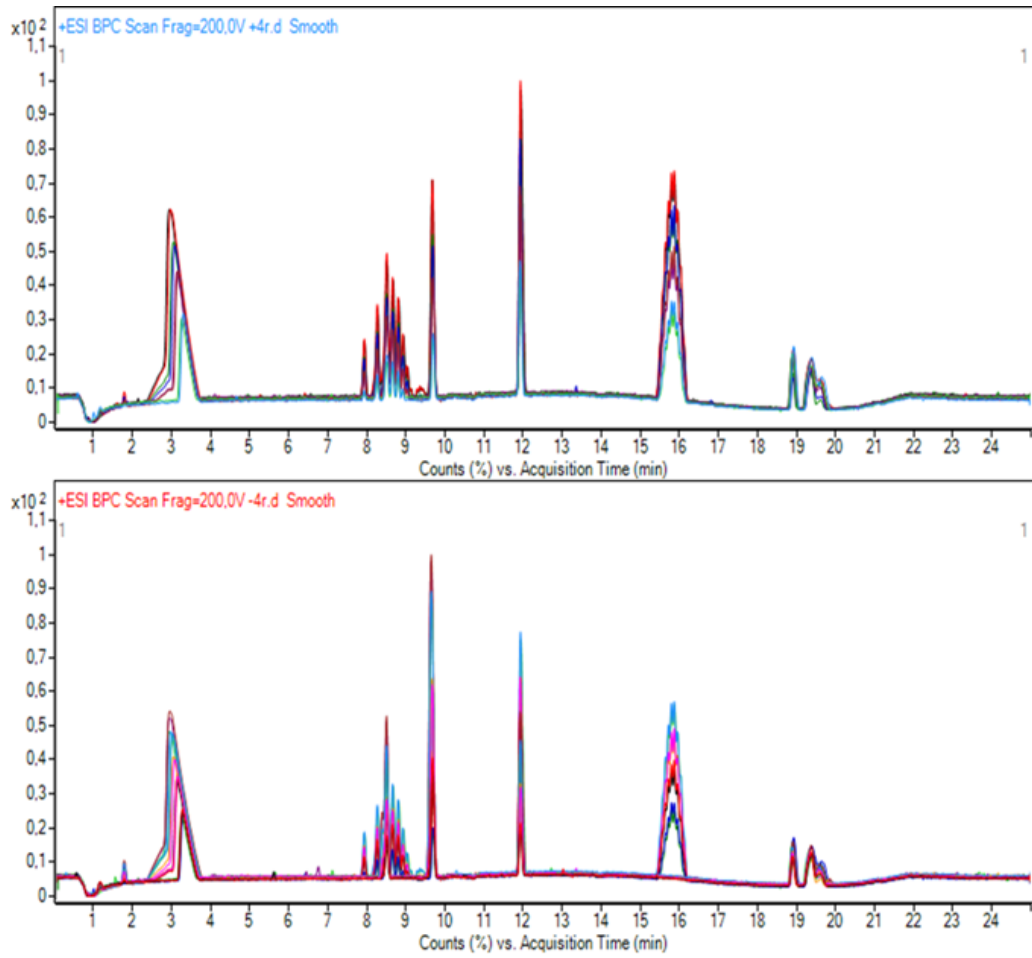
hücrelere etkisini incelemek amacıyla NNP grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldı. İlaç yüklü nanopartiküllerin ilacın serbest formundan farklılıklarını incelemek amacıyla NNP-PCX grubu PCX grubuyla karşılaştırıldı. İlaç yüklü nanopartiküllerin yüksüz partiküllerden farkını incelemek amacıyla NNP-PCX grubu NNP grubuyla karşılaştırıldı. Bu amaçla gruplar arasında miktarı anlamlı olarak değişen ($FC > 1.5$) ve istatistiksel olarak güvenilir ($p < 0.05$) pikler belirlendi. PCA grafikleri Metaboanalyst yazılımı kullanılarak çıkarıldı. Isı grafikleri ToolBox for biologists v2.019 kullanılarak çıkartıldı. Yolak analizleri MetaboAnalyst destekli olarak KeGG veribankasında gerçekleştirildi. Yolak analizlerinde ve gruplar arasında değişen metabolitlerin belirlenmesinde sadece kütüphane eşleşmesi veren metabolitler kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Lizizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması

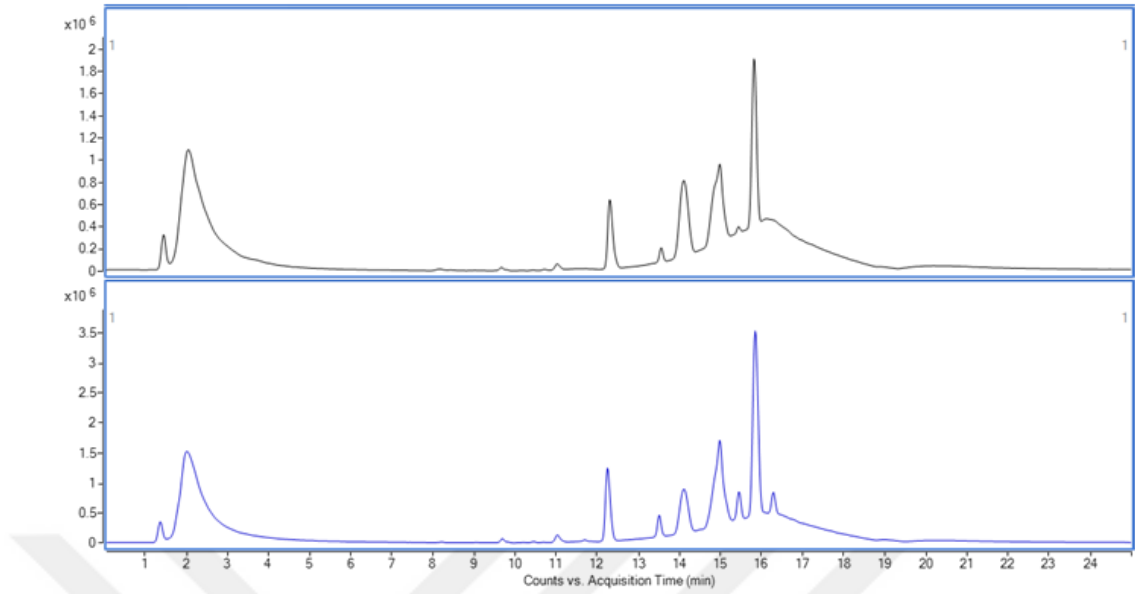
Bölüm 3.1.1 ve 3.1.2’de ayrıntıları verilen yöntemlerle hazırlanan hücrelere ait LC/MS kromatogramları Şekil 4.1.’de verilmiştir. Bölüm 3.1’de ayrıntıları verilen yöntemle işlenen veriler sonrasında $R > 0.90$ değerine sahip deterjan bazlı yöntemde 551 pik, fiziksel parçalama ile liziz yönteminde 695 adet pik bulunmuştur.



Şekil 4.1. Deterjan bazlı liziz yöntemi (üstte) ve fiziksel parçalama ile liziz (altta) yöntemlerine ait temel pik kromatogramları

4.2. Veri İşleme Yöntemlerine Dair Bulgular

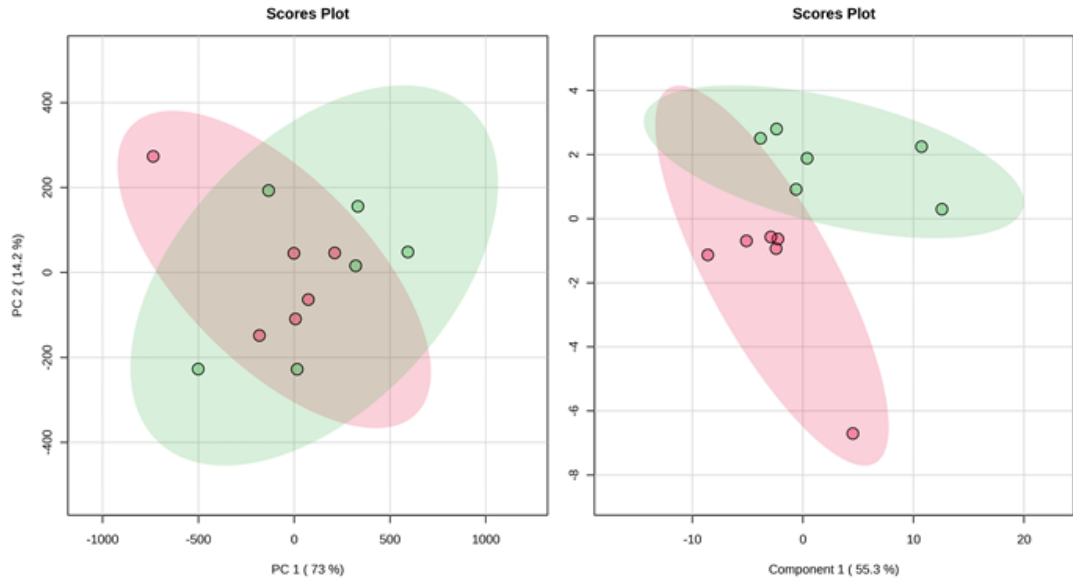
Örnekler bölüm 3.2.’de ayrıntıları verilen şekillerde veri değerlendirme işlemine tabii tutulmuştur. Şekil 4.2.’de iki çalışma grubuna ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 4.2. Veri değerlendirme basamağında kullanılmak üzere gerçekleştirilen çalışmaya ait temel pik kromatogramları.

Veri işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla yapılan analizlerin sonuçları, ektopik gebelik hastalarından alınan plazma numuneleri kullanılarak elde edilen metabolomik verilerin PCA grafikleriyle görselleştirilmiştir. Bu analizler, bölüm 3.2.1. ve bölüm 3.2.2. 'de ayrıntılı olarak açıklanan iki farklı veri işleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.3'te sunulan PCA grafiklerinden soldaki, ardışık seyreltme ve kör çözelti filtrelemesi sonrası elde edilen sonuçları göstermektedir. Sağdaki grafik ise putative nitel analiz ve kütüphane destekli nitel analiz sonuçlarını sunmaktadır.



Şekil 4.3. İki farklı veri işleme tekniğine ait veri değerlendirme sonuçları, solda ardışık seyreltme ve kör çözelti filtrelemelerini, sağda putative tanımlama ve kütüphane eşleşmelerini gösteren PCA grafikleri.

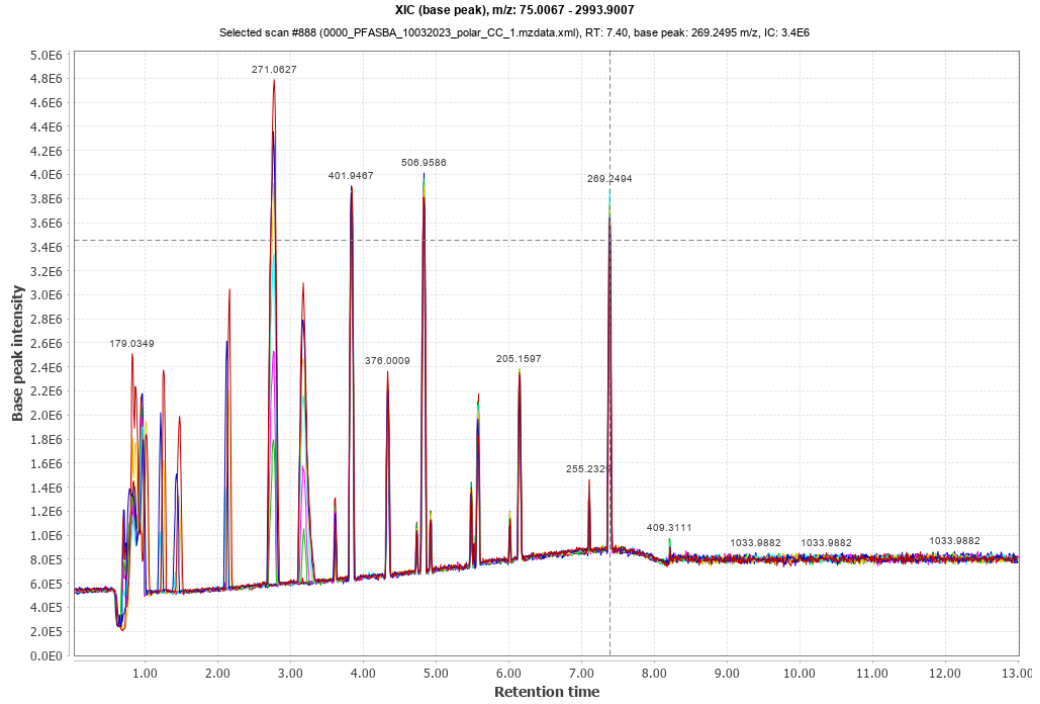
4.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar

Protein Miktar Tayini

Bölüm 3.3.1.'de anlatılan yöntemle protein miktar tayini sonucunda $y = 0.8447x + 0.3698$ ($R^2 = 0.9965$) denklemi kullanılarak yapılan protein miktar analizi sonuçlarında kontrol grubu örnekler ortalama $2.321 (\pm 0.102)$ mg/mL, NNP grubu örnekleri ortalama $2.296 (\pm 0.120)$ g/mL, NNP-PCX grubu örnekler $2.365 (\pm 0.097)$ mg/mL toplam protein yoğunluğuna sahip oldukları hesaplanmıştır.

4.3.1. Metabolomik Analizler

Metabolomik analizlerde ham veride 3058 adet pik tespit edilmiştir. Bu piklerde kütüphaneden 108 eşleşme yakalanmıştır. Sinyal/gürültü (>3) ve havuz örneklerde bağıl standart sapma değerlerine ($<30\%$) göre yapılan filtreleme işlemi sonucu bu sayılar 454 pik ve 49 eşleşen metabolit şeklindedir. Şekil 4.4.'de metabolomik çalışmalara ait LC/MS kromatogramı verilmiştir. Şekil 4.5.'de yöntemde kullanılan iç standartlara ait LC/MS kromatogramı verilmiştir. Tablo 4.1.'de yöntemde kullanılan iç standartlar ve bağıl standart sapma değerleri verilmiştir. Bu iç standart



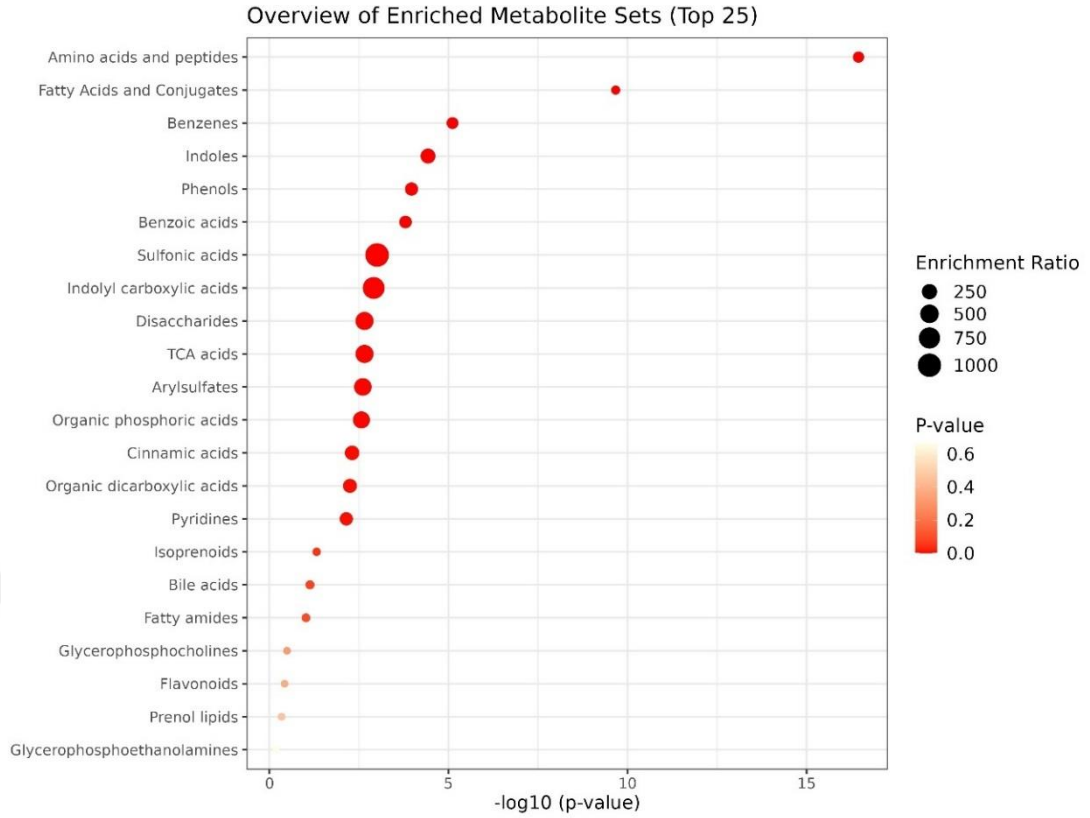
Şekil 4.5. Metabolomik çalışmada kullanılan iç standartlara ait temel pik kromatogramı

Tablo 4.2. Kütüphane eşleşmesi sonrası tanımlanan metabolitler, sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerde bağıl standart sapmaları

m/z	t _R	Metabolit	HMDB	S/G	%BSS
137.0255	0.88	3-Hydroxybenzoic alcohol	NA	-----	26.40
123.0448	0.85	4-Hydroxybenzyl alcohol	HMDB0011724	16.5	141.42
190.0427	0.78	5-Hydroxyindoleacetic acid	HMDB0000763	22.52	24.25
128.0354	0.66	Pyroglutamic acid	HMDB0000267	6395.01	1.32
263.1296	1.40	Abscisic acid	HMDB0036093	124.85	141.42
407.2802	4.74	Allocholic acid	HMDB0000505	7.65	1.13
303.2331	6.81	Arachidonic acid	HMDB0001043	----	4.46
279.2331	6.86	C18:2	NA	125.03	30.67
301.2174	6.48	C20:5	NA	225.52	37.82
327.2331	6.75	C22:6	NA	122.41	35.26
478.3166	4.31	CA-Ala	NA	3.95	1.44
171.1391	4.49	Capric acid	HMDB0000511	4.58	10.12
494.3082	4.31	CA-Ser	NA	5.83	26.27
191.0192	0.76	Citric acid	HMDB0000094	-----	16.04
163.0403	0.82	Coumarinic acid	HMDB0041592	476.30	20.00
130.0652	0.96	Creatine	HMDB0000064	665.14	28.19
391.2859	5.49	DCA	NA	1.73	9.48
173.0121	0.78	Dehydroascorbic acid	HMDB0001264	0.10	42.23
199.1704	5.57	Dodecanoic acid	HMDB0000638	-----	6.22
193.0504	0.89	Ferulic acid	HMDB0000954	9.90	35.21
259.0219	0.65	Fructose 6-phosphate	HMDB0000124	167.29	71.95
169.0127	0.73	Gallic acid	HMDB0005807	25.20	12.27

Tablo 4.2. (Devam) Kütüphane eşleşmesi sonrası tanımlanan metabolitler, sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerde bağıl standart sapmaları

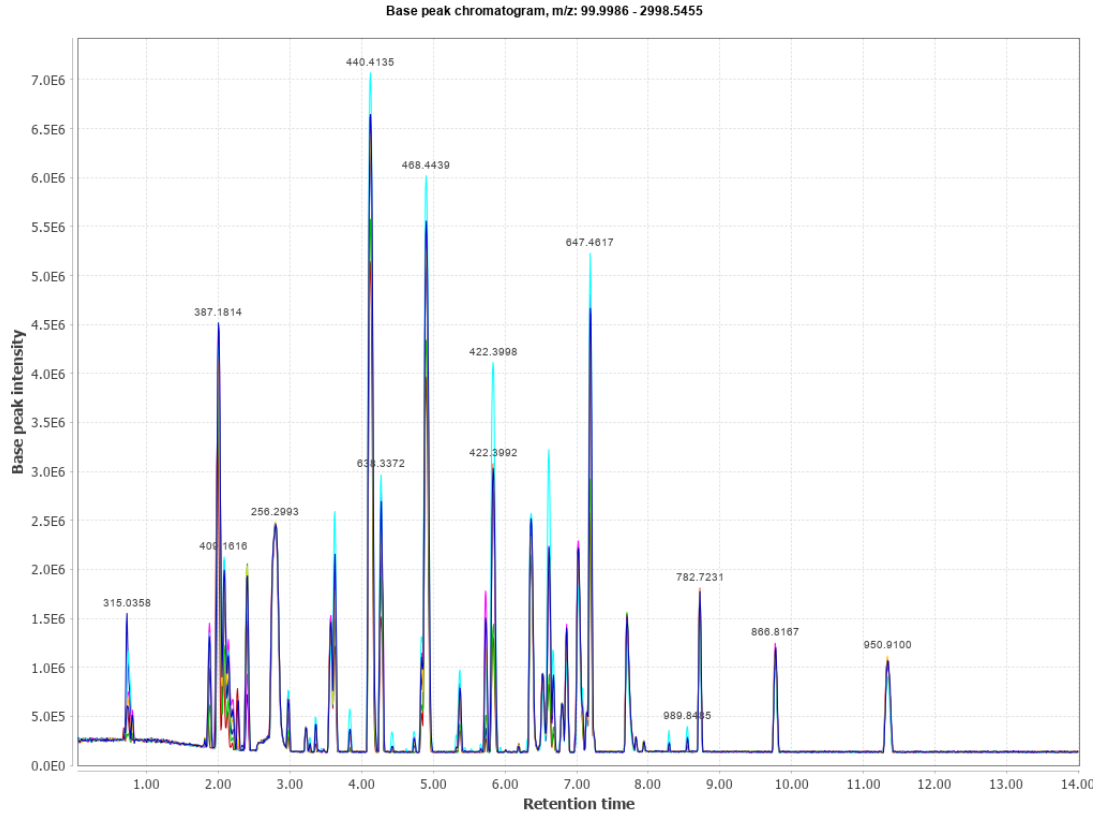
m/z	t _R	Metabolit	HMDB	S/G	%BSS
464.3015	4.37	GCA	NA	18.76	7.64
448.3067	4.93	Chenodeoxycholic acid glycine conjugate	HMDB0000637	4.21	5.81
464.3018	3.89	GHCA	NA	23.25	25.63
432.3109	5.53	GLCA	NA	4.13	28.20
146.0458	0.73	Glutamic acid	HMDB0000148	407.55	27.98
171.0123	0.67	Glycerol 3-phosphate	HMDB0000126	2523.25	21.15
253.2175	6.64	Palmitoleic acid	HMDB0003229	66.85	2.50
115.0764	1.49	Caproic acid	HMDB0000535	1.00	28.45
174.0561	1.06	Indoleacetic acid	HMDB0000197	----	21.52
144.0454	2.01	Indole-3-carboxaldehyde	HMDB0029737	170.78	3.83
188.0713	1.24	Indole-3-propionic acid	HMDB0002302	----	22.12
267.0749	0.85	Inosine	HMDB0000195	4.55	23.21
130.0873	0.79	Isoleucine	HMDB0000172	12542.8	0.57
129.0197	0.71	Itaconic acid	HMDB0002092	0.30	141.42
89.02419	0.74	Lactic acid	HMDB0000190	730.09	6.82
375.2902	6.03	LCA	NA	-----	5.50
277.2174	6.49	alpha-Linolenic acid	HMDB0001388	1203.2	1.06
582.3778	7.70	LysoPC(O-18:0/0:0)	HMDB0011149	-----	21.42
614.3411	6.48	LPC(22:5)	NA	-----	122.12
500.2781	6.94	LPE(20:4)	NA	-----	125.25
145.0946	0.82	Lysine	HMDB0000182	4.25	15.65
148.0447	0.77	Methionine	HMDB0000696	-----	13.09
147.0648	0.79	Mevalonic acid	HMDB0000227	6.67	10.52
227.0331	0.65	Mevalonic acid 5-phosphate	NA	-----	36.52
227.2018	6.42	Myristic acid	HMDB0000806	16.35	7.07
143.1078	3.07	Caprylic acid	HMDB0000482	10.94	7.36
281.2489	7.24	Oleic acid	HMDB0000207	26.64	1.10
255.2334	7.10	Palmitic acid	HMDB0000220	4.79	0.89
107.0137	2.77	p-Cresol	HMDB0001858	-----	124.14
187.0076	1.17	p-Cresol sulfate	HMDB0011635	-----	68.15
164.0725	0.85	Phenylalanine	HMDB0000159	9896.02	1.01
251.0922	4.20	Phenytoin	HMDB0014397	-----	33.66
114.0552	0.75	Proline	HMDB0000162	-----	14.75
104.0356	0.75	Serine	HMDB0000187	-----	17.04
283.2644	7.63	Stearic acid	HMDB0000827	3.86	2.19
341.1072	0.69	Sucrose	HMDB0000258	-----	41.09
124.0073	0.72	Taurine	HMDB0000251	-----	20.11
225.1862	5.91	Tetradecenoic acid	NA	150.64	6.19
514.284	4.33	THCA	NA	-----	24.54
118.0509	0.75	L-Threonine	HMDB0000167	-----	5.67
482.2945	5.47	TLCA	NA	-----	25.55
203.0828	0.91	L-Tryptophan	HMDB0000929	10615.8	0.90
116.0735	0.75	L-Valine	HMDB0000883	5892.71	2.13



Şekil 4.6. Eşleşen metabolitlere ait molekül grupları

4.3.2. Lipidomik Çalışmalara ait bulgular

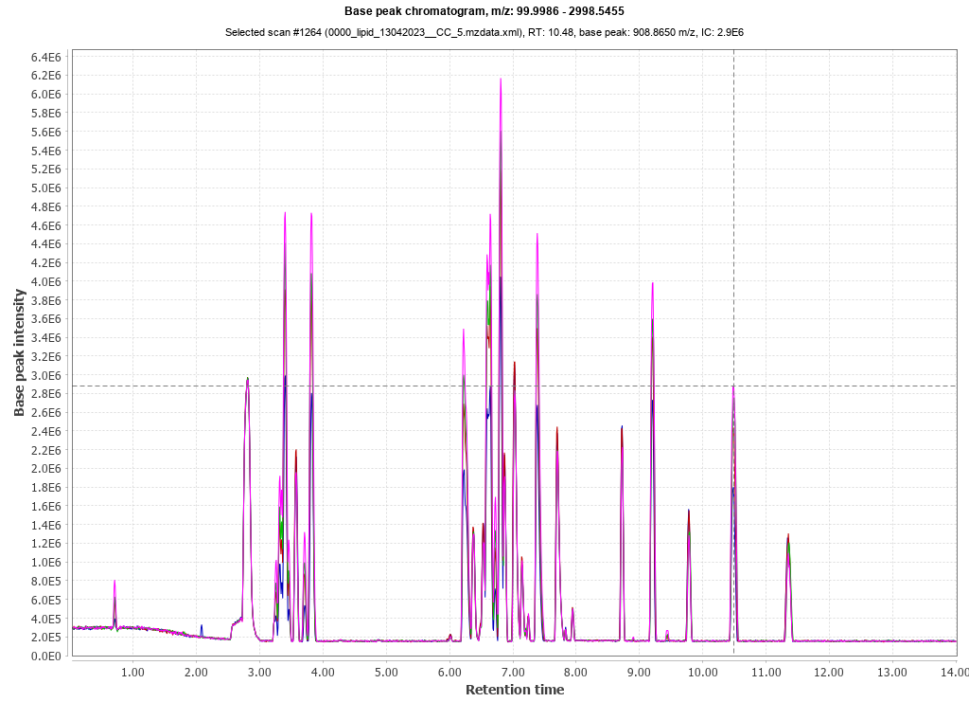
Lipidomik analizlerde ham veride 31268 adet pik tespit edilmiştir. Bu piklerde kütüphaneden 316 eşleşme yakalanmıştır. Sinyal/gürültü (>3) ve havuz örnekelerde bağıl standart sapma değerlerine (<%30) göre yapılan filtreleme işlemi sonucu bu sayılar 3004 pik ve 193 eşleşen metabolit şeklindedir. Şekil 4.7.'de lipidomik çalışmalara ait LC/MS kromatogramı verilmiştir. Tablo 4.3.'de yöntemde kullanılan iç standartlar ve bağıl standart sapma değerleri verilmiştir. Şekil 4.8.'de yöntemde kullanılan iç standartlara ait sonuçlar verilmiştir. Pikler kendilerine en yakın alıkonma zamanına sahip iç standartın pik alanı kullanılarak normalize edilmiştir. Tablo 4.4.'de eşleşen lipidlerin m/z değerleri, alıkonma zamanları (t_R), yaygın isimleri, sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerdeki bağıl standart sapma değerleri verilmiştir.



Şekil 4.7. Lipidomik çalışmalara ait temel pik kromatogramları

Tablo 4.3. Lipidomik yöntemle ait iç standartların %BSS değerleri

m/z	t _R	Lipid	%BSS
510.3544	3.54	LPC(17:0)	2.52
717.5894	6.53	SM(d18:1/17:0)	1.22
790.7717	6.53	PC(16:0/d30/18:1)	5.31
552.5342	6.86	Cer(d18:1/17:0)	9.35
762.5998	7.02	PC(17:0/17:0)	3.25
720.5530	7.15	PE(17:0/17:0)	8.70
782.7223	8.72	TG(15:0/15:0/15:0)	2.51
866.8163	9.77	TG(17:0/17:0/17:0)	12.53
369.3503	9.66	CE(17:0)	13.17
950.9100	11.34	TG(19:0/19:0/19:0)	9.37



Şekil 4.8. Lipidomik çalışmalara ait temel pik kromatogramı

Tablo 4.4. Lipidomik çalışmalarda eşleşen lipidler

m/z	t _R	Eşleşen Lipid	S/G	%BSS
204.1217	0.71	acetylcarnitine	17.72	27.74
428.3729	3.72	AcylCarnitine(12:0)	7.36	4.98
369.3500	6.11	CE fragment	68.63	6.38
369.3498	9.32	CE(15:0)	43.68	8.22
369.3500	9.44	CE(16:0)	24.09	11.54
642.6161	9.43	CE(16:0)	9.61	34.33
369.3501	8.90	CE(16:1)	273.00	2.95
369.3496	8.57	CE(16:2)	106.84	5.27
668.6313	9.32	CE(18:1)	7.66	31.81
1319.2324	9.32	CE(18:1)	3.36	46.43
666.6181	8.89	CE(18:2)	94.85	13.33
688.6019	8.37	CE(20:5)	8.94	20.72
369.3490	8.22	CE(20:5)	3.32	49.24
604.6005	7.78	Cer (d40:1) / (d18:1/22:0)	6.34	41.44
622.6133	7.64	Cer(d18:1/22:0)	9.47	10.40
622.6130	7.75	Cer(d18:1/22:0)	8.18	14.49
636.6276	7.93	Cer(d18:1/23:0)	4.83	32.21
650.6429	8.08	Cer(d18:1/24:0)	7.90	9.16
648.6275	7.68	Cer(d18:1/24:1)	32.99	4.15
630.6147	7.69	Cer(d18:1/24:1), loss of H ₂ O	----	23.72
632.6319	8.08	Cer(d42:1)	9.62	24.12
612.5923	7.13	DG(16:0/18:1)	7.28	20.11
704.5218	5.69	DG(20:5/22:6)	502.63	3.53
730.5383	5.92	DG(22:6/22:6)	6.91	29.82
414.3567	3.41	Heptadecanoyl carnitine	7.87	21.10
246.1686	0.81	Isovaleryl-carnitine	11.56	11.52

Tablo 4.4. (Devam) Lipidomik çalışmalarda eşleşen lipidler

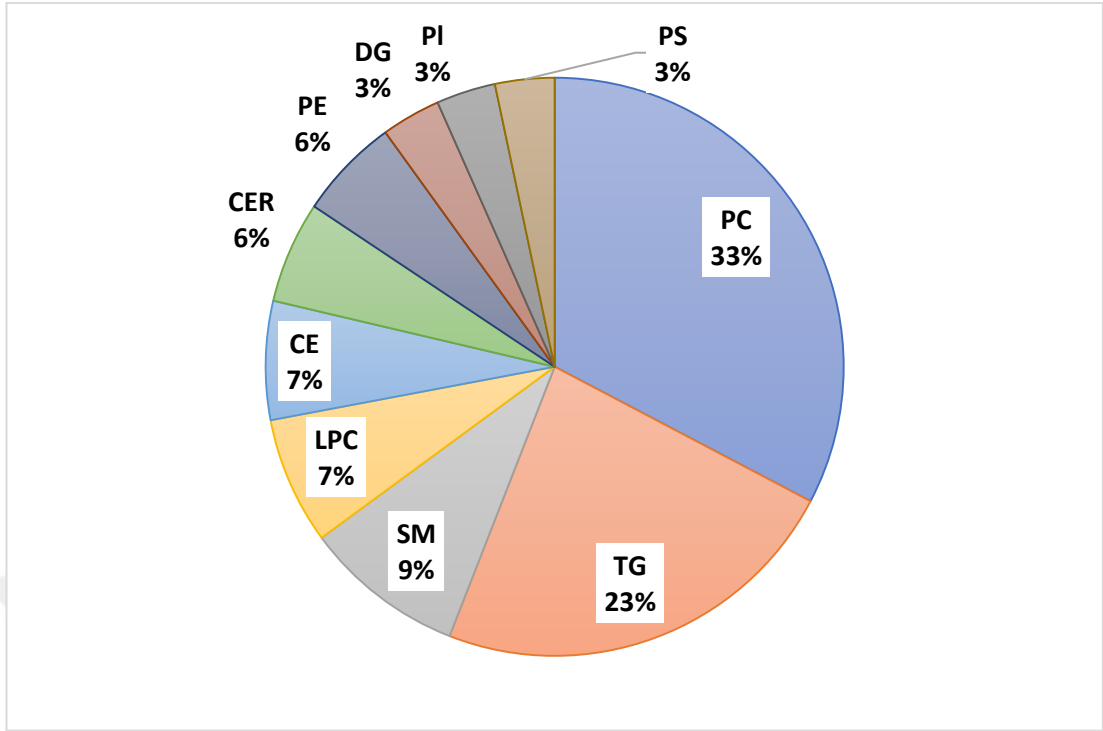
m/z	t _R	Eşleşen Lipid	S/G	%BSS
162.1096	0.83	L-Carnitine	7.86	29.00
468.3071	2.94	LPC(14:0)	22.84	4.63
496.3387	3.34	LPC(16:0)	163.65	2.95
482.3605	3.55	LPC(16:0e)	15.37	34.13
480.3431	3.48	LPC(16:0p)	66.80	5.32
494.3220	3.01	LPC(16:1)	35.01	5.17
524.3701	3.81	LPC(18:0)	189.21	0.74
546.3532	3.26	LPC(20:3)	9.05	24.95
544.3393	3.06	LPC(20:4)	25.33	7.63
542.3211	3.10	LPC(20:5)	8.20	24.21
570.3542	3.11	LPC(22:5)	22.92	2.04
453.2795	3.40	LPE (16:0)	2.43	47.06
502.2932	3.10	LPE(20:4)	2.09	21.05
372.3127	2.90	Myristoyl-L-carnitine	38.52	26.84
400.3402	3.27	Palmitoylcarnitine	9.17	11.96
734.5683	6.61	PC(16:0/16:0)	443.56	7.55
760.5835	6.59	PC(16:0/18:1)	2883.74	2.65
746.6038	6.87	PC(16:0e/18:1(9Z))	182.28	5.26
790.6293	7.39	PC(18:0/18:0)	2.13	22.95
772.6207	6.85	PC(18:0p/18:1(9Z))	159.07	1.82
706.5371	6.14	PC(30:0)	496.10	2.69
720.5534	6.34	PC(31:0)	161.91	39.21
732.5520	6.14	PC(32:1)	787.75	0.74
730.5373	5.69	PC(32:2)	465.91	2.16
748.5843	6.76	PC(33:0)	67.99	5.06
746.5683	6.36	PC(33:1)	143.10	5.22
774.5609	4.79	PC(34:2(OH))	24.78	26.80
758.5686	6.19	PC(34:2)	879.70	2.72
756.5527	5.82	PC(34:3)	1259.40	15.72
756.5531	5.72	PC(34:3)	198.27	31.25
774.5996	6.80	PC(35:1)	2036.96	19.62
772.5838	6.36	PC(35:2)	449.25	1.55
770.5687	6.00	PC(35:3)	62.17	13.95
768.5529	5.83	PC(35:4)	2.10	28.46
788.6152	7.00	PC(36:1)	4698.37	3.05
802.5938	5.32	PC(36:2(OH))	54.75	6.48
786.5991	6.62	PC(36:2)	2290.96	2.32
784.5841	6.29	PC(36:3)	982.02	1.03
784.5837	6.18	PC(36:3)	779.25	1.24
782.5664	6.59	PC(36:4)	1265.44	13.47
782.5676	5.81	PC(36:4)	584.36	11.39
782.5685	6.06	PC(36:4)	305.67	3.57
780.5523	5.71	PC(36:5)	479.28	2.42
802.6289	6.85	PC(37:1)	182.03	15.09
800.6152	6.80	PC(37:2)	123.69	4.06
798.5996	6.49	PC(37:3)	159.11	22.66
796.5846	6.28	PC(37:4)	68.89	12.05
816.6462	7.33	PC(38:1)	32.80	18.94
812.6153	6.70	PC(38:3)	---	0.91
812.6102	6.53	PC(38:3)	294.32	14.61

Tablo 4.4. (Devam) Lipidomik çalışmalarda eşleşen lipidler

m/z	t _R	Eşleşen Lipid	S/G	%BSS
810.5992	6.37	PC(38:4)	1003.73	3.15
808.5834	6.03	PC(38:5)	578.87	0.88
808.5834	6.16	PC(38:5)	464.65	2.28
806.5689	5.88	PC(38:6)	16.21	32.05
832.6631	7.45	PC(39:0)	16.74	31.06
820.5889	6.11	PC(39:6)	4.45	18.09
838.6302	6.77	PC(40:4)	----	6.19
836.6117	6.68	PC(40:5)	21.91	32.33
834.6017	6.07	PC(40:6)	46.33	1.79
832.5854	5.89	PC(40:7)	----	49.97
864.6438	6.78	PC(42:5)	10.12	7.55
720.5851	6.89	PC(O-32:0)	19.15	22.78
718.5748	6.81	PC(O-32:1)	29.27	13.79
744.5893	6.49	PC(O-34:2)	76.17	9.66
742.5734	6.40	PC(O-34:3)	165.09	1.85
759.6358	7.17	PC(O-34:3) + [NH ₄]	52.96	8.97
770.6025	6.80	PC(O-36:3)	718.07	4.60
768.5871	6.45	PC(O-36:4)	484.97	3.71
766.5717	6.26	PC(O-36:5)	210.59	19.00
796.6189	6.52	PC(O-38:4)	9.37	35.35
794.6034	6.68	PC(O-38:5)	10.84	3.95
792.5865	5.99	PC(O-38:6)	3.68	37.13
820.6147	6.62	PC(O-40:6)	5.52	37.92
818.6054	6.17	PC(P-18:0/22:6)	2.66	30.11
718.5397	6.71	PE(16:0/18:1)	594.77	9.19
740.5262	6.18	PE(16:0/20:4)	6.17	23.09
726.5409	6.51	PE(16:1e/20:3)	23.63	7.62
768.5527	6.62	PE(18:0/20:4)	58.54	2.93
742.5382	6.29	PE(18:1/18:2)	216.87	1.45
766.5380	6.16	PE(38:5)	12.36	17.67
702.5384	6.92	PE(O-16:0/18:1)	4.04	40.32
700.5263	6.52	PE(P-16:0/18:2)	14.62	11.18
889.5626	6.71	PI (38:3)	2.21	31.14
904.5906	6.12	PI(18:0/20:4)	84.98	10.27
898.5531	6.03	PI(38:7)	7.81	42.50
971.6399	7.47	PI(44:4)	5.22	13.23
876.5683	6.61	PS(41:4)	---	39.55
874.5536	6.27	PS(41:5)	---	4.04
771.6342	6.93	SM (39:2)	4.39	37.50
807.6352	7.14	SM (d18:1/24:4)	10.52	26.78
773.6512	7.34	SM (d39:1)	19.06	20.53
811.6674	7.07	SM (d42:3)	190.23	1.56
785.6518	7.13	SM(40:2)	108.56	15.37
701.5583	5.72	SM(d16:1/18:1)	332.87	8.31
677.5571	5.89	SM(d18:0/14:0)	5.26	39.03
705.5817	6.36	SM(d18:0/16:0)	4.15	7.90
703.5736	6.25	SM(d18:1/16:0)	3.49	4.34
815.6982	7.89	SM(d18:1/24:0)	85.15	6.56
675.5417	5.68	SM(d32:1)	151.38	3.46
733.6101	6.89	SM(d36:0)	4.54	4.42

Tablo 4.4. (Devam) Lipidomik çalışmalarda eşleşen lipidler

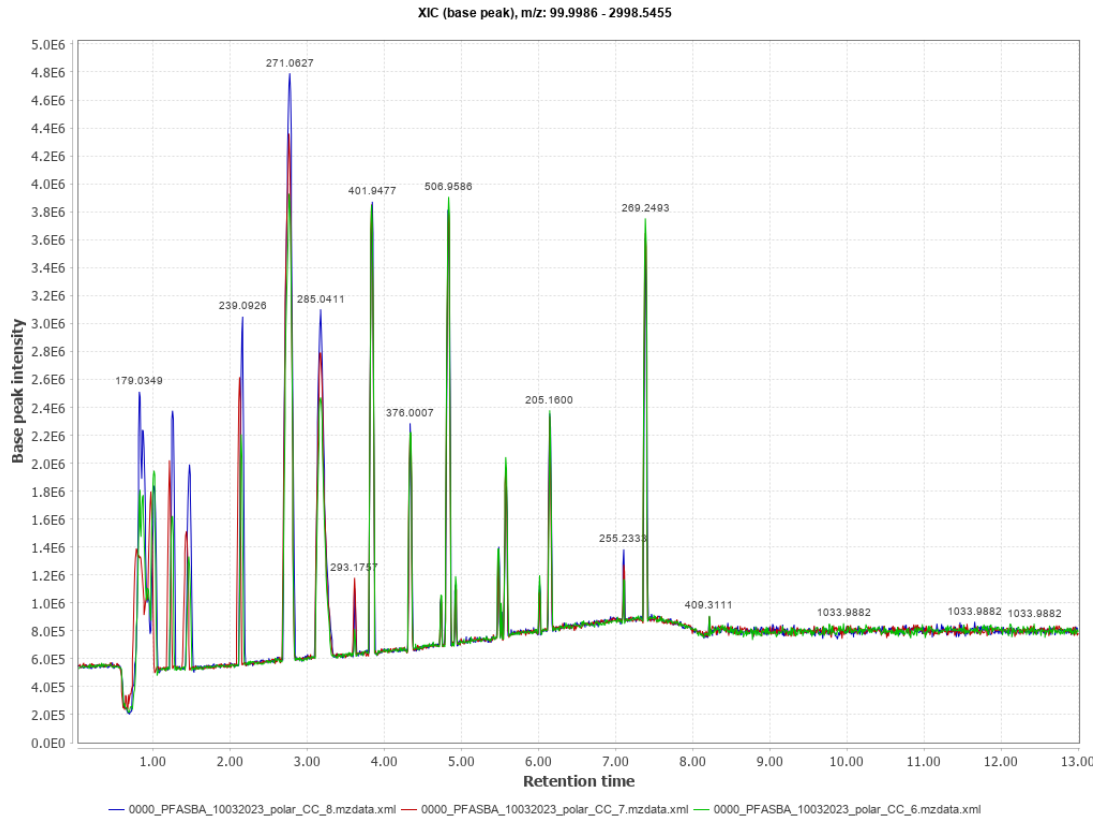
m/z	t _R	Eşleşen Lipid	S/G	%BSS
729.5886	6.27	SM(d36:2)	77.57	4.81
757.6217	6.72	SM(d38:2)	9.73	28.19
787.6670	7.54	SM(d40:1)	190.14	29.83
801.6830	7.71	SM(d41:1)	281.39	1.65
799.6676	7.32	SM(d41:2)	158.72	10.98
815.6940	7.58	SM(d42:1)	22.96	45.63
813.6842	7.47	SM(d42:2)	415.71	6.48
822.7542	8.82	TG(14:0/16:0/18:1)	8.91	19.48
848.7693	8.76	TG(14:0/18:1/18:1)	10.72	13.37
844.7354	8.22	TG(14:0/18:2/18:2)	27.57	37.15
878.8167	9.47	TG(16:0/18:0/18:1)	20.95	16.04
794.7224	8.56	TG(16:1/18:1/12:0)	7.01	22.31
820.7380	8.55	TG(18:1/12:0/18:1)	6.79	22.78
876.8002	9.04	TG(18:1/18:1/16:0)	10.65	18.02
902.8157	8.97	TG(18:1/18:1/18:1)	4.88	14.30
898.7839	8.55	TG(18:1/18:2/18:2)	6.95	35.10
874.7845	8.71	TG(18:2/18:1/16:0)	5.98	16.72
900.7967	8.84	TG(18:2/18:1/18:1)	----	31.07
808.7387	8.69	TG(47:1)	9.45	14.38
827.7092	8.82	TG(48:1)	9.85	13.62
825.6938	8.53	TG(48:2)	9.08	19.91
818.7185	8.27	TG(48:3)	5.18	38.00
821.6487	7.32	TG(48:4)	17.14	25.73
836.7698	8.94	TG(49:1)	16.51	13.21
834.7542	8.64	TG(49:2)	15.43	22.42
832.7376	8.60	TG(49:3)	2.25	35.66
850.7854	9.12	TG(50:1)	13.66	16.59
853.7254	8.77	TG(50:2)	8.60	13.57
851.7090	8.49	TG(50:3)	16.05	45.05
846.7531	8.50	TG(50:3)	10.28	30.86
864.8006	9.28	TG(51:1)	21.28	13.43
862.7850	8.90	TG(51:2)	26.21	16.77
860.7686	8.59	TG(51:3)	14.89	38.35
880.8259	9.44	TG(52:0)	4.96	34.17
881.7558	9.04	TG(52:2)	8.56	12.05
879.7408	8.71	TG(52:3)	31.82	23.18
890.8159	9.20	TG(53:2)	32.42	30.24
911.8028	9.87	TG(54:1)	9.49	41.38
907.7715	8.97	TG(54:3)	3.44	11.61
905.7551	8.78	TG(54:4)	4.02	17.77
903.7381	8.53	TG(54:5)	5.41	12.02
901.7248	8.25	TG(54:6)	3.84	43.83
894.7528	8.10	TG(54:7)	2.18	42.12
920.8561	9.47	TG(55:1)	18.24	17.85
932.8624	9.76	TG(56:2)	34.37	16.97
930.8463	9.29	TG(56:3)	23.32	34.97
928.8300	8.93	TG(56:4)	9.95	36.82
926.8125	8.64	TG(56:5)	9.00	30.06
952.8320	8.87	TG(58:6)	2.08	43.03
978.8459	8.63	TG(60:7)	30.74	16.85



Şekil 4.9. Eşleşen lipidlerin lipid alt gruplarına göre dağılımı

4.3.3. SCFA Yöntemine Dair Bulgular

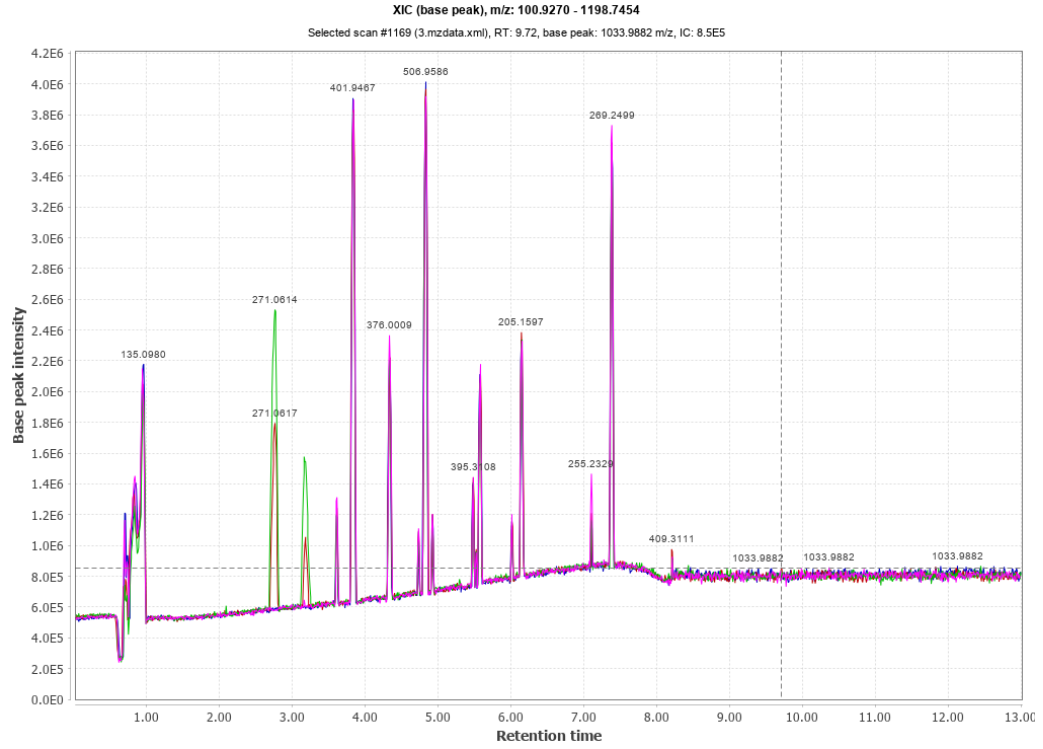
SCFA analizlerinde ham veride 2451 adet pik tespit edilmiştir. Bu piklerde kütüphaneden 23 eşleşme yakalanmıştır. Sinyal/gürültü (>3) ve havuz örneklerde bağıl standart sapma değerlerine ($<30\%$) göre yapılan filtreleme işlemi sonucu bu sayılar 681 pik ve 23 eşleşen metabolit şeklindedir. Şekil 4.10'da SCFA analizlerine ait LC/MS kromatogramı verilmiştir. Şekil 4.11.'de yöntemde kullanılan iç standartlara ait LC/MS kromatogramı verilmiştir. Tablo 4.5.'de yöntemde kullanılan iç standartlar ve bağıl standart sapma değerleri verilmiştir. Pikler kendilerine en yakın alıkonma zamanına sahip iç standartın pik alanı kullanılarak normalize edilmiştir. Tablo 4.6.'da eşleşen metabolitlerin m/z değerleri, alıkonma (t_R) süreleri, yaygın isimleri, sinyal/gürültü oranları ve havuz örneklerdeki bağıl standart sapma değerleri verilmiştir.



Şekil 4.10. SCFA yöntemine ait temel pik kromatogramı

Tablo 4.5. SCFA yönteminde kullanılan iç standartlar

m/z	t _R	Metabolit	%BSS
197.0758	3.67	Asetat-d ₄	16.27
229.1322	4.59	Bütrik asit-d ₈	21.16
253.1383	5.29	Hegzanoat-d ₃	12.12
210.0850	4.19	Propanoat-d ₂	14.52
391.1308	4.72	Süksinat-d ₄	13.19



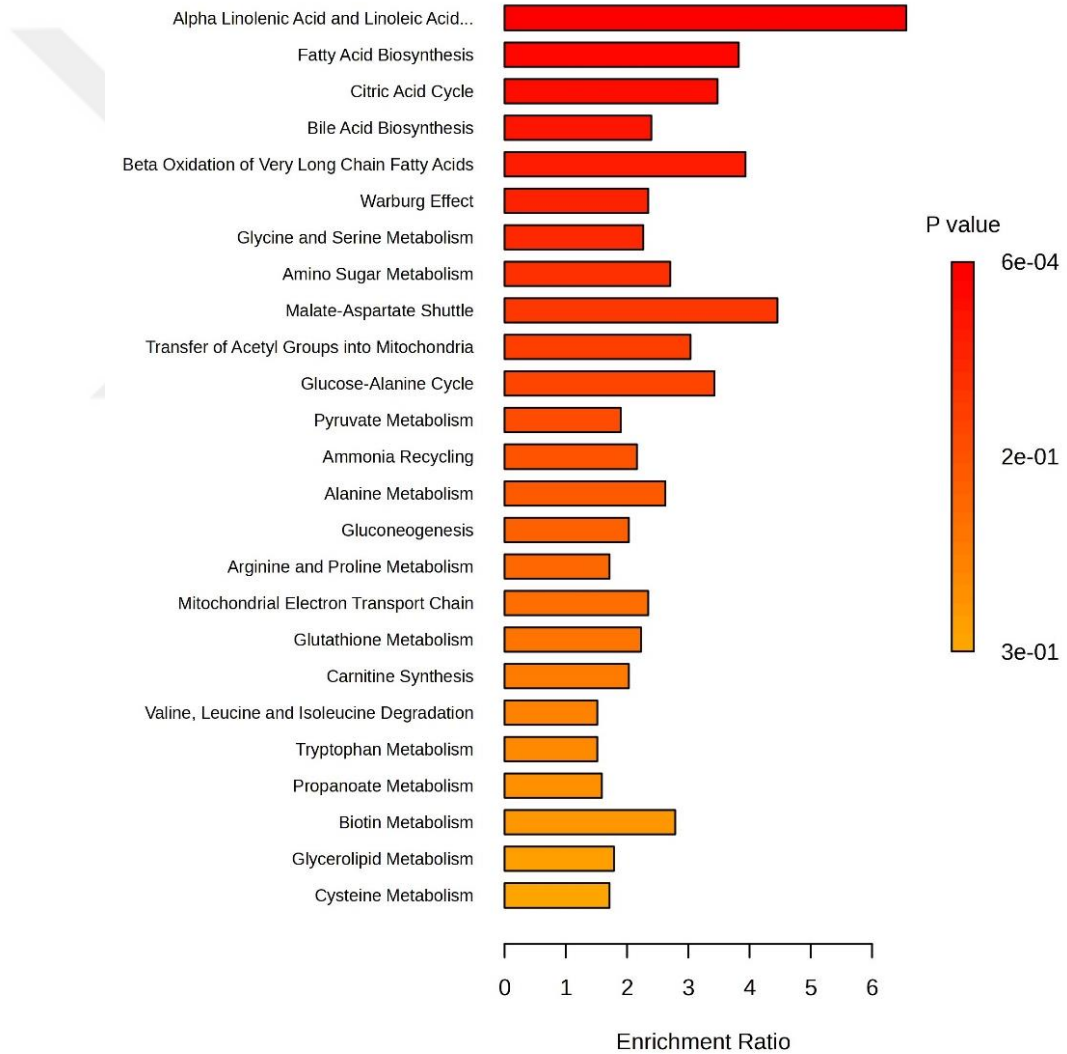
Şekil 4.11. SCFA yöntemine ait temel pik kromatogramı

Tablo 4.6. SCFA yöntemine ait eşleşen metabolitler listesi

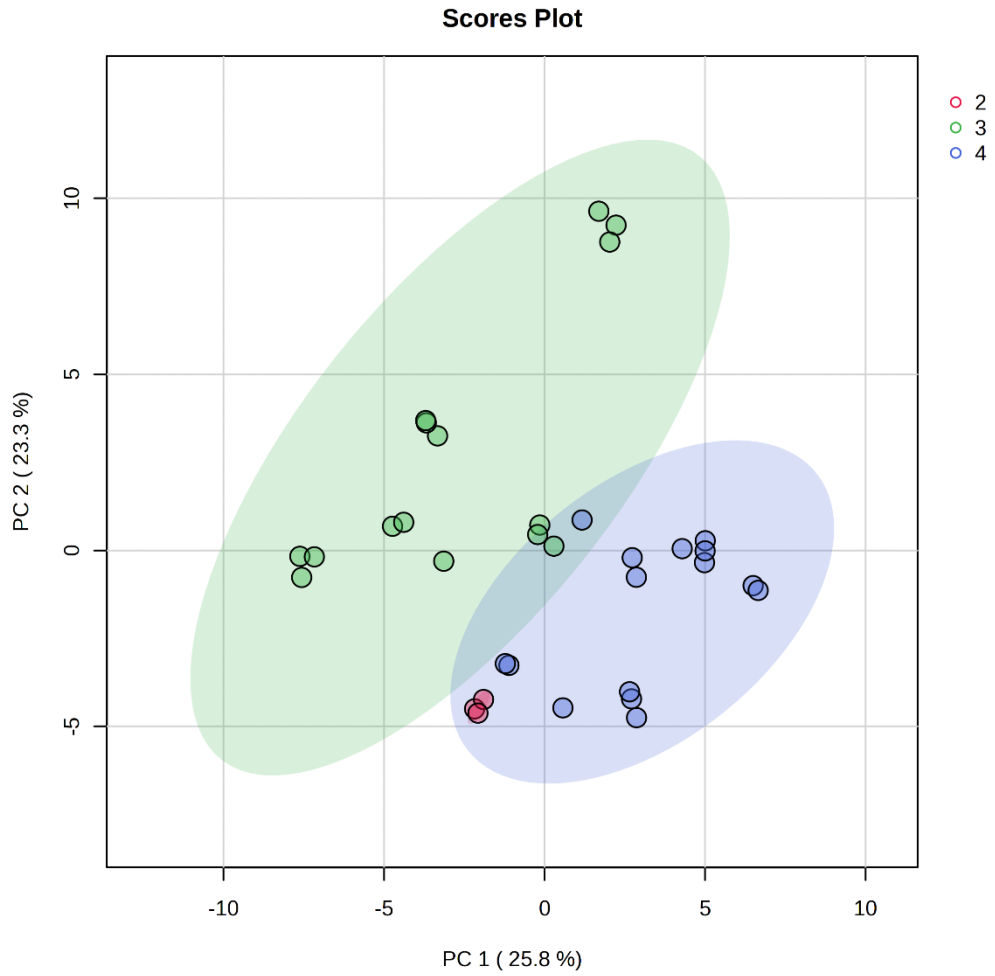
m/z	t _R	Metabolit	s/g	%BSS
298.1013	4.07	2-Deoxy-D-glucose	1.52	17.52
238.0773	3.63	2-Hydroxybutyric acid	4.21	35.21
385.1254	6.19	3-Methyl-2-oxobutanoic acid	25.63	144.74
399.1418	6.33	3-Methyl-2-oxovaleric acid	20.65	32.25
399.1412	5.97	3-Methyl-2-oxovaleric acid (izomer)	15.35	66.96
443.0943	5.12	Aconitate	11.47	23.32
443.0940	5.48	Aconitate (izomer)	23.62	14.87
314.0990	3.76	Fructose	654.87	11.10
314.0991	3.58	Fructose (izomer 1)	58.48	13.50
314.0991	3.47	Fructose (izomer 2)	50.98	12.96
313.0690	6.06	Hippuric acid	45.87	16.63
390.2755	7.79	Methylpentadecanoic acid	49.81	26.35
264.1348	5.59	N-Acetylputrescine	63.86	24.41
416.2910	7.88	Oleic acid	1.76	12.96
388.2599	7.29	Palmitoleic acid	2.88	15.52
353.1463	4.02	Pantothenic acid	12.76	23.41
194.0573	3.67	Acetate	5.65	12.41
250.1189	5.32	Caproate	77.40	21.10
208.0725	4.20	Propionate	23.86	14.40
224.0674	3.57	Lactate	43.73	12.20
403.0999	4.59	Malate	21.76	21.12
357.0948	5.87	Pyruvate	11.94	36.54
387.1073	4.72	Succinate	9.68	52.14

4.3.4. Gruplar Arasında Değişen Metabolitler ve Yolak Analizleri

Çalışma grupları arasında farklılıkları belirlemek ve metabolik aktiviteyi belirleyebilmek amacıyla, ilaç yüklü nanopartiküllerden oluşan (NNP-PCX) grubunun yalın paklitaksel (PCX) grubu ile farklılıkları, ilaç yüklü nanopartikül grubu (NNP-PCX)'in boş nanopartikül grubundan (NNP) farklılıkları ve boş nanopartikül grubunun (NNP) kontrol grubundan (MCF-7) farklılıkları ayrı ayrı incelenmiştir. Metabolomik ve SCFA yönteminde eşleşen metabolitlerin görev aldığı yolaklar Şekil 4.12.'de sunulmuştur.



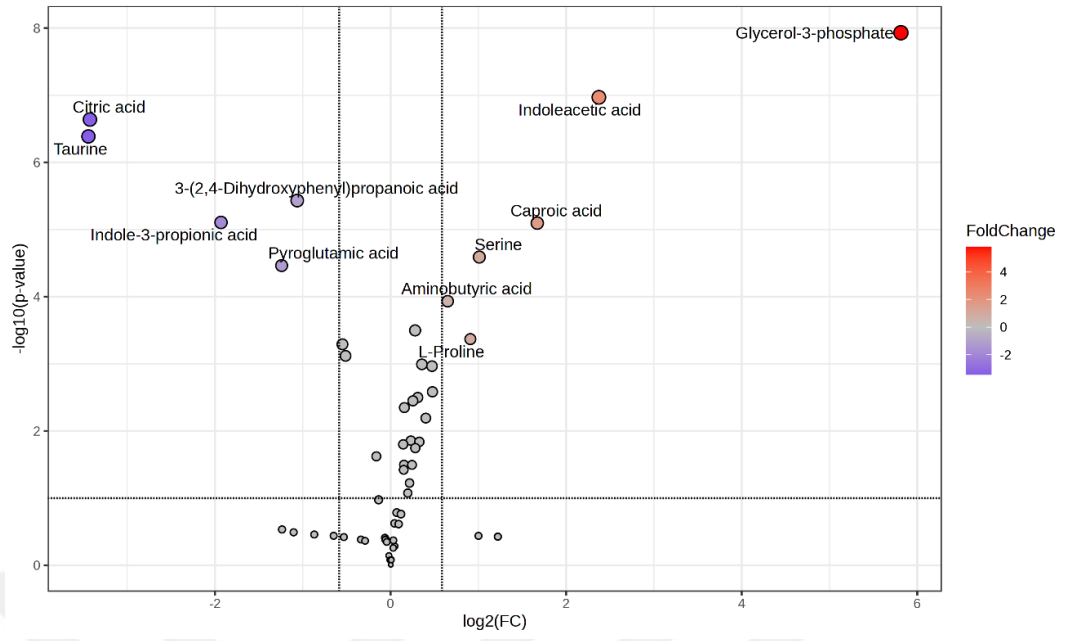
Şekil 4.12. Eşleşen metabolitlerin (SCFA dahil, lipidler hariç) görev aldığı yolaklar



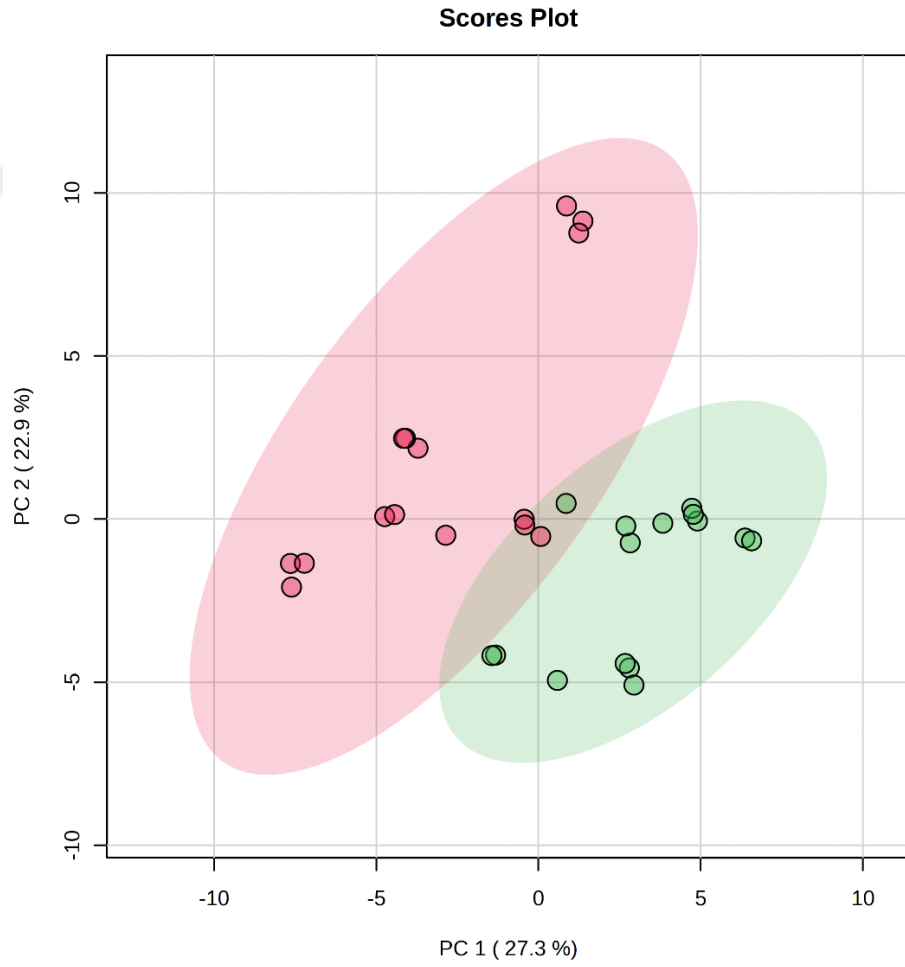
Şekil 4.13. PCX (kırmızı), NNP (yeşil) , NNP-PCX grupları (mavi) ile oluşturulan PCA grafiği.

Tüm pikleri dahil ederek PCX grubu örnekler (kırmızı), boş nanopartiküllerden oluşan grup (yeşil) ve paklitaksel yüklü nanopartiküllerden oluşan gruplardaki (mavi) tanımlanmış ve tanımlanmamış pikler kullanılarak oluşturulan PCA grafiği şekil 4.13.'de verilmiştir.

Şekil 4.14. kontrol grubuna karşılık paklitaksel grubu arasında metabolit seviyesinde farklılaşan ($F.C. > 1.5$, $p < 0.005$) metabolitleri gösteren grafik.

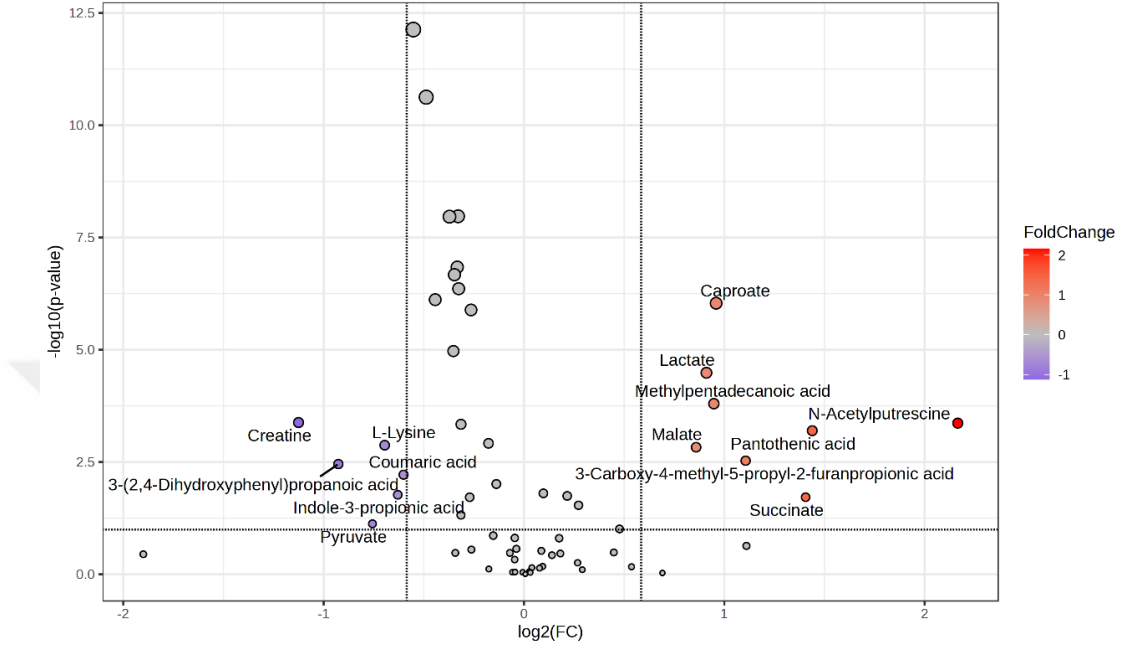


Şekil 4.14. Kontrol grubuna karşılık PCX grubunda farklılaşan metabolitler

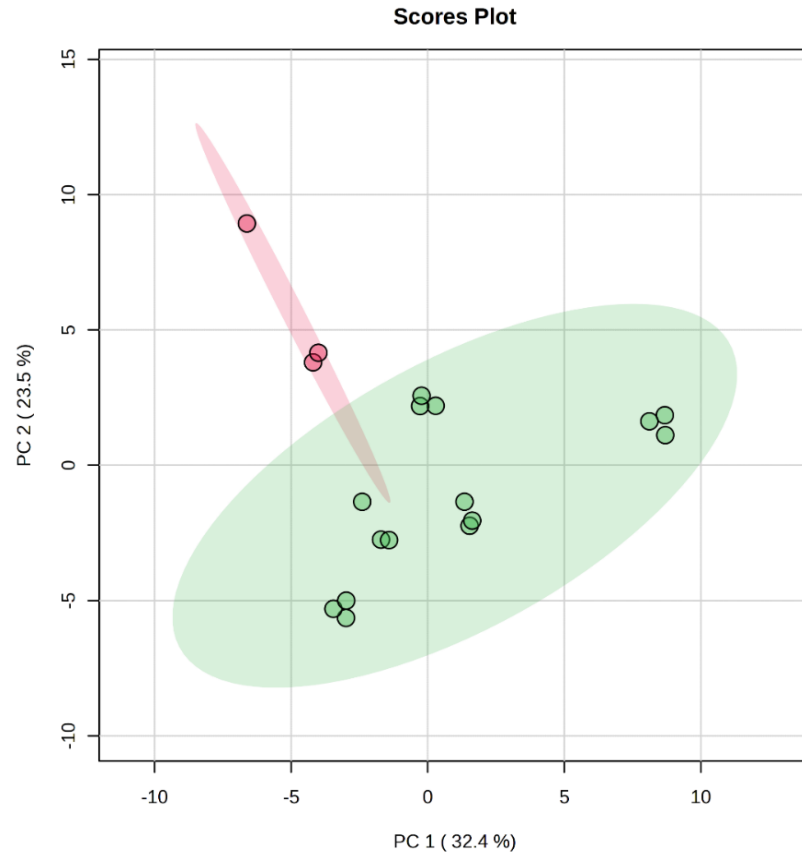


Şekil 4.15. NNP-PCX (yeşil) ve NNP (kırmızı) gruplarına ait PCA grafiği.

İlaç yüklü nanopartiküller (NNP-PCX) ve boş nanopartiküller (NNP) kullanılarak oluşturulan PCA grafiği şekil 4.15.'de verilmiştir. Aynı gruplar arasında farklılaşan metabolitler ($F.C.>1.5$, $p<0.005$) şekil 4.16.'daki grafikte verilmiştir.

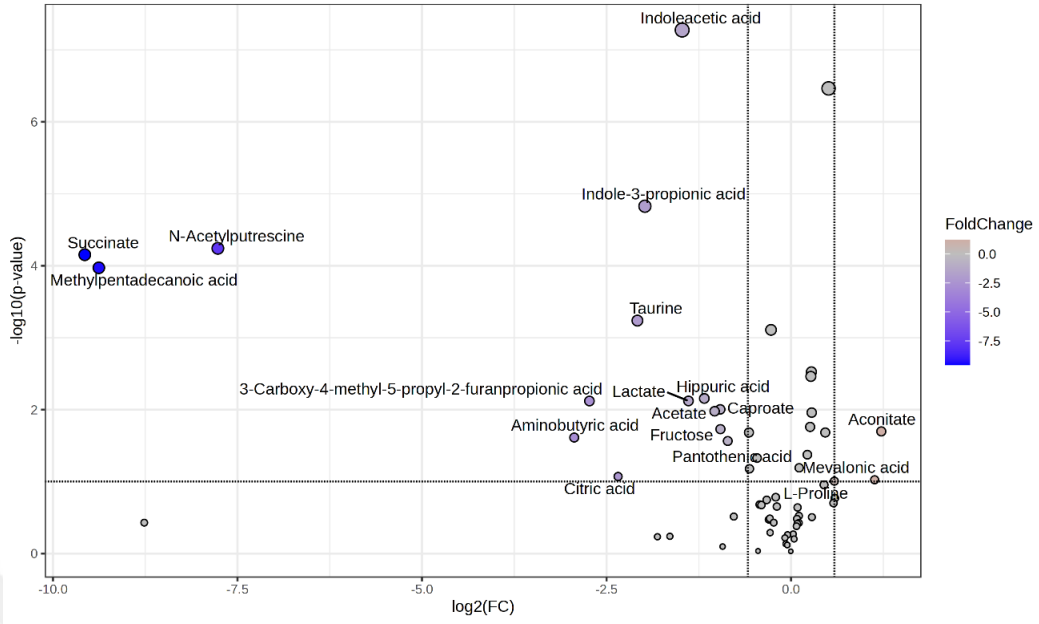


Şekil 4.16. NNP-PCX ve NNP grupları arasında farklılaşan metabolitler.



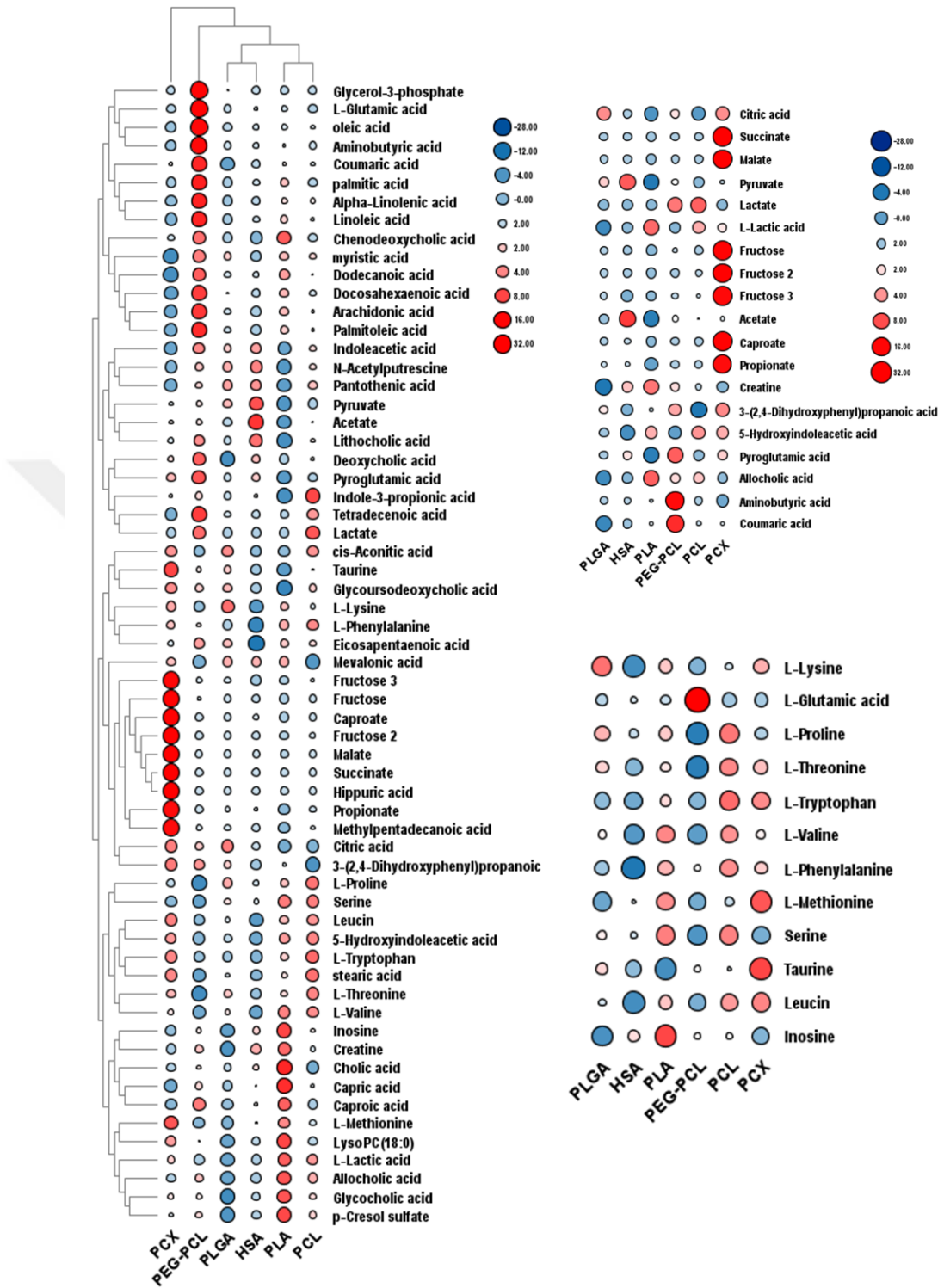
Şekil 4.17. MCF-7 grubuna (kırmızı) NNP grubundan (yeşil) oluşan PCA grafiği.

Kontrol grubu (MCF-7) ve boş nanopartiküller (NNP) kullanılarak oluşturulan PCA grafiği şekil 4.17.'de verilmiştir. Aynı gruplar arasında farklılaşan metabolitler ($F.C.>1.5$, $p<0.005$) şekil 4.18.'deki grafikte verilmiştir.

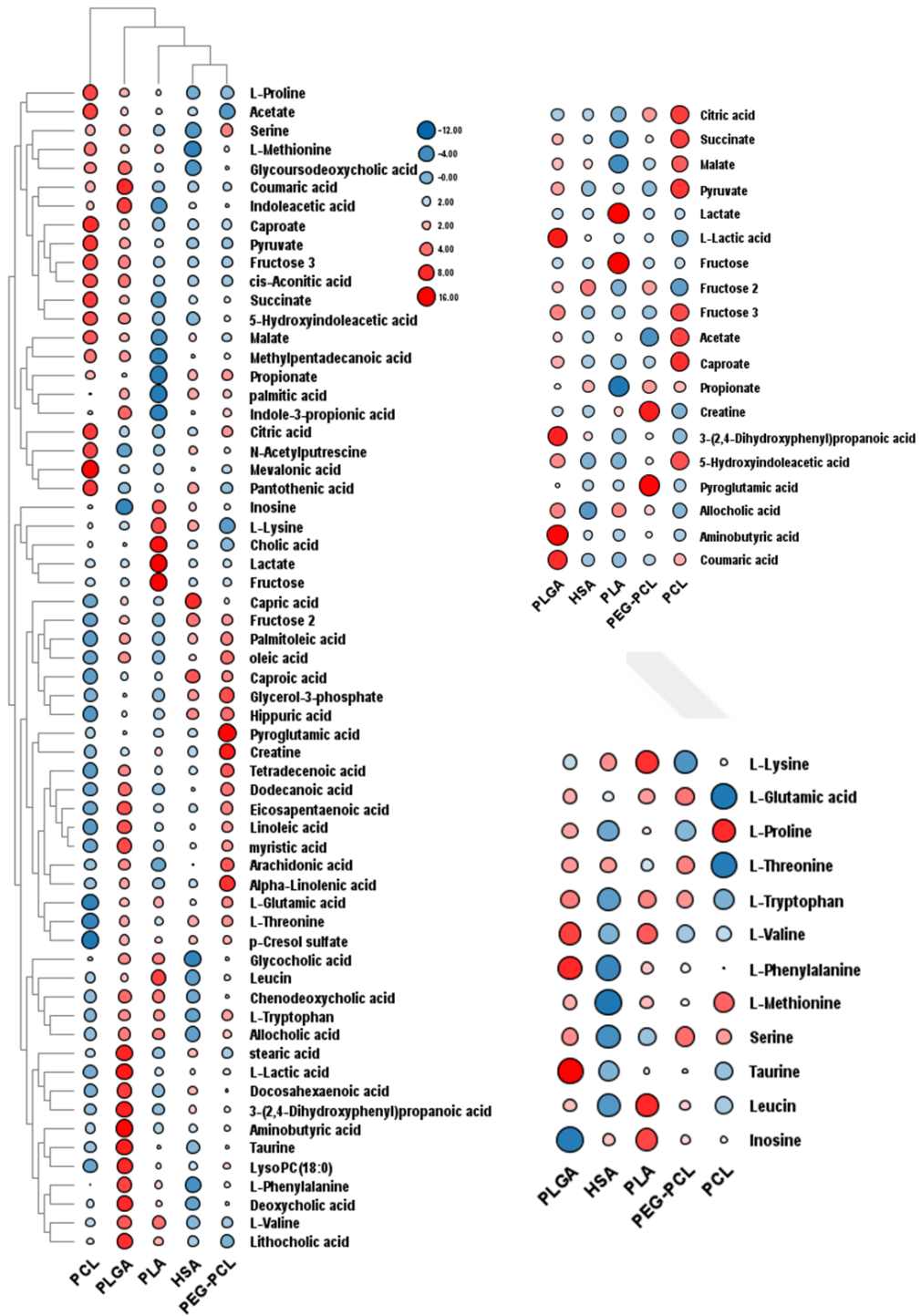


Şekil 4.18. MCF-7 ve NNP grupları arasında farklılaşan metabolitler.

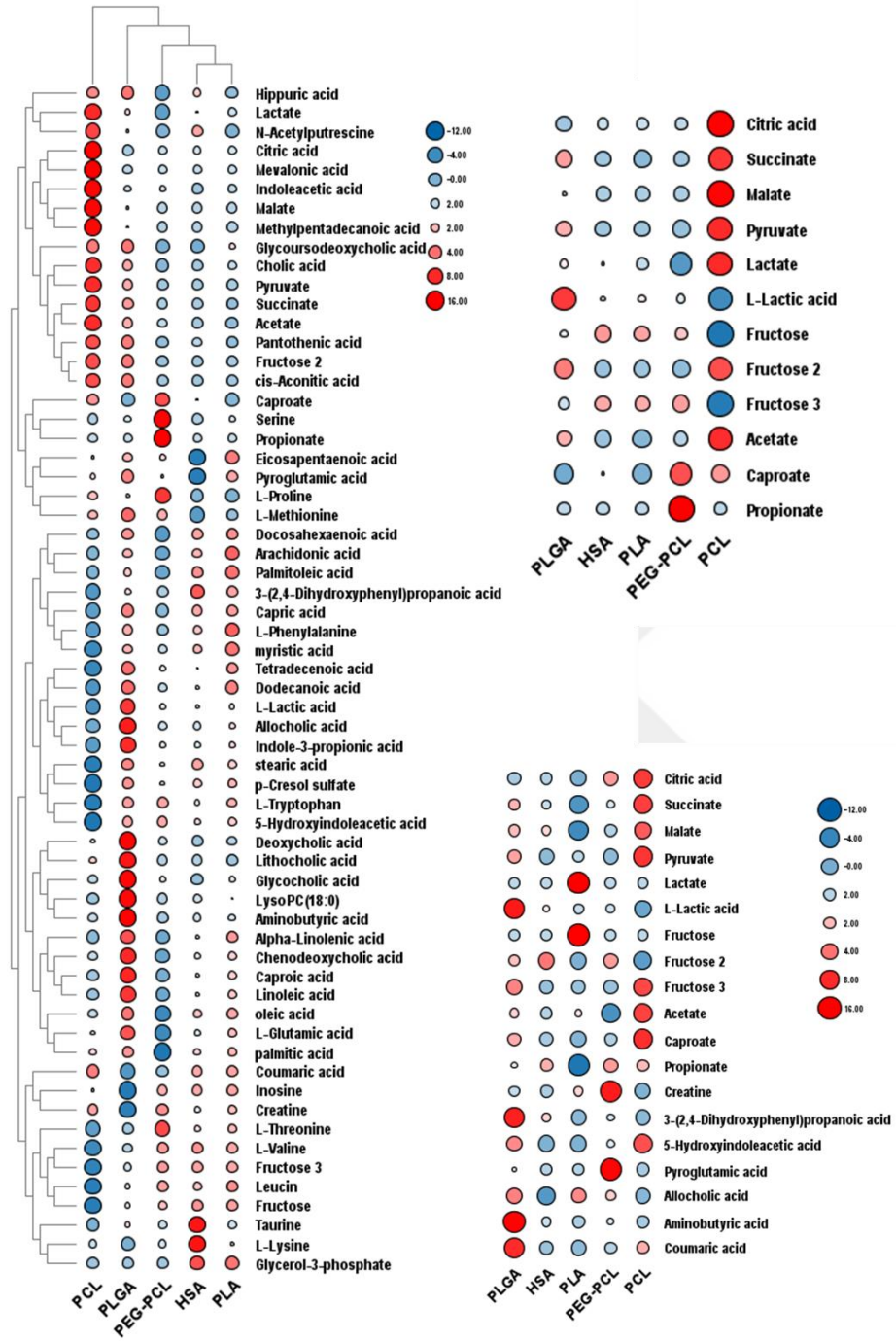
Metabolomik ve SCFA gruplarında eşleşen metabolitler her bir nanopartikül ayrı ayrı olacak şekilde ısı grafikleri çıkartılmıştır ve şekil 4.19’da verilmiştir. İlaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) ve paklitaksel (PCX) grubu arasında metabolom düzeyinde farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği şekil 4.20.’de verilmiştir. İlaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) boş nanopartikül (NNP) grubu arasında farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği şekil 4.21.’de verilmiştir. NNP, PCX ve kontrol grupları arasında metabolomik, lipidomik ve SCFA gruplarında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları şekil 4.22.’de verilmiştir. İlaç yüklü nanopartiküller (NNP-PCX) ve paklitaksel (PCX) grubu metabolomik, lipidomik ve SCFA gruplarında arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları şekil 4.23.’de verilmiştir. İlaç yüklü nanopartikül grubu (NNP-PCX) ve NNP arasında metabolomik, lipidomik ve SCFA gruplarında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları şekil 4.24.’de verilmiştir.



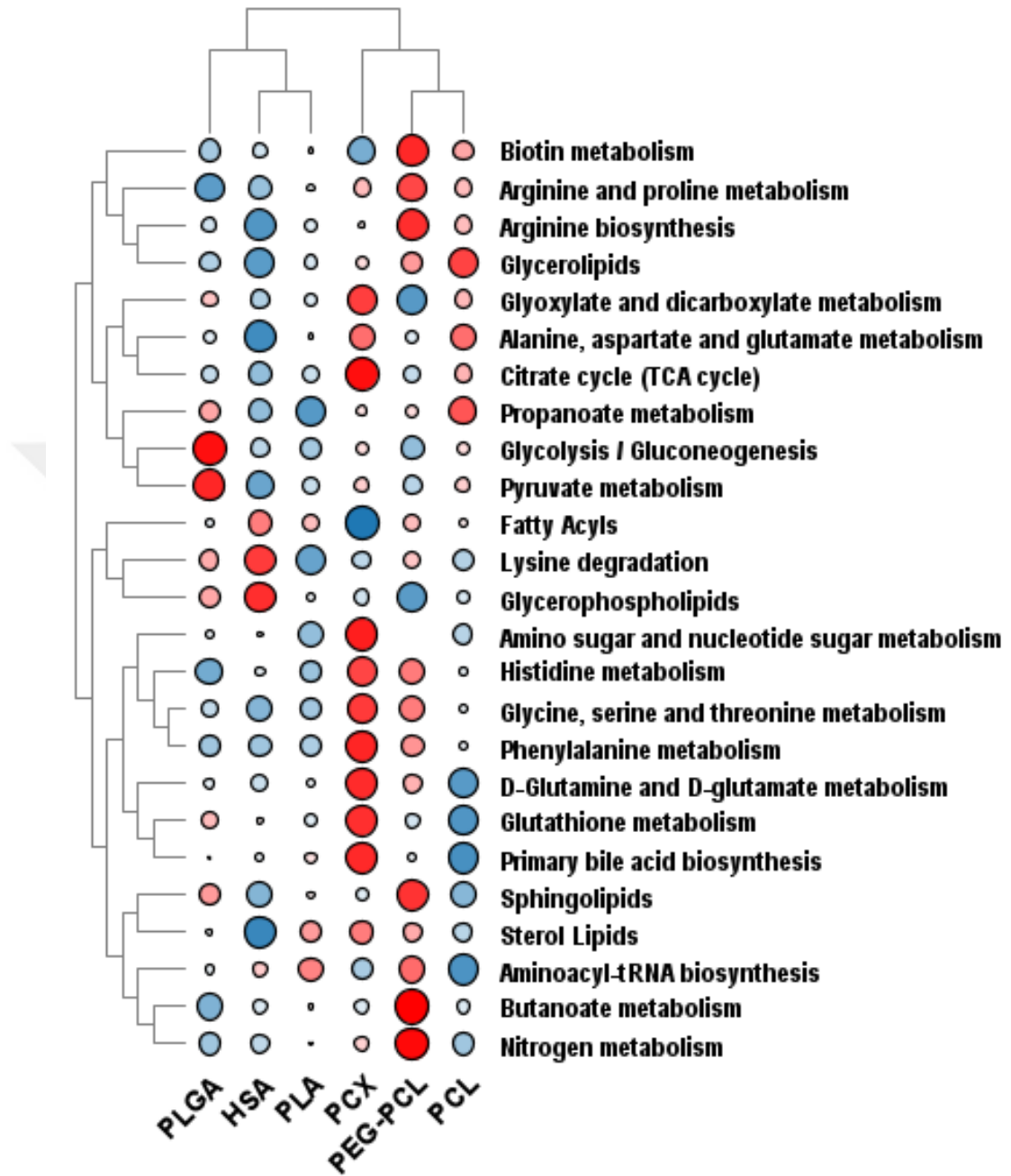
Şekil 4.19. NNP, PCX ve kontrol grupları arasında farklılaşan metabolitlere ait ısı haritası grafiği.



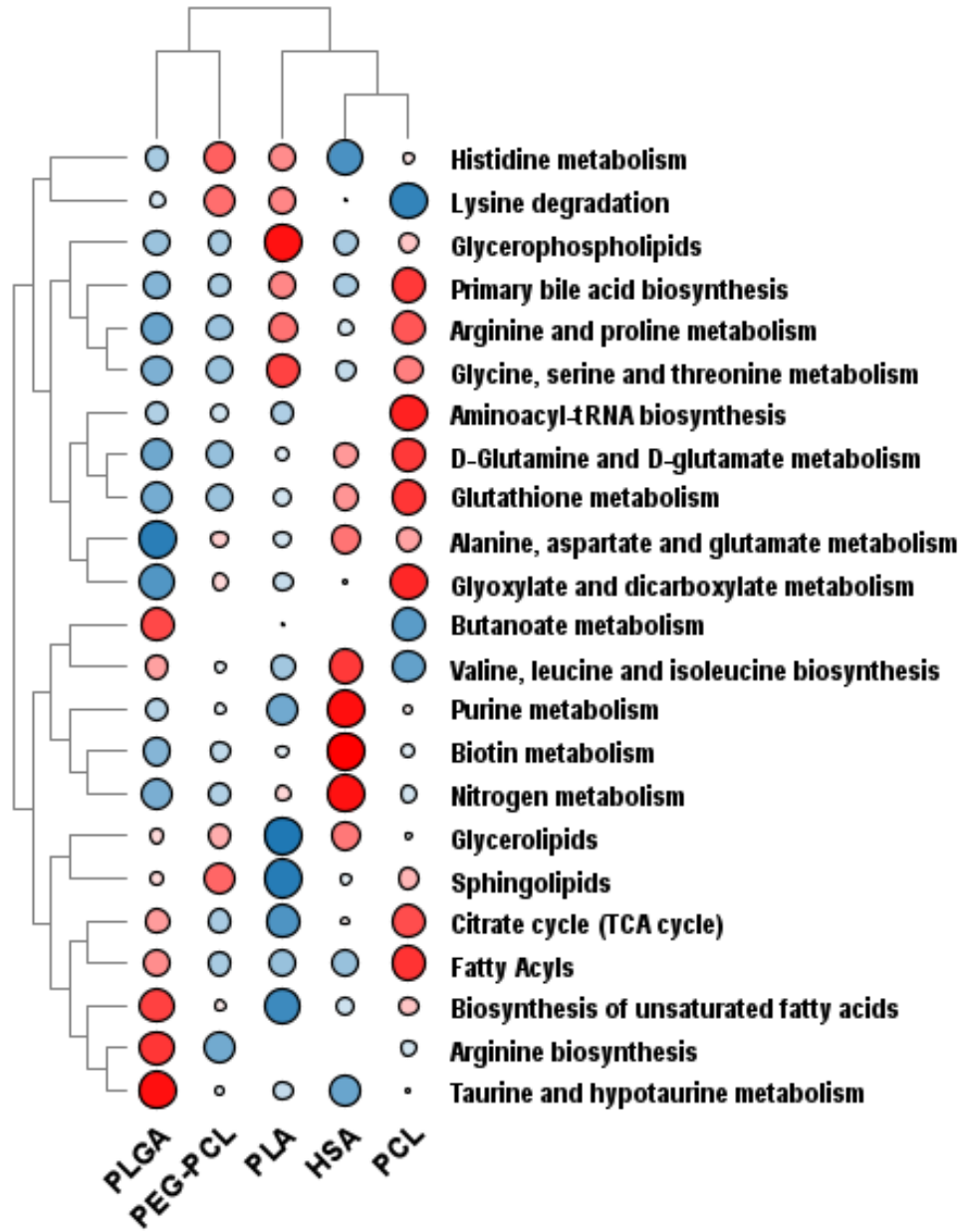
Şekil 4.20. İlaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) ve paklitaksel (PCX) grubu arasında metabolom düzeyinde farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği.



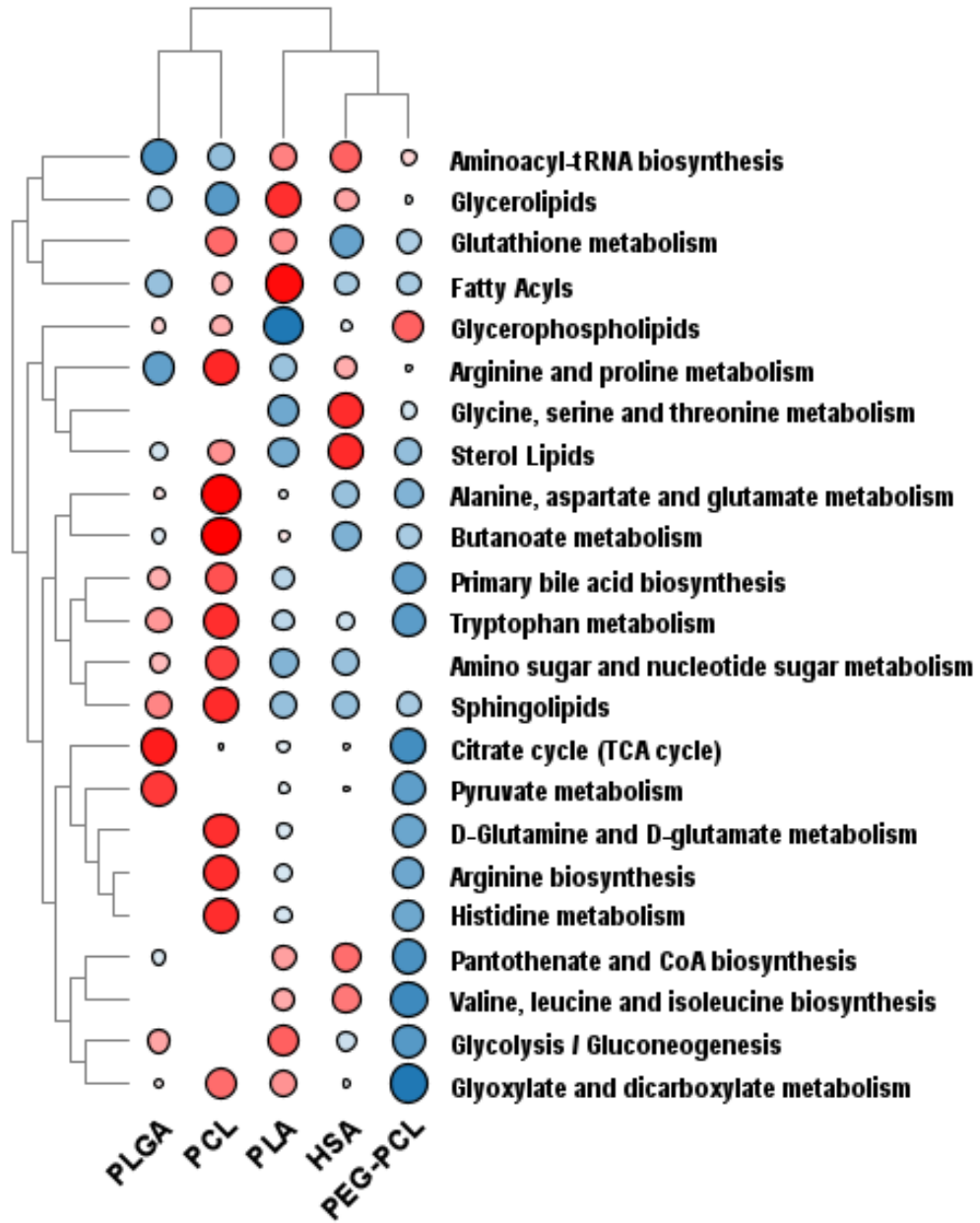
Şekil 4.21. ilaç yüklü nano partiküllerin (NNP-PCX) boş nanopartikül (NNP) grubu arasında farklılaşmaları gösteren ısı haritası grafiği.



Şekil 4.22. NNP, PCX ve kontrol grupları arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları.



Şekil 4.23. İlaç yüklü nanopartiküller (NNP-PCX) ve paklitekasel (PCX) grubu arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları.



Şekil 4.24. İlaç yüklü nanopartikül grubu (NNP-PCX) ve NNP grupları arasında farklılaşan metabolitler kullanılarak hazırlanan yolak analizleri sonuçları.

5. TARTIŞMA

5.1. Hücre Liziz Tekniklerinin Karşılaştırılması

Hücreden arındırılmış lizat (CFL), hücrelerin liziz yoluyla parçalanması sonucu elde edilen, ancak hücre zarı ve diğer büyük hücresel bileşenlerden arındırılmış bir çözeltiyi ifade eder. CFL, sadece hücre içi bileşenleri içerir ve araştırmalarda hücresel metabolitler, enzimler, proteinler ve diğer makromoleküllerin analizinde kullanılır. Hücre liziz teknikleri, hücrelerin parçalanarak iç bileşenlerinin serbest bırakılması amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Bu teknikler arasında mekanik liziz (homojenizasyon, dondurup çözme, ultrasonikasyon, cam boncuk kullanımı), kimyasal liziz (deterjanlar, enzimler, diğer kimyasallar), osmotik liziz (hipotonik çözeltiler) ve enzimatik liziz (özellikle bitki ve bakteriyel hücreler için enzimler) gibi seçeneklere rastlamak mümkündür. Her yöntem, hücre tipi ve hedef moleküle göre seçilir çünkü bazı yöntemler belirli bileşenlere zarar verebilir veya yeterince etkili olmayabilir. Bu tez çalışmasında, en doğru hücre liziz tekniğinin seçilmesi, elde edilecek sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Hücre liziz teknikleri, hücre tipine, liziz amacıyla kullanılan maddelerin hassasiyetine ve araştırma hedeflerine göre değişiklik gösterir. Örneğin, mekanik liziz teknikleri fiziksel kuvvet kullanarak hücreleri parçalayabilirken, kimyasal liziz deterjanlar veya enzimler kullanarak hücre zarını çözebilir. Bu nedenle, hücre bileşenlerinin yapısını bozmadan ve hedef molekülleri koruyarak en uygun yöntemin seçilmesi, başarılı bir hücre lizizi ve doğru bilimsel sonuçlar için temel teşkil eder.

Hücre liziz tekniği, metabolomik çalışmalar açısından büyük önem taşır çünkü hücre içindeki metabolitlerin doğru ve bütün halde serbest bırakılması ve analiz edilmesi için gereklidir. Metabolomik analizler, hücrelerin metabolik profilini belirlemek için yapılan kapsamlı çalışmalardır ve bu analizlerin doğruluğu, elde edilen hücresel içeriklerin kalitesine bağlıdır. Yanlış veya yetersiz bir liziz tekniği, metabolitlerin bozulmasına veya kaybına neden olabilir, bu da analiz sonuçlarını yanıltıcı hale getirebilir. Dolayısıyla, hücre türüne ve hedeflenen metabolitlere en uygun liziz yönteminin seçilmesi, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için

kritiktir. Deterjanlı ve deterjansız liziz teknikleri, hücrelerin parçalanmasında kullanılan farklı yöntemler olup, her birinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Deterjanlı liziz, hücre zarını etkili bir şekilde çözerek hücre içi bileşenlerin serbest bırakılmasını sağlar ve özellikle membran proteinlerinin izole edilmesinde etkilidir. Ancak, deterjanlar bazı hücresel bileşenlere zarar verebilir. Deterjansız liziz, hücre bileşenlerine daha az zarar verir ve genellikle basit ve düşük maliyetlidir, ancak mekanik yöntemler daha uzun sürebilir ve düşük verimlilikle sonuçlanabilir.

Tez çalışmalarının bu bölümünde, hücre içi bileşenlerin en doğru şekilde serbest bırakılmasını ve elde edilen verilerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla hem deterjanlı hem de deterjansız liziz tekniklerini karşılaştırarak değerlendirdik. Hücrelerin parçalanması ve hücresel bileşenlerin serbest bırakılması sürecinde "wet" (ıslak) ve "rough" (kaba) liziz teknikleri olarak tabir ettiğimiz ve de detayları bölüm 3.1.'de sunulan liziz tekniklerinin performansı değerlendirilmiştir. 4.1. bölümünde detayları verilen sonuçlar göstermektedir ki; ıslak liziz tekniği hücre zarının etkili bir şekilde çözülmesiyle daha fazla non-polar metabolit elde edilmesini sağlamıştır. Bu durum, hücre zarının daha etkili çözülmesi ve non-polar bileşenlerin serbest kalması ile ilişkilidir. Öte yandan, kaba liziz tekniği polar metabolitlerin daha yüksek yoğunlukta elde edilmesini sağlamıştır. Bu teknik, hücre içi sıvıların daha az zararla serbest kalmasını sağlayarak polar metabolitlerin korunmasını mümkün kılmıştır. Her iki tekniğin de kendine özgü avantaj ve dezavantajları olduğu için, spesifik araştırma hedeflerine uygun liziz yöntemlerinin kombinasyonunun kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Numune hazırlama tekniğinin belirlenmesi için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında liziz teknikleri üzerine elde ettiğimiz çalışma sonuçları "Comparison of cell lysis techniques via Q-TOF LC/MS" isimli makale ile yayımlanmıştır (161). Eldeki veriler ve de güncel çalışma sonuçları dikkatle incelendiğinde çalışmanın geri kalan bölümünde mümkün mertebe en fazla sayıda metabolitin hücre kültürü ortamından geri kazanımının elde edilecek metabolom verisini zenginleştireceği dikkate alınarak çalışmalarımıza fiziksel parçalama (sıvı nitrogen ve soğuk metanol eklenmiş halde) tekniği ile devam edilmeye karar verilmiştir.

5.2. Veri İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Bu tez çalışmasında teknik hatalar, matris etkileri ve veri işleme ile normalizasyon süreçlerinden kaynaklı hatalı pozitif sonuçların önlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan stratejiler değerlendirilmiş ve de ardışık seyreltme yöntemi ile kör çözelti kullanılarak filtreleme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bu iki yöntem veri işleme basamağının gürültü piklerinden arındırılması, matristen veya başka kaynaklardan gelen piklerin örneklerle karışmaması amacıyla uygulanan yöntemlerdir.

Bölüm 2.3.1.'de ve 2.3.5.'de detayları tartışıldığı üzere, metabolomik çalışmalar hedef analitlerin önceden belirlenmediği, mümkün olan en fazla sayıda pikin tespit edilmesinin amaçlandığı çalışmalardır. Tespit edilen pik sayısı arttıkça bu piklerin arasında sahte pozitif/negatif sonuçların karışması da daha fazla olur. Yanlış pozitif sonuçlar, matris etkileri, çapraz kontaminasyon gibi nedenlerle oluşabilir. Bu etkiler, örnekte bulunmayan metabolitlerin varmış gibi tespit edilmesine yol açar. Bunu önlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden olan ardışık seyreltme yönteminde örnekler bir seri dilüsyon halinde hazırlanarak analiz basamağına eklenir ve pik eşleştirme yapılır. Bu işlemde sonra, örneklerin pik şiddetleri seyreltme faktörü ile kıyaslanarak pik şiddetlerinde aynı oranda değişim olup olmadığına bakılır (164). Kör çözelti kullanılarak gerçekleştirilen filtreleme yönteminde, sadece çözücünden oluşan bir çözelti, örnek hazırlama basamağında gerçek örneklerle aynı adımlarla muamele edilir (75). Veri işleme basamağında sinyal/gürültü oranlarına göre filtreleme yapılarak gürültü pikleri elimine edilir.

Tez çalışmaları çerçevesinde geliştirilen veri işleme stratejisinin gerçek numunelerde uygulanması sonucu elde edilecek sonuçların incelenmesi için ektopik gebelik hastalığında veri işleme yöntemlerinin karşılaştırılması planlanmış ve bu amaçla toplam 160 örnek, bölüm 3.2.'de verilen yöntemle analiz edilmiştir. Bu çalışmada, dış gebelik teşhisi için plazma metabolomik analizleri kullanılarak potansiyel biyobelirteçler araştırılmıştır. T1 (ultrason ve beta-hCG ile teşhis edilmiş dış gebelik hastaları, n = 40), T2 (cerrahi tedavi sonrası histopatoloji ile doğrulanmış dış gebelik hastaları, n = 40), P (ilk prenatal ziyarette sağlıklı hamile kadınlar, n = 40)

ve C (rutin jinekolojik muayene için gelen sağlıklı gönüllüler, n = 40) grupları LC/MS cihazı kullanılarak metabolom düzeyinde analiz edilmiştir. Çalışma sonunda tüm gruplarda ortak 4601 pik bulunmuş ve 2021 pik ardışık seyreltme yönteminde, 2369 pik ise kör çözelti kullanılarak filtre edilmiştir. Filtre edilen pikler karşılaştırma yapabilmek amacıyla ardışık seyreltme ve kör çözelti filtrelemeleri sonrası ayrı ayrı normalize edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Şekil 4.3.'de verilen PCA grafiği incelendiğinde, soldaki grafikte ardışık seyreltme ve ekstraksiyon kör çözeltisi filtrelemeleri sonrası kalan pikler arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bu sonuç bize iki veri filtreleme yönteminin benzer sonuçlar ürettiğini göstermiştir.

Veri işleme basamağında tez çalışmalarında yapılan ikinci karşılaştırma metabolit tanımlama yöntemleri arasındaki farklılıklardır. Metabolomik çalışmalarda metabolit tanımlama işlemi, bölüm 2.3.4. ve bölüm 2.3.5.'de üzerinde durulduğu üzere çok katmanlı bir süreçtir. Metabolom, farklı kimyasal yapılar, polarite, moleküler ağırlık ve izomerler gibi çeşitli özelliklere sahip binlerce metaboliti içeren geniş ve karmaşık bir bileşikler kümesidir. Bu çeşitlilik, her bir metaboliti doğru bir şekilde tanımlamayı zorlaştırır. Ayrıca, metabolit tanımlama için kullanılan referans veritabanları genellikle sınırlıdır ve tüm biyolojik sistemlerde bulunan tüm metabolitleri kapsamamaktadır, bu da bilinmeyen veya nadir bulunan metabolitlerin tanımlanmasını zorlaştırır.

Putative metabolit tanımlama, metabolomik çalışmalarda keşfedilen ve kimliği kesin olarak belirlenmemiş ancak bazı özellikleri (örneğin, kütle/yük oranı) bilinen metabolitlerin geçici olarak tanımlanmasıdır. Kütle dedektörü ne kadar hassas olursa olsun bölüm 2.3.4.'de de tartışıldığı üzere tek başına m/z değeri bir metaboliti tanımlamak için çok yetersiz kalmaktadır ve pike ait m/z değerine ek olarak örneğin alıkonma zamanı veya parçalanma pikleri gibi tanımlayıcı değerlerin de eklenmesi gerekir. Bu sorununun görece üstesinden gelme yolu laboratuvara ve kullanılan yöntemlere ait (in-house) kütüphaneler oluşturmaktır. Bu kütüphaneler laboratuvarın sıkça karşılaştığı ve ilgilendiği metabolitlerin referans standartlarının m/z değeri, alıkonma zamanı, izotop pikleri, parçalanma ürünleri gibi referans

bilgilerini toplamasıyla oluşturulur. Bu veriler kullanılan analitik yöntemle göre değişebildiğinden ancak deneysel verilerle oluşturulabilir. Analiz edilen örneklerin spektrumları, in-house kütüphanedeki referans spektrumlarla karşılaştırılır. Bu karşılaştırma, yazılım araçları kullanılarak otomatik olarak veya manuel olarak yapılabilir. Tanımlanan metabolitler, in-house kütüphanede bulunan standartlarla karşılaştırılarak doğrulanır.

Bu bilgiler ışığında aynı çalışmada yapılan putative metabolit tanımlama sonuçları, çalışmada kullanılan yöntemlerle oluşturulan in-house kütüphane ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada putative olarak tanımlanan 57 pikten 29 tanesi aynı eşleşmeyi vermiş 28 tanesi ise farklı eşleşmeler veya hatalı eşleşmeler göstermiştir. Örneğin; deoksisitidin metaboliti için 11.2 dakikada m/z değeri 144.1377 olan bir pik ile putative eşleşme sağlanmıştır. Oysa ki; deoksisitidin, sudaki çözünürlüğü son derece yüksek (15.9 g/L) polar bir moleküldür ve 11.2 dk. gibi kromatografik koşullarımızda neredeyse en apolar moleküllerin elüe olduğu bir alıkonma zamanında elüe olmamalıdır. Şekil 4.3.'de putative ve kütüphane eşleşmeleri sonrası tanımlanan metabolitler kullanılarak gerçekleştirilen yolak analizi zenginleştirme sonuçlarına ait PCA grafikleri bulunmaktadır. Soldaki grafikte ardışık seyreltme ve kör çözelti filtrelemesi sonrası farklılaşmayan sonuçlar, putative ve kütüphane eşleştirmelerinin etkisiyle birbirlerinden bariz bir şekilde farklılaşmıştır. Bu bölümde elde ettiğimiz bilgiler ışığında iki filtreleme yönteminin sonuçlar üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmadığını ancak metabolit tanımlamada kullanılan yöntemin ciddi farklılıklar yarattığı sonucuna ulaşarak, çalışmaların geri kalanında filtreleme için ekstraksiyon kör çözeltilerini, metabolit tanımlama için ise kütüphane eşleşmelerinin temel alındığı tanımlama yöntemleri kullandık. İlgili çalışmalara ait sonuçlar “Evaluation of recent data processing strategies on Q-TOF LC/MS based untargeted metabolomics” ve Plasma metabolomics for diagnostic biomarkers on ectopic pregnancy” isimleriyle yayınlanmıştır (164, 165).

5.3. MCF-7 Hücre Hatlarında Metabolomik Çalışmalar

Tez çalışmalarında bu bölümde, MCF-7 hücre hatlarında beş farklı nanopartikülün yalın ve paklitaksel yüklü halinin metabolit profillerindeki olası farklılıkları belirlemek amacıyla metabolomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Metabolomik analizler, hücrelerde bulunan çeşitli metabolitlerin detaylı profillerini çıkararak, farklı nanopartikül gruplarının metabolik etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Önceki bölümlerde de tartışıldığı üzere, metabolomik çalışmalarda en fazla sayıda metabolitin güvenilir şekilde tespit edilmesi, biyolojik sistemlerin karmaşıklığı nedeniyle zorluklar içermektedir. Bu hedef doğrultusunda, kullanılan yöntemlerde çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır.

Çalışmalar üç farklı yöntem üzerinden yürütülmüştür. Bu yöntemler, polar ve yarı polar metabolitlerin analizinde kullanılan metabolomik yöntem, daha apolar metabolitlerin analizinde kullanılan lipidomik yöntem ve kısa zincirli yağ asitleri ile şeker türevlerinin analizinde kullanılan SCFA yöntemidir. Örnek hazırlama basamağında, bölüm 5.1.'de tartışıldığı üzere hücre hatlarının lizisi amacıyla yapılan denemeler doğrultusunda hücrelerin sıvı azot kullanılarak fiziksel parçalamaya tabii tutulması ve soğuk metanol kullanılarak metabolit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi sayesinde hem metabolik aktivite durdurulup hücrelerin lizisi gerçekleştirilmiş, hem de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemini molekül gruplarına göre uyarlayarak, farklı tür metabolitlerin etkin bir şekilde ekstrakte edilmesi ve analiz edilecek metabolit çeşitliliğinin artırılması amaçlanmıştır. Polar metabolitler (örneğin, şekerler, amino asitler, nükleotitler) su gibi polar çözücülerde daha iyi çözünürken, apolar metabolitler (örneğin, yağ asitleri, steroller, lipidler) organik çözücülerde (örneğin, kloroform, eter) daha iyi çözünür. Polar metabolitlerin ekstraksiyonunda MeOH:H₂O (70:30, h/h) kullanılırken, lipid ekstraksiyonu için CHCl₃:MeOH (2:1, h/h) kullanılmış, bu durum çapraz kontaminasyon riskini azaltarak her bir metabolit grubunun daha temiz ve spesifik şekilde analiz edilmesine olanak sağlamıştır.

Metabolomik çalışmalarda kalite kontrol ve tekrar edilebilirlik konuları, güvenilir ve geçerli sonuçlar elde etmek için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, izotop işaretli iç standartlar, ekstraksiyon kör çözeltileri, kalite kontrol (QC) örnekleri, havuzlanmış örnekler ve plazma standart çözeltileri kalite kontrol amacıyla kullanılmıştır. Ekstraksiyon çözeltilerine, her yöntemdeki molekül grubuna benzer belirli derişimlerde izotop işaretli iç standartlar eklenmiştir. İç standartlar, ekstraksiyon etkinliğindeki olası varyasyonları ve alıkonma zamanlarındaki kaymaları izlemek için kullanılmıştır. Normalizasyon sırasında pikler, alıkonma zamanları kendilerine en yakın iç standart kullanılarak normalize edilmiştir. Ekstraksiyon kör çözeltileri, %0.9 NaCl çözeltisi kullanılarak gürültü piklerinin filtrelenmesinde kullanılmıştır. Havuzlanmış örnekler, tüm örneklemin karışımından oluşturulan ve tüm pikleri içerdiği kabul edilen örneklerdir, bu nedenle filtreleme ve metabolit tanımlama işlemlerinde esas alınmıştır. QC örnekler, laboratuvarın uzun dönemli kalite kontrol örnekleridir ve geçmiş dönem sonuçlarıyla karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Standart plazma çözeltisi ise tanımlanan metabolitlerin doğrulanması için kullanılmıştır. QC ve havuz örneklerde varyasyonun kabul edilebilir eşik değeri %30 ve altı olarak belirlenmiştir. %30 BSS, kompleks biyolojik örneklerdeki doğal varyasyonu tanıyarak ve veri kalitesini sağlayarak dengeli bir seçim olarak kabul edilir (166).

Bu yaklaşımlar, analitik ölçümlerin güvenilirliğini ve tekrar edilebilirliğini sağlamayı, veri setindeki tutarsız sonuçları elemeyi ve yanlış pozitif veya negatif sonuçları azaltmayı hedeflemiştir. Bulgular incelendiğinde, filtreleme işlemleri sonrası metabolomik yöntemde bulunan piklerin 3058'den 454'e, lipidomik yöntemde 31268'den 3004'e, SCFA analizlerinde ise 2451 pikten 962'ye düştüğü görülmüştür. Metabolomik verilerin büyük hacmi ve karmaşıklığı, veri işleme ve analiz süreçlerini karmaşık hale getirmektedir. Pik tanımlama, hizalama, normalizasyon ve biyolojik yorumlama gibi adımlar yüksek derecede uzmanlık gerektirir, bu nedenle metabolit tanımlama işlemi metabolomik çalışmaların en zorlu ve kritik aşamalarından biridir.

Veri işleme basamağında MZmine yazılımı kullanılmıştır. MZmine, grafiksel kullanıcı arayüzü (GUI) ve piklerin ve diğer verilerin grafiksel temsilleri sayesinde veriyi anlamayı ve sonuçları yorumlamayı basitleştirir. Modüler yapısı sayesinde, kullanıcılar veri işleme akışlarını ihtiyaçlarına göre özelleştirebilirler. Farklı analiz aşamaları (örneğin, pik tespiti, hizalama, normalizasyon) arasında geçiş yapmak ve parametreleri ayarlamak mümkündür. MZmine, kullanıcıların metabolomik verileri daha etkili ve verimli bir şekilde analiz etmelerine olanak tanır, bu da çalışmaların kalitesini ve doğruluğunu artırır.

Tez çalışmasında “İsveç-Örebro Üniversitesi Metabolomik Araştırmalar Laboratuvarı’na” ait metabolit kütüphaneleri kullanılmıştır. Tezde kullanılan analitik yöntemle dair referans bilgileri de kapsayan şekilde olmak üzere, metabolomik analizlerde 387 metabolit içeren kütüphane, lipidomik analizlerde 696 lipid içeren kütüphane, SCFA analizlerinde 136 metabolit içeren kütüphaneler kullanıldı. Kütüphane eşleşmelerinden önce iç standart değerleri kullanılarak alıkonma zamanı düzeltmeleri yapıldı. Toplamda 1219 metabolit taraması gerçekleştirilip metabolomik çalışmalarda 108, lipidomik çalışmalarda 316, SCFA analizlerinde 23, toplam 447 eşleşme şeklinde gerçekleşmiştir. Bu metabolitlerin veri işleme basamağında yapılan filtrelemeler sonucu sayıları ise metabolomik çalışmalarda 49, lipidomik çalışmalarda 193, SCFA analizlerinde 20 şeklindedir. Metabolit tanımlama basamağından elde ettiğimiz sonuçları incelediğimizde aynı molekül ağırlığına sahip birden fazla izomer eşleşmesi göze çarpmaktadır. Birçok metabolit aynı kütle veya m/z değeriyle bulunabilir ancak farklı yapısal izomerler olarak var olabilir ve bu izomerlerin ayrılması ve tanımlanması ileri seviye teknikler gerektirir. Örneğin SCFA analizleri sonuçlarında 319.0992 m/z değerine sahip fruktoz metaboliti ile aynı kütlede ve çok yakın alıkonma zamanlarında iki pik daha belirlenmiş ve bu pikler fruktoz izomerleri olarak bulgulara geçirilmiştir. Biyolojik örneklerde bulunan diğer bileşikler ya da yöntemde kullanılan kimyasallar, yani matris bileşenleri, analit sinyallerini bozarak metabolitlerin tanımlanmasını zorlaştırabilir. Bulgularda bir diğer dikkat çeken metabolit tanımlama sonucunda iyon kaynağında meydana gelen etkileşimler sonucu PC(O-34:3) lipidi [NH₄] bağlanmış olarak Cer(d18:1/24:1) lipidi ise [H₂O] kaybetmiş olarak bulgulara

geçirilmiştir. Metabolomik çalışmalarda metabolitler beklenileceği üzere düşük alıkonma zamanlarına sahipken, lipidomik yöntemde daha yüksek alıkonma zamanları gözlemlenmiştir. SCFA yöntemi ve kütüphanesi ilk kez bir hücre hattında denenmiştir.

PCA, metabolomik çalışmalarda veri boyutunun azaltılması, sınıflandırma ve örnekler arası korelasyonun tespitinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. PCA, yüksek boyutlu ve karmaşık metabolomik veri setlerini daha anlaşılabilir hale getirir ve en önemli varyasyon kaynaklarını temsil eden birkaç ana bileşen oluşturur. PCA, veri setindeki temel varyasyon kaynaklarını ortaya çıkararak biyolojik ve teknik varyasyonların nedenlerini anlamamıza yardımcı olur. Aynı zamanda farklı örnek gruplarını ayırt etmek ve sınıflandırmak için kullanılır, bu da metabolit profilleri arasındaki farkları tespit etmeyi sağlar. PCA ayrıca, veri setinde anormal veya beklenmeyen örnekleri, yani aykırı değerleri tespit ederek analizlerin doğruluğunu artırır. Metabolitler arasındaki korelasyonları inceleyerek, benzer biyolojik yollar veya süreçlerle ilişkili olabilecek metabolitleri belirlemeye yardımcı olur. Bu durum, metabolitlerin biyokimyasal yollarını ve etkileşimlerine dair ipuçları sunar. Şekil 4.15.'de sunulan grafikte, yalın haldeki nanopartiküller (yeşil küme), paklitaksel yüklü nanopartiküller (mavi küme) ve paklitaksel grubunun PCA grafiği verilmiştir. NNP ve NNP-PCX grupları belirgin şekilde ayrılmış iki kümeden oluşmaktadır. Bu iki grup arasındaki fark, ilaç yüklü olup olmama durumudur ve paklitaksel grubu da ilaç yüklü nanopartiküllerle beraber görünmektedir. Grafikte yeşil ve mavi kümeleri oluşturan noktalar, üçerli gruplar halinde görülmektedir ve bu üçerli gruplar, 5 farklı nanopartikülün de kendi içinde kümелendiğini göstermektedir.

Şekil 4.12.'de metabolomik çalışmalarda tanımlanan metabolitlerin görev aldığı yollara dair bir görsel bulunmaktadır. Grafikte, farklı metabolik yolların zenginleştirme oranları (Enrichment Ratio) ve bu yolların istatistiksel anlamlılıkları (p değeri) gösterilmektedir. Örneğin, "Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism" ve "Fatty Acid Biosynthesis" gibi yolların yüksek enrichment oranları ve

düşük p değerleri, bu yolların bu koşul altında önemli ölçüde yorumlanabileceğini gösterir.

Şekil 4.9. tanımlanan lipidlerin lipid alt gruplarına göre oransal dağılımını göstermektedir. Bu dağılım, lipidlerin biyolojik işlevlerini ve hücrel süreçlerdeki rollerini anlamak için kritiktir. Lipidlerin çeşitli alt gruplarındaki artışlar ve azalışlar, farklı biyokimyasal yollar ve metabolik süreçlerdeki değişimleri yansıtır. Bu analizler, lipid metabolizmasının belirli koşullar altında nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin hücrel işlevler üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koyar. Özellikle, belirli lipid alt gruplarında gözlemlenen değişiklikler, bu grupların hangi metabolik yollarla ilişkilendirilebileceğine dair ipuçları sunar. Bu kapsamda, lipidlerin oransal dağılımındaki değişiklikler, hastalık durumları, ilaç etkileri veya diğer biyolojik koşullar altında lipid metabolizmasının nasıl etkilendiğini anlamamıza yardımcı olur. Bu bilgiler, yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi ve biyomarkerların keşfi için değerli veriler sağlar. Lipid alt gruplarının ayrıntılı analizi, metabolik yolların daha iyi anlaşılmasına ve hücrel işlevlerin düzenlenmesinde lipidlerin oynadığı kritik rollerin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunur.

Örnek gruplarını üç farklı açıdan değerlendirmek amacıyla şekil 4.14.'de, kontrol grubuna karşılık PCX grubunda farklılaşan metabolitlere ait bir volcano grafiği sunulmuştur. Bu grafik, MCF-7 grubuna karşı PCX grubunun metabolit seviyelerindeki farklılıkları ve bu farklılıkların istatistiksel anlamlılıklarını gösterir. X eksen, değişim katsayısını (fold change, FC) $\log_2$ ölçeğinde, Y eksen ise p-değerlerini $-\log_{10}$ ölçeğinde göstermektedir. Pozitif $\log_2(FC)$ değerleri PCX grubunda metabolit seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını, negatif değerler ise azaldığını ifade eder. Renkler değişimin büyüklüğünü temsil eder; kırmızı ve turuncu renkler yüksek pozitif katlanma değişimlerini (PCX grubunda artış), mavi renkler ise negatif katlanma değişimlerini (PCX grubunda azalma) gösterir. Grafikte, gliserol-3-fosfat en yüksek F.C. değerine ($\log_2(FC) \approx 6$) ve istatistiksel anlamlılığa ($p < 0.0001$) sahiptir, bu da bu metabolitin PCX grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını gösterir. Sitrik asit ve taurin gibi metabolitler ise negatif değişimi ve yüksek istatistiksel

anamlılıkla dikkat çekmektedir, bu da bu metabolitlerin PCX grubunda azaldığını gösterir. Orta bölgede yer alan ve anlamlı olmayan noktalar, bu metabolitlerin PCX ve kontrol grupları arasında önemli bir farklılık göstermediğini işaret eder. Bu grafik, metabolit profillerindeki değişikliklerin genel bir görünümünü sunarak, belirli metabolitlerin hangi gruplarda arttığını veya azaldığını ve bu değişimlerin ne kadar anlamlı olduğunu görsel olarak göstermektedir.

Şekil 4.15.'de verilen PCA grafiğine göre NNP-PCX ve NNP grupları arasında net bir ayrım söz konusudur. İki grup arasında paklitaksel ilacı ile enkapsüle olmama farklılığı bulunmaktadır ve şekil 4.16.de verilen grafiğe göre kaproat, laktat, metilpentadekanoik asit, pantotenik asit gibi metabolitler, NNP-PCX grubunda NNP grubuna göre belirgin şekilde artmış ve istatistiksel anlamlılığa sahiptir. Sol üst köşede yer alan kreatin, L-lisin, 3-(2,4-dihidroksifenil-propanoik asit, indol-3-propanoik asit gibi metabolitler ise negatif FC değişimi ve istatistiksel anlamlılıkla dikkat çekmektedir, bu da bu metabolitlerin NNP-PCX grubunda azaldığını gösterir.

Şekil 4.16.'da verilen grafikte boş nanopartikül grubu (NNP) ile kontrol grubu arasında farklılaşan metabolitler incelendiğinde indolasetik asit ve indol-3-propanoik asit gibi metabolitlerin NNP grubunda artışı ve aynı grupta sükkinat ve n-asetilputesin metabolitlerindeki azalış bu metabolitlerin kanser veya diğer biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayabileceğini gösterebilir.

Şekil 4.19'da verilen ısı haritası grafiği NNP ve PCX gruplarının kontrol grubuna göre metabolitlerindeki değişimleri göstermektedir. Grafikte solda tanımlanmış ve istatistiksel olarak anlamlı metabolitlerin tamamı (lipidler hariç) olarak görülmektedir. Sağ üstte tanımlanan amino asitler ve sağ altta ise enerji metabolizmasında görev alan metabolitler gösterilmiştir. Bu grafiklerde PCX grubunun, boş nanopartiküllere göre özellikle enerji metabolizmasında ayrıldığını göstermektedir. Toplam 16 metabolit artış veya azalış yönünde geri kalan gruplardan ayrılmaktadır. Nanopartikül gruplarında en az değişimler HSA ve PCL nanopartiküllerinde görünürken, PEG-PCL özellikle lipid metabolizmasında değişikliklere sebep olmuş görünmektedir. Şekil 4.20.'deki grafik ilaç yüklü NNP-PCX

grubunun PCX grubuyla farklılıklarını göstermektedir. HSA grubunda aminoasitlerde belirgin düşüş görülmektedir. PCL ve PLGA enerji metabolizmasında yüksek aktivite göstermektedir. PCL nanopartikülde artış azalış yönlerinde daha keskin sonuçlar gözlenirken HSA nanopartikülü en az farklılaşan nanopartikül olarak görülmektedir. Şekil 4.21.'de enkapsüle nanopartiküllerin (NNP-PCX) boş nanopartiküllerden (NNP) farklarını incelemek amacıyla verilen grafikte, PCL nanopartikülü yüksek enerji ve aminoasit grubu aktivitesinin yanında metabolitler arasında en çok artış ve azalışın görüldüğü gruptur. PLGA nanopartikül grubu lipid benzeri metabolitlerde aktif olarak görülmektedir. PLA ve HSA en az farklılık gözlenen gruplardır.

Şekil 4.22. ile beraber, lipidlerin de dahil olduğu yolak analiz grafikleri sunulmuştur. Metabolomik yolak analizleri, hücrelerin ve organizmaların biyokimyasal ve metabolik süreçlerini derinlemesine anlamamıza yardımcı olur. Bu analizler, temel araştırmalardan klinik uygulamalara kadar geniş bir yelpazede önemli bilgiler sunar, böylece hastalıkların mekanizmalarını anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek mümkün olur. Bu grafikler, ilaç yüklü NNP-PCX grubunun PCX grubuyla olan farklılıklarını göstermektedir. PCL ve PLGA gruplarının yüksek aktivitesi bu grafikte belirgin olarak görülmektedir. HSA grubu ise pürin, biotin ve azot metabolizmalarında diğer gruplardan belirgin şekilde ayrılmaktadır. PLA grubu, lipid metabolizmasında belirgin aktivite göstermektedir. Şekil 4.23.'de verilen grafikte, ilaç yüklü nanopartikül grubu (NNP-PCX) ile boş nanopartikül grubu (NNP) arasındaki yolak aktiviteleri gösterilmiştir. Bu grafikte, PCL ve PEG-PCL gruplarının hemen her yolakta en aktif grup olarak görüldüğü, beş grubun ise birbirinden bariz farklı aktivite gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca, Şekil 4.24., NNP grubu ve PCX'in kontrol grubu (MCF-7) arasındaki yolak analizlerini göstermektedir. PCX grubu, enerji ve şeker metabolizmalarında belirgin farklılıklar göstererek diğer nanopartikül gruplarından ayrılmıştır. Bu farklılıklar, PCX'in metabolik yollarda spesifik değişikliklere neden olduğunu ve bu değişikliklerin kanser hücrelerinin metabolik profillerinde önemli etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu yolak analizleri, farklı nanopartikül gruplarının metabolik aktivitelerini ve biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini anlamak için önemli veriler sağlamaktadır. Her bir grubun farklı metabolik yollarda gösterdiği aktivite, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini ve biyouyumluluğunu değerlendirmek için kritik bilgiler sunar. Bu bilgiler, kanser tedavisinde kullanılabilecek daha etkili nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Genel çerçeveden bakacak olursak, bulgular bize nanopartiküllerin hücreler üzerinde PCX'ten bağımsız etkilerinin olabileceğini, bu etkilerin farklı kimyasal yapılara sahip nanopartikül türlerine göre farklılaştığı söylenebilir.



6. SONUÇ

Tez kapsamında ilk olarak iki farklı liziz tekniği karşılaştırılmıştır. Her yöntem, hücre tipi ve hedef moleküle göre farklılık gösterebilir. İki liziz tekniğinin de birbirine göre farklı avantajları söz konusu olmakla birlikte, çalışmaların devamında en fazla sayıda pikin görüldüğü fiziksel parçalama tekniği kullanılmıştır. Tez çalışmasının ikinci aşamasında analitik yöntemden veya veri işleme süreçlerinden kaynaklı hatalı sonuçların önlenmesi amacıyla yaygın kullanılan stratejiler incelenmiş ve ardışık seyreltme yöntemi ile kör çözelti kullanılarak filtreleme yöntemleri karşılaştırılmıştır.

Çalışmada, dış gebelik teşhisi için plazma metabolomik analizleri kullanılmış ve örnekler analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, iki filtreleme yönteminin benzer sonuçlar ürettiği ancak metabolit tanımlama yöntemlerinin sonuçları önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Bu nedenle, çalışmaların geri kalanında ekstraksiyon kör çözeltileri filtreleme yöntemi olarak, kütüphane eşleşmeleri ise metabolit tanımlama yöntemi olarak kullanılmıştır.

Tez çalışmalarının üçüncü aşamasında, MCF-7 hücre hatlarında beş farklı nanopartikülün (yalın ve paklitaksel yüklü) metabolit profillerindeki farklılıkları belirlemek için kapsamlı metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir. Metabolomik analizler, hücrelerdeki çeşitli metabolitlerin detaylı profillerini çıkararak farklı nanopartikül gruplarının metabolik etkilerini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Bu çalışmalar üç ana yöntemle yürütülmüştür: polar ve yarı polar metabolitlerin analizinde metabolomik yöntem, apolar metabolitlerin analizinde lipidomik yöntem ve kısa zincirli yağ asitleri ile şeker türevlerinin analizinde SCFA yöntemi kullanılmıştır. Hücre lizizi ve ekstraksiyon işlemleri, hücrelerin sıvı azotla fiziksel parçalanması ve soğuk metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalite kontrol ve tekrar edilebilirlik için izotop işaretli iç standartlar, ekstraksiyon kör çözeltileri, QC örnekleri, havuzlanmış örnekler ve plazma standart çözeltileri kullanılmıştır. Bu sayede analitik ölçümlerin güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği takip edilmiş, veri setindeki tutarsız sonuçlar ve yanlış pozitif veya negatif sonuçlar azaltılmıştır. Tez

çalışmasında kullanılan analitik yöntemler ve referans kütüphaneler, metabolit tanımlama sürecini desteklemiş ve toplamda 447 metabolit tanımlanmıştır. Metabolomik ve lipidomik analizlere ek olarak SCFA yönteminin hücre hatlarında ilk denemesi gerçekleştirilmiştir.

PCA analizleri, nanopartikül grupları arasındaki metabolit profillerindeki farklılıkları ortaya koymuştur. Paklitaksel yüklü ve yalın nanopartiküller arasında belirgin farklar gözlenmiş, bu farkların ilaç yüklü olup olmama durumuna bağlı olduğu tespit edilmiştir. Nanopartikül gruplarının her biri kendi içinde kümelenmiş ve belirli metabolitlerde artış veya azalışlar göstermiştir. Metabolitlerin görev aldığı yollar ve lipid alt gruplarının oransal dağılımları incelenmiş, PCX grubunun enerji metabolizmasında belirgin farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Yolak analizleri, farklı nanopartikül gruplarının metabolik aktivitelerini ve biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini anlamak için önemli veriler sağlamıştır. Bu analizler, nanopartiküllerin metabolik etkilerini ve biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini anlamak için kritik veriler sağlamaktadır. Farklı nanopartikül gruplarının metabolik aktiviteleri, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliği ve moleküler mekanizmalarını değerlendirmek için önemli bilgiler sunar.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkilerini metabolomik yaklaşımlarla detaylı bir şekilde inceleyerek, farklı nanopartikül türlerinin metabolik yollarda nasıl değişiklikler yarattığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, nanopartiküllerin hücreler üzerinde paklitaksel'den bağımsız etkilerinin olabileceği ve bu etkilerin farklı kimyasal yapılara sahip nanopartikül türlerine göre farklılaştığı söylenebilir. Bu bilgiler, kanser tedavisinde kullanılabilecek daha etkili nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal çeşitlilikleri, bu farklılıkların kaynağı olarak değerlendirilmiştir ve bu çeşitliliğin biyolojik etkiler üzerindeki rolü detaylı olarak analiz edilmiştir.

Metabolomik, biyomedikal araştırmalarda giderek daha önemli bir araç haline gelmektedir ve gelecekte hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde ve kişiselleştirilmiş tıpta önemli bir rol oynaması

beklenmektedir. Metabolomik alışmalar, büyük veri hacmi ve kompleks veri yapısı nedeniyle zorluklar içermektedir. Gelecekte, daha hassas ve yüksek çözünürlüklü analiz teknikleri, gelişmiş veri işleme algoritmaları ve kapsamlı metabolit kütüphanelerinin geliştirilmesi, metabolomik çalışmaların daha da ilerlemesini sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *The Journal of nutrition*. 2007;137(1):259S-66S.
2. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*. 2018;16:1-33.
3. Babu A, Templeton AK, Munshi A, Ramesh R. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *Aaps Pharmscitech*. 2014;15:709-21.
4. Demain AL. Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften*. 1980;67:582-7.
5. MacCracken J, Hoel D, Jovanovic L. From ants to analogues: Puzzles and promises in diabetes management. *Postgraduate medicine*. 1997;101(4):138-50.
6. Dijkstra AJ. How Chevreul (1786-1889) based his conclusions on his analytical results. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 2009;16(1):8-13.
7. Williams RJ, Berry LJ, Beerstecher Jr E. Individual metabolic patterns, alcoholism, genetotrophic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1949;35(6):265-71.
8. Dalgliesh C, Horning E, Horning M, Knox K, Yarger K. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochemical Journal*. 1966;101(3):792-810.
9. Horning EC, Horning M-G. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical chemistry*. 1971;17(8):802-9.
10. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
11. Chen CJ, Lee DY, Yu J, Lin YN, Lin TM. Recent advances in LC-MS-based metabolomics for clinical biomarker discovery. *Mass spectrometry reviews*. 2023;42(6):2349-78.
12. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 genes. *Science*. 1996;274(5287):546-67.
13. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D622-d31.
14. Bory C, Boulieu R, Chantin C, Mathieu M. Diagnosis of alcaptonuria: rapid analysis of homogentisic acid by HPLC. *Clinica Chimica Acta*. 1990;189(1):7-11.
15. Palsson BØ. *Systems biology: properties of reconstructed networks*: Cambridge university press; 2006.

16. Macedo AN, Mathiapparanam S, Brick L, Keenan K, Gonska T, Pedder L, et al. The sweat metabolome of screen-positive cystic fibrosis infants: Revealing mechanisms beyond impaired chloride transport. *ACS central science*. 2017;3(8):904-13.
17. Cheng Y, Schlosser P, Hertel J, Sekula P, Oefner PJ, Spiekerkoetter U, et al. Rare genetic variants affecting urine metabolite levels link population variation to inborn errors of metabolism. *Nature communications*. 2021;12(1):964.
18. Huang YH, Chang CY, Kuo YZ, Fang WY, Kao HY, Tsai ST, et al. Cancer-associated fibroblast-derived interleukin-1 β activates protumor C-C motif chemokine ligand 22 signaling in head and neck cancer. *Cancer science*. 2019;110(9):2783-93.
19. Dey SK, Filonov GS, Olarerin-George AO, Jackson BT, Finley LW, Jaffrey SR. Repurposing an adenine riboswitch into a fluorogenic imaging and sensing tag. *Nature chemical biology*. 2022;18(2):180-90.
20. Chen Y, Lu T, Pettersson-Kymmer U, Stewart ID, Butler-Laporte G, Nakanishi T, et al. Genomic atlas of the plasma metabolome prioritizes metabolites implicated in human diseases. *Nature Genetics*. 2023;55(1):44-53.
21. Goodman RP, Markhard AL, Shah H, Sharma R, Skinner OS, Clish CB, et al. Hepatic NADH reductive stress underlies common variation in metabolic traits. *Nature*. 2020;583(7814):122-6.
22. White PJ, Newgard CB. Branched-chain amino acids in disease. *Science*. 2019;363(6427):582-3.
23. Sovio U, Goulding N, McBride N, Cook E, Gaccioli F, Charnock-Jones DS, et al. A maternal serum metabolite ratio predicts fetal growth restriction at term. *Nature medicine*. 2020;26(3):348-53.
24. Qiu S, Cai Y, Wang Z, Xie Y, Zhang A. Decoding functional significance of small molecule metabolites. *Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie*. 2023;158:114188.
25. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology*. 1999.
26. Tavares G, Venturini G, Padilha K, Zatz R, Pereira AC, Thadhani RI, et al. 1,5-Anhydroglucitol predicts CKD progression in macroalbuminuric diabetic kidney disease: results from non-targeted metabolomics. *Metabolomics*. 2018;14(4):39.
27. Guan S-y, Liu Y-y, Guo Y, Shen X-x, Liu Y, Jin H-x. Potential biomarkers for clinical outcomes of IVF cycles in women with/without PCOS: Searching with metabolomics. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:982200.
28. Klatt S, Doecke JD, Roberts A, Boughton BA, Masters CL, Horne M, et al. A six-metabolite panel as potential blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*. 2021;7(1):94.

29. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):94.
30. Gong Y, Ji P, Yang Y-S, Xie S, Yu T-J, Xiao Y, et al. Metabolic-pathway-based subtyping of triple-negative breast cancer reveals potential therapeutic targets. *Cell metabolism*. 2021;33(1):51-64. e9.
31. Xiao Y, Ma D, Yang Y-S, Yang F, Ding J-H, Gong Y, et al. Comprehensive metabolomics expands precision medicine for triple-negative breast cancer. *Cell research*. 2022;32(5):477-90.
32. Liu P, Cai Y, Qiu S, Yang Q, Xie Y, Zhang A. Critical roles of functional molecule metabolites. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2023;10:1119588.
33. Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ, Borén J, Aguilar-Salinas CA, Aversa M, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *European heart journal*. 2021;42(47):4791-806.
34. Nam HW, Karpyak VM, Hinton DJ, Geske JR, Ho AMC, Prieto ML, et al. Elevated baseline serum glutamate as a pharmacometabolomic biomarker for acamprosate treatment outcome in alcohol-dependent subjects. *Translational Psychiatry*. 2015;5(8):e621-e.
35. Bai J, Wang MX, Chowbay B, Ching CB, Chen WN. Metabolic profiling of HepG2 cells incubated with S(-) and R(+) enantiomers of anti-coagulating drug warfarin. *Metabolomics*. 2011;7(3):353-62.
36. Baranovicova E, Racay P, Zubor P, Smolar M, Kudelova E, Halasova E, et al. Circulating metabolites in the early stage of breast cancer were not related to cancer stage or subtypes but associated with ki67 level. Promising statistical discrimination from controls. *Molecular and Cellular Probes*. 2022;66:101862.
37. Mars RA, Yang Y, Ward T, Houtti M, Priya S, Lekatz HR, et al. Longitudinal multi-omics reveals subset-specific mechanisms underlying irritable bowel syndrome. *Cell*. 2020;182(6):1460-73. e17.
38. Liang L, Rasmussen M-LH, Piening B, Shen X, Chen S, Röst H, et al. Metabolic dynamics and prediction of gestational age and time to delivery in pregnant women. *Cell*. 2020;181(7):1680-92. e15.
39. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, Bayraktar EC, Shen Y, La K, Guarecuco R, et al. Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death. *Nature*. 2019;567(7746):118-22.
40. Chen L, Wang D, Garmaeva S, Kurilshikov A, Vila AV, Gacesa R, et al. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. *Cell*. 2021;184(9):2302-15. e12.

41. Allesøe RL, Lundgaard AT, Hernández Medina R, Aguayo-Orozco A, Johansen J, Nissen JN, et al. Discovery of drug–omics associations in type 2 diabetes with generative deep-learning models. *Nature Biotechnology*. 2023;41(3):399-408.
42. Vatanen T, Jabbar KS, Ruotula T, Honkanen J, Avila-Pacheco J, Siljander H, et al. Mobile genetic elements from the maternal microbiome shape infant gut microbial assembly and metabolism. *Cell*. 2022;185(26):4921-36. e15.
43. Campos AI, Zampieri M. Metabolomics-driven exploration of the chemical drug space to predict combination antimicrobial therapies. *Molecular cell*. 2019;74(6):1291-303. e6.
44. Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*. 2020;10(7):1403.
45. Liu R, Luo C, Pang Z, Zhang J, Ruan S, Wu M, et al. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment. *Chinese chemical letters*. 2023;34(2):107518.
46. Skoll K, Palmethofer J, Lummerstorfer M, Anzengruber M, Gabor F, Wirth M. Human serum albumin nanoparticles as a versatile vehicle for targeted delivery of antibiotics to combat bacterial infections. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;50:102685.
47. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews*. 1997;28(1):5-24.
48. Christen MO, Vercesi F. Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:31-48.
49. Xin H, Chen L, Gu J, Ren X, Luo J, Chen Y, et al. Enhanced anti-glioblastoma efficacy by PTX-loaded PEGylated poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2010;402(1-2):238-47.
50. Blanco E, Sangai T, Hsiao A, Ferrati S, Bai L, Liu X, et al. Multistage delivery of chemotherapeutic nanoparticles for breast cancer treatment. *Cancer letters*. 2013;334(2):245-52.
51. Ercan A, Çelebier M, Varan G, Öncül S, Nenni M, Kaplan O, et al. Global omics strategies to investigate the effect of cyclodextrin nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;123:377-86.
52. Nicholson DE. *An introduction to metabolic pathways*: Blackwell Scientific; 1970.
53. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*. 2007;35(suppl_1):D521-D6.

54. Dunn WB, Lin W, Broadhurst D, Begley P, Brown M, Zelena E, et al. Molecular phenotyping of a UK population: defining the human serum metabolome. *Metabolomics*. 2015;11:9-26.
55. Sampson JN, Boca SM, Shu XO, Stolzenberg-Solomon RZ, Matthews CE, Hsing AW, et al. Metabolomics in epidemiology: sources of variability in metabolite measurements and implications. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2013;22(4):631-40.
56. Ferreira J, Zwinderman A. On the benjamini–hochberg method. 2006.
57. Lai L, Michopoulos F, Gika H, Theodoridis G, Wilkinson RW, Odedra R, et al. Methodological considerations in the development of HPLC-MS methods for the analysis of rodent plasma for metabonomic studies. *Molecular BioSystems*. 2009;6(1):108-20.
58. Staufner C, Haack TB, Köpke MG, Straub BK, Kölker S, Thiel C, et al. Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts. *J Inherit Metab Dis*. 2016;39(1):3-16.
59. Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Shankle WR, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2865-72.
60. Kortessniemi M, Noerman S, Kårlund A, Raita J, Meuronen T, Koistinen V, et al. Nutritional metabolomics: Recent developments and future needs. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2023;77:102400.
61. Hyötyläinen T. Analytical challenges in human exposome analysis with focus on environmental analysis combined with metabolomics. *Journal of Separation Science*. 2021;44(8):1769-87.
62. Salem MA, Perez de Souza L, Serag A, Fernie AR, Farag MA, Ezzat SM, et al. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites*. 2020;10(1):37.
63. Ali A, Abouleila Y, Shimizu Y, Hiyama E, Emara S, Mashaghi A, et al. Single-cell metabolomics by mass spectrometry: advances, challenges, and future applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019;120:115436.
64. Li Y-F, Qiu S, Gao L-J, Zhang A-H. Metabolomic estimation of the diagnosis of hepatocellular carcinoma based on ultrahigh performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *RSC advances*. 2018;8(17):9375-82.
65. Li Y, Qiu S, Zhang AH. High-throughput metabolomics to identify metabolites to serve as diagnostic biomarkers of prostate cancer. *Analytical methods*. 2016;8(16):3284-90.

66. Canelas AB, ten Pierick A, Ras C, Seifar RM, van Dam JC, van Gulik WM, et al. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Analytical chemistry*. 2009;81(17):7379-89.
67. Duportet X, Aggio RBM, Carneiro S, Villas-Bôas SG. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*. 2012;8:410-21.
68. Breier M, Wahl S, Prehn C, Fugmann M, Ferrari U, Weise M, et al. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. *PloS one*. 2014;9(2):e89728.
69. Zimmerman LJ, Li M, Yarbrough WG, Slebos RJ, Liebler DC. Global stability of plasma proteomes for mass spectrometry-based analyses. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
70. Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabolomics studies. *Journal of Chromatography A*. 2008;1189(1-2):314-22.
71. Yin P, Lehmann R, Xu G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407:4879-92.
72. Koning Wd, Dam Kv. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*. 1992;204(1):118-23.
73. Pinu FR, Villas-Boas SG, Aggio R. Analysis of Intracellular Metabolites from Microorganisms: Quenching and Extraction Protocols. *Metabolites*. 2017;7(4):53.
74. Chang MS, Ji Q, Zhang J, El-Shourbagy TA. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons. *Drug Development Research*. 2007;68(3):107-33.
75. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(6):1523-48.
76. Reis A, Rudnitskaya A, Blackburn GJ, Fauzi NM, Pitt AR, Spickett CM. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL [S]. *Journal of lipid research*. 2013;54(7):1812-24.
77. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem*. 1957;226(1):497-509.

78. Folch J, Lees M, Stanley GS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*. 1957;226(1):497-509.
79. Kaplan O, Koçak E, Çelebier M. Comparison of Different Sample Preparation Techniques for Untargeted Metabolomics Utilizing Q-TOF LC/MS and MetaboAnalyst 4.0. *Current Metabolomics and Systems Biology Formerly: Current Metabolomics*. 2021;8(1):53-60.
80. Idborg-Björkman H, Edlund P-O, Kvalheim OM, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis. *Analytical Chemistry*. 2003;75(18):4784-92.
81. Maharjan RP, Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*. 2003;313(1):145-54.
82. Kaplan O. Assit Ayırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini için Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemi Geliştirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Hacettepe Üniversitesi. 2017.
83. Croixmarie V, Umbdenstock T, Cloarec O, Moreau A, Pascussi J-M, Boursier-Neyret C, et al. Integrated comparison of drug-related and drug-induced ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry metabonomic profiles using human hepatocyte cultures. *Analytical chemistry*. 2009;81(15):6061-9.
84. Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT. Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics. *Analytical chemistry*. 2011;83(9):3406-14.
85. Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, et al. Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells. *Analytical chemistry*. 2009;81(1):174-83.
86. Sheikh KD, Khanna S, Byers SW, Fornace Jr AJ, Cheema AK. Small molecule metabolite extraction strategy for improving LC/MS detection of cancer cell metabolome. *Journal of biomolecular techniques: JBT*. 2011;22(1):1.
87. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Analytical biochemistry*. 2010;404(2):155-64.
88. Kaplan O, Oncul S, Ercan A, Çelebier M. Comparison of cell lysis techniques via q-tof lc/ms. *Mass Spectrometry Letters*. 2020;11(2):36-40.
89. Bennett BD, Yuan J, Kimball EH, Rabinowitz JD. Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nature Protocols*. 2008;3(8):1299-311.
90. Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *the plant journal*. 2000;23(1):131-42.

91. Förster J. Pathway analysis of the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. 2003.
92. Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*. 2005;24(5):613-46.
93. Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G. From Exogenous to Endogenous: The Inevitable Imprint of Mass Spectrometry in Metabolomics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(2):459-68.
94. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2006;1125(1):76-88.
95. Patti GJ. Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of separation science*. 2011;34(24):3460-9.
96. Liigand P, Liigand J, Kaupmees K, Kruve A. 30 Years of research on ESI/MS response: Trends, contradictions and applications. *Analytica Chimica Acta*. 2021;1152:238117.
97. Annesley TM. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2003;49(7):1041-4.
98. Benton HP, Ivanisevic J, Mahieu NG, Kurczy ME, Johnson CH, Franco L, et al. Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling. *Analytical chemistry*. 2015;87(2):884-91.
99. Ivanisevic J, Want EJ. From Samples to Insights into Metabolism: Uncovering Biologically Relevant Information in LC-HRMS Metabolomics Data. *Metabolites*. 2019;9(12):308.
100. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2000;11(11):942-50.
101. Sterner JL, Johnston MV, Nicol GR, Ridge DP. Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples. *J Mass Spectrom*. 2000;35(3):385-91.
102. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(12):1175-85.
103. Tohge T, Mettler T, Arrivault S, Carroll AJ, Stitt M, Fernie AR. From models to crop species: caveats and solutions for translational metabolomics. *Frontiers in plant science*. 2011;2:61.
104. Antignac J-P, Marchand P, Le Bizec B, Andre F. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*. 2002;774(1):59-66.

105. Gerssen A, McElhinney MA, Mulder PP, Bire R, Hess P, De Boer J. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;394:1213-26.
106. De Livera AM, Olshansky M, Speed TP. Statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols*: Springer; 2013. p. 291-307.
107. Li B, Tang J, Yang Q, Li S, Cui X, Li Y, et al. NOREVA: normalization and evaluation of MS-based metabolomics data. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(W1):W162-W70.
108. De Livera AM, Dias DA, De Souza D, Rupasinghe T, Pyke J, Tull D, et al. Normalizing and Integrating Metabolomics Data. *Analytical Chemistry*. 2012;84(24):10768-76.
109. Wang W, Zhou H, Lin H, Roy S, Shaler TA, Hill LR, et al. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Analytical chemistry*. 2003;75(18):4818-26.
110. Sysi-Aho M, Katajamaa M, Yetukuri L, Orešič M. Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC bioinformatics*. 2007;8(1):1-17.
111. Mashego M, Wu L, Van Dam J, Ras C, Vinke J, Van Winden W, et al. MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-13C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnology and bioengineering*. 2004;85(6):620-8.
112. Birkemeyer C, Luedemann A, Wagner C, Erban A, Kopka J. Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling. *Trends in biotechnology*. 2005;23(1):28-33.
113. Liu RH, Lin D-L, Chang W-T, Liu C, Tsay W-I, Li J-H, et al. Peer Reviewed: Isotopically Labeled Analogues for Drug Quantitation. ACS Publications; 2002.
114. Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Analytical methods*. 2014;6(9):2812-31.
115. Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*. 2002;16(3):119-28.
116. Dwek M, Alaiya A. Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues. *British journal of cancer*. 2003;89(2):305-7.
117. Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*. 2002;64(3):479-98.
118. Dhall D, Kaur R, Juneja M. Machine learning: a review of the algorithms and its applications. *Proceedings of ICRIC 2019: Recent Innovations in Computing*. 2020:47-63.

119. Wang G, Qiu M, Xing X, Zhou J, Yao H, Li M, et al. Lung cancer scRNA-seq and lipidomics reveal aberrant lipid metabolism for early-stage diagnosis. *Science Translational Medicine*. 2022;14(630):eabk2756.
120. Crawford L, Morrison JD. Computer methods in analytical mass spectrometry. Identification of an unknown compound in a catalog. *Analytical chemistry*. 1968;40(10):1464-9.
121. Kind T, Fiehn O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*. 2010;2(1):23-60.
122. Salek RM, Steinbeck C, Viant MR, Goodacre R, Dunn WB. The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience*. 2013;2(1).
123. Fiehn O, Robertson D, Griffin J, van der Werf M, Nikolau B, Morrison N, et al. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007;3:175-8.
124. Kodra D, Pousinis P, Vorkas PA, Kademoglou K, Liapikos T, Pechlivanis A, et al. Is current practice adhering to guidelines proposed for metabolite identification in lc-ms untargeted metabolomics? a meta-analysis of the literature. *Journal of Proteome Research*. 2021;21(3):590-8.
125. Evans AM, O'Donovan C, Playdon M, Beecher C, Beger RD, Bowden JA, et al. Dissemination and analysis of the quality assurance (QA) and quality control (QC) practices of LC–MS based untargeted metabolomics practitioners. *Metabolomics*. 2020;16(10):113.
126. Zhang Y, Liao J, Le W, Wu G, Zhang W. Improving the Data Quality of Untargeted Metabolomics through a Targeted Data-Dependent Acquisition Based on an Inclusion List of Differential and Preidentified Ions. *Analytical Chemistry*. 2023;95(34):12964-73.
127. Theodoridis G, Gika H, Raftery D, Goodacre R, Plumb RS, Wilson ID. Ensuring Fact-Based Metabolite Identification in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*. 2023;95(8):3909-16.
128. Pirhaji L, Milani P, Leidl M, Curran T, Avila-Pacheco J, Clish CB, et al. Revealing disease-associated pathways by network integration of untargeted metabolomics. *Nature methods*. 2016;13(9):770-6.
129. Rosato A, Tenori L, Cascante M, De Atauri Carulla PR, Martins dos Santos VA, Saccenti E. From correlation to causation: analysis of metabolomics data using systems biology approaches. *Metabolomics*. 2018;14:1-20.
130. Domingo-Almenara X, Montenegro-Burke JR, Guigas C, Majumder EL-W, Benton HP, Siuzdak G. Autonomous METLIN-guided in-source fragment annotation for untargeted metabolomics. *Analytical chemistry*. 2019;91(5):3246-53.
131. Kuhl C, Tautenhahn R, Bottcher C, Larson TR, Neumann S. CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid

- chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical chemistry*. 2012;84(1):283-9.
132. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*. 2006;78(3):779-87.
 133. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*. 2010;11(1):1-11.
 134. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*. 2015;12(6):523-6.
 135. Frainay C, Schymanski EL, Neumann S, Merlet B, Salek RM, Jourdan F, et al. Mind the gap: mapping mass spectral databases in genome-scale metabolic networks reveals poorly covered areas. *Metabolites*. 2018;8(3):51.
 136. Shao F, Li R, Guo Q, Qin R, Su W, Yin H, et al. Plasma metabolomics reveals systemic metabolic alterations of subclinical and clinical hypothyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2023;108(1):13-25.
 137. Wang Z, Tang J, Jin E, Zhong Y, Zhang L, Han X, et al. Serum untargeted metabolomics reveal potential biomarkers of progression of diabetic retinopathy in Asians. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022;9:871291.
 138. Belk WP, Sunderman FW. A Survey of the Accuracy of Chemical Analyses in Clinical Laboratories. *American Journal of Clinical Pathology*. 1947;17(11):853-61.
 139. Williams RJ, Pelton RB, Hakkinen H-M, Rogers LL. Identification of blood characteristics common to alcoholic males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1958;44(2):216-22.
 140. Gibon Y, Rolin D. Aspects of experimental design for plant metabolomics experiments and guidelines for growth of plant material. *Plant metabolomics: methods and protocols*. 2012:13-30.
 141. Khan SR, Whiteman DC, Kimlin MG, Janda M, Clarke MW, Lucas RM, et al. Effect of solar ultraviolet radiation exposure on serum 25 (OH) D concentration: a pilot randomised controlled trial. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2018;17(5):570-7.
 142. Carraro P, Zago T, Plebani M. Exploring the Initial Steps of the Testing Process: Frequency and Nature of Pre-Preanalytic Errors. *Clinical Chemistry*. 2012;58(3):638-42.
 143. Pinto J, Domingues MRM, Galhano E, Pita C, do Céu Almeida M, Carreira IM, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst*. 2014;139(5):1168-77.

144. Comstock GW, Burke AE, Norkus EP, Gordon GB, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. *Clinical Chemistry*. 2001;47(1):139-42.
145. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow. *Annual review of biochemistry*. 2017;86:277-304.
146. Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*. 2021;18(7):747-56.
147. Gika HG, Macpherson E, Theodoridis GA, Wilson ID. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography–TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. *Journal of Chromatography B*. 2008;871(2):299-305.
148. Gika HG, Theodoridis GA, Wingate JE, Wilson ID. Within-Day Reproducibility of an HPLC–MS-Based Method for Metabonomic Analysis: Application to Human Urine. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(8):3291-303.
149. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*. 2011;6(7):1060-83.
150. Van Der Kloet FM, Bobeldijk I, Verheij ER, Jellema RH. Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *Journal of proteome research*. 2009;8(11):5132-41.
151. Hendriks MM, van Eeuwijk FA, Jellema RH, Westerhuis JA, Reijmers TH, Hoefsloot HC, et al. Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011;30(10):1685-98.
152. Liu KH, Nellis M, Uppal K, Ma C, Tran V, Liang Y, et al. Reference standardization for quantification and harmonization of large-scale metabolomics. *Analytical chemistry*. 2020;92(13):8836-44.
153. Lippa KA, Aristizabal-Henao JJ, Beger RD, Bowden JA, Broeckling C, Beecher C, et al. Reference materials for MS-based untargeted metabolomics and lipidomics: a review by the metabolomics quality assurance and quality control consortium (mQACC). *Metabolomics*. 2022;18(4):24.
154. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(10):733-9.
155. Wang S-Y, Kuo C-H, Tseng YJ. Batch Normalizer: A Fast Total Abundance Regression Calibration Method to Simultaneously Adjust Batch and Injection Order Effects in Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry-

- Based Metabolomics Data and Comparison with Current Calibration Methods. *Analytical Chemistry*. 2013;85(2):1037-46.
156. Kind T, Tolstikov V, Fiehn O, Weiss RH. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer. *Analytical biochemistry*. 2007;363(2):185-95.
 157. Millard P, Letisse F, Sokol S, Portais J-C. IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(9):1294-6.
 158. Cho K, Mahieu NG, Johnson SL, Patti GJ. After the feature presentation: technologies bridging untargeted metabolomics and biology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;28:143-8.
 159. Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, Smirnov A, Myers O, Dyrland TS, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature biotechnology*. 2023;41(4):447-9.
 160. Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Molecular cell*. 2015;58(4):699-706.
 161. Kaplan O, Öncül S, Ercan A, Çelebier M. Comparison of cell lysis techniques via q-tof lc/ms. *Mass Spectrometry Letters*. 2020;11(2):36-40.
 162. Varan G, Patrulea V, Borchard G, Bilensoy E. Cellular Interaction and Tumoral Penetration Properties of Cyclodextrin Nanoparticles on 3D Breast Tumor Model. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(2).
 163. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:395.
 164. Ozan K, Mustafa Ç. Evaluation of recent data processing strategies on Q-TOF LC/MS based untargeted metabolomics. *Mass Spectrometry Letters*. 2020;11(1):1-5.
 165. Kaplan O, Ertürk Aksakal S, Fidan BB, Engin-Üstün Y, Çelebier M. Plasma metabolomics for diagnostic biomarkers on ectopic pregnancy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2024:1-9.
 166. Karaman I. Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis. In: Sussulini A, editor. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 145-61.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Raporu



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ETLİK ZÜBEYDE HANIM KADIN HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi: 27.01.2021

Karar No: 2021/15

27.01.2021 tarihinde Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul'u Doç. Dr. Fulya KAYIKÇIOĞLU başkanlığında Türk ilaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun sağladığı link (birlikte.titck.gov.tr) vasıtasıyla isteyenlerin online katılımı ile toplantı yeter sayısı sağlanarak toplandı.

Toplantıda Sorumlu Araştırmacı Op. Dr. Sezin ERTÜRK AKSAKAL tarafından başvurusu yapılan **"Ektopik gebelikte yeni diagnostik biyobelirteçlerin tanımlanması"** klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, revizyon sonrası kabulüne oy birliği ile karar verilmiştir.

Çalışmada istenen revizyonlar aşağıda belirtilmiştir;

1. Materyal Metot' un revize edilmesi
 - a. Grup 2'ye dahil edilecek hastalar için "ya da cerrahi" ibaresinin çıkarılması ve o grubun sadece "cerrahi" geçiren ve histopatolojik olarak ektopik gebelik doğrulanan olgular şeklinde düzeltilmesi.
 - b. Çalışmaya dahil edilecek olguların "Hassas popülasyon" olarak tanımlanmasının "Hastalar" olarak düzeltilmesi.
2. Araştırmacıların çalışmadaki görev dağılımının detaylı bir şekilde verilmesi.
3. Çalışma onam formunun, çalışmanın amacını ve bilime katkısını kısaca belirtecek şekilde revize edilmesi.

Doç. Dr. Fulya Kayıkçioğlu

Etik Kurul Başkanı

Doç. Dr. İstemi Han Çelik

Etik Kurul Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Berna Dilbaz

Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Salim Erkaya

Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ali Turhan Çağlar

Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Şevki Çelen

Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Özlem Evliya Bozkurt

Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Çiğdem Özer

Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Ömer Lütfi Tapısız

Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nüket P. Erdaydar

Öğretim Üyesi

EK-2: Orjinallik Raporu

turnitin Yeni Görünümüne git

Ozan Kaplan | Ozan Kaplan Önce

1 / 1

22
T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ

%2

Sıra	Referans	Oran
1	dergipark.org.tr	%<1
2	sciencesseer	%<1
3	www.cerimobil.org	%<1
4	Benay, Hacı Elvan Del...	%<1
5	TEKEL, Zülfa, İlçin...	%<1
6	www.ilegri.org	%<1
7	disponibilite	%<1
8	openaccess.hacettepe...	%<1
9	Hoy-Yon, J. Wang, Hsiao...	%<1
10	pin.kingpin.com	%<1
11	TUTU, Sunan, Özdemir...	%<1
12	Ezri University no gne...	%<1
13	Hacettepe University n...	%<1

EK-3: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Ozan Kaplan
Ödev başlığı:	MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ M...
Gönderi Başlığı:	Ozan Kaplan Dr tez
Dosya adı:	ozankaplanTEZ_jurison.docx
Dosya boyutu:	5.51M
Sayfa sayısı:	98
Kelime sayısı:	19,143
Karakter sayısı:	140,256
Gönderim Tarihi:	04-Tem-2024 03:34ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2412466318

TC,
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRE HATTINDA LC/MS TEMELLİ
METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALAR

Uzm. BİL. OZAN KAPLAN

AKADEMİK KİMLİK PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

Copyright 2024 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

