T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOLE BAĞLI OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI TEDAVİSİNDE NANO-ENKAPSÜLE İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİN LC/Q-TOF MS İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALARLA İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Yasin ŞENOL

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOLE BAĞLI OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI TEDAVİSİNDE NANO-ENKAPSÜLE İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİN LC/Q-TOF MS İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALARLA İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Yasin ŞENOL

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

ANKARA
2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOLE BAĞLI OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI TEDAVİSİNDE NANO-ENKAPSÜLE İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİN Q-TOF LC/MS İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN LİPİDOMİK ÇALIŞMALARLA İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: Ecz. Yasin ŞENOL

Danışman: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Bu tez çalışması 27.01.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sedef KIR

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Ab.D.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Ab.D.

Üye: Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Ab.D.

Üye: Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ab.D.

Üye: Prof. Dr. Nursabah E. BAŞCI AKDUMAN

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Ab.D.

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

23 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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.

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

…… /……/……

(İmza)

Ecz. Yasin ŞENOL

i

---

[i] *"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*

*(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** 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 **danışmanının** 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 **danışmanının** 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, Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Yasin ŞENOL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, sabrı, bilgisi ve yol göstericiliğiyle ufkumu genişleten benim için çok değerli olan sayın hocam Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER'e,

Analitik Kimya eğitimim boyunca teorik ve pratik derslerde aktardıkları eşsiz bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalımızın tüm Saygıdeğer Hocalarına ve destekleri için değerli arkadaşlarım Ecz. Merve NENNİ, Bilm. Uzm. Kim. Ozan KAPLAN ve Bilge Başak FİDAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca bana destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Şenol, Y. Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması Tedavisinde Nano-Enkapsüle İlaçların Etkinliğinin LC/Q-TOF MS ile Gerçekleştirilen Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarla in vitro Değerlendirilmesi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Bu tez çalışmasında alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığı (NAFLD) tedavisinde İnsan Serum Albumin (İSA) nanopartiküller kullanılarak geliştirilen E vitamini yüklü nanopartiküllerin tedavi etkinliği LC/Q-TOF MS temelli metabolomik çalışmalarla incelenmiştir. Bu amaçla; boş İSA nanopartiküller (Grup C), E vitamini yüklü nanopartiküller (Grup T) ve E vitamini HEPG2 karaciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Her üç grup için (Grup C, T ve E) elde edilen sitozolik fraksiyonlar apolar/polar faz karışımıyla ekste edilmiştir. Elde edilen metabolit ve lipid fraksiyonları LC/Q-TOF MS cihazı kullanılarak C18 kolon ile gradiyent elüsyon programı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen ham kromatogramlar en yüksek sayıda metabolitin ve lipidin profillene bilmesi amacıyla güncel veri işleme süreçlerine tabi tutulmuştur. Tespit edilen pikler normalize edilip gruplar arasındaki farklılaşmalar incelenmiştir. Temel bileşenler analizi sonucu gruplar için metabolit ve lipit profillerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Metabolomik çalışmalarda tespit edilen 1969 pik veri işleme sonucu gruplar arasında istatistiksel ($p<0.05$) olarak farklı olduğu görülen ve de en az 1.5 kat farklılaşmış 247 pike indirgenmiştir. Bu piklerden 18 tanesi ile eşleşen 44 adet metabolit incelemeye alınmıştır. Farklılaşan metabolit ve lipit profili yorumlanıp nano-enkapsüle E vitamini kullanımının avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipidomik, metabolomik, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması, E vitamini, nanopartikül, kütle spektrometrisi

ABSTRACT

Senol, Y. In vitro Evaluation of the Efficacy of Nano-Encapsulated Drugs in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver by Metabolomic and Lipidomic Studies Performed with LC/Q-TOF MS. Hacettepe University Graduate School Health Sciences Analytical Chemistry Program Master's Thesis, Ankara, 2022. In this thesis, the efficacy of vitamin E loaded nanoparticles developed using Human Serum Albumin (ISA) nanoparticles in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) was investigated by LC/Q-TOF MS-based metabolomics studies. To this end; blank NSA nanoparticles (Group C), vitamin E loaded nanoparticles (Group T) and vitamin E were applied to HEPG2 liver cancer cell lines. The cytosolic fractions obtained for all three groups (Groups C, T and E) were extracted with apolar/polar phase mixture. Obtained metabolite and lipid fractions were analyzed using the LC/QTOF MS instrument using a gradient elution program with a C18 column. The obtained raw chromatograms were subjected to up-to-date data processing processes in order to profile the highest number of metabolites and lipids. The detected peaks were normalized and the differences between the groups were examined. As a result of principal component analysis, it was observed that the metabolite and lipid profiles for the groups were different from each other. The 1969 peak data processing result detected in metabolomic studies was reduced to 247 peaks, which were statistically ($p<0.05$) different between the groups and differed at least 1.5 times. 44 metabolites matching with 18 of these peaks were examined. Differentiating metabolite and lipid profiles were interpreted and the advantages and disadvantages of using nanoencapsulated E vitamin were evaluated.

Keywords: Lipidomics, metabolomics, non-alcoholic fatty liver disease, vitamin E, nanoparticle, mass spectrometry

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması	4
2.2. E Vitamini	7
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemi Olarak Nanopartiküller	8
2.3.1. Klinikte Kullanılan Nanopartiküller	9
2.3.2. İnsan Serum Albumin Nanopartiküller	12
2.4. Lipitler ve Lipidomik Yaklaşımlar	13
2.4.1. Lipitler	13
2.4.2. Lipitlerin Genel Yapısı	13
2.4.3. Metabolomik Yaklaşımlarda Lipit Metabolizmasının Önemi	14
2.4.4. Metabolomik ve Lipidomik Teriminin Tanımı	14
2.4.5. Metabolomik ve Lipidomik Yaklaşımın Tarihçesi	16
2.4.6. Lipit Biyoinformatiğinin Metabolomik Çalışmalarda Önemi	17
2.5. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda Kullanılan Ayırım Teknikleri	18
2.5.1. Kromatografik Teknikler	18
2.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış	20
2.7. Kütle Spektroskopisine Genel Bakış	21
2.7.1. Kütle Spektrometre Cihazının Genel Yapısı	22

2.7.2. Elektrosprey İyonizasyon 24
2.7.3. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi 25
2.8. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda R Programlama Dili, XCMS ve Önemi 26
3. GEREÇ ve YÖNTEM 28
3.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmaların Özeti 28
3.2. İSA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 31
3.2.1. E Vitamini yüklü İSA Nanopartiküllerin Hazırlanmas 31
3.2.2. Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu 32
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları 32
3.4. Analiz Edilecek Numunelerin Hazırlanması 32
3.5. Ardışık Seyreltme Yöntemi ile Numunelerin Hazırlanması 33
3.6. Sistem Uygunluk Testi 34
3.7. LC/Q-TOF MS ile Metabolitlerin ve Lipitlerin Hedeflenmemiş Analizi için Cihaz Parametereleri 34
3.8. LC/Q-TOF MS ile Metabolitlerin ve Lipitlerin Hedeflenmemiş Analizi için Kromatografik Parametreler 36
3.8.1. UPLC/Q-TOF MS Enstrümantal Koşullar 36
3.8.2. Metabolit Fraksiyonunun Analizi 36
3.8.3. Lipit Fraksiyonunun Analizi 36
3.9. XCMS ve MS Excel ile Kromatogramlardaki Verileri İşleme Çalışmaları 37
3.9.1 Ham Data Dosyalarının XCMS'e Uygun Olarak Dönüştürülmesi 37
3.9.2. XCMS Programının Kurulumu 37
3.9.3. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu 38
3.9.4. XCMS Analizleri 39
3.9.5. XCMS Sonuç Tablosunun MS Excel'de İşlenmesi 40
3.10. İşlenmiş Kromatogram Verisi sonucu tespit edilen Metabolit piklerin MetaboAnalyst 5.0 aracılığıyla İşlenmesi 41
3.11. XCMS ile İşlenen Metabolomik ve Lipidomik Verinin Temel Bileşenler Analizi ile Yorumlanması 46

4. BULGULAR 47
4.1. E Vitamini Yüklü İSA Karakterizasyonu 47
4.2. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalara Ait Kromatogramlar 47
4.3. Ham Kromatogramların XCMS ve MS Excel ile İşlenmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular 50
4.4.İşlenmiş Kromatogram Verisi Sonucu Tespit Edilen Piklerin MetaboAnalyst 5.0 Aracılığıyla İşlenmesi Sonucu Eşleşme Sağlanan Metabolitler 50
4.5. Eşleşme Sağlanan 44 Metabolitin HMDB (İnsan Metabolom Veribankası) Bilgisi 65
4.5.1. L-histidin 65
4.5.2. N-metiltiramin 65
4.5.3. N-metilfeniletanolamin 66
4.5.4. 2-oksoarjinin 66
4.5.5. N(ω)-hidroksiarjinin 67
4.5.6. Aspartilglikozamin 68
4.5.7. S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid 69
4.5.8. S-(3-metilbutanoil) dihidrolipoamid-E 69
4.5.9. Pantetein 70
4.5.10. S-(2-kloroasetil) glutatyon 71
4.5.11. 2-(S-glutatyonil) asetil klorür 71
4.5.12. Prostoglandin H2 72
4.5.13. Prostaglandin E2 73
4.5.14. Prostaglandin D2 74
4.5.15. Prostaglandin I2 75
4.5.16. Tromboksan A2 76
4.5.17. (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksiprost-13-enoik asit 77
4.5.18. 13,14-dihidro-15-keto-PGE2 77
4.5.19. 20-hidroksi-lökotrien B4 78
4.5.20. Lipoksin A4 79
4.5.21. Lipoksin B4 80

4.5.22. NPC 81
4.5.23. 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al 81
4.5.24. 7α,12α-dihidroksi-5β-kolestan-3-on 82
4.5.25. 20α,22β-dihidroksi kolesterol 83
4.5.26. 7α,27-dihidroksi kolesterol 83
4.5.27. (24S)-7α,24-dihidroksi kolesterol 84
4.5.28. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit 85
4.5.29. α-tokotrienol 85
4.5.30. Kenodeoksikolik asit 86
4.5.31. Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı 87
4.5.32. K1 Vitamini 87
4.5.33. Ürobilinojen 88
4.5.34. PA(P-16:0/18:2(9Z,12Z)) 89
4.5.35. Koproporfirinojen III 90
4.5.36. Koproporfirinojen I 92
4.5.37. PA (16:0/16:0) 92
4.5.38. Glukozilseramid 93
4.5.39. 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on 94
4.5.40. 17α,20α-dihidroksi kolesterol 94
4.5.41. 7α,25-dihidroksi kolesterol 95
4.6. Metabolomik ve Lipidomik Çalışma Sonucu Grup C, Grup T ve Grup E Arasında Farklılaşmayı Gösteren PCA grafikleri 96
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 98
6.KAYNAKLAR 105
7. EKLER
Ek 1. MS Excel Veri İşleme Sonucu Elde Edilen 247 Pik
Ek 2. KEGG Veri Bankası Sonuçları
Ek 3. Turnitin Ekran Görüntüsü
Ek 4. Turnitin Dijital Makbuz
8. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

CE	Kapiler elektroforez
ESI	Elektrosprey iyon kaynağı
GC	Gaz kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İSA	İnsan serum albumin
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
MS	Kütle spektrometrisi
m/z	Kütle/yük oranı
NAFLD	Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı
NASH	Alkole bağlı olmayan steatohepatit
NP	Nanopartikül
Q-TOF MS	Kuadropol uçuş zamanlı-kütle spektrometrisi

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
1.1.	Omik yaklaşımların şematik gösterimi.	2
2.1.	Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanmasının ilerleyişi ve hepatosellüler karsinom oluşumu.	4
2.2.	Diyabetli hastada NAFLD. İltihaplı bölgeler (kısa oklar) ve fibrotik doku birikimi (uzun oklar) ile birlikte steatoz (kalın oklar) [16].	5
2.3.	Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer. Siyah okla gösterilen büyük ve küçük damlacıklar, beyaz okla gösterilen makroveziküler steatoz ve lipogranülom [23].	6
2.4.	Tokoferol ve tokotrienol yapısı. Daireler, tokoferollerdeki 2’, 4’ ve 8’ olmak üzere üç kiral merkezi göstermektedir [16, 17].	8
2.5.	Dendrimerin şematik gösterimi [31].	10
2.6.	Misellerin şematik gösterimi [31].	10
2.7.	Nanoküre genel yapısı [31].	11
2.8.	Nanokapsülün genel yapısı.	11
2.9.	Nanotüpler (A) ve fullerenlerin (B) genel yapısı [31].	11
2.10.	Lipozomun genel yapısı.	12
2.11.	Sekiz adet lipitin molekül yapısı [45].	13
2.12.	HPLC’nin genel yapısı.	20
2.13.	Kütle spektrometresi genel şeması.	23
2.14.	ESI’nin pozitif iyon modunda çalışma şekli.	24
2.15.	Q-TOF MS cihazı genel yapısı.	25
2.16.	XCMS Çalışma Algoritması.	27
3.1.	Yöntem geliştirme basamağını gösteren şema.	29
3.2.	Agilent 6530 LC/Q-TOF MS sistemi.	35
3.3	ProteoWizard yazılımı ekranı.	37
3.4.	XCMS kurulumu için kullanılan kod.	38
3.5.	IPO yazılımı için kullanılan kod.	38
3.6.	IPO optimizasyon kodu.	39

3.7. Kullanılan XCMS kodu. 40
3.8. Örnek XCMS veri çıktısı. 40
3.9. Örnek normalize pik şiddetleri tablosu. 41
3.10. MetaboAnalyst 5.0'a giriş ekranının çıktısı. 42
3.11. MetaboAnalyst 5.0'da "Functional Analysis" sekmesi ekran çıktısı. 43
3.12. MetaboAnalyst 5.0 parametre seçim ekranı çıktısı. 44
3.13. Veri bütünlüğü kontrol ekranı. 45
3.14. MetaboAnalyst 5.0 – "Metabolite ID Conversion" uygulaması ekran çıktısı. 46
4.1. Metabolomik çalışmalara ait Grup C, E ve T toplam iyon kromatogramı. 48
4.2. Lipidomik çalışmalara ait Grup C, E ve T toplam iyon kromatogramı. 49
4.3. XCMS analizi sonucu elde edilen 1969 pikin, veri işleme sonucu Grup C ve Grup T arasında değişim gösteren 247 pike indirgenmesini gösteren şema. 50
4.4. Grup C ve Grup T arasında değişim gösteren 247 pikin MetaboAnalyst 5.0 ile işlenmesi sonucu kalan ve çalışma kapsamında incelemeye alınmış 44 metaboliti içeren süreci gösteren şema. 51
4.5. L-histidin, N-metiltiramin, N-metilfeniletanolamin, 2-Oksoarjinin, N(ω)-hidroksiarjinin metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 56
4.6. Aspartilglukozamin piki. 56
4.7. S-(2-metilbutanol) dihidroksilipoamid, S-(3-metilbutanoil) dihidroksilipoamid-E metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 57
4.8. Pantetein metabolityle eşleşen kromatogram. 57
4.9. S-(2-kloroasetil) glutatyon, 2-(S-glutatyonil) asetilklorid metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 58
4.10. Prostaglandin H2, Prostaglandin E2, Prostaglandin D2, Prostaglandin I2, Tromboksan A2, (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit, 13,14-dihidroksi-15-keto-PGE2, 20-hidroksi-lökotrien B4, Lipoksin A4, Lipoksin B4 metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 58
4.11. NPC metabolitiyle eşleşen kromatogram. 59

4.12. 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al, 7α,12α-dihydroxy-5β-kolestan-3-on, 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on, (20R)-17α,20-dihidroksikolestrol, 20α,22β-dihidroksikolestrol, 7α,27-dihidroksikolestrol, 7α,24S-dihidroksikolestrol, 7α,25-dihidroksikolestrol, metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 59

4.13 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit, α-tokotrienol metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 60

4.14. Kenodeoksikolik asit, Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı metabolitleriyle eşleşen kromatogram. 60

4.15. K1 Vitamini metabolitiyle eşleşen kromatogram. 61

4.16. Ürobilinojen metabolitiyle eşleşen kromatogram. 61

4.17. PA(P-16:0e/18:2(9Z,12Z)) metabolitiyle eşleşen kromatogram. 62

4.18. Ürobilinojen metabolitiyle eşleşen kromatogram. 62

4.19. Koproporfinojen III, Koproporfinojen I metabolitleriyle eşleşen kromatogram - 1. 63

4.20. Koproporfinojen III, Koproporfinojen I metabolitleriyle eşleşen kromatogram - 2. 63

4.21. PA(16:0/16:0) metabolitiyle eşleşen kromatogram. 64

4.22. Glukozilseramid metabolitiyle eşleşen kromatogram. 64

4.23. L-histidin genel yapısı [95]. 65

4.24. N-metiltiramin genel yapısı [96]. 66

4.25. N-metilfeniletanolamin genel yapısı [97]. 66

4.26. 2-oksoarjinin genel yapısı [98]. 67

4.27. N(ω)-hidroksiarjinin genel yapısı [99]. 68

4.28. Aspartilglikozamin genel yapısı [100]. 68

4.29. S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid genel yapısı [101]. 69

4.30. S-(3-metilbutanoil) dihidrolipoamid-E genel yapısı [102]. 70

4.31. Pantetein genel yapısı [103]. 70

4.32. S-(2-kloroasetil) glutatyon genel yapısı [104]. 71

4.33. 2-(S-glutatyonil) asetil klorid genel yapısı [105]. 72

4.34. Prostoglandin H2 genel yapısı [106]. 73

4.35. Prostaglandin E2 genel yapısı [107]. 74
4.36. Prostaglandin D2 genel yapısı [108]. 75
4.37. Prostaglandin I2 genel yapısı [109]. 76
4.38. Tromboksan A2 genel yapısı [110]. 76
4.39. (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit genel yapısı [111]. 77
4.40. 13,14-dihidro-15-keto-PGE2 genel yapısı [112]. 78
4.41. 20-hidroksi-lökotrien B4 genel yapısı [113]. 79
4.42. Lipoksin A4 genel yapısı [114]. 80
4.43. Lipoksin B4 genel yapısı [115]. 80
4.44. NPC genel yapısı [116]. 81
4.45. 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al genel yapısı [117]. 82
4.46. 7α,12α-dihidroksi-5β-kolestan-3-on genel yapısı [118]. 83
4.47. 20α,22β-dihidroksi kolesterol genel yapısı [119]. 83
4.48. 7α,27-dihidroksi kolesterol genel yapısı [120]. 84
4.49. (24S)-7α,24-dihidroksi kolesterol genel yapısı [121]. 84
4.50. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit genel yapısı [122]. 85
4.51. α-tokotrienol genel yapısı [123]. 86
4.52. Kenodeoksikolik asit genel yapısı [124]. 86
4.53. Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı genel yapısı [125]. 87
4.54. K1 vitamini genel yapısı [126]. 88
4.55. Ürobilinojen genel yapısı [127]. 89
4.56. PA(P-16:0/18:2(9Z,12Z)) genel yapısı [128]. 90
4.57. Koproporfirinojen III genel yapısı [129]. 91
4.58. Koproporfirinojen I genel yapısı [130]. 92
4.59. PA(16:0/16:0) genel yapısı [131]. 93
4.60. Glukozilseramid genel yapısı [132]. 94
4.61. 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on genel yapısı [133]. 94
4.62. 17α,20α-dihidroksi kolesterol genel yapısı [134]. 95
4.63. 7α,25-dihidroksi kolesterol genel yapısı [135]. 95
4.64. Metabolomik çalışmaya ait PCA grafiği. 96
4.65. Lipidomik çalışmaya ait PCA grafiği. 97

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Kromatografik yöntemlerin sınıflaması.	18
3.1.	Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.	30
3.2.	Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.	31
3.3.	Dilüsyon serisi hazırlama yöntemi.	33
3.4.	Sistem uygunluk numunesi içeriği.	34
3.5.	LC/Q-TOF MS parametreleri	35
4.1.	Boş ve E vitamini yüklü İSA nanopartiküllerin in vitro karakteristikleri.	47
4.2.	Metabolomik çalışmalar sonucu Grup T, Grup E ve Grup C arasında değişime uğradığı tespit edilen 18 metabolit piki ve piklerin eşleştiği 44 metaboliti gösteren liste.	52

1. GİRİŞ

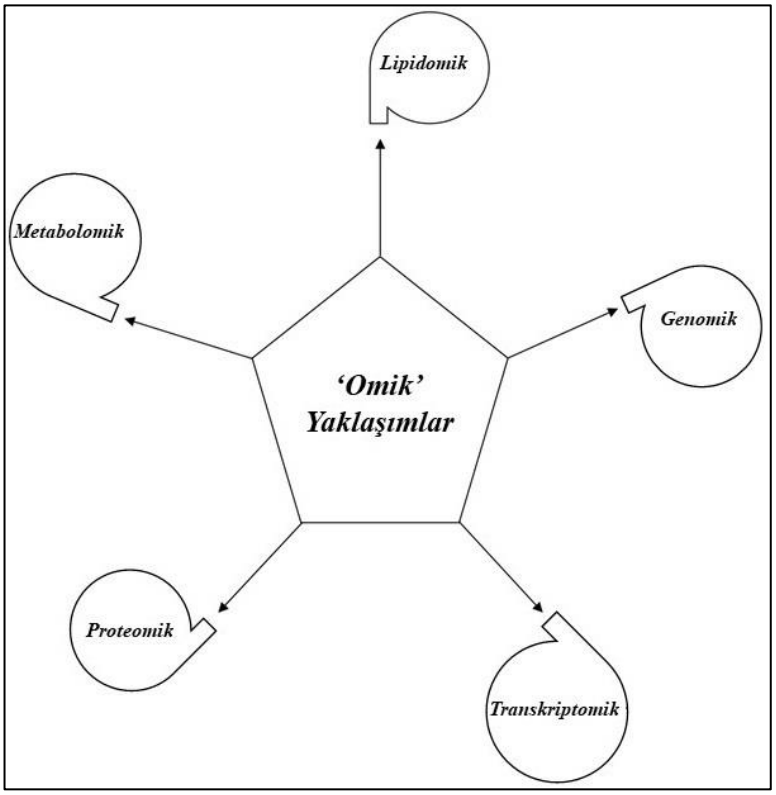
Günümüzde “omik” çalışmalar denildiğinde; Şekil 1.1.’de gösterildiği gibi genomik (genler), proteomik (proteinler), transkriptomik (transkriptler), metabolomik (metabolitler) ve diğer omik çalışmalar akla gelmektedir [1]. "Omik" terimi, kütle veya çok anlamına gelen Latince "ome" son ekinden türer. Son yıllarda, hücresel ve moleküler sistemlerin incelenmesi, “Omik” bilimlerinin gelişmesiyle farklı bir boyut kazanmıştır. Omik yaklaşımlar, sistem biyolojisinin önemli bir bileşeni ve multidisipliner bir alan olarak dikkat çekmektedir [2]. Bugün yapılan çalışmalarla ve “Sistem Biyolojisi” olarak adlandırılan biyoinformatik dalıyla beraber organizmada birçok bilinmezlik aydınlatılabilmektedir [3-5]. Aşağıda omik bilimlerin alt dallarına ait açıklamalar yapılmıştır.

Proteomik; biyolojik numunenin organel, hücre, doku veya organizma gibi bileşenlerindeki proteinlerin analizini içeren dinamik bir çalışma alanıdır. Bu bağlamda, ekspresyon, translasyon sonrası modifikasyon, protein-protein etkileşim ağları, biyokimyasal yol analizi, canlı sistem anormalliklerin belirlenmesi sağlanabilmektedir. Proteomik çalışmalar, iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi ile hız kazanmıştır. Ayrıca moleküler analizdeki yeni teknolojilerle, bu alandaki çalışmalar yeni bir boyut kazandırmıştır [6].

Transkriptomik; Transkripsiyon faktörleri hücre yapısı ve düzenleyici genler üzerinde rol alır. Bir hücredeki tüm RNA dizilerinin analizine transkriptomik denir ve bu teknikle araştırmacılar organizmaya ait hücredeki veya dokudaki genin hareketini tanımlayabilir. Ayrıca, belirli bir hücre veya dokuda, genlerin ekspresyonunu belirlenerek transkripsiyon sayısı bulanabilir. Organizmalarda hücrelerin genetik benzerlikleri olsa da farklı hücreler çeşitli gen ekspresyon modellerine sahiptir. Çeşitli hücre tiplerinde transkriptomları analiz etmek, hücre fonksiyonu, gen aktivitesi ve bu faktörlerin bir hastalık sürecindeki etkisi hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Örneğin; kanser çalışmalarında, transkriptomik veriler, kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere kıyasla gen ekspresyonunun daha yüksek olduğunu göstermektedir [6]. Ayrıca transkriptomik veriler hastalıkların araştırması için yenilikçi bir bakış açısı sunar.

Genomik; genlerin çalışma mekanizmasını ve bu genlerin kalıtımdaki rolünü inceleyen bir disiplindir. Genomik araştırmaların temel amacı, enzimlerin çalışma şekli ve haberci moleküller ile proteinlerin yapımını ele alan genlerin tanımlanması ve nicel olarak değerlendirilmesidir. Genomikteki gelişmeler biyolojik araştırmalarda büyük bir devrim yaratmış ve karmaşık sistemler olan beyin veya tümörler gibi bazı biyolojik sistemler ile ilgili bilinmeyenin keşfini kolaylaştırmıştır [6, 7].

Metabolomik; metabolik reaksiyonlarda yer alan küçük molekülleri tanımlamayı ve ölçmeyi amaçlar. Son yıllarda metabolomik çalışmalar, hastalıkların moleküler temelini çözmek, tanısal ve prognostik biyobelirteçleri bulmak ve yeni tedavi fırsatları geliştirmek için anahtar rol almaktadır. Metabolomik çalışmalar, hedefli çalışmalar ve metabolit profili olarak bilinen hedefsiz çalışmalar olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir [8]. Hedeflenen çalışmalar hali hazırda odaklanmış metabolitlerin mutlak tespiti içindir, metabolit profili ise yaş, diyet ve hastalıklar gibi çevresel etkilere göre değişen metabolitlerin nispi miktarını karşılaştırmaktır [8]. Örneğin; 2013 yılında yapılan bir çalışmada alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığında (NAFLD) fibrozis ile ilişkili 28 metabolit serumdan tespit edilmiştir [9].



Şekil 1.1. Omik yaklaşımların şematik gösterimi.

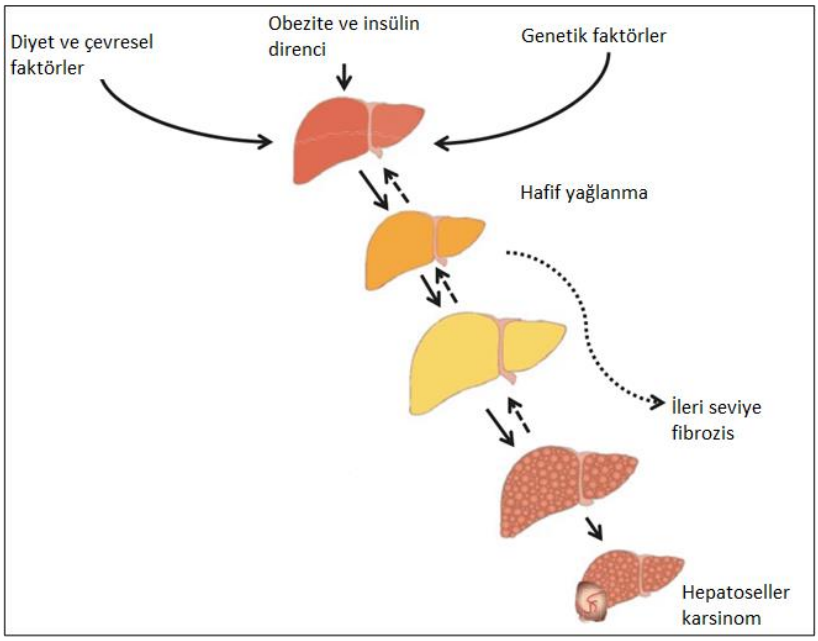
Bu tez çalışmasında insan serum albüminle hazırlanmış nano-enkapsüle E vitaminin HEPG2 hücresi üzerinde lipit metabolizmasında ve lipidomik düzeyde farklı etki gösterdiğinin ispat edilmesi, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığında nano-enkapsüle formülasyonların avantajlarının sayısal verilerle ortaya koyulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması

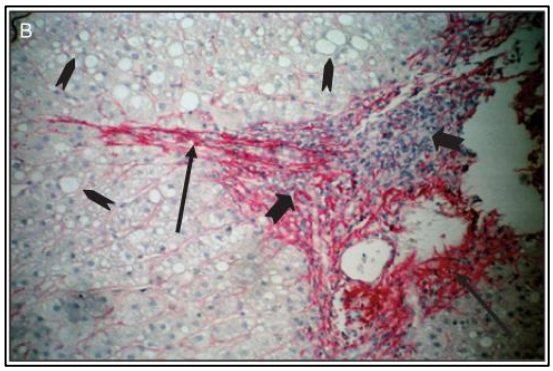
Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), hem yetişkinlerde hem de çocuklarda etiyolojik olarak sistemik ve hepatik insülin direnci ile ilişkili olan karmaşık bir metabolik hastalıktır [10]. NAFLD, metabolik sendromun hepatik belirtisi olup alkol tüketimine bağlı olmayan hastalarda karaciğerde yağ birikmesi olarak tanımlanır. Hastalık, etkilenen hastaların çoğunda asemptomatik seyreder [11].

Obezite ve beslenme bozukluğunun artmasıyla beraber NAFLD, 21. yüzyılın en önemli küresel halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir [12]. Günümüzde dünyanın en az %25'inin NAFLD olduğu düşünülmekte olup en fazla Orta Doğu ve Güney Amerika'da ve en düşük Afrika bölgesinde görülmektedir [13]. Hastalık, ileri seyirde kronik karaciğer hastalığının en yaygın nedeni haline gelmekte, siroz, hepato hücresel karsinom ve karaciğer nakli sonrası görülen önemli nedenler arasında yer aldığı düşünülmektedir. Şekil 2.1.'de belirtildiği gibi NAFLD hastalarının çoğunda hafif yağlanma, insülin direnci ve/veya tip 2 diyabet, hiperkolesteremi ve hiperglisemi görülmektedir. Hastalarda metabolik sendromun türleri ne kadar fazlaysa, ileri fibrozis ve karaciğere bağlı ölüm riski o kadar yüksek olmaktadır [13, 14].



Şekil 2.1. Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanmasının ilerleyişi ve hepatosellüler karsinom oluşumu.

Andrea E.Reid’e göre NAFLD en yaygın kronik karaciğer hastalığı olarak belirtilmektedir [15]. Hastalık yaklaşık olarak %20-30'u alkole bağlı olmayan steatohepatit (NASH) Şekil 2.2.’de görüldüğü gibi siroz ve hepatosellüler karsinom şeklinde karaciğer hasarına dönüşme eğilimindedir. NAFLD oluşumu diyabet ve obezitesi olan kişilerde daha sık görülür. Bu durum daha sonra, metabolik sendromla birlikte, karaciğer biyopsisinde NASH ve ileri fibrozis olarak görülmektedir [12, 16, 17].

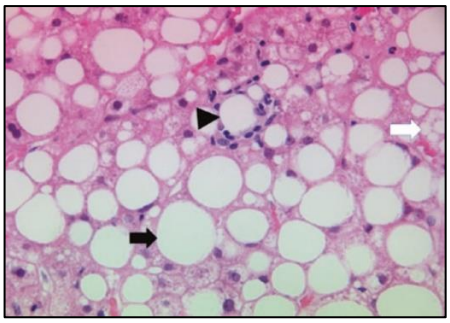


Şekil 2.2. Diyabetli hastada NAFLD. İltihaplı bölgeler (kısa oklar) ve fibrotik doku birikimi (uzun oklar) ile birlikte steatoz (kalın oklar) görünümü [16].

NAFLD'nin patogenezi tam olarak anlaşılmamış olsa da, hepatik lipitlerin girişi veya sentezi ile bunların dışarı atılması veya oksidasyonu arasındaki dengeyi kontrol eden lokal ve sistemik faktörlerin değişmesinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [18]. İnsülin direnci de obeziteyi teşvik eden çevresel faktörlerin yanı sıra NAFLD’yi etkileyen birçok faktör arasında sıralanmaktadır. Oksidatif stres, NAFLD patogenezinde ana etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir [13, 19]. Hastalıkta trigliseritlerin birikmesi ile karakterize bir durum oluşmaktadır [20]. NAFLD için klinik tedavi araştırmaları yapılmasına karşın etkili tedavisi için klinik olarak kanıtlanmış ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Diyet ve yaşam tarzı iyileştirmesi bu hastaların yönetiminde birincil tedavi olarak tercih edilmektedir [21].

NAFLD'deki steatoz genellikle makrovesikülerdir. Makrovesiküler steatoza ek olarak, merkezi yerleştirilmiş çekirdekli hepatosit grupları ve sitoplazmada çok sayıda lipit damlacıkları ve steatoza dönüşüm Şekil 2.3.’te gösterilmiştir. Stetaoza ek olarak lobular inflamasyon, hafif portal inflamasyon ve lipogranuloma da görülmektedir. Hepatopatologlara göre, NAFLD'in histolojik tanısı için minimum kriterler steatoz,

genellikle balon şeklinde hepatosit oluşumu ve tipik olarak lobular inflamasyonun görülmesi olarak ifade edilmektedir. Sitoplazmada karakteristik bir flokülent görünüme sahip, genişlemiş hepatositlerin varlığı ile karakterizedir. Bu hücrelerin içinde yağ damlacıkları olabilir. Ek olarak, Mallory-Denk cisimcikleri olarak adlandırılan sitoplazmik agregatlar mevcut olabilir [22]. Fibrozis ise, diğer kronik hepatit formlarında olduğu gibi NAFLD için gerekli bir tanı özelliği değildir. Lobular inflamasyon genellikle hafiftir ve lenfositler, bazı eozinofiller ve birkaç nötrofilden oluşan karışık bir enflamasyon meydana gelir. Çoğunlukla lenfositlerden oluşan kronik lobular inflamasyon odakları zaman zaman görülür. Dağınık lobuler mikrogranulomalar (Kupffer hücre) ve lipogranulomalar yaygındır [12, 22, 23].



Şekil 2.3. Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer: Siyah okla gösterilen büyük ve küçük damlacıklar, beyaz okla gösterilen makroveziküler steatoz ve lipogranülom [23].

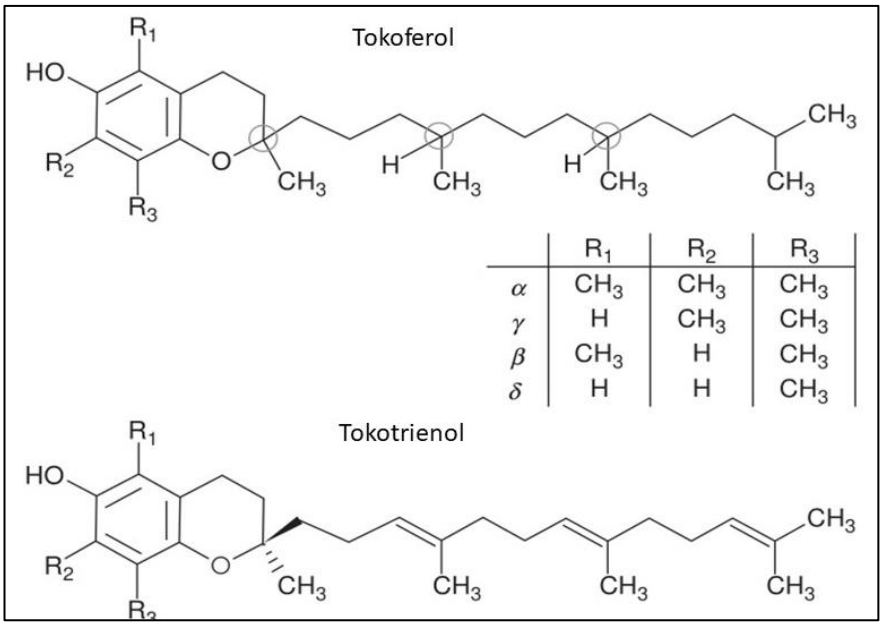
NAFLD’nin teşhisi ve lezyonların tanınması patologların ilgi alanı olmaya devam etmektedir. Tanıda çeşitli laboratuvar testleri yaygın olarak yapılmakta, ancak bu testlerin hassasiyeti ve özgünlüğünün zayıf olduğu belirtilmektedir. Karaciğer disfonksiyonu için en yaygın tarama testlerinden biri serum ALT seviyesinin ölçülmesidir; ancak hastalıkta ayırt edici seviyenin ne olduğunu halen belirlenememiştir. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan bir çalışmada ölçüm yapılan NAFLD hastaların %79'unun ALT seviyelerinin normal olduğu görülmüştür [22, 23]. Bu yüzden ALT düzeylerinin ölçümünün hastalığın tespiti veya ileri evre hastalığın tanımlanması için idealden uzak olduğu söylenebilir.

Transkripsiyon faktörlerinin ve sitokinlerin modüle edilmiş ekspresyonu veya sekresyonu, bütün metabolik yolları etkiler ve bu nedenle NAFLD patogenezinde çok önemli bir rol oynar. Örneğin, sterol düzenleyici temel bağlayıcı protein 1c (SREBP-1c), lipojenik genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Yüksek SREBP-1c, NAFLD

hastalarında hepatik steatoz ile ilişkilidir. Glukoz metabolizmasını ve lipogenezi düzenleyen karbonhidrat yanıt elemanı bağlayıcı proteinin (ChREBP) yokluğu hepatik steatozu iyileştirir, bu da ChREBP'nin NAFLD ile de bağlantılı olduğunu gösterir. Endojen lipit metabolizmasında rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, pregnan X reseptörü ve konstitütif androstan reseptörü gibi ksenobiyotik metabolizmayı düzenleyen nükleer reseptörler ve faz I ve II ilaç metabolize eden enzimlerin NAFLD'de profil değişikliği gözlenmektedir [24].

2.2. E Vitamini

E vitamini, Evans ve Bishop tarafından 1922 yılında sıçanlarda üreme için gerekli bir faktör olarak keşfedilmiştir [25]. Lipit peroksidasyonu gibi serbest radikal reaksiyonlarda serbest radikal süpürücü ve zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. α-, β-, γ- ve δ- olarak adlandırılan dört tokoferol ve dört tokotrienol içeren sekiz lipofilik bölge içerir. Kromanol halkadaki metil gruplarının sayısı ve konumuna göre farklılık gösterir. E vitamininin en iyi bilinen işlevi, lipit peroksidasyonunun döngüsel yayılmasını önleyen zincir kırıcı bir antioksidan olmasıdır. Bitkiler, α-, β-, γ- ve δ-tokoferoller ve bunlara karşılık gelen dört tokotrienol dahil olmak üzere E vitamini antioksidan aktivitesine sahip sekiz farklı molekül sentezler. Şekil 2.4.'te görüldüğü gibi tokotrienoller, üç çift bağ içeren doymamış bir kuyruğa sahipken, dört tokoferolün bir fitil kuyruğu vardır. RRR-α-Tokoferol, 2, 4 ve 8 pozisyonlarında R-konformasyonunda kiral karbonlar içeren a-tokoferolün doğal olarak oluşan formudur. Bununla birlikte, α-tokoferolün kimyasal sentezi, yarısı S-konformasyonunda 2 pozisyona sahip sekiz farklı stereoizomerin (RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS, SSS) homojen bir karışımı ile gerçekleşir [16].



Şekil 2.4. Tokoferol ve tokotrienol yapısı. Daireler, tokoferollerdeki 2' , 4' ve 8' olmak üzere üç kiral merkezi göstermektedir [16, 17].

E vitamini yağda çözünür özelliktedir. E vitamininin bağırsaktan emilimi, pankreas esterazlarının ve safra asitlerinin salgılanmasını gerektirir. NAFLD, kistik fibroz veya kolestatik karaciğer hastalığı gibi safra salgılarının bozulmasına neden olan bozukluklar, E vitamini eksikliği ile sonuçlanır. Bu salgılar, E vitamini de dahil olmak üzere diyet yağlarının miselizasyonu ve serbest yağ asitlerini serbest bırakan trigliseritlerin hidrolizi için gereklidir [16, 17].

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemi Olarak Nanopartiküller

Peter Speiser tarafından 1976'da yayınlanan nanopartiküller hakkındaki ilk makale, "nanopartikül" kavramının öncüleri arasındadır [26]. Son yıllarda, nanobilim ve nanoteknoloji alanındaki araştırma ve uygulamaların benzeri görülmemiş bir şekilde büyümesine tanık olunmaktadır [27-29].

Kontrollü ilaç salım sistemleri, konvansiyonel farmasötik formlara kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. İlaç, hedeflenen yere ulaştığında çevre dokulara oluşturduğu yan etkilerin en aza inmesi sağlanabilir. Hedef bölgede terapötik etkinin artması için kontrollü salımla doz birikimi sağlayıp ve gerekli olacak dozun daha az miktarıyla daha yüksek etki sağlanabilmektedir. Bu durum özellikle ilacın dozu ve konsantrasyonu ile terapötik etki veya toksik etki arasında bir tutarsızlık durumlarında

önem arz etmektedir. Kontrollü salım sistemlerinin kullanımı ilacın yapısına ve hedef bölgenin özelliklerine bağlıdır [30].

Nanopartiküller (NP), genellikle polimerlerden yapılan ve boyutları nanometre (nm) biriminde (10^{-9}) olan tercihen 500 nm'den küçük ultra dağılmış katı supramoleküler yapılar olarak tanımlanmaktadır. Tıp ve eczacılık alanında tercihen nanometre (nm) boyutunda (10^{-9}) olması istenen, özel olarak tasarlanmış ve oluşturulmuş sistemlerdir. Genellikle bu parçacıkların, kullanım amaçlarına bağlı olarak boyutları değişir. Genel olarak, partikül boyutu NP'nin ilgili hastalıkta salınım miktarı ve etki edeceği yerin özellikleri önceden bilinerek oluşturulur. NP yapısı, küreler, dallı yapılar, kabuklar, tüpler, fullerenler, emülsiyonlar ve lipozomları içeren çeşitli boyut ve şekildedir. Çoğunlukla organik moleküller içerseler de bazen çekirdek olarak bir metal içeren inorganik elementlere sahip olabilir [31]. NP'nin vücutta amaçlanan hastalıklı bölgeye ulaşıldığında taşıdığı ilacı istenen özellikte salması gerekir. Bu nedenle ilaç salımı için biyolojik olarak parçalanabilen yapıya sahip olmalıdır [32].

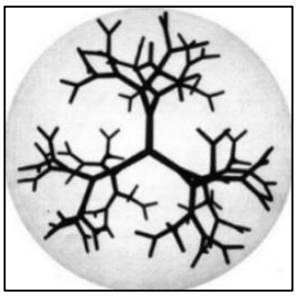
Hücreye özgü hedefleme, ilaçlar özel olarak tasarlanmış taşıyıcılara eklenerek gerçekleştirilebilir. Lipozomlar, polimerler, dendrimerler, silikon veya karbon malzemeler ve manyetik nanoparçacıklar dahil olmak üzere çeşitli nano yapılar, ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanıma örnek verilebilir. İlaç salımındaki en büyük zorluklardan biri, ilacın vücutta ihtiyaç duyulan yerde salınmasını sağlamak ve sağlıklı dokulara olası yan etkileri önlemektir [30, 32].

2.3.1. Klinikte Kullanılan Nanopartiküller

Nanopartiküller, tıpta ilaç taşıyıcı sistem veya çeşitli hastalıklar için tek başına tedavi amacıyla kullanılmıştır. Farmasötik dozaj formu olarak hedef doku ve ilaç yapısı dikkate alınarak ve biyouyumlu-biyobozunur olarak geliştirilen çeşitli nanopartiküller bulunmaktadır [33]. Günümüzde çeşitli nanopartikül-ilaç içerikli farmasötik ürünler mevcuttur. Örneğin; ABD'de iki ticari lipozomal özellikte farmasötik ürün bulunmaktadır. Bunlar pegile lipozomal doksorubisin ve lipozomal daunorubisindir [34-37]. Avrupa'da albümine bağlı paklitaksel farmasötik ürünü

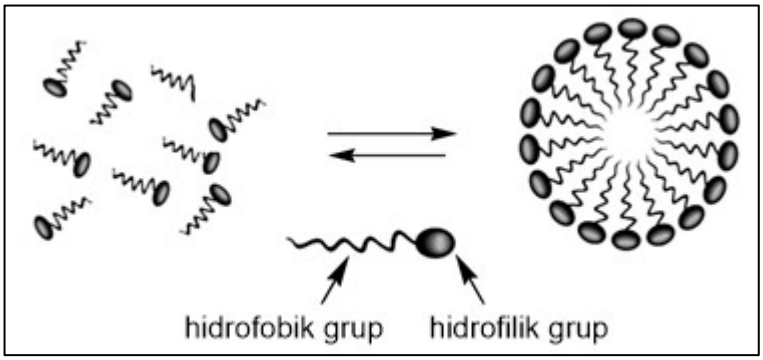
mevcuttur [38]. Kullanım amaçlarına göre şekillenen çeşitli nanopartikül yapıları vardır. Bunlar;

Dendrimerler; (**Şekil 2.5.**) çok işlevli bir merkezi çekirdek molekülü ile düzenli olarak dallanmış üç boyutlu ağaç benzeri yapılardır. Dallanma birimleri, merkezi çekirdekten polimerizasyon yoluyla ortaya çıkar. Dal uzunluklarının sterik sınırlamaları vardır. Boyutları küçütür ancak moleküler ağırlıkları büyüktür. İlaç molekülü, üstündeki fonksiyonel gruplara eklenir veya kürenin iç ortamının dendritik kanallarına yerleştirilebilir. [31, 39].



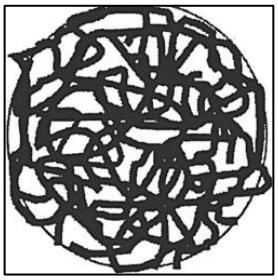
Şekil 2.5. Dendrimerin şematik gösterimi [31].

Miseller; (**Şekil 2.6.**) sıvı ortamda kürenin merkezi çekirdeğini oluşturmak için yüzey-aktif/surfaktan moleküllerin kümelenmesi sonucu küresel özellikteki yapılardır. Hidrofilik uç misel yapısını çevreleyen sıvı ortamla temas halindedir. Bir miselin şekli ve boyutu, yüzey aktif madde moleküllerinin geometrisi ve yüzey aktif madde konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve iyonik kuvvet gibi çözelti koşullarının bir fonksiyonudur [40]. Miseller, hidrofobik merkezi çekirdekte taşınan suda çözünmeyen ilaçların verilmesi için kullanılabilir [31, 39].



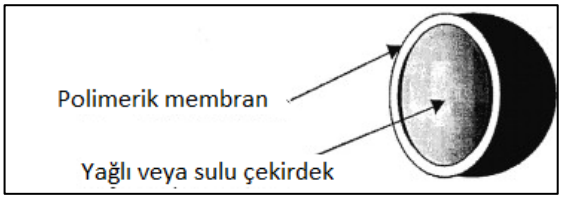
Şekil 2.6. Misellerin şematik gösterimi [31].

Nanoküreler; (**Şekil 2.7.**) ilacın nanopartikül yapıya eklenmesiyle bağlanma veya kapsülleme yoluyla taşıma yapılan bir matriks sisteminden oluşan küresel yapılardır. Kürenin yüzeyi polimerlerin eklenmesiyle değiştirilebilir ve ligandlar veya antikorlar gibi biyolojik materyaller de amaca göre eklenebilir [31, 39].



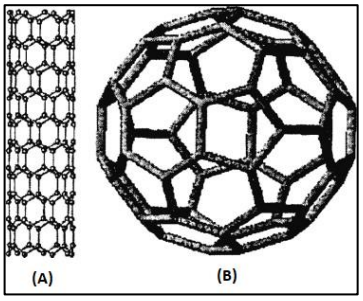
Şekil 2.7. Nanoküre genel yapısı [31].

Nanokapsüller; (**Şekil 2.8.**) ilacın hapsedildiği merkezi bir boşluk veya çekirdeğe sahip olan veziküler sistemlerdir. Çekirdek, yüzeye bağlı hedefleyici ligandların veya antikorların eklenebildiği bir dış kabuk olan polimerik zar ile çevrilidir. Çekirdek malzemesi katı, sıvı veya gaz; çekirdek kısmı sulu veya yağlı yapıda olabilir [31, 39].



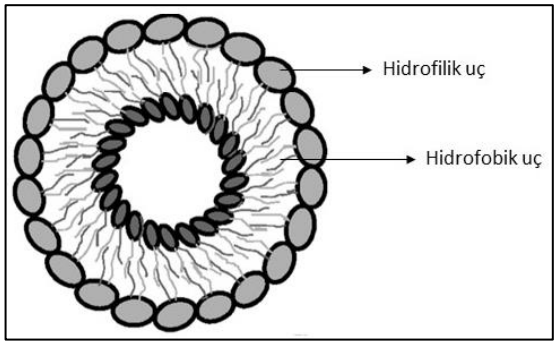
Şekil 2.8. Nanokapsülün genel yapısı

Fullerenler ve nanotüpler; (**Şekil 2.9.**) içi boş bir küre veya elipsoid tüp şeklinde karbon yapılıdır. Küre fullerenler, Buckminster Fuller'ın jeodezik kubbe tasarımına benzerliklerinden dolayı "bucky topları" olarak da anılır [31, 39].



Şekil 2.9. Nanotüpler (A) ve Fullerenlerin (B) genel yapısı [31].

Lipozomlar; (**Şekil 2.10.**) lipit tabakalarından oluşan kapalı veziküllerdir ve lipit çift tabakalarının sayısına göre tek katmanlı veya çok katmanlı olarak sınıflandırılır. Tek katmanlı sistemler suda çözünür ilaçların kapsüllenmesi için sulu bir çekirdeğe sahipken, çok katmanlı sistemler lipitte çözünür ilaçları hapseder. Aktif hedefleme, spesifik bölge epitoplarına veya reseptörlerine karşı yönlendirilen antikorlar veya ligandların NP'ye bağlanmasıyla gerçekleşir [31, 39].



Şekil 2.10. Lipozomun genel yapısı

2.3.2. İnsan Serum Albumin Nanopartiküller

İnsan serum albümini (İSA) karaciğer tarafından üretilir ve moleküler ağırlığı 66.5 kDa'dır. İnsan vücudunda en bol bulunan proteindir ve yaklaşık 19 günlük bir yarı ömre sahiptir [41]. *İn vivo* biyolojik olarak parçalanabilen, toksik ve immünojenik olmayan İSA, nanotaşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Çeşitli ilaç bağlanma bölgelerine sahip olduğundan, amino asitler, ilaçlar, oligonükleotitler veya proteinler verimli bir şekilde yüklenebilir ve yüzeyleri, fonksiyonel gruplar kullanılarak ilaç hedefleyen ligandlar tarafından kolayca değiştirilebilir. Ek olarak, İSA ticari olarak yaygın olup seri üretimi basittir [42]. Örneğin, albümine bağlı paklitaksel nanopartikülü, metastatik meme kanseri tedavisi için FDA tarafından halihazırda onaylı olan ve paklitaksel serbest formuyla karşılaştırıldığında metastatik meme kanserinde daha etkili olduğu belirtilmiştir [43].

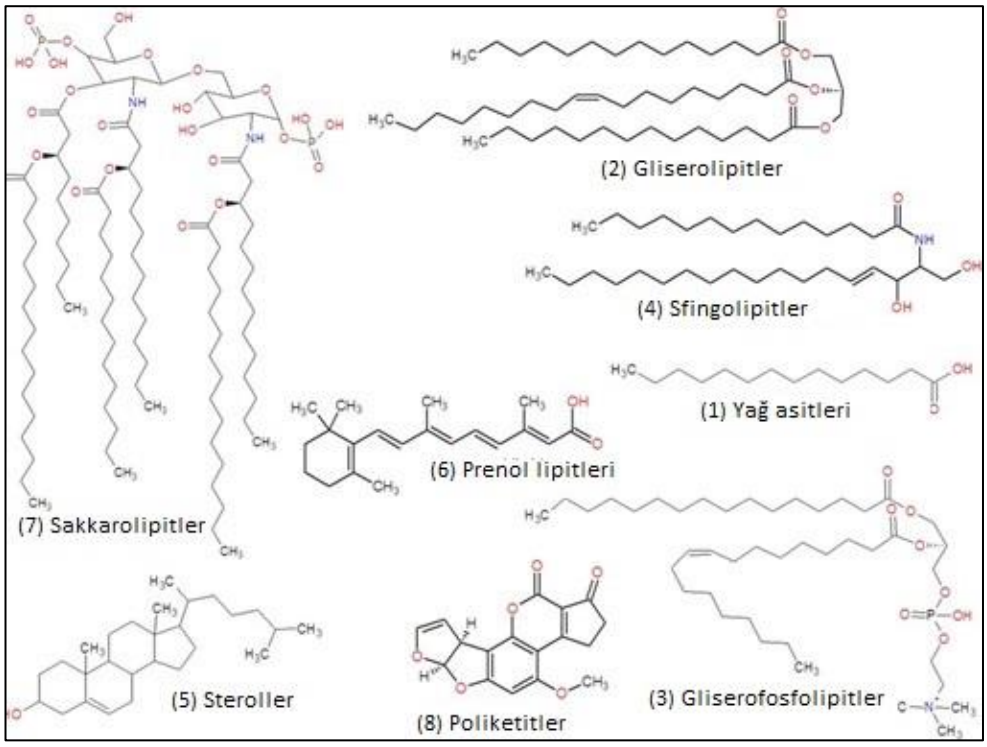
2.4. Lipitler ve Lipidomik Yaklaşımlar

2.4.1. Lipitler

Lipitler organik yapıları nedeniyle organik çözücülerde çözünür ve suda çözünmez özelliktedir. Birçok hücre mekanizmasında önemli bir rol aldığı için inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif bozukluklar, diyabet ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilidir [44]. Son yıllarda bu tür hastalıklarda yapılan çalışmalarda artış mevcuttur. Bu artışın nedenlerinden biri, sürekli olarak kromatografik, kütle spektrometrik ve biyoinformatik yöntemlerin gelişmesidir. Özellikle yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi, son yıllarda bu artışta büyük bir role sahiptir [45].

2.4.2. Lipitlerin Genel Yapısı

Lipitler kimyasal yapılarına göre Şekil 2.11.'de belirtildiği gibi; (1) yağ asitleri, (2) gliserolipitler, (3) gliserofosfolipitler, (4) sfingolipitler, (5) steroller, (6) prenol lipitleri, (7), sakkarolipit ve (8) poliketidler olarak sınıflandırılır. Mevcut sınıflandırmayı daha alt sınıflara ayırmak mümkündür. Hidrofobiklikleri, hücrelerin hidrofilik çevresine karşı membran oluşturmalarını sağlar [45].



Şekil 2.11. Sekiz adet lipitin molekül yapısı [45].

Sistematik isimlendirme için genel kabul görmüş kılavuzlar, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimyacılar Birliği ve Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUPAC-IUBMB) tarafından tanımlanmıştır. Birçok lipit, özellikle gliserolipitler, gliserofosfolipitler ve sfingolipitler, kompleks lipitleri tanımlarken kullanılan kısaltmaların omurgaları, ana grupları ve şeker birimlerini belirtmek için kullanılabilir. Bu isimlendirme şekli hızlı, verimli, metin tabanlı aramalar için uygun olup sistematik isimlendirmeye alternatif olarak lipit araştırmalarında yaygın olarak kullanılır [46, 47].

2.4.3. Metabolomik Yaklaşımlarda Lipit Metabolizmasının Önemi

Lipitler biyolojik sistemlerdeki ana yapılardan biri olup canlı için önemli fizyolojik görevleri yerine getirir. Bunlardan en önemlisi hücre zarında bulunmaları, enerji metabolizmasında kullanılmaları, sinyal iletim süreci, hücresel fonksiyonların düzenlenmesi ve kontrolünde yer almalarıdır [45]. Lipit metabolizmasının düzensizliği, enflamatuvar bozuklukların, kardiyometabolik ve nörolojik hastalıkların ve çeşitli kanser türlerinin ortaya çıkmasında önemli bir rol oynar [48]. Biyolojik örneklerin kapsamlı lipidomik profili çıkartılarak lipit türlerinin ve metabolik yolların hastalığın başlangıcı ve ilerlemesiyle bağlantısı sağlanabilmektedir. Elde edilen veriler, sadece altta yatan hastalık süreciyle ilgili temel bilgimizi ilerletmeye değil aynı zamanda hastalığın teşhisine ve yönetimine yardımcı olacak tedavi modelleri geliştirmeye de olanak sağlayabilir [49].

2.4.4. Metabolomik ve Lipidomik Teriminin Tanımı

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan veya hücre tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerin her birine "metabolit" denir. Hücredeki tüm metabolitler topluca "metabolom" olarak adlandırılır. "*Metabolomik*" terimi buradan türetilmiştir[50]. Metabolomik çalışmalar, bir hücre veya dokudaki metabolit miktarlarının ölçülmesi, tanımlanması ve çalışma sırasında belirlenen değişkenlere dayalı olarak birbirleriyle karşılaştırılmasıdır [51]. Metabolomik araştırmaların uzun süredir tanı ve tedavi yönünde yapılması, hücrede veya fizyolojik sıvıda yapılan analizlerle metabolit profili çıkarma çalışmaları moleküler düzeydeki etki mekanizmalarını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalardır. Moleküler seviyedeki

hastalıkların belirlenmesi ve dolayısıyla metabolom düzeyindeki patolojik süreçlerle bağlantılı biyobelirteçlerin bulunması son zamanlarda ortaya çıkmıştır. [52-56]. Biyobelirteç, bilindiği üzere bir hastalığın tanı, teşhis ve tedavisini takip etmeye yarayan biyomoleküllere verilen genel bir ifadedir [57].

Lipidomik, analitik kimya ilkelerine ve teknolojik araçlara, özellikle kütle spektrometrisine dayalı olarak hücresel lipitleri geniş ölçekte inceleyen yeni ortaya çıkmış bir disiplindir [58]. Bu tanım, lipit metabolizmasını geniş ölçekte incelemek için kullanılır. Lipidomikler, lipit metabolizmasındaki spesifik değişikliklerin altında yatan biyokimyasal mekanizmaları aydınlatabilir. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC–MS) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile lipitlerin tespit edildiği akademik çalışmalar çalışmaları mevcuttur. Bunlar arasında LC-MS, iyi hassasiyet ve seçiciliğe sahip geniş analitik aralığı nedeniyle en kullanışlı teknolojilerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kütle spektrometrisindeki gelişmeler lipidomik alanını büyük ölçüde hızlandırmıştır. Kimyasal türevlendirme ile lipidomik çalışmalarda analitik duyarlılık ve özgünlük düzeyi iyileştirilebilir. Son zamanlarda, teknikler büyük ölçüde ilerlemiş ve lipidomiklerin yeni uygulamaları ortaya çıkmıştır [20, 58-61].

Lipidomik, organellerden hücrelere kadar biyolojik kaynakların lipidomlarını nitel ve nicel olarak kapsamlı bir şekilde tanımlayarak hücresel lipit yollarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Lipit türlerini MS ile kapsamlı bir şekilde belirlemeye yönelik ilk girişimlerden bu yana, lipidomik hakkındaki yayınların sayısı her yıl artmıştır [62]. Muhtemelen başka hiçbir "-omik" disiplini hem gelişmeler hem de uygulamalar açısından bu kadar hızlı bir büyüme yaşamamıştır. Lipidomiklerin kısa tarihindeki kilometre taşları, elektrosprey iyonizasyonunun (ESI) geliştirilmesi, nicel lipit analizini mümkün kılmak için dahili lipit standartlarının getirilmesi ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinin oluşturulması gibi enstrümantal analiz ilerlemelerine dayanmaktadır. Ekstraksiyon prosedürünün ve numune hazırlamadaki gelişmelerle ana lipit sınıflarının çoğu nicel olarak analiz edilebilir durumdadır [63, 64].

2.4.5. Metabolomik ve Lipidomik Yaklaşımın Tarihçesi

Modern metabolomik çalışmalar son on yıla kadar hızlansa da kökenleri eski dönemlere kadar uzanan ilkel analitik yöntemlere götürülebilir. Örneğin M.Ö. 2000 yılında eski Çin uygarlığında diyabet teşhisi için uygulanan yöntemde; insaların idrar örnekleri incelenerek değerlendirilen ilkel bir analitik teknik ve tanı yöntemi örnek verilebilir. [65]. Bir başka örnekte ise Orta çağ döneminde Ullrich Pinder, *"üre tekerleği"* adını verdiği bir renk tayfı modellemesi ile bazı hastalıklara teşhis ve tanı koymaya çalışmıştır. Modern metabolomik çalışmaların başlangıcı Williams, RJ ve ark. tarafından 1950'lerin başında yapılan çalışma olarak kabul edilebilir. Williams bu çalışmada alkolikler, şizofreni hastaları ve diğer birçok hastalık grubundan örnek toplayarak 200.000'den fazla kağıt kromatografisi yapmış ve sonuçları hastalık gruplarına göre ayıran ilk profilleme çalışmasını gerçekleştirmiştir [66].

Williams'ın çalışmaları umut verici sonuçlar vermesine rağmen, yöntem ve uygulamadaki zorluklar daha sonraki çalışmaları geciktirmiş ve benzer çalışmaların yapılması 1970'leri bulmuştur. Gaz kromatografisindeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler sayesinde çalışmalar çeşitlenmeye ve hız kazanmaya başlamıştır [67]. E.C. Hornings, 1971 gaz kromatografisine dayalı çalışmasında, referanslarda "metabolit profilleme" terimini kullanan ilk araştırmacı olarak öne çıkmıştır [68]. 1980'ler, metabolomik çalışmalarda iki yeni analitik tekniğin kullanılmaya başlandığı yıllar olarak dikkat çekmektedir. Games D.E. ve ark. tarafından karabiber bileşenlerinin incelendiği ve 1984 yılında yapılan araştırmalar, "Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (LC/MS)" cihazı ile gerçekleştirilen ilk metabolomik çalışmalardan biri olarak kabul edilir [69].

"Lipidom" terimi literatürde ilk kez 2001 yılında ortaya çıkmıştır. 2002'de Rilfors ve Lindblom "fonksiyonel lipidomik" terimini "membran lipitlerinin oynadığı rolün incelenmesi" olarak ortaya koymuştur. Her ne kadar lipidom ve lipidomik terimleri literatürde 2000'lerin başlarına kadar ortaya çıkmamış olsa da araştırmacılar hücre lipitleri üzerine erken zamanlarda çalışmaya başlamışlardır. Bu ilk çalışmalar, çeşitli araçlar kullanarak lipidomik analizlere öncülük etmiştir. En önemlisi, çeşitli hastalıklarda anlamlı değişikliklere yol açan lipit profilindeki değişiklikler ve lipit metabolizmasındaki farklılıkların tanımlanmasına dair fikir sağlamıştır. İlk

çalışmaların çoğu, lipit türüne, sınıflandırmasına ve enzim kataliz yolaklarına odaklanmıştır. Lipit metabolizması üzerine yalnızca izole bir sistemden araştırma yapmak veya yalnızca bir türe veya bir lipit sınıfına odaklanmanın önemli sınırlamaları vardır. Bu yüzden organel, hücre tipi, organ, sistem veya türün tüm lipidomunun metabolizması sistemler biyolojisi yaklaşımıyla araştırılmalıdır. Bu nedenle de, lipit metabolizması çalışmalarında kapsamlı bir yaklaşıma duyulan ihtiyaç, lipidomik temelli çalışmaların ortaya çıkmasına büyük ölçüde katkı sağlamıştır [58].

2.4.6. Lipit Biyoinformatiğinin Metabolomik Çalışmalarda Önemi

Biyoinformatik, biyolojik verilerin yönetimi ve analizinden kaynaklanan sorunları çözmek için veri tabanlarının, algoritmaların, hesaplamalı ve istatistiksel tekniklerin ve teorinin oluşturulmasını ve geliştirilmesinde gereklidir [70].

Lipit biyoinformatiği, lipidomik tarafından incelenen lipit profili değişiklikleri, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonlar, hücreler arası lipit geçişleri, hücre membran bileşimindeki değişiklikler, sistemik lipit metabolizması veya lipit oksidasyonu gibi değişikliklerin matematiksel değerlendirmesi olarak tanımlanır. Örneğin yapılan bir çalışmada; 36 tip-2-diyabet (T2D) ile ilişkili hiperlipidemi hastası ve 43 sağlıklı kontrol arasındaki lipit profilindeki farklılıklar ultra performanslı sıvı kromatografisi-kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (UPLC/Q-TOF MS) ile incelenmiştir. Kontrol grubuyla T2D ile ilişkili hiperlipidemi grubu karşılaştırıldığında 22 lipidin önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir [60]. Yapılan başka bir çalışmada akciğer kanseri hastalarında gliserofosfolipit metabolizması, sfingolipit metabolizması, glikolipit metabolizması ve primer safra asidi biyosentezinin ve gliserofosfolipit metabolizmasının önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir [71] Yapılan bir diğer çalışmada *Mori fructus*'un farelerde alkole bağlı karaciğer hasarına etkisi incelenmiştir [62]. Lipidomik veri setinin yapısı metabolomiktekine benzerdir. Perttu ve ark. metabolomikte uygulanan çoğu yöntem ve istatistiksel işlemin lipit verilerinin analizi için de uygulanabileceğini belirtmişlerdir [70].

KEGG gibi veri tabanları genel olarak lipidomik temelli analizlerden elde edilen değişikliklerin tespitinde kullanılmaktadır. Ayrıca, lipitlerin birçok varyasyonu

nedeniyle ve yapısal olarak oldukça çeşitli olduğundan, moleküler düzeyde tüm olası lipit yolaklarının grafiğini çıkarmak güçtür [70, 72].

2.5. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda Kullanılan Ayırım Teknikleri

2.5.1. Kromatografik Teknikler

Kromatografi, 1900'lerin başlarında Rus botanikçi Mikhail S. Tswett'in kalsiyum karbonat dolgulu cam kolonlar kullanarak bitki pigmentlerini ayırmasıyla ortaya çıkmıştır [73]. Kromatografi, sıvı ve gaz karışımların bileşenlerine ayrılması, tanımlanması ve miktar tayini için kullanılan bir tekniktir. Hareketli ve sabit fazlar arasındaki bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılması temeline göre sabit faz tarafından tutulan bileşenlerin, kısmen tutulan veya tutulmayan bileşenlerden daha yavaş sürüklenmesi esasına dayanır. Kromatografik yönemler uygulanan yönteme, faz tipine ve ayırma şekline göre sınıflandırılır [74, 75]. Tablo 2.1.'de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması mevcuttur.

Tablo 2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflaması.

Uygulama Biçimine Göre	Faz Tipine Göre	Ayırma Şekline Göre
Kolon Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi	Afinite Kromatografisi
Düzlem Kromatografisi	Gaz Kromatografisi	İyon çifti Kromatografisi
		İyon Değişimi Kromatografisi
		Partisyon Kromatografisi
		Jel Filtrasyon Kromatografisi
		Adsorbsiyon Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), basit, hızlı, ucuz, güvenilir bir yöntem olduğu için analitik kimyada yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Numunenin uygunluğuna göre nicel analiz yapılabilir. Hareketli fazın türüne göre, kompleks

karışımların bile ayrılması sağlanır. MALDI-MS, DESI-MS ve ESI-MS gibi analitik araçlarla birlikte kullanılabilir. Birbirine kapalı sistem bağlı cihazlarda analizden önce numuneyi TLC plakasından çıkarmak gerekli değildir. Analiz çok hızlı bir şekilde yapılabildiği için oksidasyon gibi olası riskler en aza indirilip TLC plakasının görsel incelemesine kıyasla çok daha yüksek çözünürlükte çalışılabilir. TLC'nin tek başına kullanılması hassasiyette düşüklük ve radyoaktif boyalarla tespit yapılması nedeniyle kullanımını sınırlamaktadır. Metabolit veya lipit ortam oksijenine maruz kaldığında TLC plakası bir süre sonra oksidasyona uğrar [1, 76].

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), iyi tekrarlanabilirlik ve yüksek ayırma gücü ile metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kullanılabilen ve iyi bilinen bir analitik tekniktir. Özellikle HPLC, yüksek verimliliği ve seçiciliğiyle lipidomikte popülerlik kazanmıştır. Ayrıca gelişmiş lipit saptama ve analiz performansı için ikincil kromatografik sistemler ve kütle spektrometreleri ile bağlantılı olarak da kullanılabilir. Uçuculuğun zayıf olması, sıcaklığa duyarlılık nedeniyle GC ile analiz edilemeyen lipitler kolaylıkla analiz edilebilir. Ayrılan veya analiz edilen bileşikler toplanabilir ve spektroskopik tekniklerle başka analizlere yönlendirilebilir. Hemen hemen tüm lipit moleküler türleri birbirinden ayrılabilir [1].

Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC), ayırmadan önce gereken türevlendirme basamakları nedeniyle lipidomikte çok yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir. Bunun nedeni özellikle polar lipitlerin yapısını önemli ölçüde değiştirmesidir. Bu nedenle, lipit analizi yapmak için ön ayırma gereklidir. Ayrıca hidroliz ve türevlendirme basamakları kullanıldığı için zaman alıcıdır [1].

Kapiler Elektroforez

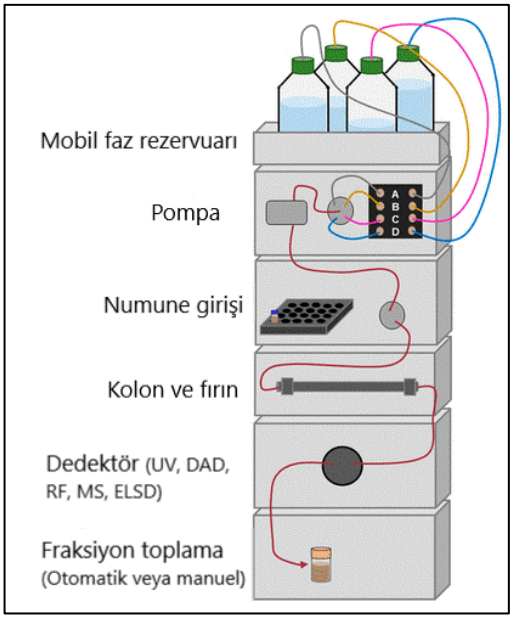
Kapiler elektroforezin (CE) lipidomiklerde uygulanması, lipitlerin düşük UV absorbansına ve zayıf suda çözünürlüğe sahip olması nedeniyle zordur. Nanolitre numune ile çalışabilmek mümkündür. Ayrıca, lipidomik çalışmalarda CE'nin en büyük dezavantajı, sulu tamponda çözülmesi zor olan yüksek hidrofobik özellikteki lipitlerin

çözülememesidir. Kapiler zon elektroforezi, kapiler elektrokromatografi, misel elektrokinetik kromatografi, mikroçip kapiler elektroforezi gibi türleri mevcuttur [1].

2.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), farmasötiklerin, biyomoleküllerin, polimerlerin ve birçok organik ve iyonik bileşiğin analizi için yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir analitik teknolojidir [77].

M. S. Tswet, farklı moleküllerinin adsorban yüzeyi ile farklı afiniteye sahip olduğunu ve daha zayıf etkileşimlere sahip analitlerin daha az tutulduğunu açıklayarak kromatografi sürecini tanımlamıştır. HPLC'de, analitlerin ayrılması geçmişten günümüze hala analitin sabit faz yüzeyine afinitesindeki farklılığına göre hareket etmesi neredeyse 100 yıl önce yapılan orijinal tanıma uymaktadır. HPLC'de sıvı faz, sabit faz ile dolu kolona sabit bir oranda pompalanır. Kolona girmeden önce analiz numunesi sisteme enjekte edilir. Kolona ulaşıldığında, numune bileşenleri, analit molekülleri ve sabit faz arasındaki fiziko-kimyasal etkileşimler temelinde seçici olarak tutunur. Sabit fazın ve hareketli fazın özelliklerine göre normal faz, ters faz ve hidrofilik etkileşimli kromatografi olarak sınıflandırılır. Bu teknikler, ayrıştırılan bileşenlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için kullanılır. Bir HPLC cihazı Şekil 2.12.'de belirtilen kısımlardan oluşur.



Şekil 2.12. HPLC'nin genel yapısı.

Hareketli faz rezarvuarları; sistemin sürekli çalışması için yeterli miktarda solventinin depolanması için kullanılır. Çözücüyü çevresel etkilerden korumak için bir baloncuk giderme sistemi (degazer) ve özel filtreler bulunabilir.

Pompa; hareketli fazın sistem üzerinden sabit ve sürekli akışını sağlar. Modern pompalar, farklı rezervuarlardan farklı solventlerin kontrollü olarak belirli oranlarda birbirine karışmasını sağlar. Hareketli fazın akış hızlarındaki değişiklikler, numune bileşenlerinin elüsyon süresini etkiler ve hatalara neden olur.

Enjektör sistemi; numunenin sisteme enjekte edilmesini sağlar. Modern enjektörler, cihaz yazılımı ile otomatik numune alma işlemi yaparak sabit veya farklı hacimlerdeki numunelerin programlanmış enjeksiyonlarına izin verir. Yüksek düzeyde doğruluk ve kesinlik sağlamada enjeksiyon tekrarlanabilirliği önemli bir parametredir.

Kolon; HPLC sisteminin kalbidir. Karışımdaki analitlerin birbirinden ayrılmasını sağlar. Hareketli fazın sabit faz ile temas halinde olduğu yerdir. Kolon, silika jel gibi bir sabit fazla dolu paslanmaz çelik bir borudur. Tekrarlanabilirlik ve ayırma verimliliği için önemli bir parametredir.

Fırın; analizin sabit veya farklı sıcaklıkta yapılmasını sağlan kısmıdır. Çalışma sırasında sıcaklığın değişmesi, ayrılan bileşenlerin alıkonma süresinde değişikliklere neden olabilir. Sıcaklık kontrolü, hareketli fazın kolon boyunca sabit bir akış hızı sağlamada önemli bir parametredir.

Dedeksiyon sistemi; kolon tarafından ayrılan bileşenlere özel yanıt verir. Dedektör hareketli fazdaki değişimi fark eder, bunu elektriksel bir sinyale dönüştürür ve bu sinyallerden kromatogramı oluşturur. Verilen cevap hareketli faz bileşimindeki herhangi bir değişiklikten bağımsız olmalıdır. Analiz edilecek maddenin özelliklerine ve yöntemin amacına göre DAD, ELSD, UV-VIS, RIF, MS dedektörleri kullanılır.

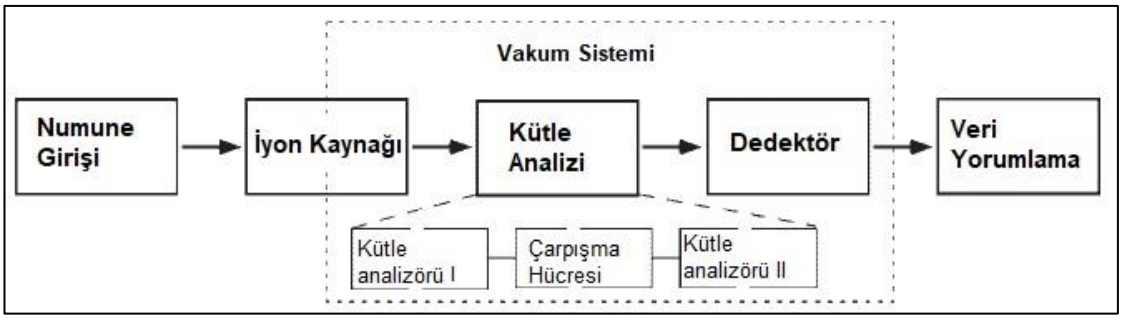
2.7. Kütle Spektroskopisine Genel Bakış

Kütle spektrometrisi (MS) ilk olarak 1880'lerin sonlarında fizikçiler tarafından tanımlanmıştır. 1913’te Cambridge Üniversitesi'nde deneysel fizik profesörü olan Sir

Joseph John Thomson tarafından ilk kütle spektrometrisi icat edilmiştir. Sonraları, endüstrisinden gelen talepler üzerine 1940'larda organik maddeleri tespit edebilen ticari kütle spektrometrik enstrümental cihazı geliştirilmiştir [63]. İyonları kütle/yük (m/z) oranına göre ayıran ilk cihaz, gazlardaki elektrik boşalmalarını ve yüklü gaz fazı türlerini analiz etme girişiminde kullanılmıştır. Thomson'un aygıtı, parabol spektrografı, yük işaretine, yüke ve kütleye bağlı olarak iyonik türlerin sapmasını sağlamak için paralel manyetik ve elektrik alanları kullanır. İyon kaynağından çıkan iyonlar, daha sonra analizöre gönderilen kabaca paralel bir ışın oluşturmak için bir kolimatörden geçirilir. Düzlemsel elektrik alan yük işaretine bağlı olarak iyonları dikey olarak yukarı (katyonlar) veya aşağı (anyonlar) saptırır. Hızlı iyonlar daha yavaş olanlardan daha küçük bir açıyla sapacakları için, y sapma açısı iyon kinetik enerjisinin bir ölçüsüdür. Manyetik alan, ışını kütle-yük oranına ve yine yük işaretine bağlı olarak yatay olarak büker. Daha ağır iyonlar eksene daha yakın dururken daha hafif olanlar daha uzağa itilir. Kütle spektrometresinin temel prensibi, uygun herhangi bir yöntemle inorganik veya organik bileşiklerden iyonlar üretmek, bu iyonları m/z oranlarına göre ayırmak ve bunları nitel ve nicel olarak tespit etmektir. MS cihazları hem başlı başına bir analitik platform hem de kromatografik bir cihazla kombine edilerek etkili bir dedektör olarak kullanılabilir [78]. MS, lipit analizi için 80'lerin başından itibaren günümüze kadar sıklıkla kullanılmaktadır. [45].

2.7.1. Kütle Spektrometre Cihazının Genel Yapısı

MS, yapısal açıklama ve niceleme için analitlerin m/z oranını inceleyen analitik bir disiplindir. Bir kütle spektrometresi genellikle bir iyon kaynağı, bir kütle analiz sistemi, dedektör ve veri yorumlama sisteminden oluşur. Numuneler bir giriş sistemi aracılığıyla iyon kaynağına verilir. Verilen numuneler iyon kaynağında iyonize edilir/buharlaştırılır. Gaz fazındaki iyonlar daha sonra kütle analizör sistemi tarafından m/z oranlarına göre ayrıştırılır. Algılanan sinyaller, veri işleme sistemi tarafından iyon yoğunluğuna karşı m/z grafiği olan bir kütle spektrumuna dönüştürülür. Şekil 2.13’te şematize edilmiştir.



Şekil 2.13. Kütle spektrometresi genel şeması.

İyon Kaynağı: İyonlar kütle spektrometresinin vakum ortamında analiz edildiğinden, analitin gaz fazı iyonlarına dönüştürülmesi gereklidir. Analit önce uçucu hale getirilir ve sonra iyonlaştırılır. İyonizasyona yönelik bu yaklaşım, termal olarak kararlı olan nispeten düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere zarar vermeden analiz edilen analit türlerini sınırlamaktadır. Biyolojik olarak ilgilenilen bileşiklerin çoğu nispeten yüksek moleküler ağırlıklara sahip olduğundan ve yüksek polariteleri uçuculuklarını ciddi bir şekilde sınırladığından, iyonizasyona yönelik bu tür bir yaklaşım, MS'nin biyolojik çalışmalara uygulanabilirliğini uzun yıllar boyunca kısıtlamıştır. Günümüzde bu sınırlamayı aşmak için iki yöntem ortaya çıkmıştır. Bunlar; elektrosprey iyonizasyon ve matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyondur [79]. Bölüm 2.7.2.'de incelenen elektrosprey iyonizasyon, analizlerde en çok kullanılan iyonlaştırma türüdür [80].

Kütle Analizörü: Bir kütle analizörü, iyonların m/z değerlerine göre ayrıldığı yerdir. İyonları m/z değerlerine göre izole edebilen çok sayıda sistem vardır. İyonlaşan moleküllerin kütlesinin yüke yani m/z oranlarına göre sinyallerinin ölçüldüğü kısımdır. Kütle analizörleri magnetik sektörlü, kuadropol, uçuş zamanlı, iyon tuzaklı gibi çok çeşitli çalışma prensipleri ve türleri olan bir modüldür. Kütle analizörü yüksek vakum altında (10^{-6} ile 10^{-9} arasında) çalışır. İyonlar, iyon kaynağında üretildikten sonra, iyonları m/z'lerine göre ayırarak çalışan kütle analizörüne iletilir. Manyetik alana dayalı analizörler kütle spektrometrisi tarihinde önemli bir rol oynamasına rağmen, bu tip analizörlerin lipidomikteki uygulamaları, büyüklüğü, maliyet fazlalığı ve göreceli çalışma zorluğu nedeniyle sınırlıdır [79, 80].

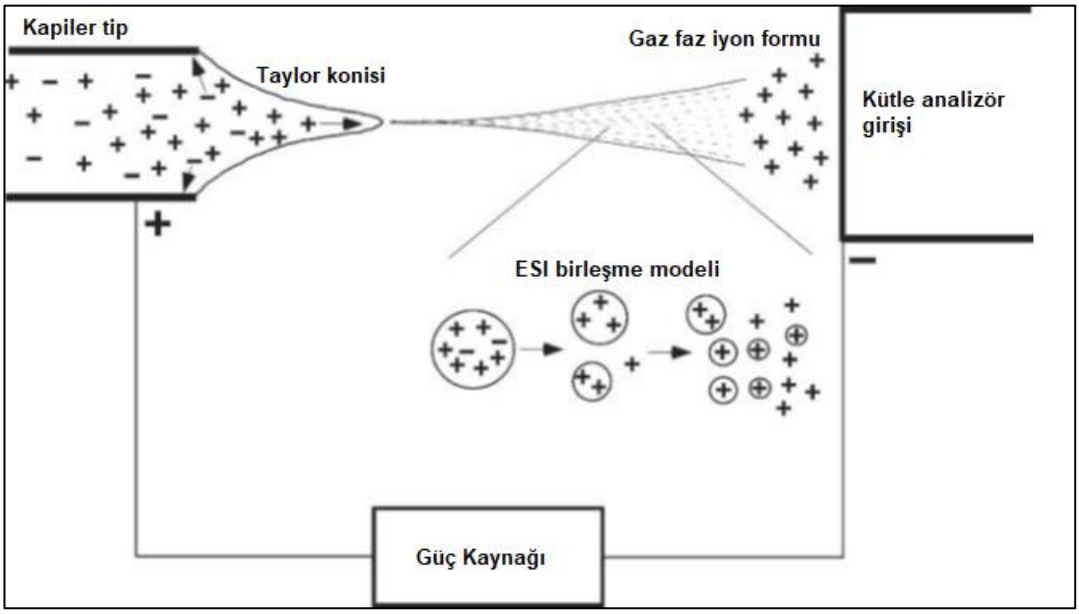
Dedektör: Kütle dedektörü esas olarak, her bir analitin mutlak veya bağıl konsantrasyonu olan kütle geçişlerinden veya gelen iyonlardan üretilen sinyali tespit

eder. Ayrılmadan sonra dedektör çıkışı bir kayıt cihazında izlenir. Dedektörler, enstrümanın beyni olarak kabul edilir. İdeal bir dedektör; hızlı tepki, düşük gürültü, yüksek toplama verimliliği, düşük maliyetli, tepkilere dar aralıklarda keskin cevap vermesi, geniş dinamik aralık, uzun süreli kararlılık ve uzun ömürlülük gereksinimlerini karşılamalıdır [81].

2.7.2. Elektrosprey İyonizasyon

Elektrosprey iyonizasyonunun (ESI) gelişimi, 1960'ların sonlarında, bir polistiren polimerini gaz fazına başarılı bir şekilde sokan Dole ve çalışma arkadaşlarının çalışmalarıyla başlamıştır [82]. 1980'li yıllarda Fenn ve ark. ise ESI başlıklarını kütle spektrometrelerine uygun hale getirerek, ESI-MS yöntemini geliştirmişlerdir [83].

Analit kütle spektrometresine sprey şeklinde verilmeye uygun bir tampon veya çözücü içinde çözdürülür. Analit, mekanik kuvvetle uygun giriş yoluyla yüksek voltaj oluşturan bir iyon kaynağına verilir. Girişin ucundaki daralmış delik ve çözelti dar ağızdan geçerken uygulanan mekanik kuvvetler, Şekil 2.14'te belirtildiği gibi Taylor konisinin oluşumunu kolaylaştırır ve ardından iyonizasyon odasına püskürtülen küçük damlacıklar kütle analizör girişine yönelir.

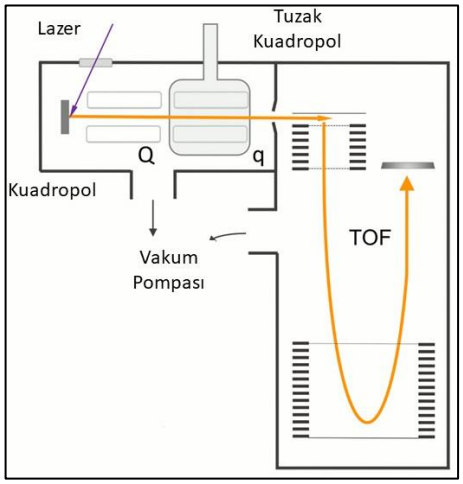


Şekil 2.14. ESI'nin pozitif iyon modunda çalışma şekli.

Girişin ucuna pozitif bir elektrik potansiyeli uygulanır ve pozitif iyon modunda ayarlı olan kütle analizörünün girişinde negatif bir elektrik potansiyeli varsa, damlacıklar pozitif yükle yüklenir. Negatif iyon modunda ise bunun tersi gerçekleşir. Bu işlemde ve sonrasında, uygulanan yüksek sıcaklık ve/veya vakum nedeniyle kapsamlı çözücü buharlaşması söz konusudur.

2.7.3. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi

Uçuş zamanlı (TOF) analizörü 1946'da W. E. Stephens tarafından yapılmış ve yayınlanmıştır [84]. TOF; farklı m/z oranlı iyonların uçuşları sırasında belirli uzunlukta, alandan bağımsız bir sürüklenme boyunca zaman içinde dağılması esasına dayanır. Aynı anda dedektöre giden parçacıklardan daha hafif olanlar dedektöre ağır olanlardan daha erken ulaşacaktır. Teorik olarak ise, iyonların tümü aynı zamanda ve iyon kaynağındaki yerde oluşturulur. Daha sonra sabit bir potansiyel (örneğin, 1-15 kV) aracılığıyla TOF sürüklenme tüpüne hızlandırılır. Aynı yüke sahip tüm iyonlar ivmelenmeden sonra aynı kinetik enerjiyle yüklendiklerinden, daha düşük m/z'si olanlar daha büyük m/z iyonlarından daha yüksek hızlara ulaşır. Yani iyon hızları m/z'nin karekökü ile ters orantılıdır [61, 78]. Kuadrapol ile kombine edilerek iki kütle analizörünün kullanıldığı yüksek performanslı Q-TOF MS cihazları vardır. Bu sayede sistem sabit m/z aralığında çalışılarak diğer maddelerin dedektöre ulaşmasına engel olunabilir. Q-TOF MS cihazları bu sayede TOF MS cihazlara göre daha iyi seçicilik ve hassasiyet sonuçları vermektedir [85]. Şekil 2.15. Q-TOF MS sisteminin bölümlerini göstermek amacıyla sunulmuştur.



Şekil 2.15. Q-TOF MS cihazı genel yapısı.

2.8. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda R Programlama Dili, XCMS ve Önemi

Yirminci yüzyılın sonlarından günümüze genom dizilimi ve proteom ölçümü çalışmaları başlatıldığında, büyük miktarda veriyi barındırabilecek biyoinformatik altyapılara önemli yatırımlar yapılmıştır. Bu makro molekülleri sınıflandırmak için veri bankaları oluşturulmuş olup kapsamlı gen ve protein dizi analizi yapmak için çok sayıda algoritma geliştirilmiştir. Benzer şekilde, metabolitler ve lipitler söz konusu olduğunda, ilk önce bu molekülleri uygun bir şekilde kromatogramlardan süzelebilmeli, mantıksal bir şekilde sınıflandırılabilmeli ve tanımlanabilmelidir.

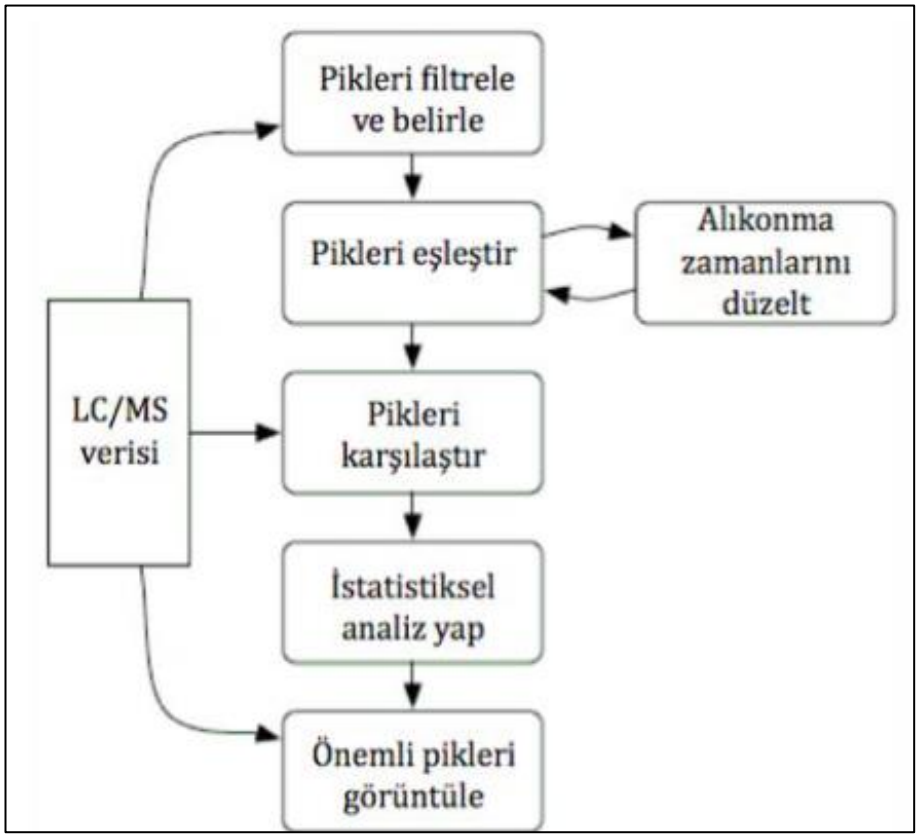
R, istatistiksel hesaplama ve grafikler için oluşturulan açık kaynak kodlu programlama dilidir. John Chambers ve meslektaşları tarafından 1960 yılında başlayarak Bell Laboratories'de geliştirilen S diline ve ortamına benzer bir projedir. Çok çeşitli istatistiksel (modellemeler, istatistiksel testler, zaman serisi analizi, sınıflandırma, kümeleme, vb.) ve grafik modellemeler oluşturmayı sağlar. Gerektiğinde matematiksel semboller ve formüller de dahil olmak üzere iyi tasarlanmış yayın kalitesinde grafikler kolaylıkla üretilebilir.

R, veri işleme, hesaplama ve grafik görüntüleme için bütünleşmiş bir yazılım olanakları paketidir. Etkin bir veri işleme ve depolama tesisi kurmak, matrisler üzerinde hesaplamalar için bir operatör paketi içermesi; veri analizi için geniş, tutarlı araçlar ve grafik oluşturma gibi kullanıcıya kolaylık sağlayan özellikler sunmaktadır [86].

XCMS yazılımı 2006 yılında hedeflenmemiş metabolomik verileri biyoinformatik veriye dönüştürmek için bir çözüm sağlayan ilk programlardan biri olarak yayınlanmıştır [87]. XCMS kısaltmasındaki 'X' ifadesi yazılımın herhangi bir kromatografik yönteme uygulanabileceğini belirtmek için kullanılır.

XCMS metabolomik çalışmalar için geliştirilen, ‘R’ istatistik yazılımı tabanlı, açık kaynak kodlu bir yazılımdır. XCMS, girilen parametreler doğrultusunda ham veriyi matematiksel modellemelere çevirir. XCMS, piklerin belirlenmesi, örnek setindeki diğer numunelerdeki piklerle eşleştirilmesi, pik şiddetlerinin

karşılaştırılması, istatistiksel testler ve ayrılmış iyon kromatogramlarını elde etmede kullanılır. Şekil 2.16.'da XCMS'in çalışma algoritmasının şematize edilmiş hali verilmiştir.



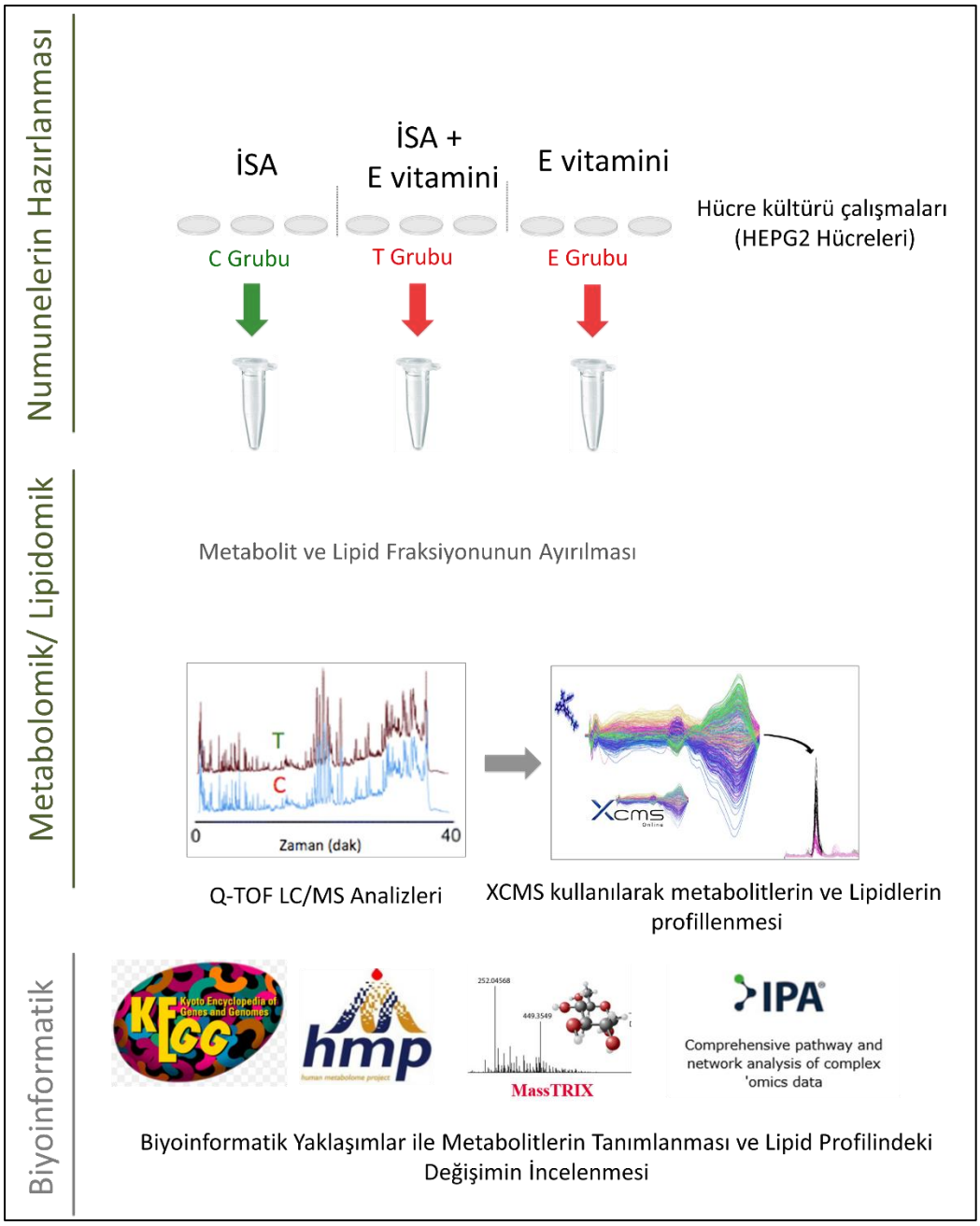
Şekil 2.16. XCMS Çalışma Algoritması.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmaların Özeti

Bu tez çalışmasında alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığı tedavisinde İSA nanopartiküller kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamini etkinliğinin metabolit ve lipit profili üzerinde meydana getirdiği değişikliğin LC/Q-TOF MS sistemi kullanılarak *in vitro* düzeyde değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla; E vitamini kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle formülasyonlar, karaciğer kanseri hücre hattı HEPG2'ye uygulanmıştır. Aynı anda; nano-enkapsüle E vitamini (Grup T), sadece E vitamini (Grup E) ve yükleme yapılmamış nanopartikül (Grup C) HEPG2 hücre hattına uygulanıp üç grup arasında metabolit ve lipit profilinde gerçekleşen değişimin LC/Q-TOF MS cihazı kullanılarak C18 kolon ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Profillenebilen metabolitler ve lipitler, her üç grup için yarı nicel olarak karşılaştırılmıştır. Ardından, değişen metabolit profili ve lipit profili yorumlanarak nano-enkapsüle ilaç kullanımının avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir. Şekil 3.1.'de ilgili tez çalışması şematize edilmiştir.

İSA ve E vitamini nano-enkapsüle İSA; Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Erem Bilensoy'un katkılarıyla hazırlanmıştır. Tez çalışması için HEPG2 karaciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmak üzere tarafımıza verilen İSA, E vitamini yüklü İSA ve sadece E vitamini Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ayşe Ercan'ın katkılarıyla HEPG2 hücrelerine *in vitro* olarak 24 saat süresince uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Yöntem geliştirme basamağını gösteren şema.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan kimyasal, sarf ve cihazlar Tablo 3.1. ve 3.2.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka	Kullanım Amacı
Asetonitril (LC/MS Grade)	Sigma	LC/MS hareketli fazı
Su (%0,1 Formik asit)	Sigma	LC/MS hareketli fazı
Metanol (HPLC Grade)	Sigma	Metabolit ekstraksiyonu
Kloroform (HPLC Grade)	Merck	Metabolit ekstraksiyonu
İzopropil alkol (LC/MS Grade)	Merck	LC/MS hareketli fazı
Formik asit (LC/MS Grade)	Sigma	LC/MS hareketli faz tamponu hazırlama
Daidzein metabolit standartı	Waters	İç standart maddesi
MS QC referans karışımı (186006963)	Waters	Sistem uygunluk numunesi Karışımı
G1969-85000 ESI-TOF TUNING MIX	Agilent	MS tune çözeltisi

Tablo 3.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.

Cihaz, Yazılım ve Sarf Malzemeleri	Marka	Kullanım Amacı
Q-TOF MS	Agilent 6530	Metabolit profilleme, hedeflenmiş metabolomik ve lipidomik
UPLC	Agilent 1200 Infinity	Metabolit profilleme, hedeflenmiş metabolomik ve lipidomik
XCMS	Ücretsiz yazılım	Metabolit eşleştirme profilleme
IPO (Isotopologue Parameter Optimization)	Ücretsiz yazılım	Pik toplama, optimizasyon, tutulma süresi belirleme
ProteoWizard	Ücretsiz yazılım	MS dosya uzantısı dönüştürücü
R	Ücretsiz yazılım	XCMS programının çalışması için kullanılan yazılım
Vakum santrifüj	Labconco Refrigerated CentriVap Concentrator	Numune ve çözeltilerin uçurulması
Agilent Zorbax 1.8 µM, 50 x 2.1 mm	Agilent	HPLC kolonu

3.2. İSA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. E Vitamini yüklü İSA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Vitamin-E yüklü insan serum albümin (İSA) nanopartikülleri içeriği 300 µM E vitamini içerecek şekilde nanoçöktürme tekniği ile hazırlanmıştır [88, 89]. E Vitamini (%1 a/h) etanol, albümin ise ultra saf su (%0,1 a/h) içinde 550 rpm'de çözündürülmüştür. Hazırlanan organik faz, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı

altında damla damla albümin çözeltisine (1:20 h/h) eklenmiştir. Organik çözücü daha sonra 100 rpm ve 40 °C'de vakum altında son hacim 5 mL'ye kadar buharlaştırılmıştır.

3.2.2. Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

İnsan Serum Albümin nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü (nm), polidispersite indeksi (PDI) ve yüzey yükü (mV), Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılma tekniği ile belirlenmiştir. Nanopartikül dispersiyonu zeta küvetlerine (DTS1070) aktarılmış ve oda sıcaklığında 173° saçılma açısında ölçülmüştür (n=3).

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

HEPG2 hücre hatları, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)' ten temin edilen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)' in ısıyla inaktive edilmiş %5 fetal sığır serumu içerdiği ortama 2 mM L-glutamin, 50 U/mL penisilin G ve 50 µg/mL streptomisin eklenerek ve 37 ºC nemli atmosfer altında %5 CO_2 uygulanarak 60 mm çaplı hücre kültürü kaplarında cm^2 başına 10000 hücre olacak şekilde çoğaltılmıştır. Grup C, Grup T ve Grup E; yukarıda anlatıldığı şekilde sırasıyla boş İSA, E vitamini (300 µM) ve E vitamini (300 µM) içeren nano-enkapsüle İSA hücre kültürü ortamına 24 saat süresince tatbik edilmiştir. DPBS (10 mM Na_2HPO_4, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH: 7.4) çözeltisi ile hücreler yıkanmış ve 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH: 7.45 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH: 7,4 çözeltisi kullanılarak deterjansız liziz tekniği ile homogenizator (Schütt Homogen, Austria) aracılığıyla sitozolik fraksiyonlar elde edilmiş ve saklanmıştır.

3.4. Analiz Edilecek Numunelerin Hazırlanması

Numuneler deney gününe kadar -80 °C'de saklanmış. Tüm gruplar için toplanan sitozolik fraksiyonlar her bir grup için ayrı olacak şekilde Fischer Scientific'ten (New Hampshire, ABD) 15 mL'lik bir FalconTM konik santrifüj tüpünde havuzlandı ve vortekslenmiştir. 200 µL sitozolik fraksiyon numunesi; 600 µL kloroform, 600 µL metanol ve 200 µL Milli-Q su kullanılarak ekstre edilmiştir. Tüm kimyasallar en az MS derecesi veya üstü olacak şekilde Merck, Darmstadt, Almanya'dan satın alınmıştır. Vortekslenen karışım 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Üst fazda metabolit fraksiyonu ve alt fazda lipit fraksiyonu toplandı. Metabolit ve lipit fraksiyonları, 4 °C'de bir Labconco Vakum Santrifüjünde uçurulmuştur. Metabolit ve lipit fraksiyonları için katı kalıntılar, 200 µL 50:50 (h/h) su (Milli-Q): Asetonitril (ACN) ile yeniden çözülmüştür. Ayrıca yöntemin ve veri değerlendirme sürecinin doğrusallığını, kesinliğini ve doğruluğunu değerlendirmek için bu örnekler ardışık seyreltme işlemine tabi tutulmuştur.

3.5. Ardışık Seyreltme Yöntemi ile Numunelerin Hazırlanması

Dilüsyon serisi 9'lu setler halinde hazırlanmıştır. 9 vialden 6 tanesi tekrarlanabilirliği ölçebilmek için aynı derişimde, kalan 3 tanesi ise regresyon analizi için azalan derişimlerde hazırlanmıştır. Dilüsyon serisi hazırlamada kullanılan yöntem Tablo 3.3.'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. Dilüsyon serisi hazırlama yöntemi.

Vial	Örnek Miktarı	Hareketli Faz Miktarı (70:30 (h/h) ACN:Su)	Son Örnek/Toplam Miktar Oranı
Vial 1	40 µL	40 µL	4/8
Vial 2	40 µL	40 µL	4/8
Vial 3	40 µL	40 µL	4/8
Vial 1	40 µL	40 µL	4/8
Vial 2	40 µL	40 µL	4/8
Vial 3	40 µL	40 µL	4/8
Vial 4	30 µL	50 µL	3/8
Vial 5	20 µL	60 µL	2/8
Vial 6	10 µL	70 µL	1/8

Metabolit ve lipit fraksiyonları 9 viale bölünmüştür. İlk 6 vial, tekrarlanabilirliği kontrol etmek ve enjeksiyonlardan kaynaklanan rastgele hataları ortadan kaldırmak için aynı konsantrasyonlarda (40 µL numune + 40 µL hareketli faz) hazırlanmıştır. Piklere regresyon analizine tabi tutulacak seyreltme serisi tipinde

hazırlanan diğer 3 vial (7. vial 30 µL numune + 50 µL hareketli faz, 8. vial 20 µL numune + 60 µL hareketli faz, 9. vial 10 µL numune + 70 µL hareketli faz) olarak hazırlanmıştır.

3.6. Sistem Uygunluk Testi

Çalışmalarda, Waters firmasının (186006963) kodlu LC-MS QC referans çözeltisi kullanılmıştır. Son derişimi 0.5 ppm olacak şekilde (70:30 (h/h) ACN:Su) seyreltilen sistem uygunluk numuneleri, her analizinde başında üç tekrarlı enjeksiyon, her altı numunede bir enjeksiyon ve analiz sonunda üç tekrarlı enjeksiyon olacak şekilde kullanılmış ve sonuçları takip edilmiştir. Kullanılan sistem uygunluğu numunesinin içeriği Tablo 3.4.'te sunulmuştur.

Tablo 3.4. Kullanılan Sistem Uygunluk Numunesinin İçeriği.

Madde Adı	m/z Değeri	Miktar (µg/mL)
Asetominofen	152.0712	10
Kafein	195.0882	1.5
Sulfaguanidin	215.0603	5
Sulfametoksin	311.0814	1
Verapamil	455.2910	0.2
Terfenadin	472.3216	0.2
Rezerpin	609.2812	0.6

3.7. LC/Q-TOF MS ile Metabolitlerin ve Lipitlerin Hedeflenmemiş Analizi için Cihaz Parametreleri

Analizler, Şekil 3.2.'de gösterilen Agilent firmasının 1200 Infinity Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazı ve yine Agilent firmasının 6530 Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF MS) cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz firmanın *'Agilent MassHunter'* isimli ticari yazılımı aracılığıyla kontrol edilmektedir. 1200 Infinity UPLC sistemi, otomatik pompalı ve otomatik enjektörlü bir sistemdir.

Kolon fırını sıcaklığı yazılım aracılığıyla kontrol edilebilmektedir. UPLC sistemi, kütle spektrometre cihazı ile bağlantıyı aynı zamanda iyonlaştırıcı olarak çalışan ESI başlığı aracılığı ile gerçekleştirir. Sistem kurutucu gaz olarak azot gazını kullanır, bu amaçla cihaza bağlı bir azot jeneratörü bulunmaktadır. LC/Q-TOF MS sistemi için gerekli vakum ortamını sağlayabilmek amacıyla, birisi kaba vakum denilen ön vakum cihazı, ikinci olarak da yüksek vakum için bir başka vakum sistemi daha kullanılmaktadır. Tablo 3.5'te metabolomik ve lipidomik çalışmalar için genel cihaz parametereleri sunulmaktadır.

Şekil 3.2. Agilent 6530 LC/Q-TOF MS sistemi.

Tablo 3.5. LC/ Q-TOF MS parametreleri.

Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS Tarama Aralığı	100-1700 m/z
Kurutucu Gaz Sıcaklığı	350 °C
Kurutucu Gaz Akışı	10 L/dakika
Kurutucu Gaz Basıncı	45 psi
Akış Hızı	0,2 mL/dakika

3.8. LC/Q-TOF MS ile Metabolitlerin ve Lipitlerin Hedeflenmemiş Analizi için Kromatografik Parametreler

3.8.1. UPLC/Q-TOF MS Enstrümantal Koşullar

Kütle spektrometrisi analizi, Agilent 6530 LC/Q-TOF MS cihazında (Agilent Technologies, 184 Santa Clara, CA) yapılmıştır. Çalışmada C18 kolonu (Agilent Zorbax 1.8 µM, 50 x 2.1 mm) kullanılmıştır.

3.8.2. Metabolit Fraksiyonunun Analizi

Hareketli faz bileşimi, su ve %0,1 formik asitten oluşan asetonitril çözeltisinden oluşmaktadır. Akış (0,20 mL/dakika(dk)) %10 ACN ile başlamış ve 10. dk'ya kadar doğrusal olarak %90 ACN'ye yükselmiştir. Daha sonra ACN oranı lineer olarak 17. dk'ya kadar %10'a düşürülmüş ve oran 25. dk'ya kadar sabit tutulmuştur. Bu işlem her bir enjeksiyon sonrası için 5 dk sonra uygulanmıştır. MS cihazı için tarama aralığı 100-1700 m/z, kolon sıcaklığı 30 °C, kurutma gazı sıcaklığı 350 °C ve kapiler voltajı 4000 V olarak ayarlanmıştır. MS cihazı pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Tüm numuneler sisteme rastgele sırayla iki ayrı grup olarak verilmiştir. MS/MS taraması için otomatik MS modu kullanılmıştır.

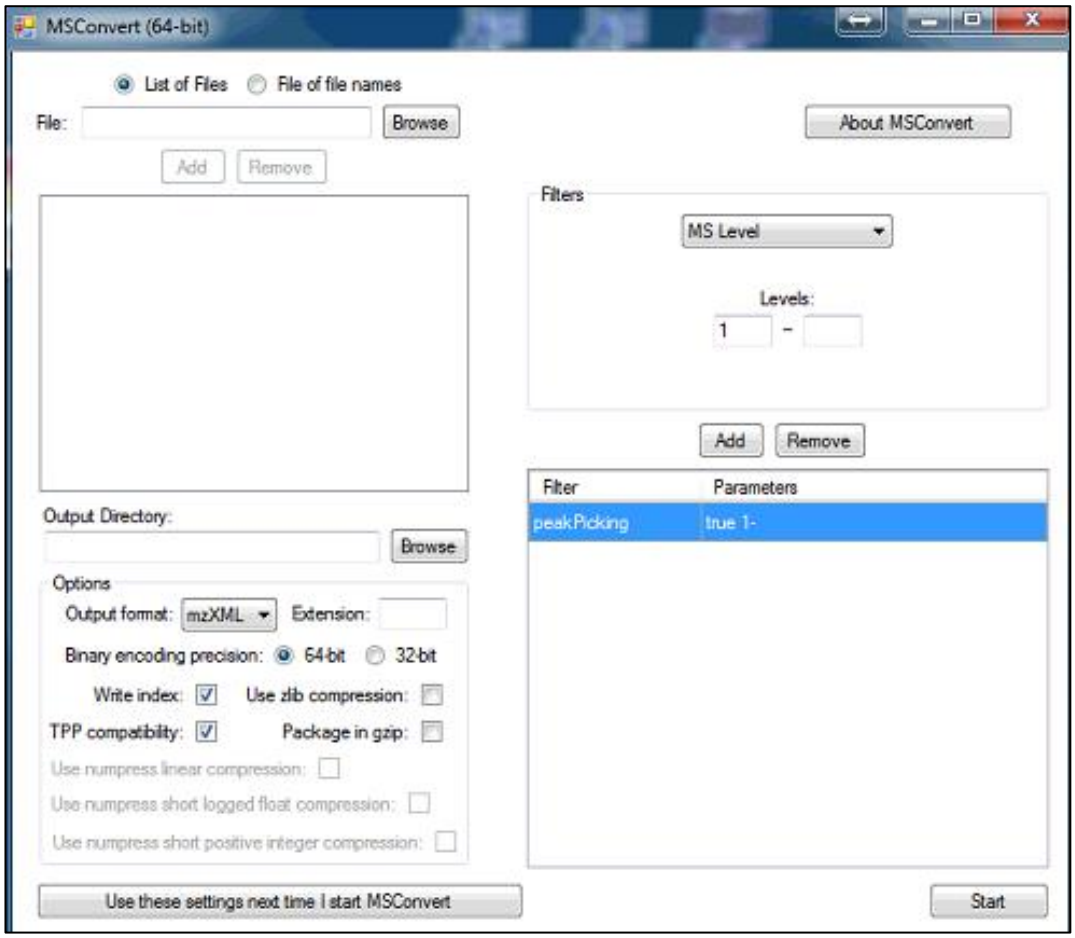
3.8.3. Lipit Fraksiyonunun Analizi

Hareketli faz bileşimi, su ve asetonitril:izopropil alkol (ACN:IPA) 70:30 (h/h) oranından oluşur. Sulu ve organik faz %1 amonyum asetat - %0,1 asetik asit içerir. Akış (0,20 mL/dk) %55 organik faz ile başlamış ve 3. dk'ya kadar %75 organik faza, 8. dk'ya %89, 11. dk'ya kadar %100 organik faza lineer olarak yükselmiştir. Oran 15. dk'ya kadar sabit tutulmuştur. Organik faz oranı 20. dk'ya kadar %55'e düşürülmüştür. Bu işlem her bir enjeksiyon sonrası için 5 dk sonra uygulanmıştır. MS cihazı için tarama aralığı 100-1700 m/z, kolon sıcaklığı 60 °C, kurutma gazı sıcaklığı 350 °C ve kapiler voltajı 3500 V olarak ayarlanmıştır. MS cihazı pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Tüm numuneler sisteme rastgele sırayla iki ayrı grup olarak verilmiştir. MS/MS taraması için otomatik MS modu kullanılmıştır.

3.9. XCMS ve MS Excel ile Kromatogramlardaki Verileri İşleme Çalışmaları

3.9.1 Ham Data Dosyalarının XCMS'e Uygun Olarak Dönüştürülmesi

LC/Q-TOF MS analizleri sonrası cihazdan alınan ".d " uzantılı data dosyaları *"ProteoWizard"* yazılımı aracılığıyla '.mzXML' uzantılı dosyalara dönüştürülmüştür. Şekil 3.3. yazılımda seçilen parametreleri ve yazılımın arayüzünü göstermektedir.



Şekil 3.3. ProteoWizard yazılımı ekranı.

3.9.2. XCMS Programının Kurulumu

XCMS programı "R" istatistik yazılımının altında çalışan bir programdır. R programı kurulduktan sonra Şekil 3.4.'te verilen kodlar aracılığı ile XCMS yazılımı kurulmuştur.

```
## try http:// if https:// URLs are not supported
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("xcms")
```

Şekil 3.4. XCMS kurulumu için kullanılan kod.

3.9.3. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu

XCMS yazılımı Bölüm 2.9.5.'de belirtildiği üzere bir dizi parametrenin kombinasyonu ile çalışmaktadır. Bu parametrelerin optimizasyonu için geliştirlen 'IPO' yardımcı yazılımı kullanılır. Bu yazılım Şekil 3.5.'te verilen kod aracılığı ile XCMS yazılımının altına kurulmuştur.

```
# try http:// if https:// URLs are not supported
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("IPO")
```

Şekil 3.5. IPO yazılımı için kullanılan kod.

IPO kurulumu yapıldıktan sonra optimize edilecek deney verilerine ait dosyalar seçilir ve Şekil 3.6.'da verilen kod aracılığı ile parametreler yazılım tarafından denenerek optimum değerler bulunur.

```
library(IPO)
peakpickingParameters <- getDefaultXcmsSetStartingParams('matchedFilter')
#setting levels for step to 0.2 and 0.3 (hence 0.25 is the center point)
peakpickingParameters$step <- c(0.2, 0.3)
peakpickingParameters$fwhm <- c(40, 50)
#setting only one value for steps therefore this parameter is not optimized
peakpickingParameters$steps <- 2

time.xcmsSet <- system.time({ # measuring time
resultPeakpicking <-
optimizeXcmsSet(files = datafiles[],
params = peakpickingParameters,
nSlaves = 1,
subdir = NULL)
retcorGroupParameters <- getDefaultRetGroupStartingParams()
retcorGroupParameters$profStep <- 1
retcorGroupParameters$gapExtend <- 2.7
time.RetGroup <- system.time({ # measuring time
resultRetcorGroup <-
optimizeRetGroup(xset = optimizedXcmsSetObject,
params = retcorGroupParameters,
nSlaves = 1,
subdir = NULL)
writeRScript(resultPeakpicking$best_settings$parameters,
resultRetcorGroup$best_settings)
```

Şekil 3.6. IPO optimizasyon kodu.

3.9.4. XCMS Analizleri

Optimize XCMS parametreleri doğrultusunda oluşturulan kod kullanılarak dosyalar her yöntem için ayrı ayrı analiz edilmiş ve ayrılmış iyon kromatogramları ve sonuçları gösteren Excel tablosu elde edilmiştir. Kullanılan XCMS kodu Şekil 3.7.'de sunulmuştur.

```
library(xcms)
library(Rmpi)

xset <- xcmsSet(method   = "matchedFilter", fwhm = 33, snthresh =
7.3, step = 0.0705, steps = 2, sigma = 14.0139289960931, max = 5,
mzdiff = 0.63785, index = FALSE)

xset <- retcor(xset, method = "obiwarp", plottype = "none", distFunc
= "cor_opt", profStep = 1, center = 3, response = 1, gapInit = 0.52,
gapExtend = 2.4, factorDiag = 2, factorGap = 1, localAlignment = 0)

xset <- group(xset, method = "density", bw = 12.4, mzwid = 0.0362,
minfrac = 0.94, minsamp = 1, max = 50)

xset <- fillPeaks(xset)
```

Şekil 3.7. Kullanılan XCMS kodu.

3.9.5. XCMS Sonuç Tablosunun MS Excel'de İşlenmesi

XCMS yazılımından sonuçlar eşleştirilmiş piklerin m/z, alıkonma zamanları, pik şiddetlerini veren bir Excel dosyası halinde alınır. Şekil 3.8. bu çıktıya örnek olarak sunulmuştur.

	name	fold	tstat	pvalue	mzmed	mzmin	mzmax	rtmed	rtmin	rtmax	RT (Mil	npeaks	C	T	metlin	assit_kf_hilicpos_1	assit_k	assit_k	assit_k	assit_k	assit_k
1	M477T221	90,91481	284,9426	3,49E-12	477,31	477,3099	477,3101	220,92	215,811	227,097	3,78495	13	0	6	http://me	44371,6163	43765,93	41619,24	43393,44	48084,5	56631,82
2	M478T221	84,18341	213,6707	2,20E-11	478,312	478,3119	478,3121	220,946	219,902	221,421	3,69035	6	0	6	http://me	9738,410066	8294,403	9377,445	9655,925	11036,08	11594,93
10	M564T340	122,0821	89,34493	8,31E-10	564,359	564,3589	564,359	339,602	335,048	342,994	5,716567	6	0	6	http://me	7777,122926	9998,824	19160,99	44584,49	37702,94	55038,33
11	M205T58	3,191793	-60,7816	8,42E-10	205,0708	205,0706	205,0709	57,804	57,095	58,149	0,96915	6	6	0	http://me	118579,1098	112540,1	114855,2	118960,6	115924,4	120856,2

Şekil 3.8. Örnek XCMS veri çıktısı.

- Alınan ham verilerde ilk işlem, hazırlanan dilüsyon serisi numunelerinde regresyon analizi işlemidir. Excel kullanılarak regresyon analizi uygulanır ve r<0,900 olan pikler değerlendirme dışı bırakılır.

- Analizler sırasında, kaynağı tespit edilemeyen sebeplerden dolayı bazı pikler bazı numunelerde görülemeyebilir. XCMS eşleştirilen pikin analiz setinin kaç tanesinde görüldüğünü belirten bir sonuç kolonu verir. Veri işlemde ikinci basamak numune setlerinde % 50'sinden fazla pik kaybına neden olan değerleri sonuçlardan çıkartılmıştır.

- Örnekler iki tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Üçüncü basamakta tekrarlı analizlerde pik şiddetlerinin ortalaması alınmıştır.

- Dördüncü işlem basamağında pikler normalizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Normalizasyon işlemi, pikin enjeksiyondaki tüm piklerin ortalamasına bölünmesi şeklinde olmuştur.

- Bu aşamadan Şekil 3.9.'dakine benzer normalize edilmiş pikler tablosu elde edilmiştir. Bu değerler 't istatistik testi' ile karşılaştırılmış ve $p<0,05$ güven aralığında değişim katsayısı (DK) 1,5 kattan fazla değişen pikler tespit edilmiştir.

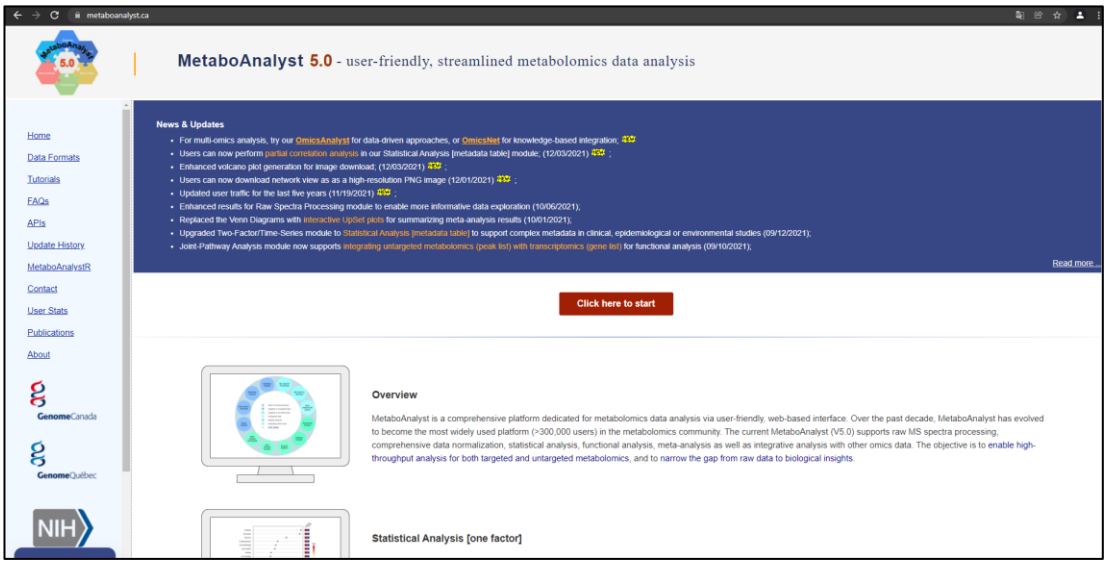
C1 A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A	T1A	T2A	T3A	T4A	T5A	T6A
0,091654	0,077844	0,072492	0,078838	0,083159	0,099445	5,870553	4,750274	4,965404	4,940366	4,720197	4,788967
0,020116	0,014753	0,016334	0,017543	0,019086	0,020361	1,156012	0,941965	0,990132	0,990507	0,937906	0,956761
0,016064	0,017784	0,033374	0,081002	0,065205	0,096647	4,746151	4,003698	4,256676	4,342845	3,927942	3,991346
0,244938	0,200169	0,200054	0,21613	0,200484	0,212223	0,051387	0,039565	0,043378	0,043355	0,042763	0,04101
0,297289	0,25537	0,250593	0,257857	0,222184	0,233366	0,03656	0,032706	0,027187	0,029449	0,022593	0,023455

Şekil 3.9. Örnek normalize pik şiddetleri tablosu.

3.10. İşlenmiş Kromatogram Verisi sonucu Tespit Edilen Metabolit Piklerin MetaboAnalyst 5.0 aracılığıyla İşlenmesi

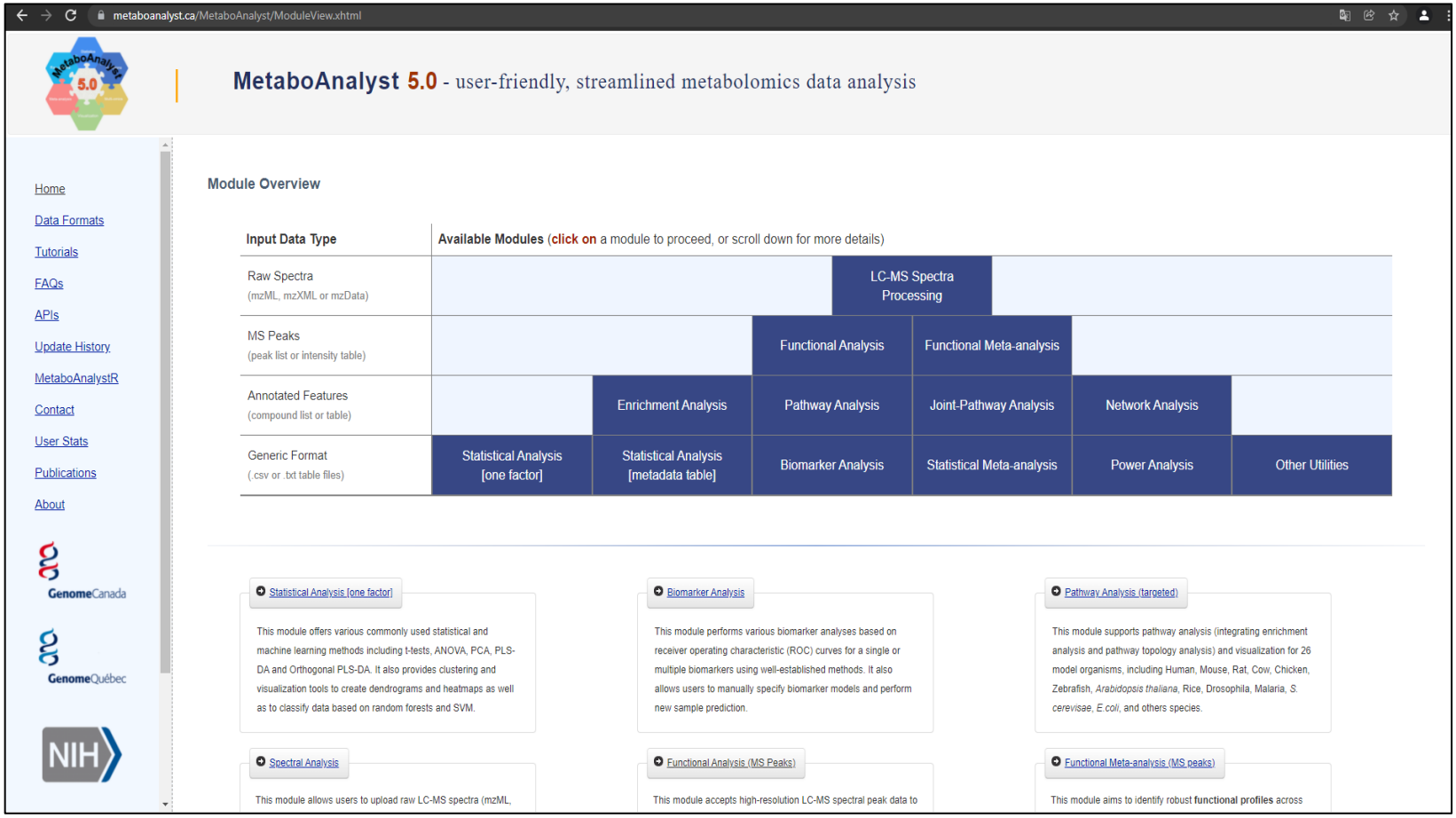
MetaboAnalyst, kullanıcı dostu, web tabanlı arayüz aracılığıyla metabolomik veri analizi için hazırlanmış bir yardımcı platformdur. Son on yılda MetaboAnalyst, metabolomik çalışmalarda en yaygın kullanılan platform (>300.000 kullanıcı) haline gelmiştir. Mevcut sürüm MetaboAnalyst 5.0 (https://www.metaboanalyst.ca/), ham MS spektrumlarını işlemeyi, veri normalizasyonunu, istatistiksel analizi, fonksiyonel analizi, meta-analizi ve diğer omik verileriyle bütünleştirici analizi destekleyen özellikler barındırmaktadır. Amaç, hem hedefli hem de hedeflenmemiş metabolit analizi için yapay zeka ve istatistiksel yaklaşımların bütüncül kullanımı aracılığıyla analiz hizmeti sağlamak ve ham verilerden elde edilen çıktıların biyolojik anlamlılığı ile ilgili sorularına cevap bulabilmektir [90]. İnsan Metabolom Veribankası (HMDB) 2.0 sürümü 2009 yılında, HMDB 3.0 sürümü ise 2013 yılında yayımlanmıştır ve HMDB'ye kayıtlı metabolit sayısı kurulduğu günden bu yana geçen sürede yaklaşık 20 kat artmıştır. MetaboAnalyst 5.0'a ait "*Functional Analysis*" isimli uygulama Bölüm 3.9.5'de anlatılığı şekilde XCMS çıktılarının işlenmesi sonucu MS Excel'de

tespit edilen ve de Grup C ve Grup T için $p<0.05$ ve değişim katsayısı (DK) >1,5 olan piklere ait m/z değerlerini taramaktadır. Bu m/z değerlerine ait onlarca metabolit ile HMDB üzerinden eşleşme sağlandığı halde MetaboAnalyst 5.0 algoritması ve eşleşmeleri yapay zeka ve bir mantık çerçevesinde eğer aynı metabolik yolakları etkileyen eşleşmeler ise doğru kabul eder; aksi taktirde eşleşmenin "hatalı-pozitif" bir eşleşme olduğunu kabul ederek eleme sağlar. MetaboAnalyst 5.0'a giriş ekranını içeren görsel Şekil 3.10.'da sunulmuştur.

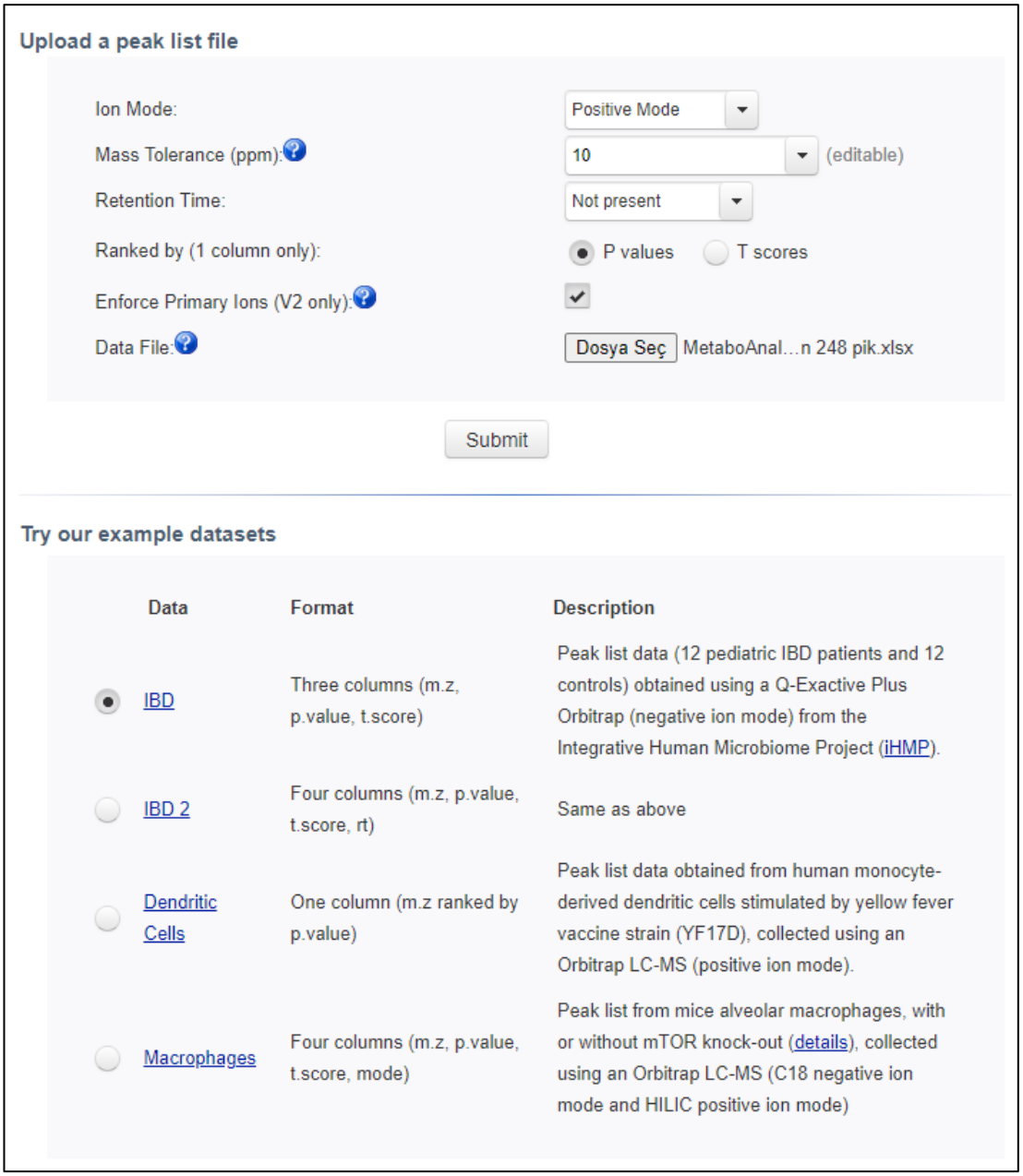


Şekil 3.10. MetaboAnalyst 5.0'a giriş ekranının çıktısı.

MetaboAnalyst 5.0 giriş ekranından Şekil 3.11.'de verildiği şekliyle "*Functional Analysis*" sekmesi kullanılarak uygun parametrelerin seçileceği bölüme ulaşılır (Şekil 3.12.).

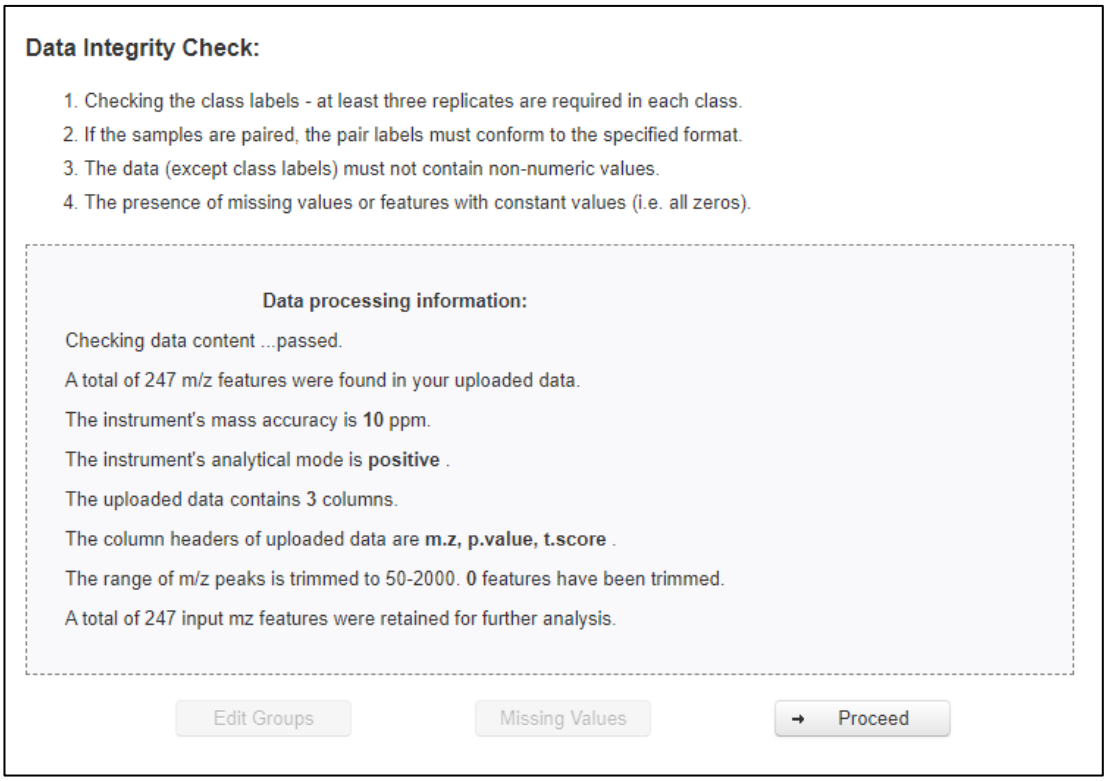


Şekil 3.11. MetaboAnalyst 5.0'da "Functional Analysis" sekmesi ekran çıktısı.



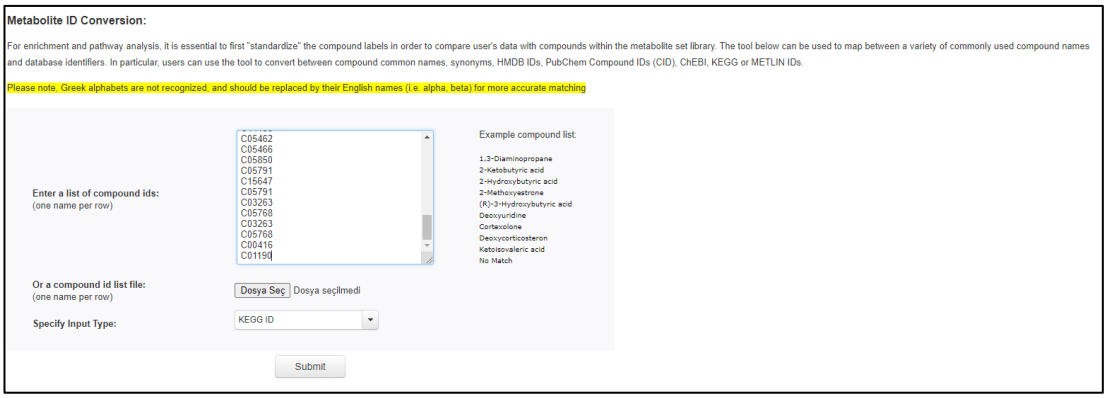
Şekil 3.12. MetaboAnalyst 5.0 parametre seçim ekranı çıktısı.

Parametre seçiminde sırasıyla LC/Q-TOF MS için iyon modu olarak “pozitif mod” seçilmiş ve en çok “10 ppm” hata payı ile nihai MS Excel çıktısındaki m/z değerlerini işlemesi talep edilmiştir. MS Excel listesinde rafine edilmiş ve işlenmiş ($p<0,05$ ve DK>1,5) piklere ait liste sisteme yüklendiğinde Şekil 3.13.’te verilen veri bütünlüğü kontrolü ekranına ulaşılmıştır.



Şekil 3.13. Veri bütünlüğü kontrol ekranı.

Veri bütünlüğü kontrolü, MetaboAnalyst 5.0 altyapısı tarafından gerçekleştirilen ve de yüklenen nihai listenin metabolitlerle eşleştirilme basamağından önceki son listedir. Eşleşme sonrası elde edilen listede Karbon 13 izotopu gibi var olma ihtimali düşük izotoplar ve farklı veri bankalarından alınan dublike sonuçlar elenerek eşleşen metabolitlere ait liste mercek altına alınmıştır. Son yapılan işlem ise MetaboAnalyst 5.0 – "Functional Analysis" eşleşmesi sonucu tespit edilen piklerin Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veribankasına ait metabolit kodlarının HMDB veribankasına dönüştürülmesi işlemidir. Bu amaçla; Şekil 3.14.'te gösterildiği gibi MetaboAnalyst 5.0'a ait "*Metabolite ID Conversion*" uygulaması kullanılmıştır.



Şekil 3.14. MetaboAnalyst 5.0 – "*Metabolite ID Conversion*" uygulamasının ekran çıktısı.

Tüm bu işlemler sonucunda gruplar arasında istatistiksel ve nicel anlamda değişim göstermiş ve tanımlanmış metabolitler biyokimyasal bir perspektif ile incelenmiş ve E vitamininin HEPG2 hücre hatları üzerinde lipit metabolizması ile ilişkili metabolik yolaklar üzerinde yaptığı değişim yorumlanmıştır. Bu kapsamda İSA aracılığıyla enkapsüle edilen E vitamininin, tek başına tatbik edilen E vitaminine göre "etkinliği" incelenmiş, nano-enkapsülasyonun sonuçları, avantaj ve dezavantaj çerçevesinde dikkate alınmıştır.

3.11. XCMS ile İşlenen Metabolomik ve Lipidomik Verinin Temel Bileşenler Analizi ile Yorumlanması

Temel Bileşen Analizi (PCA), veri sıkıştırma ve görselleştirme için kullanılan ve bir dizi yeni ortogonal özellik oluşturarak veri varyansını tanımlamayı amaçlayan bir analiz metodudur. Temel bileşenler, veri değişkenlerinin doğrusal bir birleşimidir ve karşılıklı olarak ortogonaldir. PCA'nın veri dönüşümü olarak ortogonal karakteri, temel bileşenlerin nesneler arasındaki Öklid mesafelerinin korunmasını sağlar. Bu nedenle, PCA genellikle veri analizinin ilk adımı olarak uygulanır ve genellikle metabolomik yaklaşımlar için girdi verileri olarak kullanılır. PCA ayrıca çok değişkenli regresyon, eğri çözünürlük yöntemleri, diskriminant analizi dahil olmak üzere diğer kemometrik tekniklerde sıklıkla kullanılmaktadır [91]. Bu tezde metabolomik ve lipidomik verilerin Grup C, Grup T ve Grup E için PCA grafikleri hazırlanmış ve aralarında karşılaştırma yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. E Vitamini Yüklü İSA Karakterizasyonu

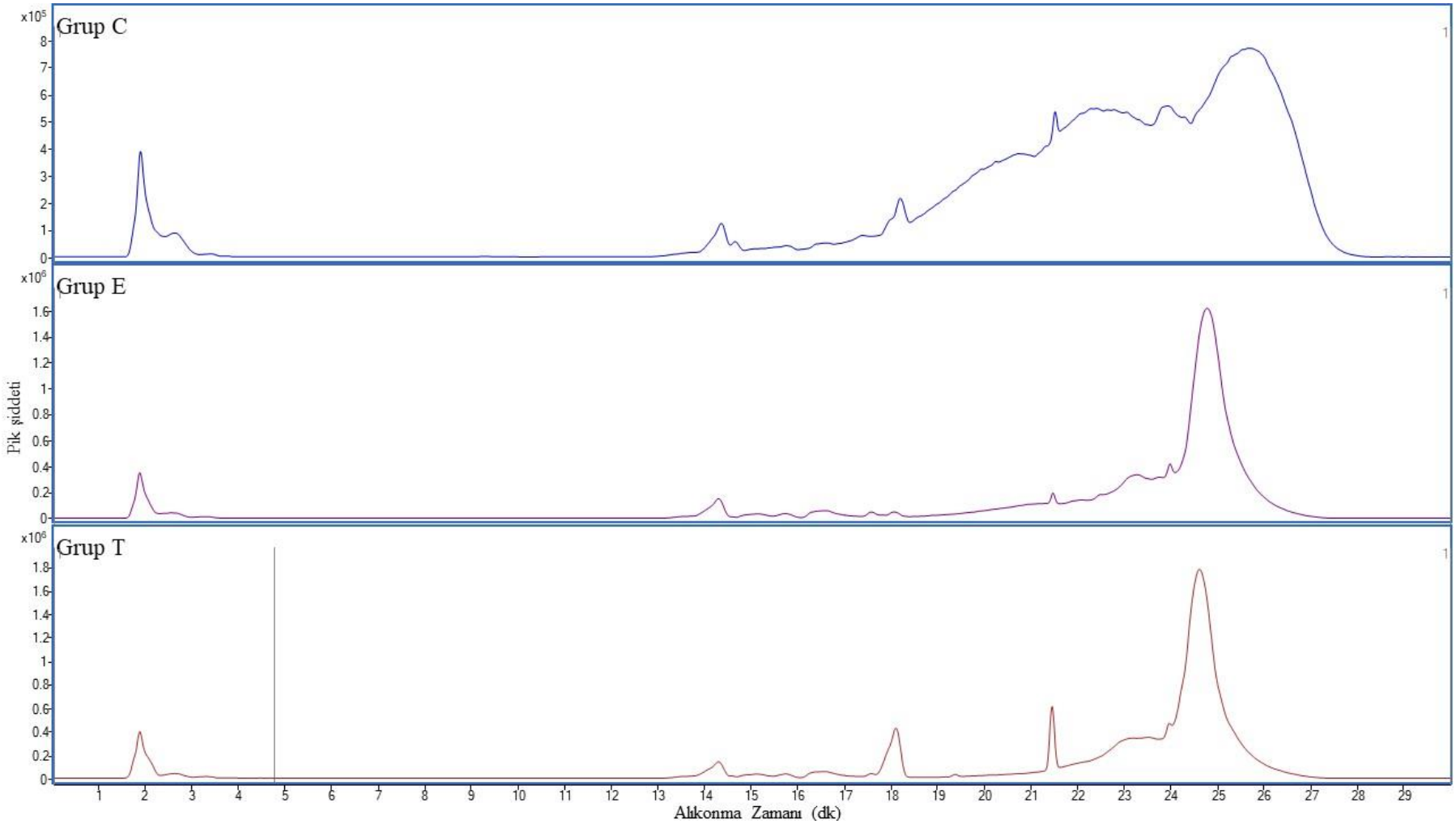
Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 119-156 nm arasında bulunmuştur. Nanopartiküllere E vitamini yüklenmesinin partikül büyüklüğünü önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Bu durum E vitamininin önemli bir kısmının nanopartikül yüzeyine adsorbe olduğunu ve nanopartikülün etrafında bir kaplama tabakası oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayrıca E vitamini yüklü nanopartiküllerde zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi boş nanopartiküllere kıyasla daha düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda E vitamini ve türevlerinin özellikle polimerik nanopartikülleri stabilize etmek ve daha monodispers, istenilen büyüklükte (genellikle <200 nm) ve stabil nanopartikül yapısı elde etmek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir [92-94]. Bu, E vitamini yüklü nanopartiküllerin boş nanopartiküllerden daha stabil olduğunun bir göstergesidir. Tablo 4.1.'de ilgili sonuçlar sunulmuştur.

Tablo 4.1. Boş ve Vitamin E yüklü İSA nanopartiküllerin *in vitro* karakteristikleri.

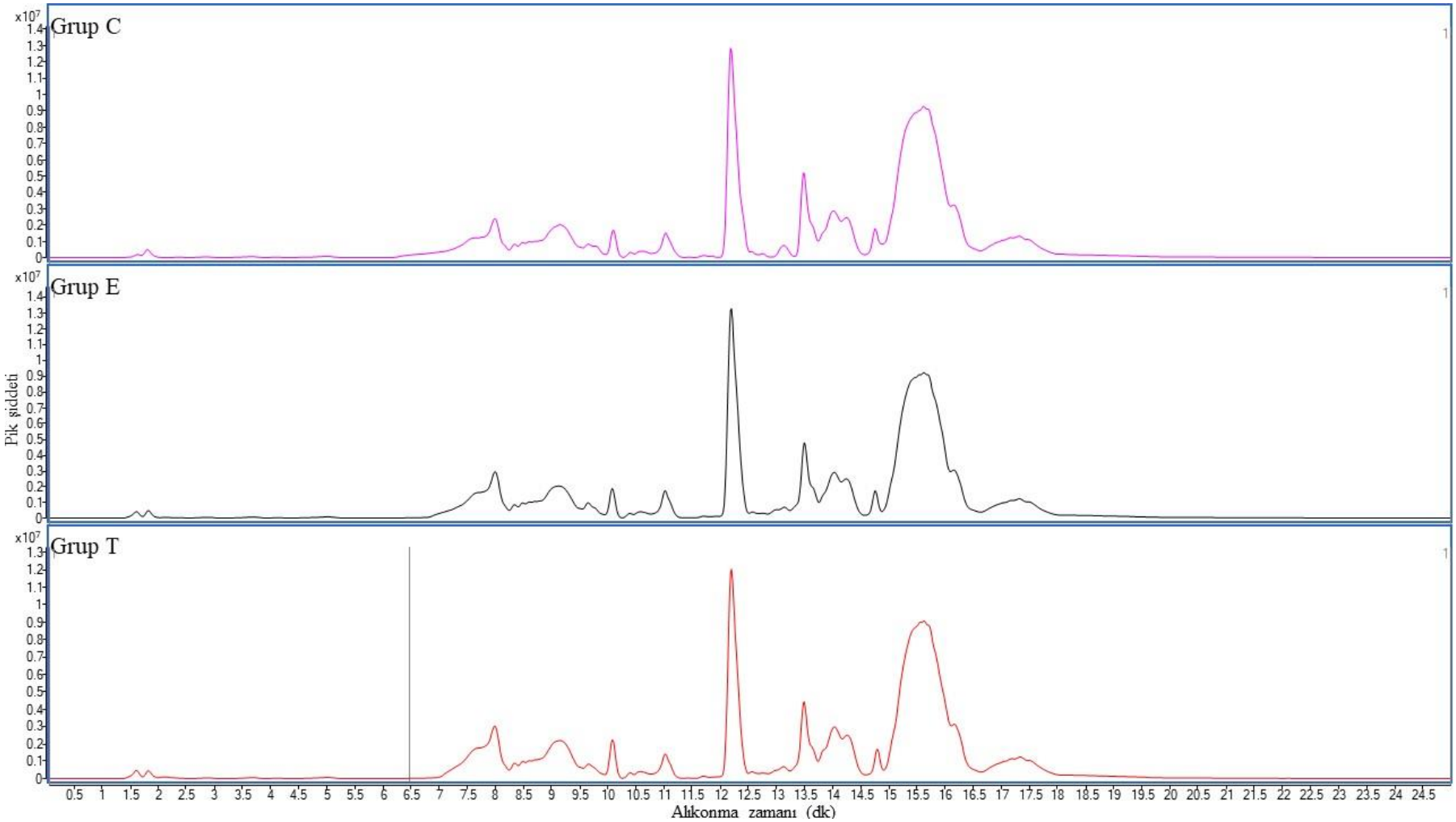
	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	**PDI**	**Zeta Potansiyeli (mV)**
Vitamin-E yüklü İSA Nanopartikülleri	155.9 ±0.81	0.127 ±0.004	-28.5 ±0.115
Boş İSA Nanopartikülleri	119.7±1.106	0.45±0.03	-23.5 ±1.33

4.2. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalara Ait Kromatogramlar

Bölüm 3.7. ve 3.8.'de anlatıldığı üzere belirlenmiş şartlarda gerçekleştirilen LC/Q-TOF MS analizi sonucunda Grup C ve Grup T için elde edilmiş metabolomik ve lipidomik çalışmalara ait toplam iyon kromatogramları Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de, ekstre edilmiş iyon kromatogramları ise Bölüm 4.4.'te sunulmuştur.



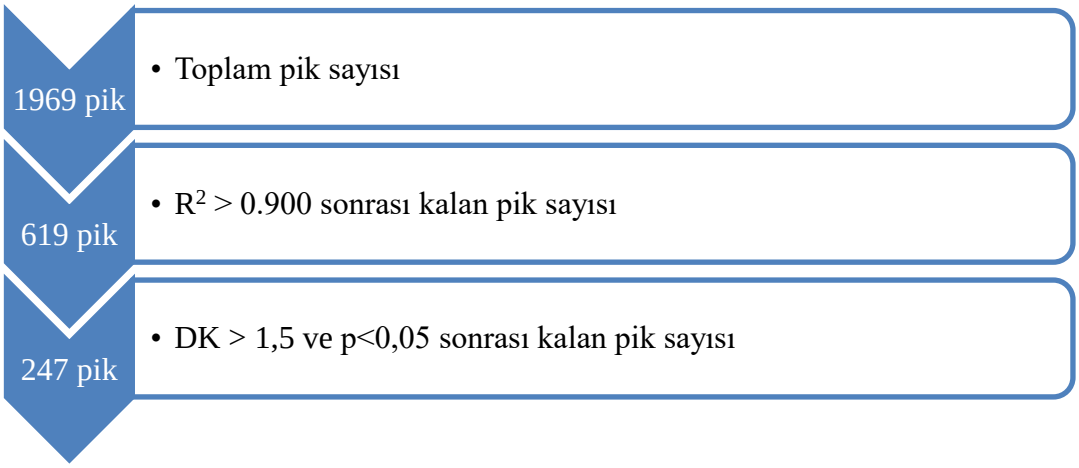
Şekil 4.1. Metabolomik çalışmalara ait Grup C, E ve T'ye ait toplam iyon kromatogramı.



Şekil 4.2. Lipidomik çalışmalara ait Grup C, E ve T'ye ait toplam iyon kromatogramı.

4.3. Ham Kromatogramların XCMS ve MS Excel ile İşlenmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular

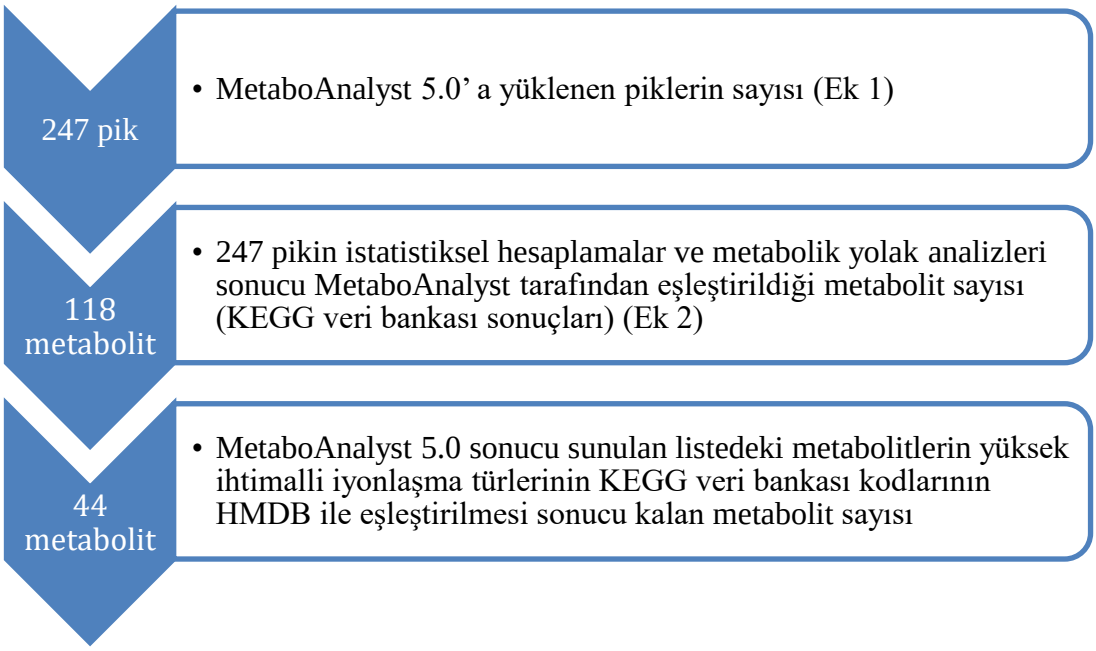
Analiz sonucu Grup C, Grup T ve Grup E için toplam 1969 adet pik bulunmuş olup regresyon analizi sonucu her bir pik için uygulanan ardışık seyreltme yöntemiyle elde edilen veriler incelendiğinde $R^2 > 0{,}900$ olan toplam 619 pike rastlanmıştır. Bu 619 pik için DK>1,5 ve p<0,05 olan pik sayısı 247 pik olarak tespit edilmiştir. İlgili süreci görselleştiren şema Şekil 4.3.'te sunulmaktadır.



Şekil 4.3. XCMS analizi sonucu elde edilen 1969 pikin, veri işleme sonucu Grup C ve Grup T arasında değişim gösteren 247 pike indirgenmesini gösteren şema.

4.4. İşlenmiş Kromatogram Verisi Sonucu Tespit Edilen Piklerin MetaboAnalyst 5.0 Aracılığıyla İşlenmesi Sonucu Eşleşme Sağlanan Metabolitler

247 adet metabolit piki (Ek 1), MetaboAnalyst 5.0 Functional Analysis işlemi sonrası 118 adet metabolit ile eşleşmiştir; ancak C13 izotopu gibi var olma ihtimali düşük türler, bizim çalışma ortamımızda var olması mümkün olmayan ve farklı veri bankalarından alınan dublike sonuçlar elendiğinde 44 adet KEGG kodu ile eşleşen metabolit (Ek 2) inceleme altına alınmıştır. MetaboAnalyst ID conversion ile 44 metabolite ait KEGG kodu HMDB koduna çevrilmiş ve KEGG veribankasında farklı formları için ayrı KEGG kodu almış metabolitler de bu sayede filtrelenmiştir. İlgili süreç Şekil 4.4.'te sunulmaktadır.



Şekil 4.4. Grup C ve Grup T arasında değişim gösteren 247 pikin MetaboAnalyst 5.0 ile işlenmesi sonucu kalan ve çalışma kapsamında incelemeye alınmış 44 metaboliti içeren süreci gösteren şema.

Nihai liste incelendiğinde toplam 44 metabolit aslında 17 pik ile eşleştiği görülmektedir. İlgili liste Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Metabolomik çalışmalar sonucu Grup T, Grup E ve Grup C arasında değişime uğradığı tespit edilen 18 metabolit piki ve piklerin eşleştiği 44 metaboliti gösteren liste.

Pik	Kütle/yük	Eşleşen Form	KEGG kodu	HMDB kodu	Metabolit	DK T/C	Artmış/ Azalmış	DK E/C	Artmış/ Azalmış
1	174.0876	M+H2O+H[1+]	C00135	HMDB0000177	L-histidin	1.63	+	2.32	+
	174.0876	M+Na[1+]	C02442	HMDB0003633	N-metiltiramin				
	174.0876	M+Na[1+]	C03711	HMDB0001387	N-metilfeniletanolamin				
	174.0876	M+H[1+]	C03771	HMDB0004225	2-oksoarjinin				
	174.0876	M-NH3+H[1+]	C05933	HMDB0004224	N(ω)-hidroksiarjinin				
2	290.1329	M-HCOOH+H[1+]	C04540	HMDB0000489	Aspartilglikozamin	1.71	+	3.07	+
3	291.1329	M[1+]	C05118	HMDB0006869	S-(2-metilbutanol)-dihidrolipoamid	1.57	+	2.50	+
	291.1329	M[1+]	C05119	HMDB0006867	S-(3-metilbutanol)-dihidrolipoamid-E				
4	317.0949	M+K[1+]	C00831	HMDB0003426	Pantetein	2.53	-	2.22	-
5	367.0382	M-NH3+H[1+]	C14864	HMDB0060505	S-(2-kloroasetil) glutatyon	3.21	-	1.00	+
	367.0382	M-NH3+H[1+]	C14865	HMDB0060342	2-(S-glutatyonil) asetilklorid				
6	375.2140	M+Na[1+]	C00427	HMDB0001381	Prostaglandin H2	1.67	-	1.46	+

Tablo 4.2. Metabolomik çalışmalar sonucu Grup T, Grup E ve Grup C arasında değişime uğradığı tespit edilen 18 metabolit piki ve piklerin eşleştiği 44 metaboliti gösteren liste (Devamı).

Pik	Kütle/yük	Eşleşen Form	KEGG kodu	HMDB kodu	Metabolit	DK T/C	Artmış/ Azalmış	DK E/C	Artmış/Azalmış
	375.2140	M+Na[1+]	C00584	HMDB0001220	Prostaglandin E2				
	375.2140	M+Na[1+]	C00696	HMDB0001403	Prostaglandin D2				
	375.2140	M+Na[1+]	C01312	HMDB0001335	Prostaglandin I2				
	375.2140	M+Na[1+]	C02198	HMDB0001452	Tromboksan A2				
	375.2140	M+Na[1+]	C04654	HMDB0001320	(13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit				
	375.2140	M+Na[1+]	C04671	HMDB0002776	13,14-dihidro-15-keto-PGE2				
	375.2140	M+Na[1+]	C04853	HMDB0001509	20-hidroksi-lökotrien B4				
	375.2140	M+Na[1+]	C06314	HMDB0004385	Lipoksin A4				
	375.2140	M+Na[1+]	C06315	HMDB0005082	Lipoksin B4				
7	475.2304	M-CO2+H[1+]	C16543	HMDB0060499	NPC	1.67	-	1.02	-
8	503.3156	M+HCOOK[1+]	C05445	HMDB0006894	3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al	1.59	-	1.01	-
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C05453	HMDB0006887	7α,12α-dihydroxy-5β-kolestan-3-on				

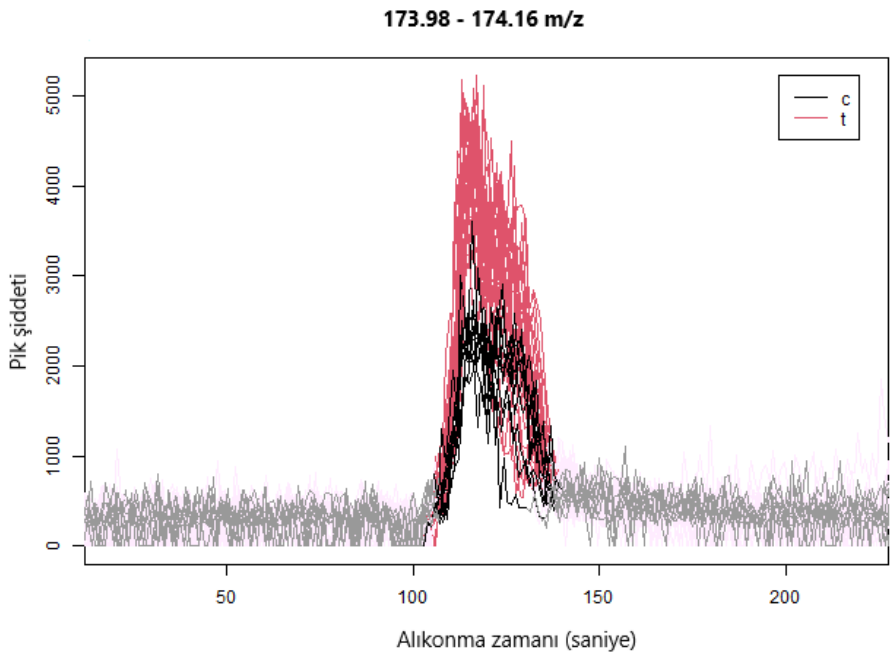
Tablo 4.2. Metabolomik çalışmalar sonucu Grup T, Grup E ve Grup C arasında değişime uğradığı tespit edilen 18 metabolit piki ve piklerin eşleştiği 44 metaboliti gösteren liste (Devamı).

Pik	Kütle/yük	Eşleşen Form	KEGG kodu	HMDB kodu	Metabolit	DK T/C	Artmış/ Azalmış	DK E/C	Artmış/Azalmış
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C05458	HMDB0006886	7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on				
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C05499	-	(20R)-17α,20-dihidroksikolestrol				
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C05501	HMDB0006763	20α,22β-dihidroksikolestrol				
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C06341	HMDB0006281	7α,27-dihidroksikolestrol				
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C15518	HMDB0060136	7α,24S-dihidroksikolestrol				
	503.3156	M+HCOOK[1+]	C15520	-	7α,25-dihidroksikolestrol				
9	509.3004	M+NaCl[1+]	C04722	HMDB0003873	3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit	6.00	-	1.33	-
	509.3004	M+HCOOK[1+]	C14153	HMDB0006327	α-Tokotrienol				
10	518.3057	M+HCOONa[1+]	C05462	HMDB0006898	Kenodeoksikolik asit	1.86	-	1.14	-
	518.3057	M+HCOONa[1+]	C05466	HMDB0000637	Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı				
11	539.3749	M+HCOONa[1+]	C05850	HMDB0003555	K1 Vitamini	6.94	-	1.75	-
12	563.3196	M-CO+H[1+]	C05791	HMDB0004158	Urobilinojen	1.61	-	1.02	+
13	621.4598	M-H4O2+H[1+]	C15647	HMDB0011155	PA(P-16:0e/18:2(9Z,12Z))	11.61	-	1.39	-

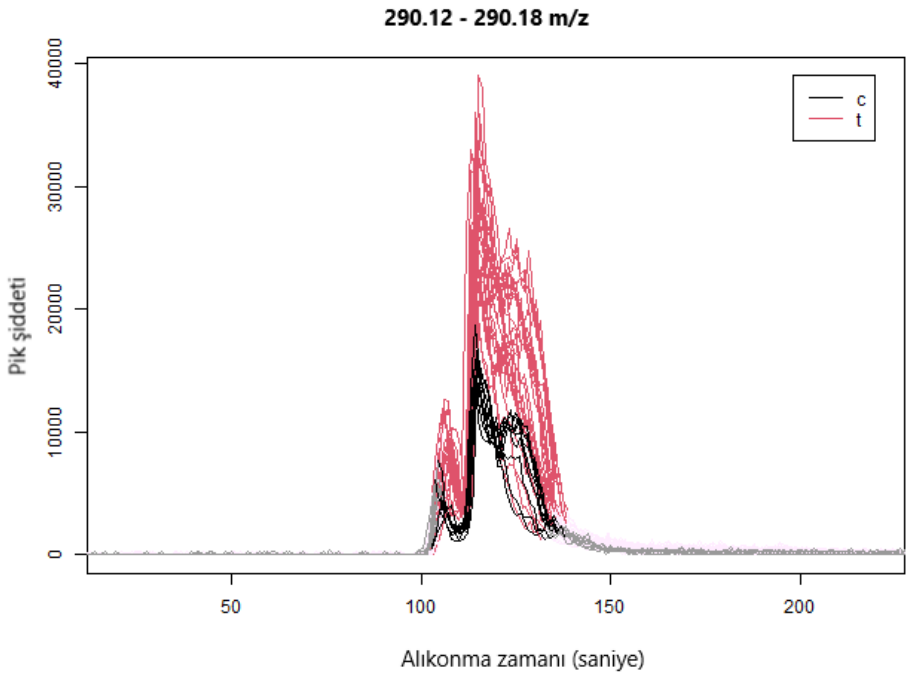
Tablo 4.2. Metabolomik çalışmalar sonucu Grup T, Grup E ve Grup C arasında değişime uğradığı tespit edilen 18 metabolit piki ve piklerin eşleştiği 44 metaboliti gösteren liste (Devamı).

Pik	Kütle/yük	Eşleşen Form	KEGG kodu	HMDB kodu	Metabolit	DK T/C	Artmış/ Azalmış	DK E/C	Artmış/Azalmış
14	659.3096	M+HCOONa[1+]	C05791	HMDB0004158	Urobilinogen	2.26	-	2.26	-
15	660.3127	M[1+]	C03263	HMDB0001261	Koproporfinojen III	2.20	-	2.19	-
	660.3127	M[1+]	C05768	HMDB0002158	Koproporfinojen I				
16	661.3171	M+H[1+]	C03263	HMDB0001261	Koproporfinojen III	2.08	-	2.03	-
	661.3171	M+H[1+]	C05768	HMDB0002158	Koproporfinojen I				
17	665.4876	M-H4O2+H[1+]	C00416	HMDB0000674	PA(16:0/16:0)	11.68	-	1.34	-
18	666.4901	M+Na[1+]	C01190	HMDB0000140	Glukozilseramid	9.61	-	1.32	-

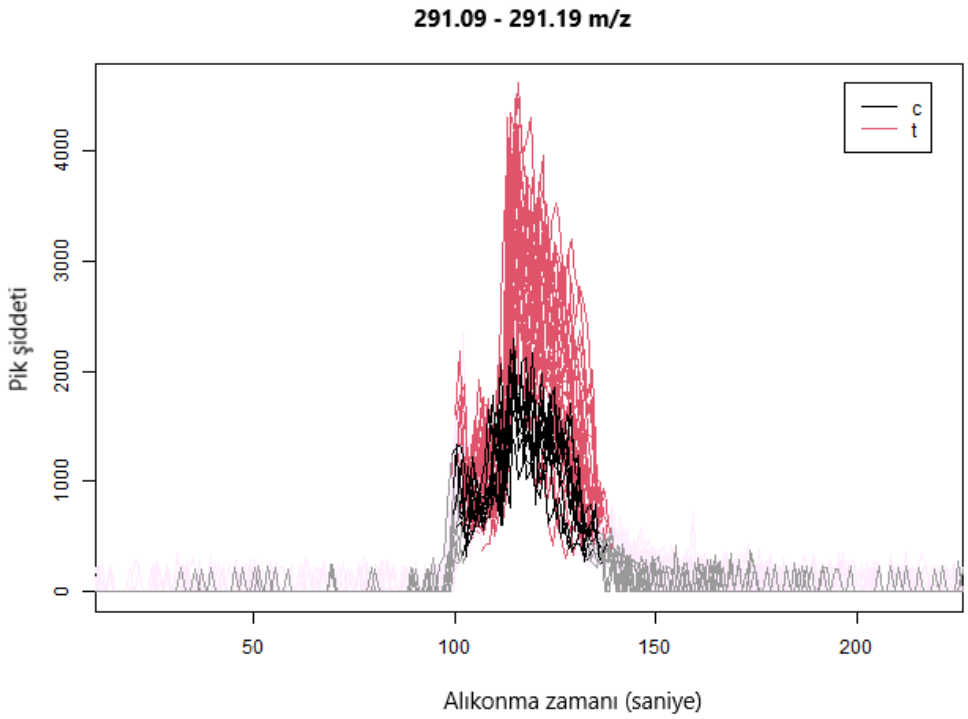
Piklerin ait olabileceği düşünülen noktalar baz alınarak kromatogramlar seçilmiştir. 18 metabolit pikine ait ekstre edilmiş iyon kromatogramları aşağıda Tablo 4.2.'deki sırayla sunulmuştur (**Şekil 4.5. – Şekil 4.21**).



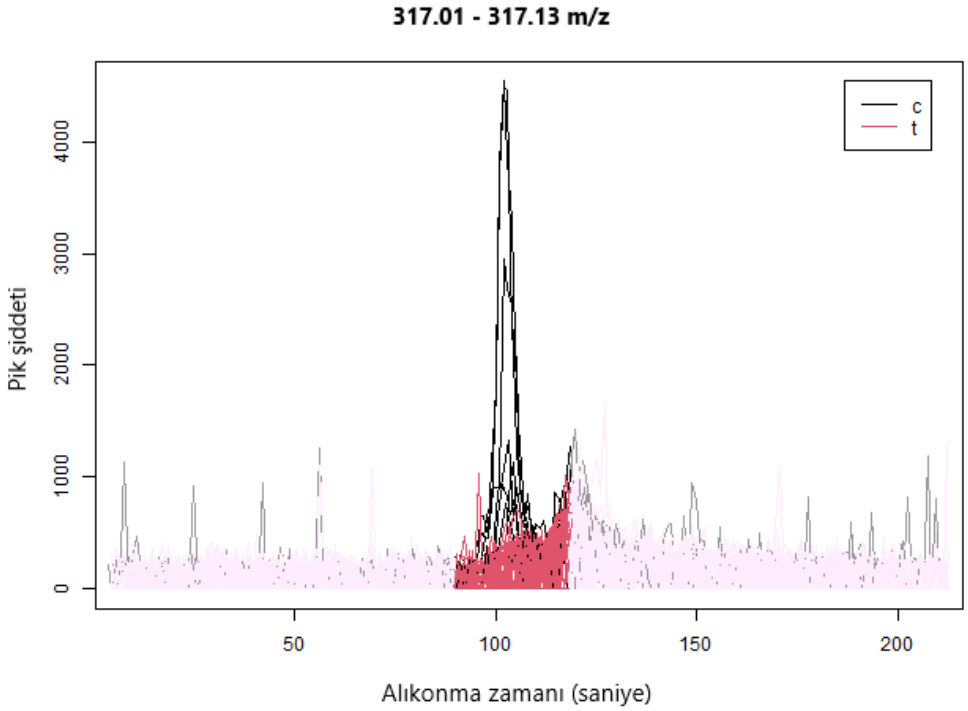
Şekil 4.5. L-histidin, N-metiltiramin, N-metilfeniletanolamin, 2-oksoarjinin, N(ω)-hidroksiarjinin metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



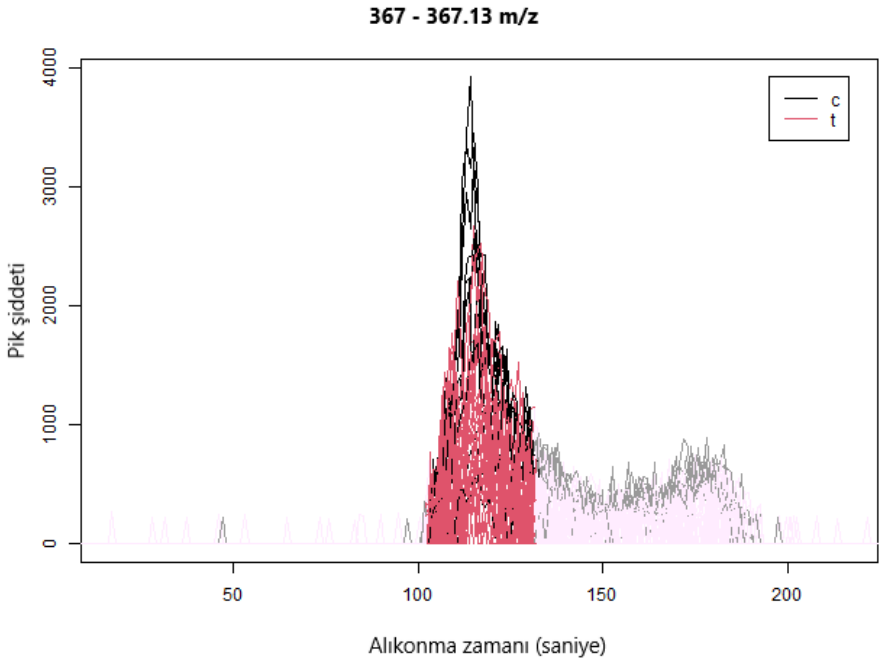
Şekil 4.6. Aspartilglukozamin metabolityle eşleşen kromatogram.



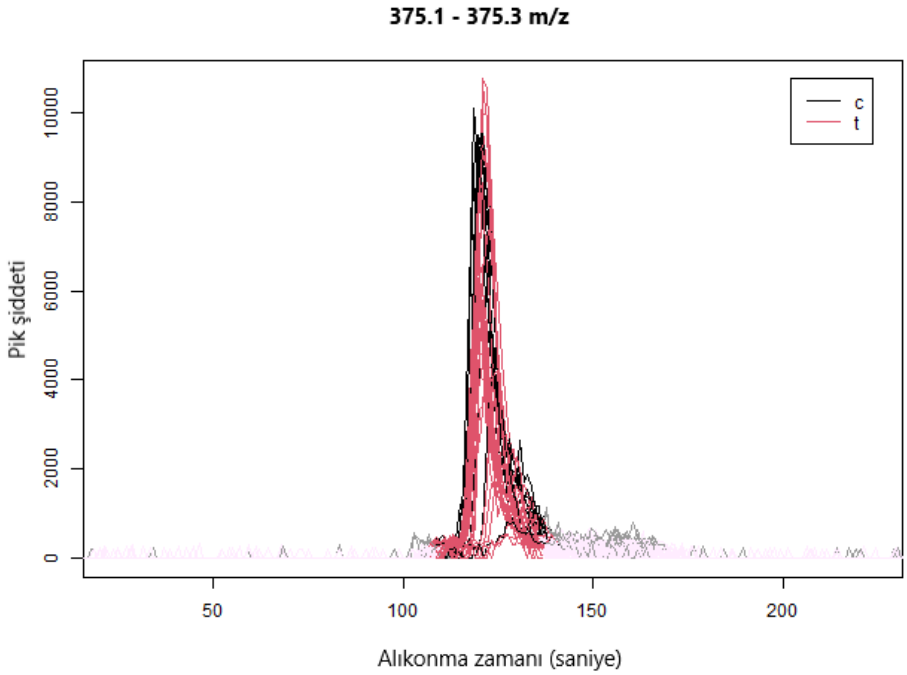
Şekil 4.7. S-(2-metilbutanol) dihidroksilipoamid, S-(3-metilbutanoil) dihidroksilipoamid-E metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



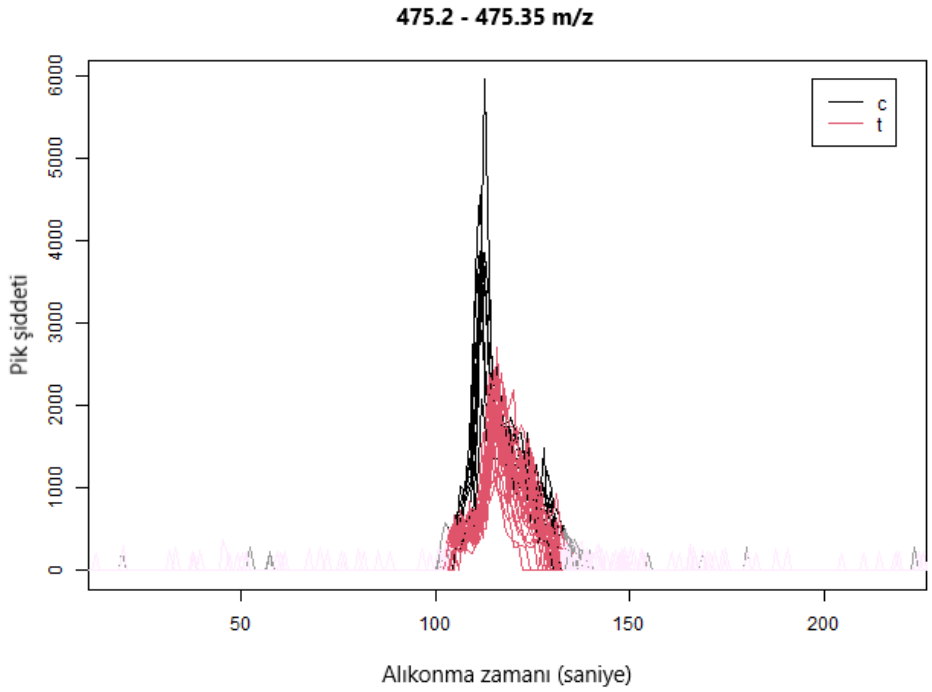
Şekil 4.8. Pantetein metabolitiyle eşleşen kromatogram.



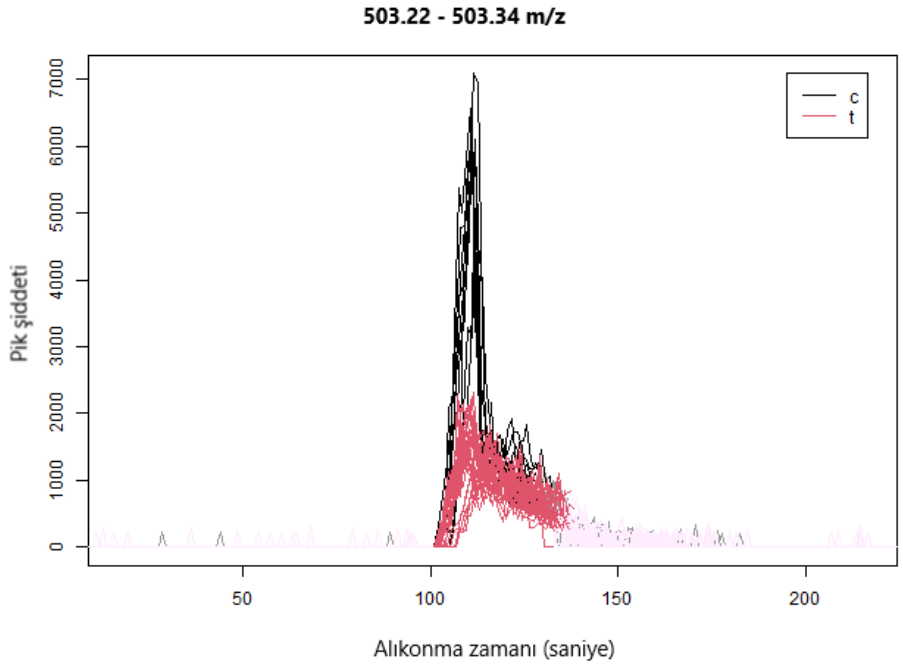
Şekil 4.9. S-(2-kloroasetil)glutatyon, 2-(S-glutatyonil)asetilklorid metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



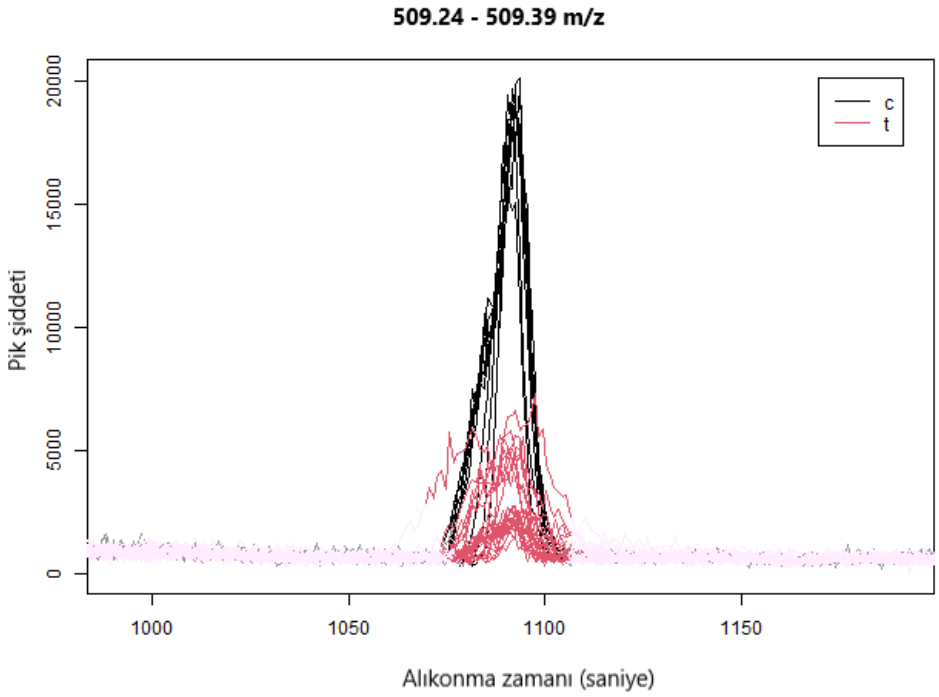
Şekil 4.10. Prostaglandin H2, Prostaglandin E2, Prostaglandin D2, Prostaglandin I2, Tromboksan A2, (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit, 13,14-dihidroksi-15-keto-PGE2, 20-hidroksi-lökotrien B4, Lipoksin A4, Lipoksin B4 metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



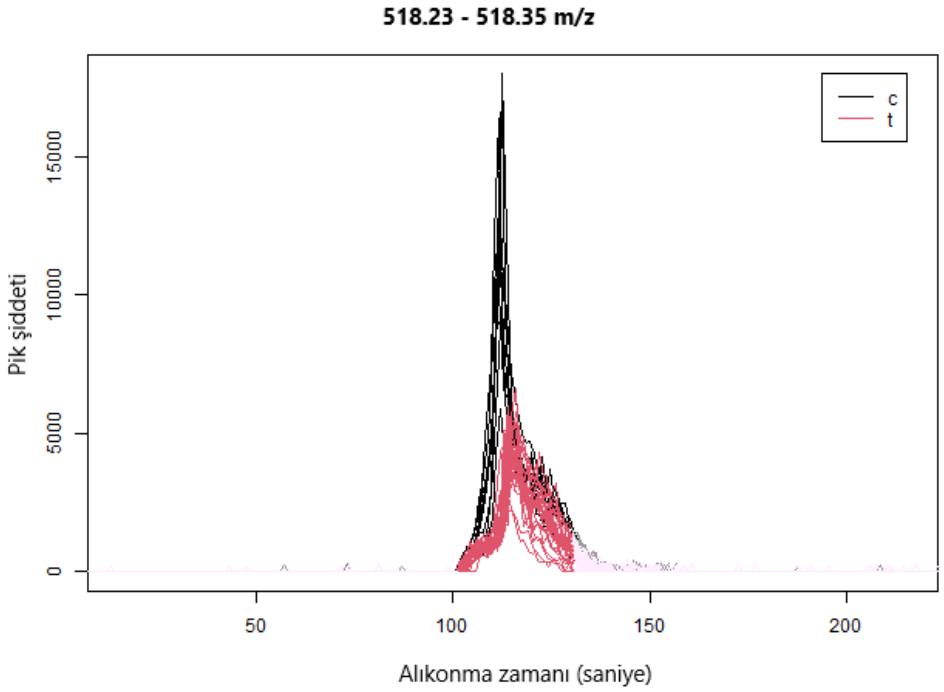
Şekil 4.11. NPC metabolitiyle eşleşen kromatogram.



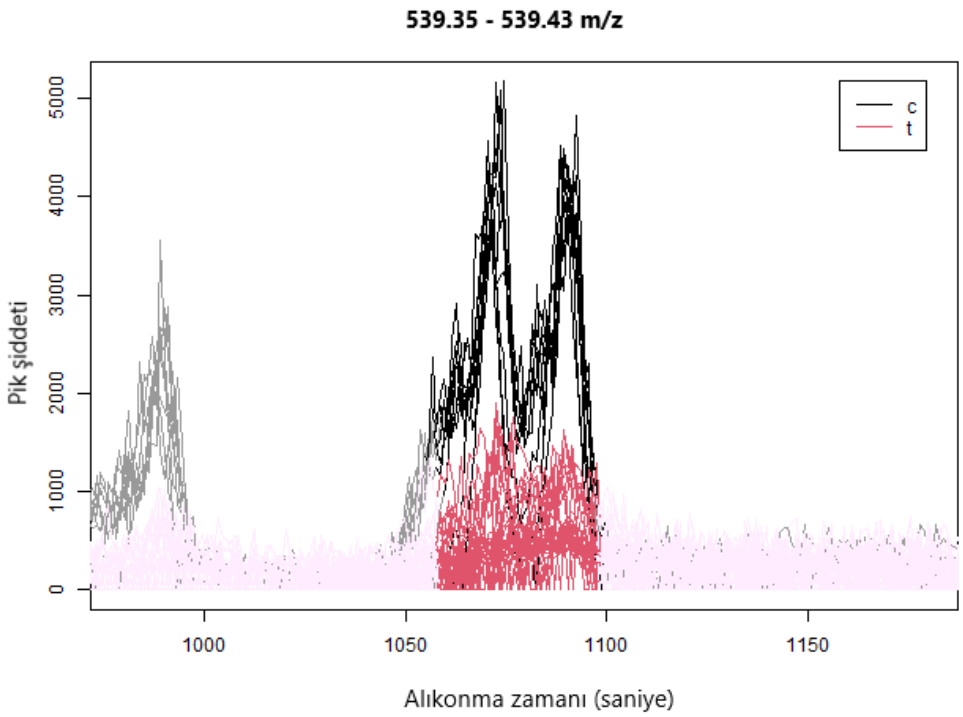
Şekil 4.12. 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al, 7α,12α-dihydroxy-5β-kolestan-3-on, 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on, (20R)-17α,20-dihidroksikolestrol, 20α,22β-dihidroksikolestrol, 7α,27-dihidroksikolestrol, 7α,24S-dihidroksikolestrol, 7α,25-dihidroksikolestrol metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



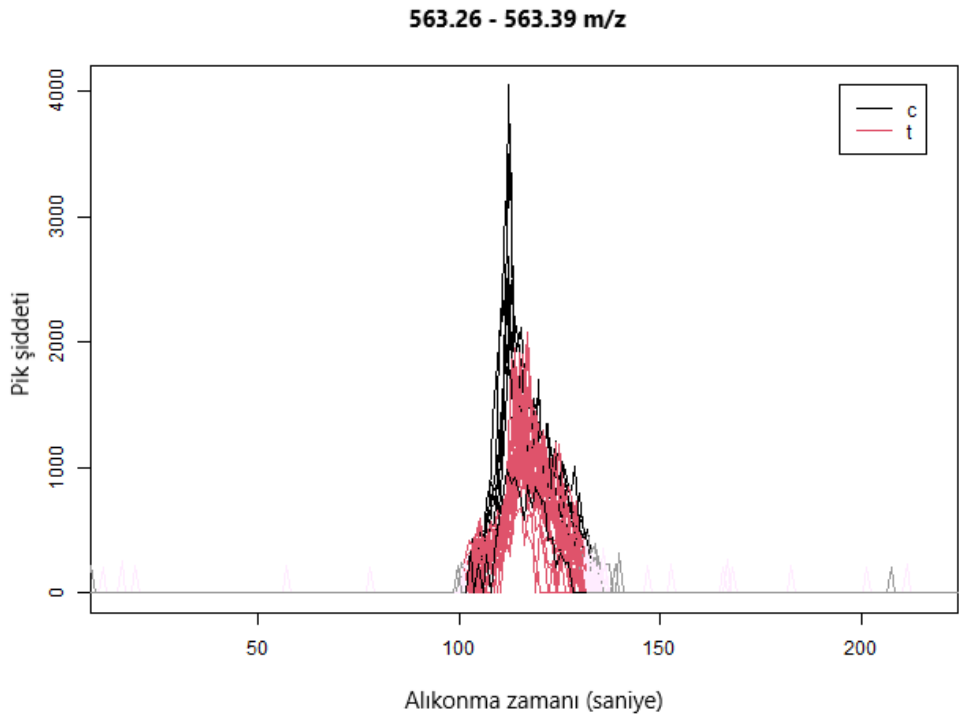
Şekil 4.13. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit, α-Tokotrienol metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



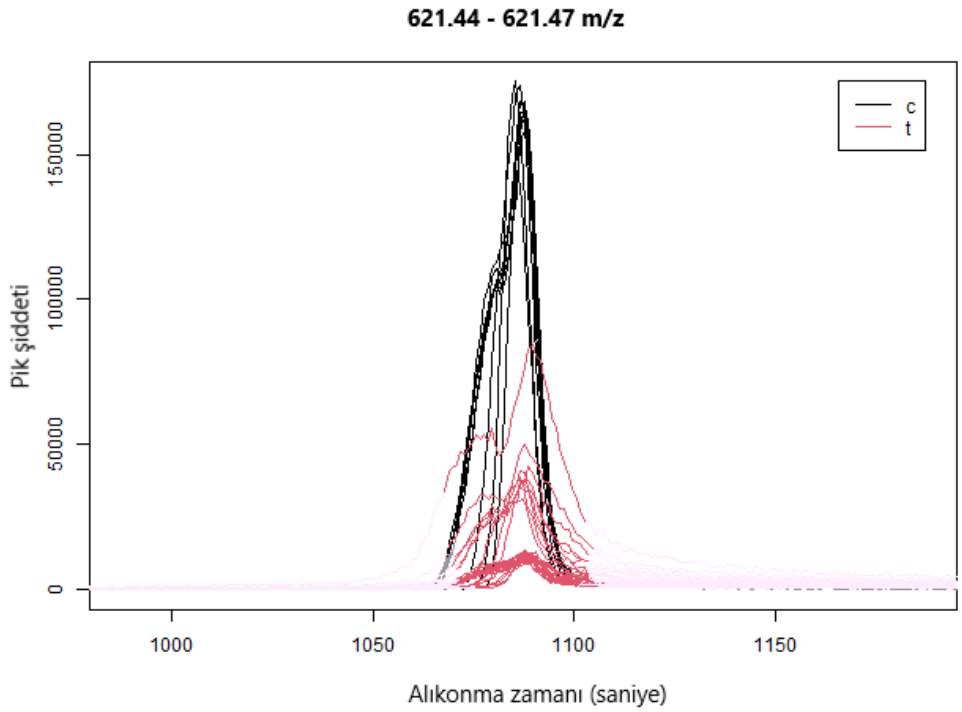
Şekil 4.14. Kenodeoksikolik asit, Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı metabolitleriyle eşleşen kromatogram.



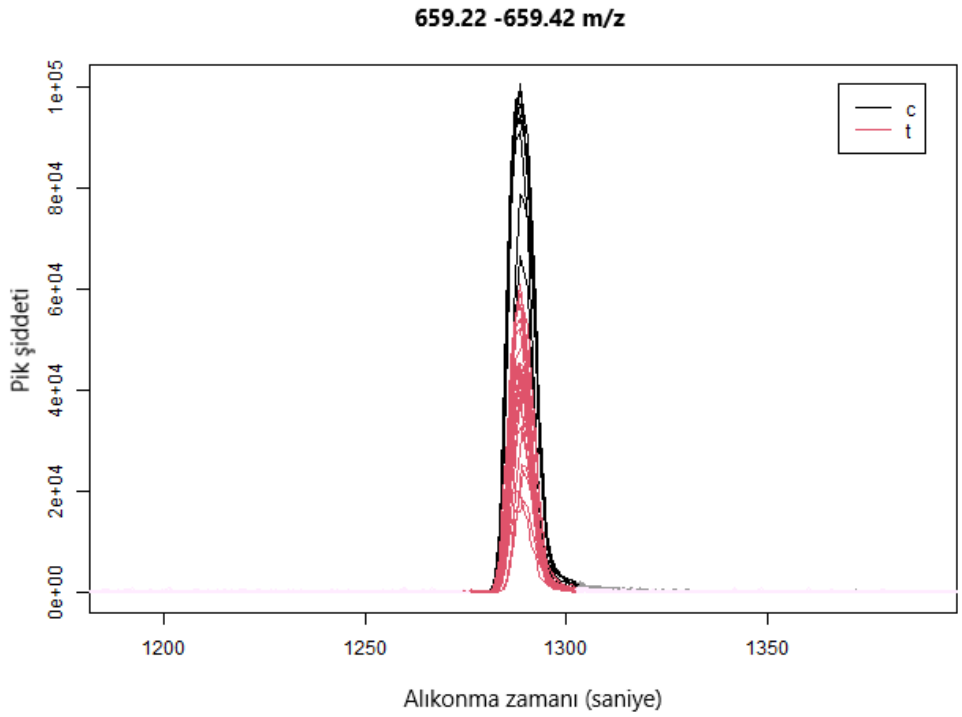
Şekil 4.15. K1 Vitamini metabolitiyle eşleşen kromatogram.



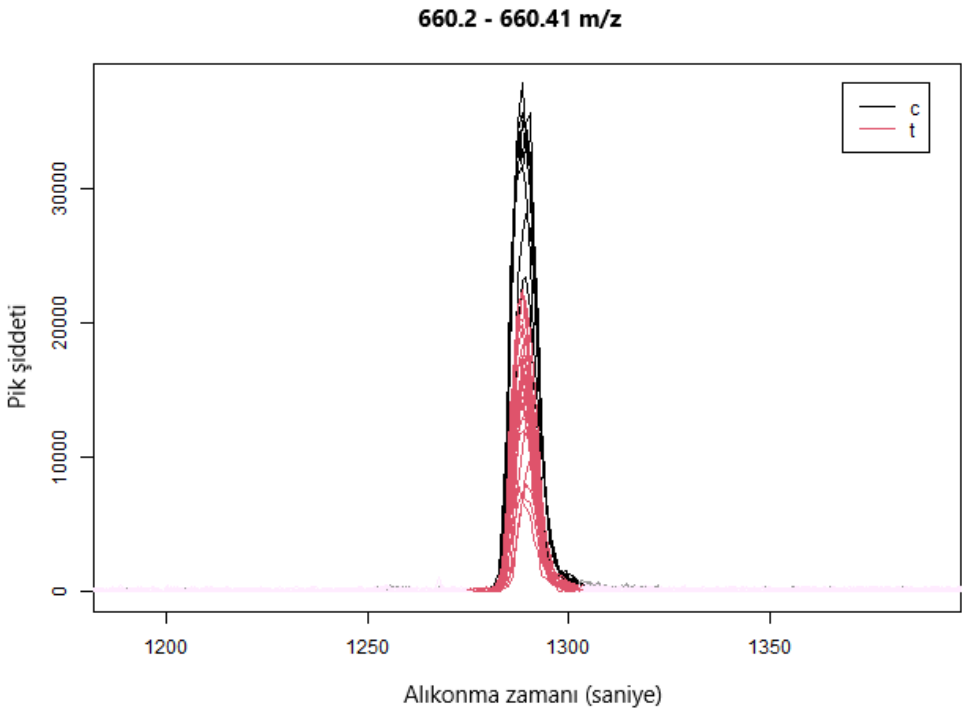
Şekil 4.16. Ürobilinojen metabolitiyle eşleşen kromatogram.



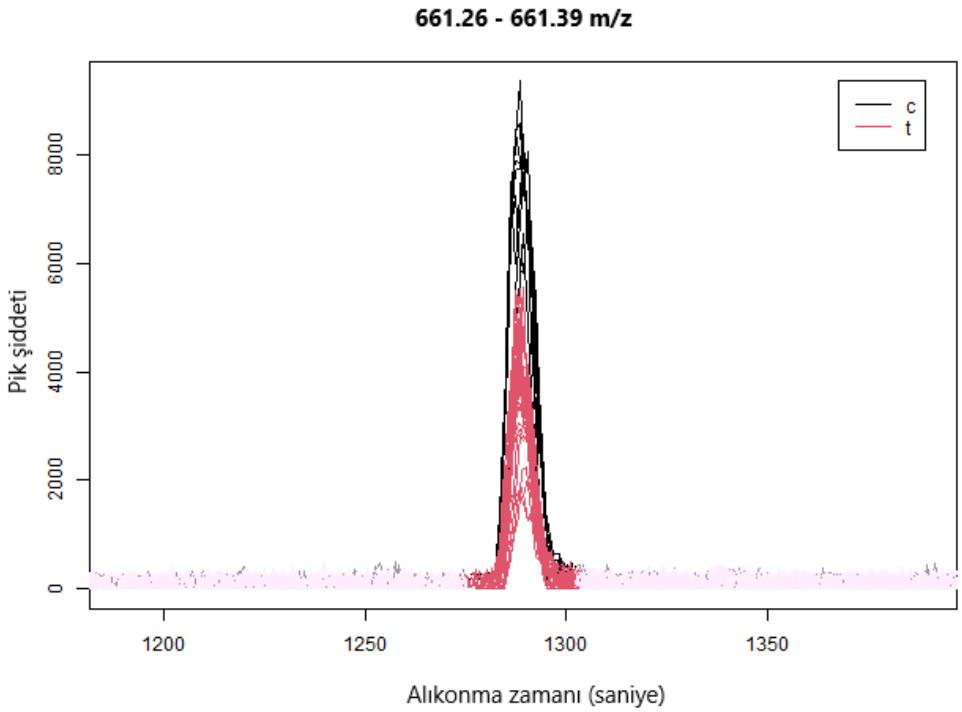
Şekil 4.17. PA(P-16:0e/18:2(9Z,12Z)) metabolitiyle eşleşen kromatogram.



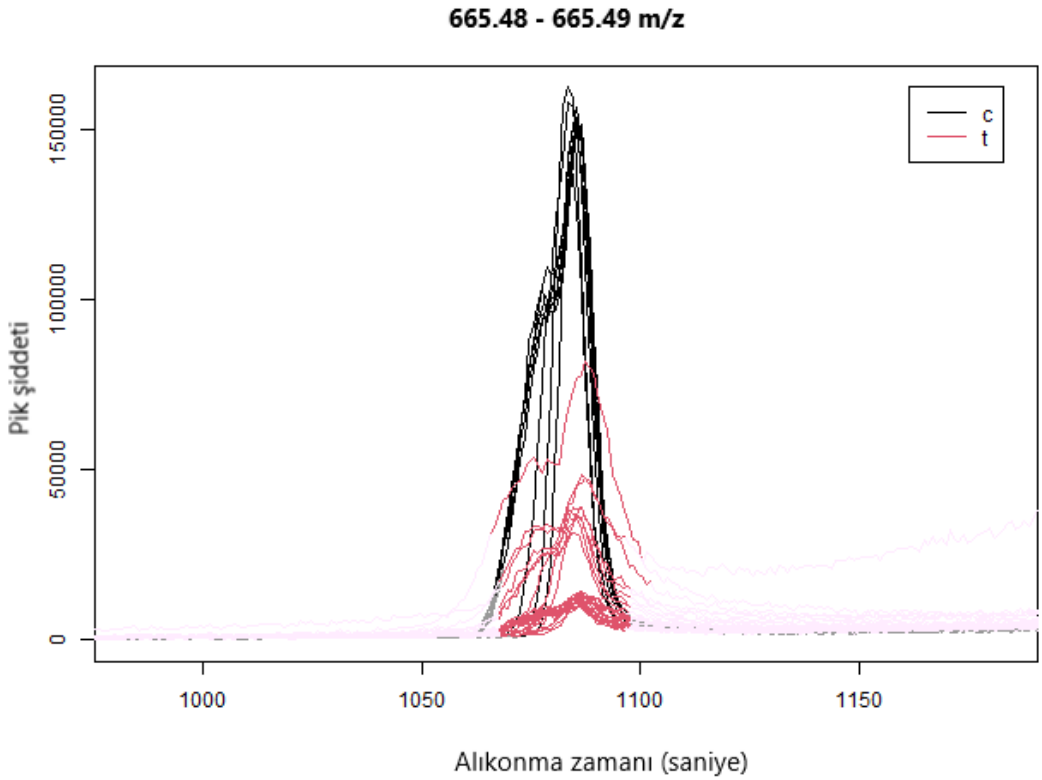
Şekil 4.18. Ürobilinojen metabolitiyle eşleşen kromatogram.



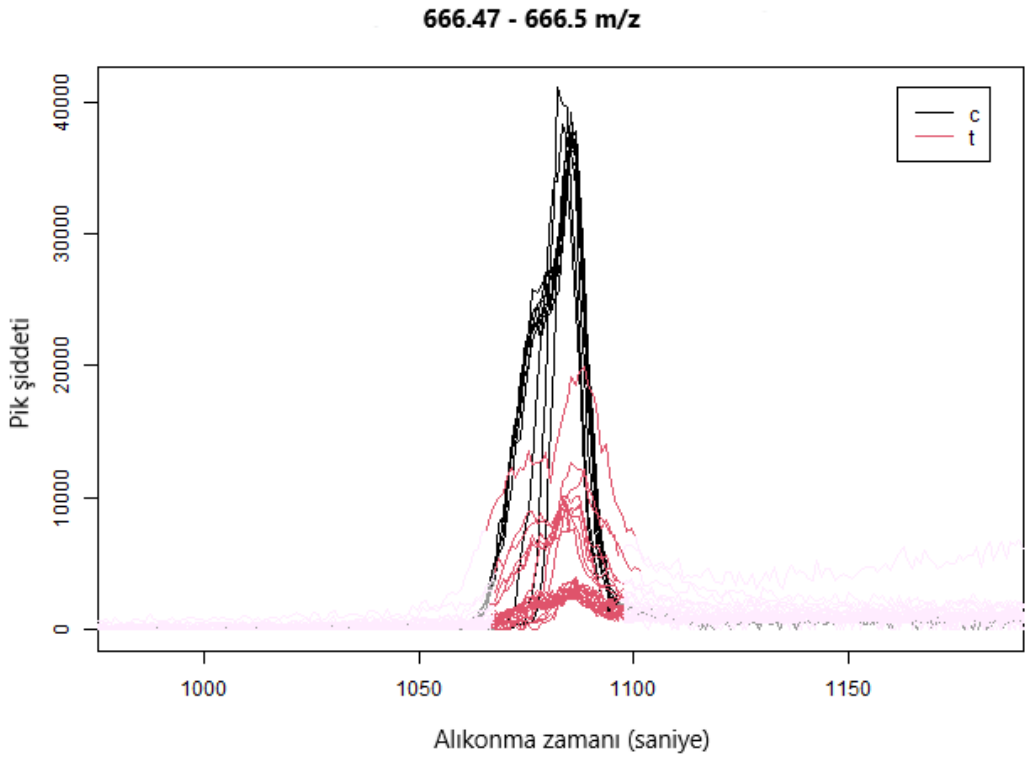
Şekil 4.19. Koproporfinojen III, Koproporfinojen I metabolitleriyle eşleşen kromatogram (1).



Şekil 4.20. Koproporfinojen III, Koproporfinojen I metabolitleriyle eşleşen kromatogram (2).



Şekil 4.21. PA(16:0/16:0) metabolitiyle eşleşen kromatogram.

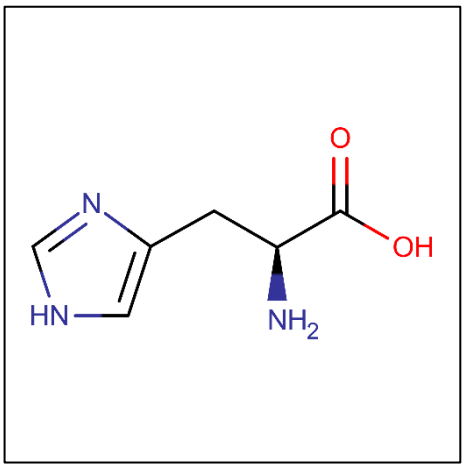


Şekil 4.22. Glukozilseramid metabolitiyle eşleşen kromatogram.

4.5. Eşleşme Sağlanan 44 Metabolitin HMDB (İnsan Metabolom Veribankası) Bilgisi

4.5.1. L-histidin

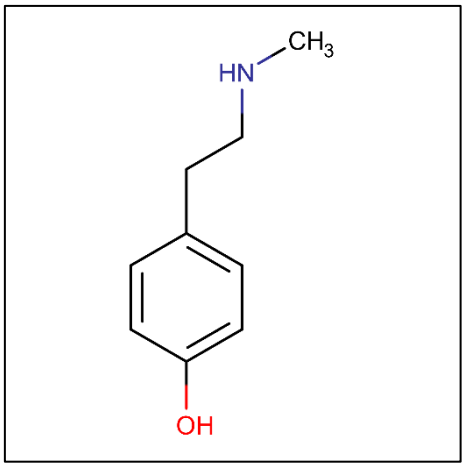
Histidin ilk olarak 1896'da Dr. Albrecht Kossel tarafından izole edilmiştir. L-Histidin olarak da bilinen histidin, insanlarda ve diğer memelilerde esansiyel bir amino asittir. Bunlar, amino grubunun, karboksilat grubuna eklendiği amino asitlerdir. Proteinlerin biyosentezinde kullanılan amino asitler olan 20 amino asitten biridir. Bakterilerden bitkilere ve hayvanlara kadar tüm organizmalarda bulunur. Alifatik, pozitif yüklü veya bazik bir amino asit olarak sınıflandırılır. Yapısında bulunan imidazol yan zincirinin asit-baz özellikleri, proteazlar gibi birçok enzimin katalitik mekanizmasına katılmasını etkiler. Histidin, birçok metal iyonu ile kompleksler oluşturur. İmidazol yan zinciri genellikle metalloproteinlerde bir ligand görevi görmektedir [95].



Şekil 4.23. L-histidin genel yapısı [95].

4.5.2. N-metiltiramin

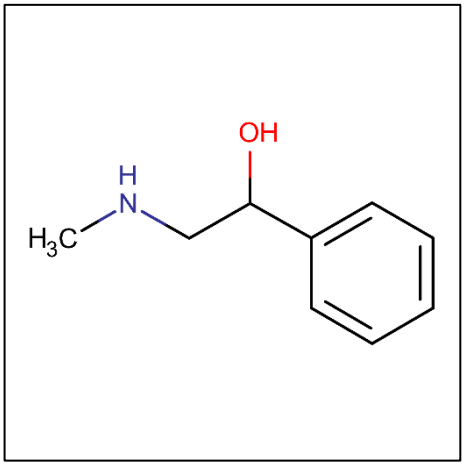
N-metiltiramin (NMT) bir fenolik amindir. NMT, alkollü fermantasyonla üretilen alkollü içeceklerde bulunan güçlü bir gastrin salınım uyarıcısıdır. NMT, ince bağırsakta, özellikle duodenum ve jejunumda iyi emilir. Karaciğerde metabolize edilir, ancak ince bağırsak mukozasında metabolize edilmez. Genellikle çocukların ve bebeklerin dışkısında rastlanmaktadır [96].



Şekil 4.24. N-metiltiramin genel yapısı [96].

4.5.3. N-metilfeniletanolamin

N-metilfeniletanolamin, arilalkilaminler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, alkil grubunun karbon atomunda aromatik bir hidrokarbür grubu olan alkilaminlerdir. Bakterilerden insanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunur. N-metilfeniletanolamin ikincil metabolittir. İkincil metabolitler, savunma veya sinyal molekülleri olarak görev yapabilen metabolik veya fizyolojik olarak esansiyel olmayan metabolitlerdir [97].

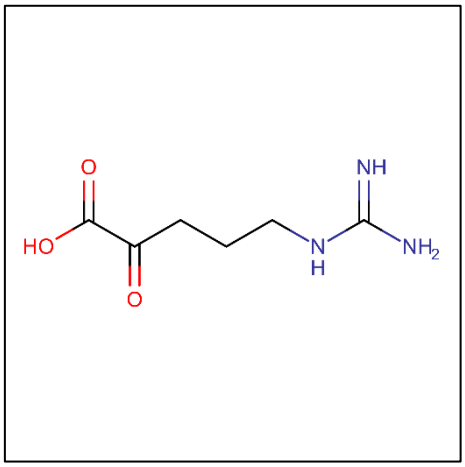


Şekil 4.25. N-metilfeniletanolamin genel yapısı [97].

4.5.4. 2-oksoarjinin

2-oksoarjinin, arginin katabolizmasından bir guanidino bileşiği metabolitidir. Arginaz eksikliği ile karakterize olan argininemiye üre döngüsünün son adımındaki

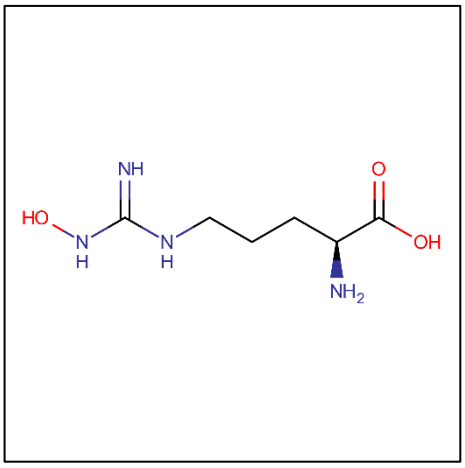
bir kusurun neden olduğu; argininin üre ve ornitine hidrolizinden kaynaklanan, otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır. Arjinin metabolitlerinin (guanidino bileşikleri gibi) özellikle 2-oksoarjinin birikimi, argininemide merkezi sinir sistemi hasarına neden olabileceği belirtilmiştir [98].



Şekil 4.26. 2-oksoarjinin genel yapısı [98].

4.5.5. N(ω)-hidroksiarjinin

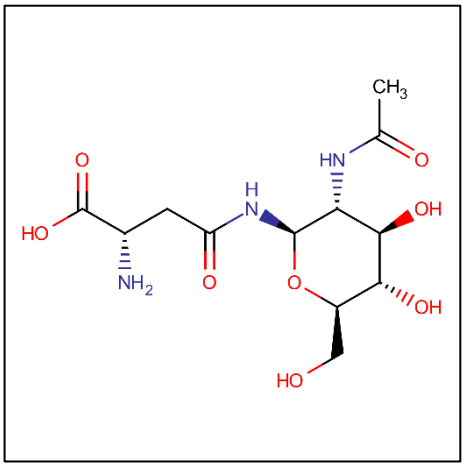
N(ω)-hidroksi-L-arginin veya 6-NOHA olarak da bilinen N(ω)-hidroksiarjinin, arginin ve türevleri sınıfına aittir. Arginin ve türevleri, amino grubunda veya karboksi grubunda arginin reaksiyonundan veya glisinin herhangi bir hidrojeninin bir heteroatom ile değiştirilmesinden kaynaklanan arginin veya bunun bir türevini içeren bileşiklerdir. NOS, nitrik oksit ve sitrülin oluşturmak için NADPH varlığında L-arjininin oksijenlenmesini katalize eden bir proteindir. Arjinin-nitrik oksit yolunun bir ürünüdür ve nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalize edilen süreçteki ilk ara üründür. N(ω)-hidroksiarjinin çok güçlü bir bazik bileşiktir. N(ω)-hidroksiarjinin, bakterilerden insanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunur. N(ω)- hidroksiarjinin ve nitrik oksit, L-arjinin'den biyosentez yoluyla oluşabilir. İnsanlarda, N(ω)-hidroksiarjinin, girat atrofisi ile hiperornitinemi adı verilen metabolik bozuklukta rol oynadığı belirtilmiştir [99].



Şekil 4.27. N(ω)-hidroksiarjinin genel yapısı [99].

4.5.6. Aspartilglikozamin

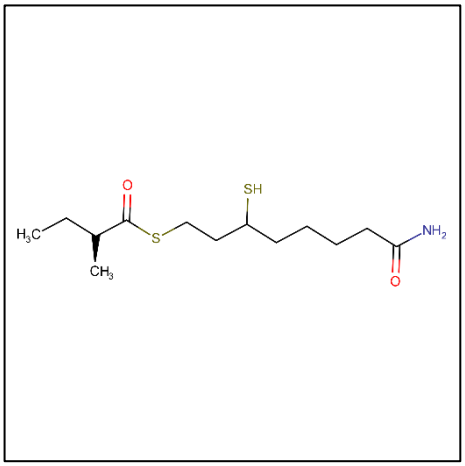
N4-(β-N-asetil-D-glukozaminil)-L-asparajin veya 1-β-aspartil-N-asetil-D-glukosaminilamin olarak da bilinen aspartiglikosamin, glikozilaminler sınıfının bir üyesidir. Glikozilaminler, bir karbonhidrata β-N-glikozidik bağ ile bağlanan ve böylece α-amino eter bağı oluşturan bileşiklerdir. Aspartiglikosamin suda çözünür ve orta derecede asidik bir bileşiktir. Aspartiglikosamin esas olarak idrarda ve insan dalak dokusunda bulunur. Hücre içinde aspartiglikozamin esas olarak sitoplazmada bulunur. Ayrıca, aspartilglikozaminin, doğuştan gelen bir metabolizma bozukluğu olan aspartilglukozaminüri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aspartilglikozaminürisi olan hastalarda, aspartilglikozamin amido hidrolaz aktivitesinin azalmasına karşılık gelen aspartiglikozamin birikmesi görülmektedir [100].



Şekil 4.28. Aspartilglikozamin genel yapısı [100].

4.5.7. S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid

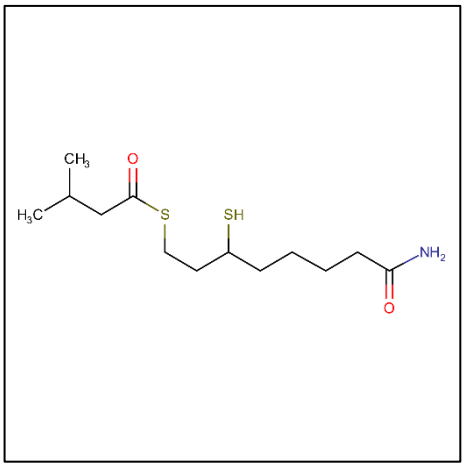
S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid, izolösin bozunmasında bir ara maddedir. S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid normalde metilpropanoiltransferaz enziminin bir lizin tortusuna konjuge edilir. Burada gösterilen yapı serbest formdur. Spesifik olarak S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid, dihidrolipoillisin tortusu (2-metilpropanoil) transferaz içindeki indirgenmiş lipoillisin tortusunun 2-metilbutanoil tiyoesteridir [101].



Şekil 4.29. S-(2-metilbutanoil) dihidrolipoamid genel yapısı [101].

4.5.8. S-(3-metilbutanoil) dihidrolipoamid-E

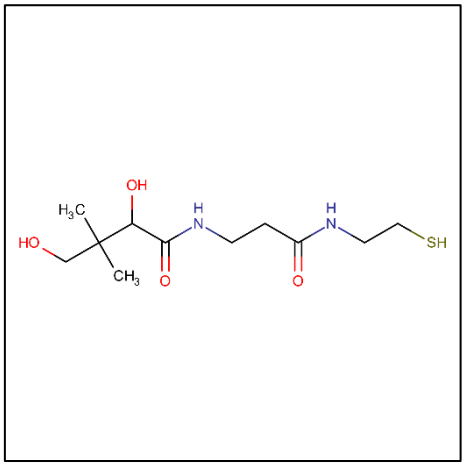
S-(3-metilbutanoil) dihidrolipoamid-E, enzim bağımlı olan, valin, lösin ve izolösin bozunmasında oluşan bir ara maddedir. Dallı zincirli yağ asidi sentezinde sondan ikinci adımdır ve 2-oksoizovalerat dehidrojenaz enzimi aracılığıyla 3-metil-hidroksibütil-ThPP'den dönüştürülür. Daha sonra dihidrolipoillisin-artığı (2-metilpropanoil) transferaz enzimi aracılığıyla 3-metilbutanoil-KoA'ya dönüştürülür [102].



Şekil 4.30. S-(3-metilbutanoil) dihidrolipoamid-E genel yapısı [102].

4.5.9. Pantetein

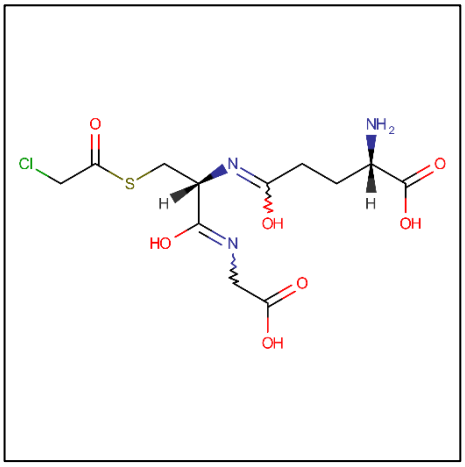
Pantetin, β-amino asitler ve türevleri olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, β-karbon atomuna bağlı bir (-NH_2) grubuna sahip amino asitlerdir. Bu bileşiğin dimeri olan pantetin daha yaygın olarak bilinir ve B5 vitamininin en güçlü formu olarak kabul edilir. Son derece zayıf bir bazik bir bileşiktir. Vücut tarafından koenzim A üretiminde (KoA) bir ara maddedir. Bakterilerden insanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunur. İnsanlarda pantetin bir dizi enzimatik reaksiyona katılır. Özellikle panteteinaz enziminin etkisiyle pantotenik asit ve sisteamine dönüştürülebilir. Ek olarak, pantetin, pantotenat kinaz 1 enzimi ile etkileşimi yoluyla pantetein 4'-fosfata dönüştürülebilir. İnsanlarda pantetein, pantotenat ve KoA biyosentezinde yer alır [103].



Şekil 4.31. Pantetein genel yapısı [103].

4.5.10. S-(2-kloroasetil) glutatyon

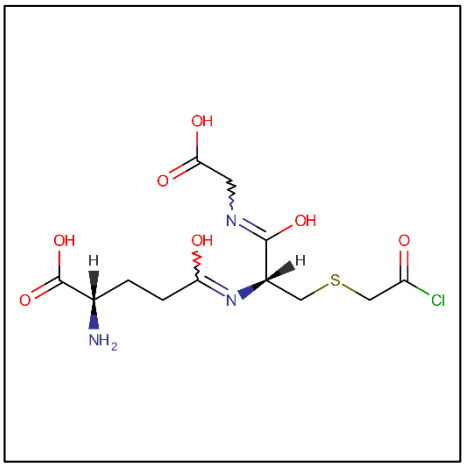
$ClCH_2COSG$ olarak da bilinen S-(2-kloroasetil) glutatyon, oligopeptitler sınıfına aittir. Bunlar, peptit bağlarıyla birleştirilen üç ila on α-amino asit dizisi içeren organik bileşiklerdir. Bunlar, iki veya daha fazla amino karboksilik asit molekülünden birinin karbonil karbonundan diğerinin nitrojen atomuna kovalent bir bağ yapan bileşiklerdir. S-(2-kloroasetil) glutatyon çok güçlü bir bazik bileşiktir. S-(2-kloroasetil) glutatyon, bakterilerden insanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunur [104].



Şekil 4.32. S-(2-kloroasetil) glutatyon genel yapısı [104].

4.5.11. 2-(S-glutatyonil) asetilklorür

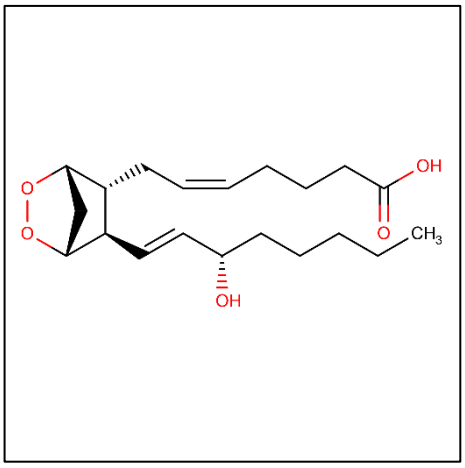
Butenolidler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, C2 karbon atomunda bir karbonil grubuna sahip dihidrofuranlardır. 2-(S-glutatiyonil) asetilklorür çok güçlü bir bazik bileşiktir. 2-(S-glutatiyonil) asetilklorür, bakterilerden insanlara kadar tüm canlı organizmalarda bulunur. Bunlar, iki veya daha fazla amino karboksilik asit molekülünden birinin karbonil karbonundan diğerinin nitrojen atomuna kovalent bir bağ yapan bileşiklerdir [105].



Şekil 4.33. 2-(S-glutatyonil) asetilklorid genel yapısı [105].

4.5.12. Prostoglandin H2

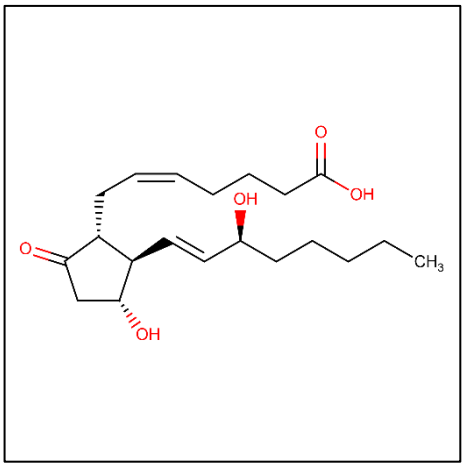
Prostaglandin H2 (PGH2), tüm prostaglandinlerin biyosentezindeki ilk ara üründür. Prostaglandinler, PGH sentaz 1 ve 2 olarak da adlandırılan COX-1 ve COX-2 enzimi tarafından araşidonik asitten sentezlenir. Bu enzimler, oldukça uzun bir yarı ömre (90-100 saat) sahip ve son derece lipofiliktir. PGH2, prostaglandin izomerazları tarafından PGE2, PGD2 ve PGF2'yi veren veya TXA2 yapmak için tromboksan sentaz veya PGI2 yapmak için prostasiklin sentaz tarafından biyolojik olarak aktif prostaglandinlere dönüştürülür. Aspirin ve indometasin gibi çoğu non-steroid antiinflamatuar ilaçlar hem PGH sentaz 1'i hem de 2'yi inhibe eder. Eikosanoid transselüler biyosentezi için önemli bir özellik, PGH2 veya LTA4'ün donör hücreden atılmasının yanı sıra bu reaktif ara maddelerin alıcı hücre tarafından alınmasıdır. Hücrelerde, PGH2 substrat olarak PGH2 kullanan enzimlerin varlığında bile enzimatik olmayan şekilde yeniden düzenlenir. Trombositler endojen araşidonik asitten tromboksan A2 oluşturduğunda, PGH2, TXA2'ninkine çok benzer ve güçlü trombosit aktivasyonu üretecek kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşır [106].



Şekil 4.34. Prostoglandin H2 genel yapısı [106].

4.5.13. Prostaglandin E2

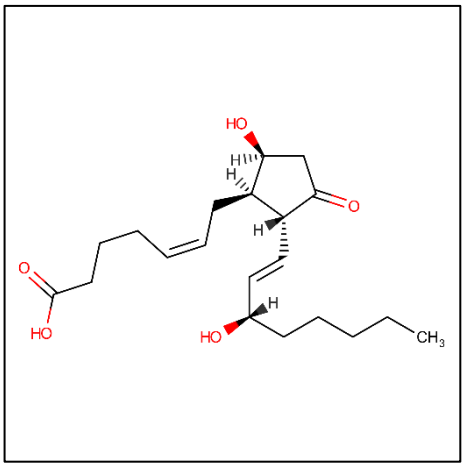
Doğal olarak oluşan prostaglandin E2 (PGE2) tıpta dinoproston olarak bilinir ve memeli prostaglandinlerinin en yaygın ve biyolojik olarak en aktifidir. Doğum sırasında önemli etkileri vardır ve ayrıca osteoklastlar tarafından kemik emilimini uyaran faktörleri serbest bırakmak için osteoblastları uyarır. PGE2 ayrıca vücut ateşini indükleyen prostaglandindir. PGE2'nin vazodilatasyon ve cAMP üretimini arttırdığı, bradikinin ve histaminin etkilerini arttırdığı ve uterus kasılmasını ve trombosit agregasyonunu indüklediği bilinmektedir. PGE2 ayrıca fetal duktus arteriozusun açık geçiş yolunun korunmasından, T-hücre proliferasyonunu ve lenfosit göçünü azaltmaktan ve IL-1α ve IL-2 sekresyonunu aktive etmekten sorumludur. PGE2, özellikle dendritik hücreler (DC) üzerinde anti-inflamatuar etki gösterir. Olgunlaşma sinyallerinin doğasına bağlı olarak, PGE2'nin DC üzerinde farklı etkileri vardır. PGE2, DC'nin olgunlaşmasını ve antijen sunma yeteneklerini azaltan bir inhibitör etki uygular. PGE2'nin ayrıca TNF-αile kombinasyon halinde verildiğinde DC'yi uyardığı ve IL-12 üretimini desteklediği gösterilmiştir. PGE2 çevresel olarak biyoaktif bir maddedir. Etkisi diğer faktörler, özellikle IL-10 tarafından sürdürülür. Farklılaşma, olgunlaşma ve sitokin salgılama yetenekleri üzerinde hareket ederek DC'nin aktivitelerini düzenler. Eritrositler hariç tüm memeli hücreleri eikosanoidleri sentezler. Bu moleküller son derece güçlüdür ve çok az konsantrasyonlarda güçlü fizyolojik etkilere neden olabilir [107].



Şekil 4.35. Prostaglandin E2 genel yapısı [107].

4.5.14. Prostaglandin D2

Prostaglandin D2 (PGD2) beyin, dalak, timus, kemik iliği, rahim, yumurtalık, yumurta kanalı, testis, prostat ve epididim gibi çeşitli organlarda aktif olarak üretilen ve birçok fizyolojik olayda görev alan bir prostaglandindir. PGD2, G-protein-bağlı bir reseptör olan prostaglandin D2 reseptörüne bağlanır. Aktivitesine esas olarak, hücre içi cAMP ve Ca^{2+}'nın yükselmesiyle sonuçlanan adenilat siklazı uyaran G-S proteinleri aracılık eder. PGD2 vücut ısısını, koku alma fonksiyonunu, hormon salınımını ve trombosit agregasyonunu önler; vazodilatasyon ve bronkokonstriksiyona neden olur. PGD2 ayrıca alerjik ve enflamatuvar aracı olarak mast hücrelerinden salınır. Prostaglandin H2, araşidonat kaskadında siklooksijenazın etkisiyle PGG2'den oluşturulan kararsız bir ara maddedir. Memeli sistemlerinde, sırasıyla PGD sentazları, PGE sentazları ve PGF sentazları olmak üzere üç grup enzimin etkisiyle PGD2, PGE2, PGF2a gibi daha kararlı araşidonat metabolitlerine dönüştürülür. PGDS, PGH2'nin PGD2'ye izomerizasyonunu katalize eder. İki tip PGD2 sentaz bilinmektedir. Lipokalin tipi PGD sentaz, beyin omurilik sıvısında, seminal sıvıda bulunur ve erkek üremesinde önemli bir rol oynayabilir. Başka bir PGD sentazı olan hematopoietik PGD sentazı dalakta, fallop tüpünde, endometriyal bez hücrelerinde, ekstravillöz trofoblastlarda ve villöz trofoblastlarda bulunur [108].

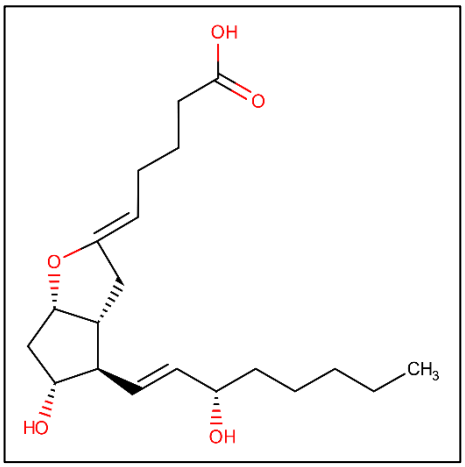


Şekil 4.36. Prostaglandin D2 genel yapısı [108].

4.5.15. Prostaglandin I2

Prostaglandin I2 veya prostasiklin (PGI2), eikosanoidler olarak bilinen lipit molekülleri ailesinin bir üyesidir. Endotel hücrelerinde prostasiklin sentaz enziminin etkisiyle prostaglandin H2'den (PGH2) üretilir. Güçlü bir vazodilatördür ve trombosit agregasyonunu engeller. Prostaglandin I2, kan damarı duvarı tarafından sentezlenen ana prostaglandindir. Bu, trombosit aracılı trombozu sınırlamada önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle PGI2 birincil hemostazda yer alan trombosit tıkacı oluşumunu engeller. Sağlıklı endotelyal hücreler tarafından salınır ve işlevini, yakındaki trombositler ve endotelyal hücreler üzerindeki G protein-bağlı reseptörleri içeren bir parakrin sinyalleşme kaskadı yoluyla gerçekleştirir. Trombosit G protein-bağlı reseptörü PGI2'ye bağlandığında aktive olur. Bu aktivasyon, sırayla, adenilil siklaza cAMP üretmesi için sinyal verir. cAMP, herhangi bir gereksiz trombosit aktivasyonunu inhibe etmeye devam eder ve TXA2 bağlanmasından kaynaklanacak sitozolik kalsiyum seviyelerindeki herhangi bir artışı engeller. PGI2 ayrıca endotelyal prostasiklin reseptörlerine bağlanır ve aynı şekilde sitozolde cAMP seviyesini yükseltir. Bu cAMP daha sonra protein kinaz A'yı (PKA) aktive etmeye devam eder. PKA daha sonra düz kas gevşemesine ve vazodilatasyona yol açan miyozin hafif zincir kinazı inhibe ederek kaskadına devam eder. Özellikle, PGI2 ve TXA2, antagonistler olarak çalışır. PGI2, bazik tamponlarda (pH=8) stabildir, ancak nötr veya asidik çözeltilerde hızla 6-keto PGF1α'ya hidrolize olur. Yarı ömür hem *in vivo* hem de *in vitro* kısa olup 30 saniye ile birkaç dakika arasında değişmektedir.

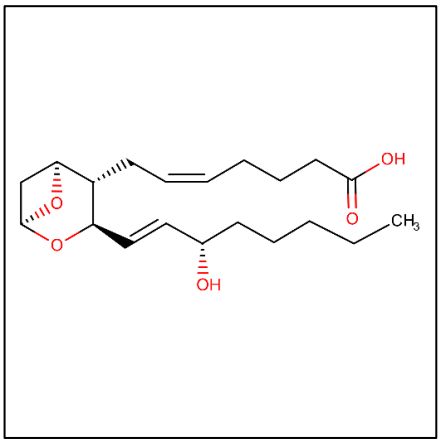
PGI2, idiyopatik pulmoner hipertansiyon tedavisi için insanlarda sürekli infüzyonla uygulanır [109].



Şekil 4.37. Prostaglandin I2 genel yapısı [109].

4.5.16. Tromboksan A2

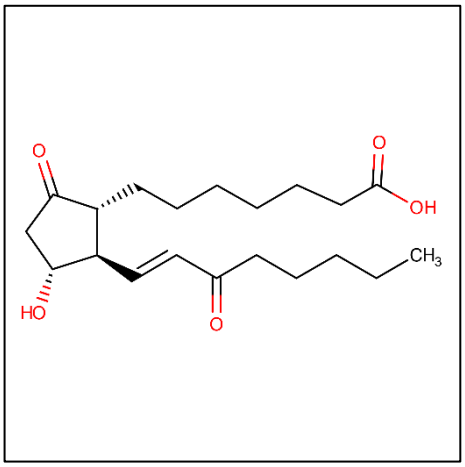
Tromboksan A2, prostaglandin endoperoksitleri ile tromboksan B2 arasında kararsız bir ara maddedir. Bileşik bir bisiklik okzanoksetan yapısına sahiptir. Trombosit agregasyonunun güçlü bir indükleyicisidir ve vazokonstriksiyona neden olur. Tavşan aortu büzülme maddesinin ana bileşenidir [110].



Şekil 4.38. Tromboksan A2 genel yapısı [110].

4.5.17. (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksiprost-13-enoik asit

Bu madde karbonil redüktaz 1 için bir substrat görevi görür. Eikosanoidler prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler ve lipoksinlerden oluşur. Prostagalandinler ve tromboksanlar topluca prostanoidler olarak tanımlanır [111].

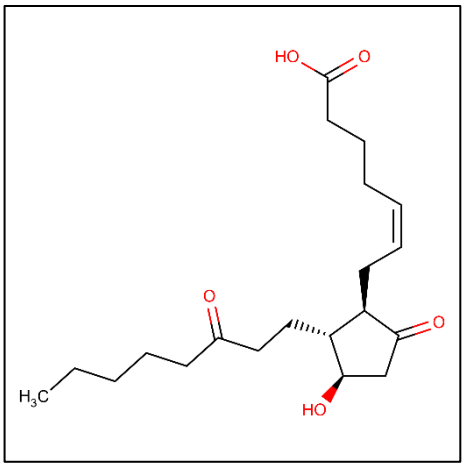


Şekil 4.39. (13E)-11α-hidroksi-9,15-dioksoprost-13-enoik asit genel yapısı [111].

4.5.18. 13,14-dihidro-15-keto-PGE2

Prostaglandin E2 metabolitlerinden biridir. *in vitro* insan fetal akciğeri, gebeliğin 12. haftasında kendini farklılaştırma yeterliliğine sahiptir ve PGE2'ye göre fetal akciğerde inaktif metabolit 13,14-dihidro-15-keto-PGE2'nin yüksek seviyelerinin varlığını düşündürür. Doğumda önemli etkileri vardır ve ayrıca osteoklastlar tarafından kemik emilimini uyaran faktörleri serbest bırakmak için osteoblastları uyarır. PGE2'nin vazodilatasyon ve cAMP üretimini arttırdığı, bradikinin ve histaminin etkilerini arttırdığı, uterus kasılmalarını indüklediği ve trombosit agregasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. T-hücre proliferasyonunu ve lenfosit göçünü azaltmak ve IL-1α ve IL-2'nin salgılanmasını aktive etmek başlıca görevleridir. PGE2, özellikle dendritik hücreler (DC) üzerinde hem pro- hem de anti-inflamatuar etkiler sergiler. Olgunlaşma sinyallerinin doğasına bağlı olarak, PGE2'nin DC biyolojisi üzerinde farklı ve bazen zıt etkileri vardır. PGE2, DC'nin olgunlaşmasını ve antijen sunma yeteneklerini azaltan bir inhibitör etki uygular. PGE2'nin ayrıca TNF-α ile kombinasyon halinde verildiğinde DC'yi uyardığı ve IL-12 üretimini desteklediği gösterilmiştir. PGE2 biyoaktif bir maddedir. Etkisi diğer faktörler,

özellikle IL-10 tarafından uzatılır. Farklılaşma, olgunlaşma ve sitokin salgılama yetenekleri üzerinde hareket ederek profesyonel DC'nin aktivitelerini düzenler. PGE2, kemik iliğinden türetilen DC'de (BM-DC) güçlü bir IL-10 indükleyicisidir ve PGE2 ile indüklenen IL-10, BM-DC pro-inflamatuar fenotipin anahtar düzenleyicisidir [112].

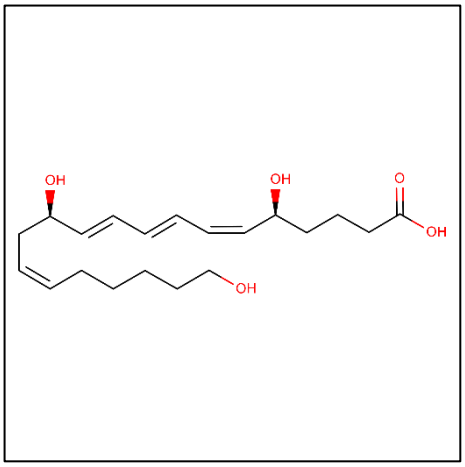


Şekil 4.40. 13,14-dihidro-15-keto-PGE2 genel yapısı [112].

4.5.19. 20-hidroksi lökotrien B4

20-hidroksi-lökotrien B4 (20-OH-LTB4), insan nötrofillerinde lökotrien B4'ün bir ω-hidroksil metabolitidir. 20-OH-LTB4 ve LTB4'ün yüksek idrar içeriğinde, FALDH eksikliğinin neden olduğu otozomal resesif geçişli bir nörokutanöz hastalık olan Sjögren-Larsson sendromu olan hastalarda bulunur. LTB4 ve 20-OH-LTB4'ün patolojik idrar atılımı, SLS için biyokimyasal bir belirteçtir. Lökotrien B4, nötrofil polimorfonükleer lökositlerdeki ana metabolittir. Lökotrienler, 5-lipoksijenaz faaliyetinden türetilen araşidonik asit metabolitleridir. 5-lipoksijenaz'ın yan ürünü, LTA4 hidrolaz tarafından enzimatik olarak LTB4'e veya lökotrien C4'e dönüştürülen lökotrien A4'tür. Lökotrien üretiminin düzenlenmesi, 5-lipoksijenazın ekspresyonu, 5-lipoksijenazın perinükleer bölgeye translokasyonu ve aktivitesini arttırmak veya inhibe etmek için fosforilasyon dahil olmak üzere çeşitli seviyelerde gerçekleşir. Biyolojik olarak aktif LTB4, özgün sitokrom P450'ler tarafından gerçekleştirilen ω-oksidasyonu ve ardından ω-karboksi konumundan β-oksidasyonu ve CoA ester oluşumundan sonra metabolize edilir. Lökotrien metabolizmasının diğer spesifik yolları, insan idrarına atıldığı gözlemlenen bir dizi konjuge dien metabolitini oluşturan

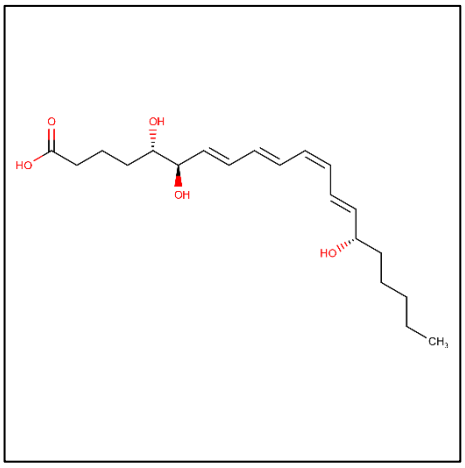
12-hidroksidehidrojenaz ve 5-okso-prostaglandin-13-redüktazı içerir. Birincil lökotrienlerin metabolik dönüşümleri, biyolojik aktivitelerinin sonlandırılması için kritik öneme sahiptir [113].



Şekil 4.41. 20-hidroksi-lökotrien B4 genel yapısı [113].

4.5.20. Lipoksin A4

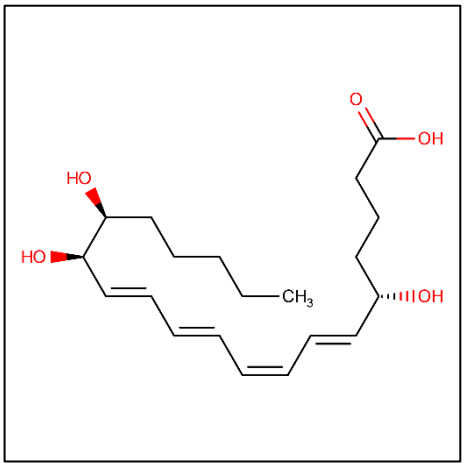
Lipoxin A4 (LXA4) ilk olarak 1984 yılında Serhan ve arkadaşları tarafından aktive edilmiş lökositlerin 5-lipoksijenaz etkileşim ürünü olarak tanımlanır. LXA4'ün endojen transselüler biyosentezi, lökositlerin epitel, endotel veya trombositlerle etkileşimi yoluyla gerçekleşir. Lipoksinler veya lipoksijenaz etkileşim ürünleri, araşidonik asitten, lipoksijenazların sıralı eylemleri ve müteakip reaksiyonlar yoluyla spesifik trihidroksitetraen içeren eikosanoidler vermek üzere üretilir. Bu benzersiz yapılar, hücre-hücre etkileşimleri sırasında oluşur ve enflamatuvar tepkiler sırasında üretilen diğer eikosanoidlerden hem zamansal hem de uzaysal olarak farklı bölgelerde etki eder ve doğal çözünürlüğü uyarmak için görünür. Lipoksin A4 ve lipoksin B4, her biri güçlü hücresel ve *in vivo* etkilere sahip izomerlerdir [114].



Şekil 4.42. Lipoksin A4 genel yapısı [114].

4.5.21. Lipoksin B4

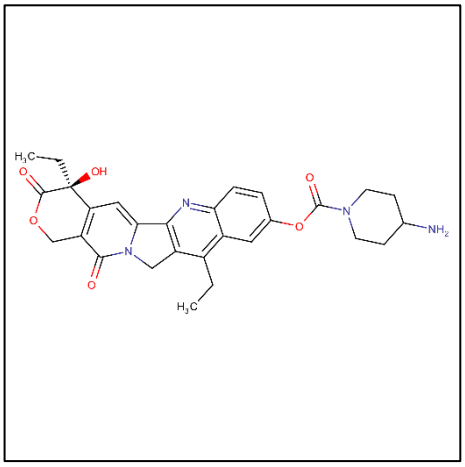
Lipoksin B4, ATL ve bunların metabolik kararlı analogları, hücresel tepkileri ortaya çıkarır ve spesifik reseptör ALX'i aktive ederek *in vivo* lökosit seviyesini düzenler. Prostaglandinler ve lökotrienler dahil olmak üzere araşidonik asitten türetilen eikosanoidlerin çoğu, immün aşırı duyarlılık ve iltihaplanma ile ilgili çok çeşitli eylemler uygulayan yerel aracılar olarak önemli roller oynar. Bununla birlikte, son gözlemler, lipoksijenaz yollarından türetilen diğer ajanların oluşturulduğunu ve akut inflamasyonun çözülmesini başlatmada anahtar bir rol oynadığını göstermektedir. Bu fenomen, belirli lipit aracıları tarafından yönetilen ve iyi düzenlenmiş bir dizi geçici olayı içeren aktif bir süreçtir. Bu nedenle, lokal olarak salınan güçlü aracılar, inflamasyonun kontrol noktası kontrolörleri olarak hizmet eder [115].



Şekil 4.43. Lipoksin B4 genel yapısı [115].

4.5.22. NPC

7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-amino] karboniloksikamptotesin (NPC), irinotekanın bir metabolitidir. İrinotekan kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. İrinotekan, topoizomeraz 1'in inhibisyonu yoluyla DNA'nın çözülmesini önler. Kimyasal olarak, doğal alkaloid kamptotesinin yarı sentetik bir analoğudur. Başlıca kullanımı kolon kanserinde, özellikle diğer kemoterapi ajanları ile kombinasyon halindedir. Bu, infüzyonal 5-florourasil, lökovorin ve irinotekandan oluşan FOLFIRI protokolünde yer alır [116].

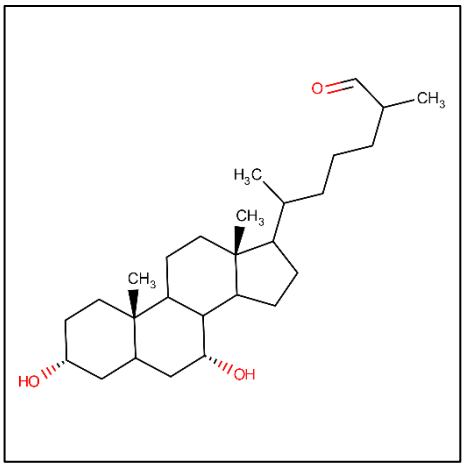


Şekil 4.44. NPC genel yapısı [116].

4.5.23. 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan-26-al

Safra asidi biyosentezinde, özellikle kenodeoksiglikolat ve litokolat sentezinde yer alan bir ara maddedir. Safra asitleri, ağırlıklı olarak memelilerin safrasında bulunan steroid asitlerdir. Farklı safra asitleri arasındaki ayrımı yalnızca 3, 7 ve 12. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak çok küçüktür. Safra asitleri, bağırsakta ve karaciğerde yağların ve sterollerin atılımını, emilimini ve taşınmasını kolaylaştıran maddelerdir. Safra asitleri ayrıca kolesterol katabolizmasından türetilen steroidal amfipatik moleküllerdir. Safra akışını ve lipit sekresyonunu modüle ederler, diyetteki yağların ve vitaminlerin emilimi için esastırlar ve kolesterol homeostazında yer alan tüm anahtar enzimlerin düzenlenmesinde rol oynarlar. Safra asitleri, enterohepatik bir devre oluşturmak için karaciğer, safra kanalları, ince bağırsak ve portal ven boyunca dolaşır. Fizyolojik pH'da anyonlar

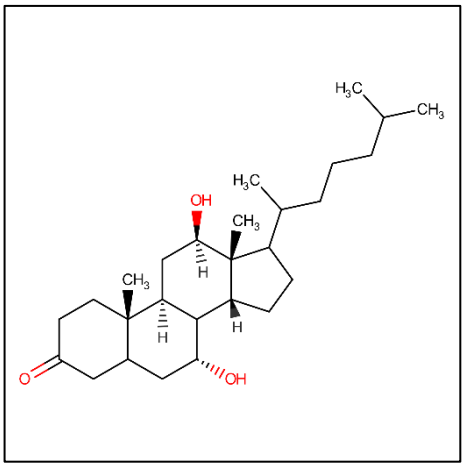
halinde bulunurlar ve sonuç olarak enterohepatik dokuların zarları boyunca taşınmak için bir taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar. Safra asitlerinin güçlü deterjan özellikleri, hidrofobik besinlerin sindirimi ve bağırsak emilimi için gereklidir. Safra asitlerinin membran bozulması gibi güçlü toksik özellikleri vardır ve bunların kan ve dokularda birikmelerini sınırlamak için mekanizmalar mevcuttur [117].



Şekil 4.45. 3α,7α -dihidroksi-5β-kolestan-26-al genel yapısı [117].

4.5.24. 7α,12α-dihidroksi-5β-kolestan-3-on

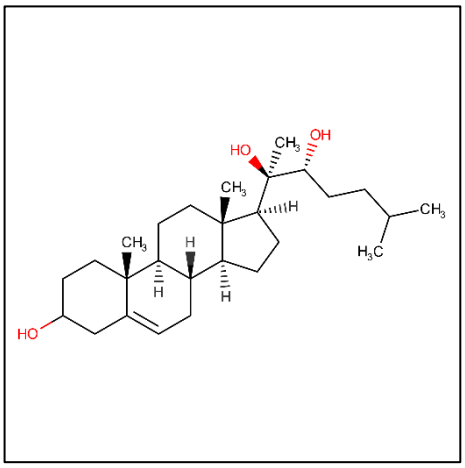
Safra asidi biyosentezinde bir ara maddedir. Safra asitleri, ağırlıklı olarak memelilerin safrasında bulunan steroid asitlerdir. Farklı safra asitleri arasındaki ayrım, yalnızca 3, 7 ve 12. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak değişir. Safra asitleri, bağırsakta ve karaciğerde yağların ve sterollerin atılımını, emilimini ve taşınmasını kolaylaştıran maddelerdir. Safra asitleri ayrıca kolesterol katabolizmasından türetilen steroidal amfipatik moleküllerdir. Safra akışını ve lipit sekresyonunu modüle eder, diyetteki yağların ve vitaminlerin emilimi için esastır ve kolesterol homeostazında yer alan tüm anahtar enzimlerin düzenlenmesinde rol oynar [118].



Şekil 4.46. 7α,12α dihidroksi-5β-kolestan-3-on genel yapısı [118].

4.5.25. 20α,22β-dihidroksi kolesterol

C21-steroid hormon metabolizmasında bir ara maddedir. 20α,22β-dihidroksi kolesterol, 3α,11β,21-trihidroksi-20-okso-5β-pregnan-18-al sentezindeki sondaki 8. adımdır ve sitokrom P450 aracılığıyla 20α-hidroksi kolesterolden dönüştürülür. Daha sonra sitokrom P450 enzimi aracılığıyla pregnenolona dönüştürülür [119].

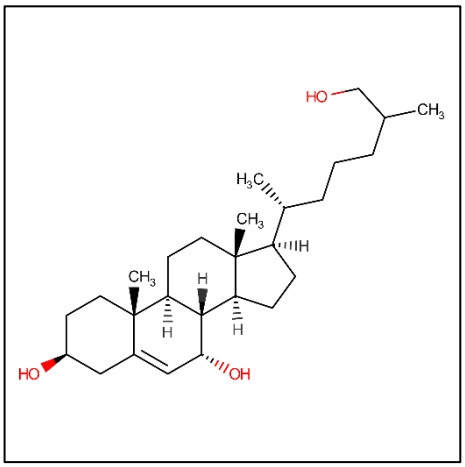


Şekil 4.47. 20α,22β-dihidroksi kolesterol genel yapısı [119].

4.5.26. 7α,27-dihidroksi kolesterol

Kolest-5-en-3β,7α,26-triol olarak da bilinen 7α,27-dihidroksi kolesterol, trihidroksi safra asitleri sınıfına aittir. Bunlar, yapısal olarak üç hidroksil grubu taşıyan bir safra asidi veya alkol ile karakterize edilen prenol lipitleridir. Bu nedenle, 7α,27-dihidroksi kolesterolün bir safra asidi lipit molekülü olduğu düşünülür. 7α,27-

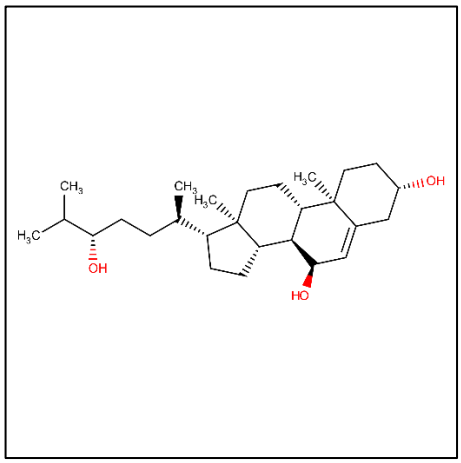
dihidroksi kolesterol, çok hidrofobik bir moleküldür, pratik olarak suda çözünmemektedir [120].



Şekil 4.48. 7α,27-dihidroksi kolesterol genel yapısı [120].

4.5.27. (24S)-7α,24-dihidroksi kolesterol

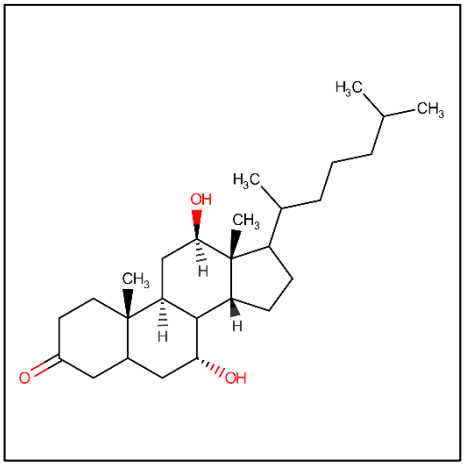
5-kolesten-3β,7α,24(S)-triol veya (24S)-kolest-5-en-3β,7α,24-triol olarak da bilinen (24S)-α,24-dihidroksi kolesterol sınıfına aittir. trihidroksi safra asitleri, alkoller ve türevleri olarak bilinen organik bileşiklerden oluşur. Bunlar, yapısal olarak üç hidroksil grubu taşıyan bir safra asidi veya alkol ile karakterize edilen prenol lipitleridir. Bu nedenle, (24S)-7α,24-dihidroksi kolesterolün bir safra asidi lipit molekülü olduğu düşünülür (24S)-7α,24-dihidroksi kolesterol, çok hidrofobik bir moleküldür, pratik olarak suda çözünmez ve kısmi nötrdür [121].



Şekil 4.49. (24S)-7alpha,24-dihidroksi kolesterol genel yapısı [121].

4.5.28. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit

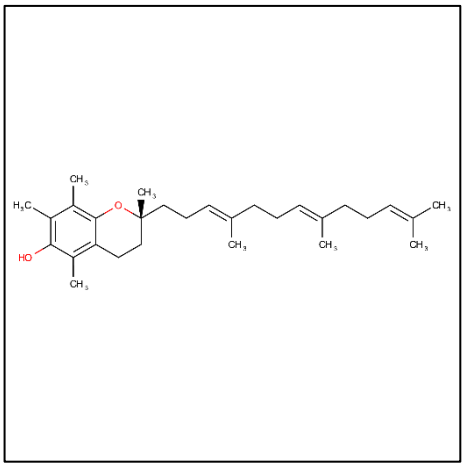
3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestan-26-oik asit olarak da adlandırılan koprokolik asit, bir safra asididir. Safra asitleri, ağırlıklı olarak memelilerin safrasında bulunan steroid asitlerdir. Farklı safra asitleri arasındaki ayrım, yalnızca 3, 7 ve 12. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak çok küçüktür. Safra asitleri ayrıca kolesterol katabolizmasından türetilen steroidal amfipatik moleküllerdir. Safra akışını ve lipit sekresyonunu modüle ederler, diyetteki yağların ve vitaminlerin emilimi için esastır ve kolesterol homeostazında yer alan enzimlerin işleyişinde rol oynar [122].



Şekil 4.50. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit genel yapısı [122].

4.5.29. α-tokotrienol

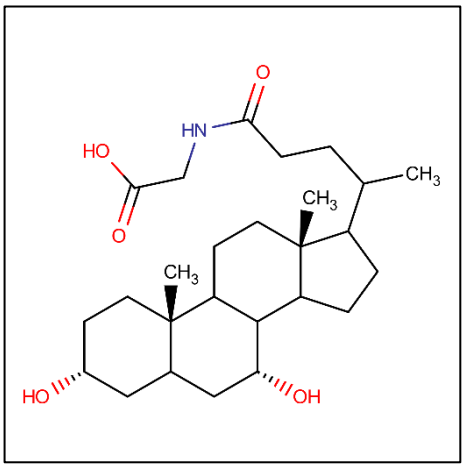
5,7,8-trimetiltokotrienol olarak da bilinen α-tokotrienol, tokotrienoller olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, bir benzopiran halka sisteminin karbon C6 atomuna bağlı doymamış bir trimetiltrideka-3,7,11-trien-1-il zinciri içeren E vitamini türevleridir. Doymuş bir trimetiltridesil zinciri içeren tokoferollerden farklıdırlar. Bu nedenle, α-tokotrienol, bir kinon lipit molekülü olarak kabul edilir. α-tokotrienol plazmada ve tüm lipoprotein alt fraksiyonlarında bulunur. Tokoferollerle karşılaştırıldığında, α-tokotrienoller çok az çalışılmıştır. Nanomolar konsantrasyonlarda kan plazmasındaki varlığının, felçle ilişkili nörodejenerasyonu önlemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir [123].



Şekil 4.51. α-tokotrienol genel yapısı [123].

4.5.30. Kenodeoksikolik asit

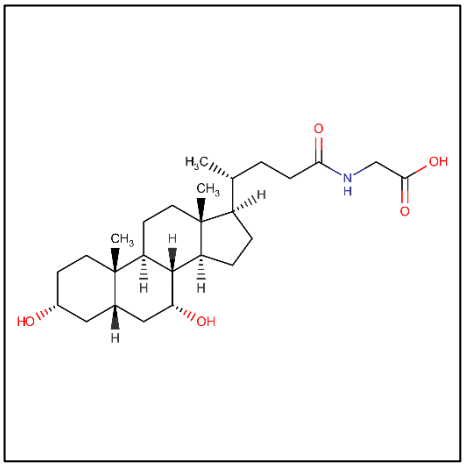
Bir glisin konjuge safra asitidir. Safra asitleri, ağırlıklı olarak memelilerin safrasında bulunan steroid yapılardır. Farklı safra asitleri arasındaki ayrım, yalnızca 3, 7 ve 12. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak çok küçüktür. Safra asitleri, bağırsakta ve karaciğerde yağların ve sterollerin atılımını, emilimini ve taşınmasını kolaylaştıran maddelerdir. Safra asitleri ayrıca kolesterol katabolizmasından türetilen steroidal amfipatik moleküllerdir. Safra akışını ve lipit sekresyonunu modüle ederler. Diyetteki yağların ve vitaminlerin emilimi için esastır ve kolesterol homeostazında yer alan tüm anahtar enzimlerin düzenlenmesinde rol oynar [124].



Şekil 4.52. Kenodeoksikolik asit genel yapısı [124].

4.5.31. Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı

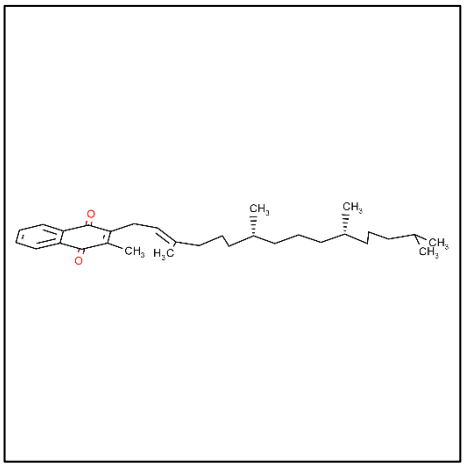
Açilglisin ve safra asidi-glisin konjugasyonuyla oluşur. Ortamın mikrobiyal florasında bulunan enzimlerin etkisiyle üretilen ikincil bir safra asididir. Hepatositlerde, hem birincil hem de ikincil safra asitleri, yan zincirdeki C-24 karboksilik asitte amino asit konjugasyonuna uğrar ve bu nedenle safra kanalındaki hemen hemen tüm safra asitleri, glisin konjuge formunda bulunur [125].



Şekil 4.53. Kenodeoksikolik asit glisin konjugatı genel yapısı [125].

4.5.32. K1 Vitamini

Filokinon veya fitonadion olarak da bilinen K1 Vitamini, 2-metil ve 1,4-naftokinon bazlı bir polisiklik aromatik ketondur. K vitamini, bir 2-metil-1,4-naftokinon halkası ve bir izoprenoid yan zinciri içeren bir filokinon ailesidir. K vitamininin çeşitli biçimleri tanımlanmıştır. Bunlar; bitkilerden elde edilen K1 vitamini, bakterilerden ve sentetik naftokinon vitaminlerden K2 vitamini (menakinon) ve K3 vitamini (menadion)'dir. Vitamin K1 proksimal izopren ünitesinde sadece bir çift bağa sahiptir. K1 vitamini, aktif protrombin (faktör II), prokonvertin (faktör VII), plazma tromboplastin bileşeni (faktör IX) ve karaciğer yoluyla üretimi için gerekli olan ve doğal olarak oluşan K vitamini ile aynı tip ve aktivite derecesine sahiptir. Zengin K1 vitamini kaynakları arasında yeşil bitkiler, algler ve fotosentetik bakteriler bulunur. Vitamin K1 antihemorajik ve protrombojenik aktiviteye sahiptir. K1 Vitamini, hava ve neme karşı stabil olan, ancak güneş ışığında ayrışan, yağda çözünen bir vitamindir. K1 vitamini kumaretralil için bir panzehirdir [126].

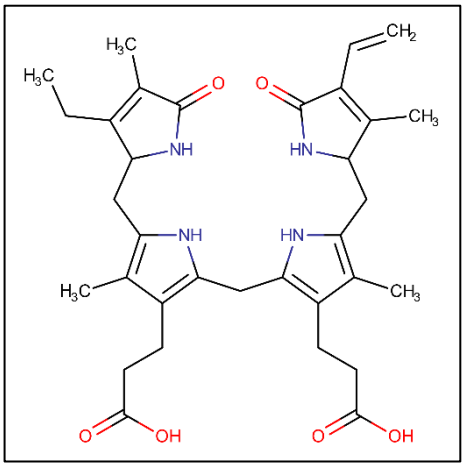


Şekil 4.54. K1 vitamini genel yapısı [126].

4.5.33. Ürobilinojen

Ürobilinojen, hem sterkobilin (dışkıların kahverengi renginden sorumlu pigment) hem de ürobilin (idrarın sarı renginden sorumlu pigment) ana bileşiği olan bir tetrapirol kimyasal bileşiğidir. Ürobilinojen, ana bileşiği olan bilirubinin mikrobiyal bozunması yoluyla oluşur. Ürobilinojen aslında hemoglobin ve kırmızı kan hücrelerindeki (RBC) kırmızı pigmentinin bozunması yoluyla üretilir. RBC'lerin yaklaşık 120 günlük bir ömrü vardır. RBC'ler faydalı ömürlerinin sonuna ulaştığında, hücreler makrofajlar tarafından yutulur ve bileşenleri geri dönüştürülür veya atılır. Hemoglobin, makrofajların endoplazmik retikulumunda bulunan hem oksijenaz olarak bilinen enzim tarafından hem halkası açıldığında parçalanır. Oksidasyon işlemi, ferrik demir (Fe^{3+}) ve karbon monoksit (CO) ile birlikte biliverdin olarak bilinen tetrapirol üretir. Bir sonraki reaksiyonda, ikinci bir metilen grubu biliverdin redüktaz olarak bilinen enzim tarafından indirgenerek bilirubin üretilir. Bilirubin, biliverdine kıyasla önemli ölçüde daha az konjugedir. Bu azalma, biliverdin molekülünün renginin mavi-yeşilden, bilirubinin rengi olan sarı-kırmızıya değişmesine neden olur. Plazmada hemen hemen tüm bilirubin, büyük ölçüde albümin olmak üzere plazma proteinlerine sıkıca bağlanır, çünkü fizyolojik pH'da sulu çözeltilerde yalnızca çok az çözünür. Sinüzoidlerde konjuge olmayan bilirubin albüminden ayrışır, karaciğer hücrelerine hücre zarından iyonik olmayan difüzyon yoluyla endoplazmik retikuluma girer. Hepatositlerde, bilirubin-UDP-glukuroniltransferaz (bilirubin-UGT), molekülün bilirubin diglukuronid olarak bilinen suda daha çözünür versiyonunu üretmek için bilirubine 2 tane glukuronik asit molekülü ekler. Bilirubin diglukuronid kanaliküler

membrandan hızla safra kanaliküllerine aktarılır ve burada daha sonra safra olarak kalın bağırsağa atılır. Bilirubin, kalın bağırsakta bulunan mikroplar tarafından ürobilinojen olarak bilinen renksiz bir ürün oluşturmak üzere indirgenir. Kolonda kalan ürobilinojen ya sterkobilinojene indirgenebilir ve sonunda sterkobiline oksitlenebilir ya da doğrudan sterkobiline indirgenebilir. Bağırsak bakterileri tarafından üretilen ürobilinojenin bir kısmı geri emilir ve tekrar enterohepatik dolaşıma girer. Bu yeniden emilen ürobilinojen oksitlenir ve ürobilin'e dönüştürülür. Ürobilin böbrekler yoluyla işlenir ve daha sonra idrarla atılır, bu da idrarda sarımsı renge neden olur. Düşük idrar ürobilinojeni, tam tıkanma sarılığından veya bağırsak bakteri florasını yok eden geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedaviden kaynaklanabilir. Yüksek idrar ürinobilinojen seviyeleri, hemolitik anemi, hematom, kısıtlı karaciğer fonksiyonu, hepatik enfeksiyon, zehirlenme veya karaciğer sirozuna işaret ettiği düşünülmektedir [127].

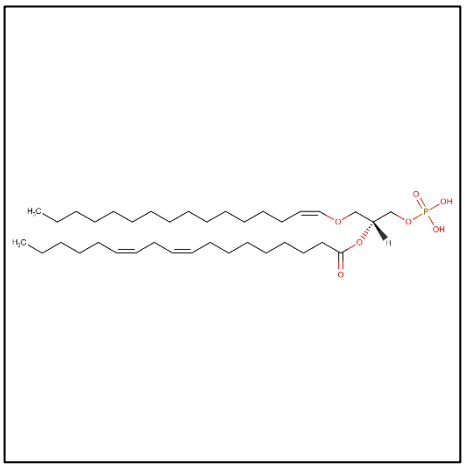


Şekil 4.55. Ürobilinojen genel yapısı [127].

4.5.34. PA(P-16:0/18:2(9Z,12Z))

2-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-1-(1Z-heksadesenil)-sn-glisero-3-fosfat, eter lipit metabolizmasının bir ara maddesidir. Eter lipitleri, gliserol üzerindeki bir veya daha fazla karbon atomunun, olağan ester bağının aksine bir eter bağı yoluyla bir alkil zincirine bağlandığı lipitlerdir. 2-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-1-(1Z-heksadesenil)-sn-glisero-3-fosfat geri dönüşümsüz olarak 2-(9Z,12Z-oktadekadienoil)-1-(1Z-heksadesenil))'den üretilir. Plazmalojenler, gliserol eter fosfolipitleridir. İki tiptedirler, alkil eter (-0-CH_2-) ve alkenil eter (-0-CH=CH-). Dihidroksiaseton fosfat (DHAP),

plazmalojenlerin sentezi için gliserol öncüsü olarak hizmet eder. Plazmalojenlerin üç ana sınıfı tanımlanmıştır Bunlar; kolin, etanolamin ve serin türevleridir. Etanolamin plazmalojen miyelin içinde yaygındır. Kolin plazmalojen, kalp dokusunda bol miktarda bulunur. Genellikle, plazmalojen formunun en yüksek oranı kolin bakımından oldukça az olan etanolamin sınıfındadır ve genellikle fosfatidilinositol gibi diğer fosfolipitlerde çok az veya hiç yoktur. Çoğu dokunun kolin plazmalojenlerinde, O-alkenil formundan ziyade genellikle daha yüksek bir oran O-alkildir, ancak kalp lipitlerinde bunun tersi doğru olma eğilimindedir. Hayvan dokusunda hem apolar hem de fosfolipitlerdeki alkil ve alkenil kısımları, 16:0, 18:0 ve 18:1 baskın olmak üzere, bileşimde oldukça basit olma eğilimindedir. Triaçilgliserollerin eter analogları, yani 1-alkildiaçilgliseroller, çoğu hayvan dokusunda sadece eser seviyede bulunur [128].

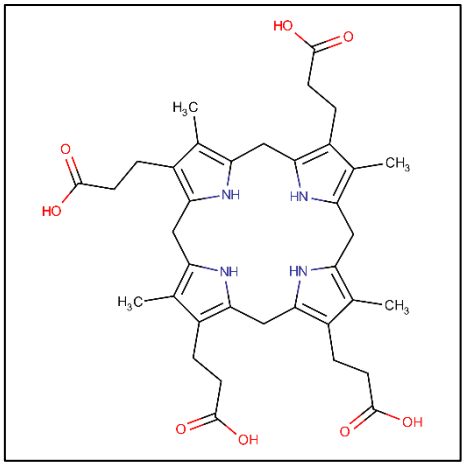


Şekil 4.56. PA(P-16:0/18:2(9Z,12Z)) genel yapısı [128].

4.5.35. Koproporfirinojen III

Koproporfirinojen III, hem sentezinden kaynaklanan bir porfirin metabolitidir. Porfirinler hem hayvan hem de bitki yaşamında bulunan pigmentlerdir. Koproporfirinojen III, hem sentezinden kaynaklanan koproporfirinojenin metilen köprülerinin kendiliğinden oksidasyonundan kaynaklanan bir tetrapirol ürünüdür. Vücuttan dışkı ve idrarla atılır. Koproporfirinojen III, üroporfirinojen III sentazın etkisiyle üroporfirinojen III'e dönüştürülen tetrapirol hidroksimetilbilandan biyosentezlenir. Üroporfirinojen III daha sonra bir dizi dört dekarboksilasyon yoluyla koproporfirinojen III'e dönüştürülür. Artan koproporfirinojen seviyeleri, doğuştan

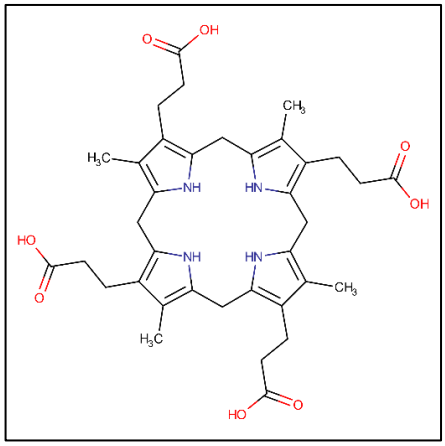
gelen eritropoietik porfiriyi veya kalıtsal bozukluklar olan sideroblastik anemiyi gösterebilir. Porfiri, porfirin metabolizması anormallikleri ile karakterize patolojik bir durumdur ve idrarda büyük miktarlarda porfirin atılımı ve ışığa karşı aşırı hassasiyet ile sonuçlanır. Hepatik faktörler, koproporfirinojen oksidazın inhibisyonundan ve ayrıca hepatositlerde koproporfirinojenin hızlı kaybından ve azalmış kullanımından kaynaklanan koproporfirinojen metabolizmasındaki bozukluğu içerir. Bu nedenle, koproporfirin halka izomer oranı (I:III), bozulmuş karaciğer fonksiyonu, intrahepatik kolestaz ve hepatik üroporfirinojen dekarboksilazın bozulmuş aktivitesi için hassas bir belirteç haline gelir. Kendi içinde, ikincil koproporfirinüri, hepatolojik-gastroenterolojik, nörolojik veya dermatolojik bir düzenin porfiri semptomları ile ilişkili değildir. Ancak bu semptomlarla koproporfirinüri ortaya çıkabilir. Belirli koşullar altında koproporfirinojen III; fototoksin, nörotoksin ve metabotoksin özelliktedir. Fototoksin, ışığa maruz kaldığında hücre hasarına yol açar. Nörotoksin, sinir hücrelerine ve sinir dokularına zarar verir. Kronik olarak yüksek porfirin seviyeleri, porfiri variegate, akut aralıklı porfiri, kalıtsal koproporfiri, konjenital eritropoietik porfiri ve sideroblastik anemi gibi porfirilerle ilişkilidir. Özellikle, koproporfirinojen III, akut aralıklı porfiri, protoporfiri ve alacalı porfiride aşırı miktarda birikir ve dışkıyla atılır. Birkaç porfiri türü vardır. Hepatik porfiriler, akut nörolojik ataklar (nöbetler, psikoz, aşırı sırt ve karın ağrısı ve akut polinöropati) ile karakterize edilirken, eritropoietik formlar cilt problemleriyle ortaya çıkar. Porfirinlerin nörotoksisitesi, mikrotübül oluşumunu bozan ve nöral malformasyonlara neden olan tübülin ile seçici etkileşimlerinden kaynaklanabilir [129].



Şekil 4.57. Koproporfirinojen III genel yapısı [129].

4.5.36. Koproporfirinojen I

HEM sentezinden kaynaklanan bir porfirin metabolitidir. Vücuttan dışkı ve idrarla atılır. Koproporfirinojen I, üroporfirinojen sentazın etkisiyle üroporfirinojen I'e dönüştürülen tetrapirol hidroksimetilbilandan biyosentezlenir. Daha sonra, bir dizi dört dekarboksilasyon yoluyla üroporfirinojen I'e dönüştürülür. Artan koproporfirinojen seviyeleri, doğuştan gelen eritropoietik porfiriyi veya kalıtsal bozukluklar olan sideroblastik anemiyi gösterebilir. Porfiri, porfirin metabolizması anormallikleri ile karakterize patolojik bir durumdur ve idrarda büyük miktarlarda porfirin atılımı ve ışığa karşı aşırı hassasiyet ile sonuçlanır. Hepatik faktörler, koproporfirinojen oksidazın inhibisyonundan ve ayrıca hepatositlerde koproporfirinojenin hızlı kaybından ve azalmış kullanımından kaynaklanan koproporfirinojen metabolizmasındaki bozukluğu içerir. Yüksek porfirin seviyeleri, akut aralıklı porfiri, kalıtsal koproporfiri, konjenital eritropoietik porfiri ve sideroblastik anemi gibi porfirilerle ilişkilidir [130].

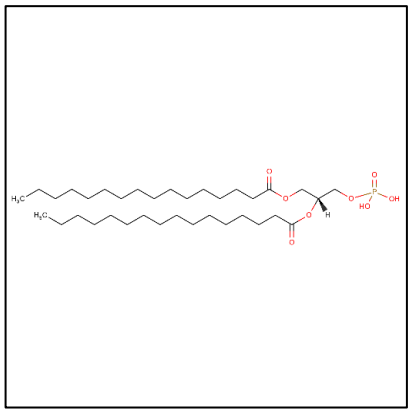


Şekil 4.58. Koproporfirinojen I genel yapısı [130].

4.5.37. PA (16:0/16:0)

PA (16:0/16:0) bir fosfatidik asittir. Bir fosfat parçasının bir gliserol ikame bölgesini işgal ettiği bir gliserofosfolipiddir. Diaçilgliserollerde olduğu gibi, fosfatidik asitler, C-1 ve C-2 pozisyonlarına bağlı çeşitli uzunluklarda ve doygunlukta birçok farklı yağ asidi kombinasyonuna sahip olabilir. 16, 18 ve 20 karbon içeren yağ asitleri en yaygın olanlarıdır. PA (16:0/16:0), özellikle, C-1 konumunda bir palmitik asit zincirinden ve C-2 konumunda bir palmitik asit zincirinden oluşur. Palmitik asit kısmı

balık yağlarından, süt yağlarından, bitkisel yağlardan ve hayvansal yağlardan elde edilir. Fosfatidik asitler oldukça nadirdir ancak triaçilgliserollerin ve fosfolipitlerin biyosentezinde ara ürünler olarak son derece önemlidir. Genelde analiz sırasında uygun olmayan depolama veya ekstraksiyon koşulları sırasında yanlışlıkla enzimatik hidrolizden kaynaklanabileceğinden, dokularda ve biyoakışkanlarda fosfatidik asitlerin konsantrasyonu olduğundan fazla tahmin edilir. Hayvan dokularında fosfatidik asidin ana biyosentetik yolu, yağ asitlerinin açil-CoA türevleri ile α-gliserofosfatın sıralı asilasyonunu içerir. PA'lar, trombosit agregasyonu, düz kas kasılması, *in vivo* vazoaktif etkiler, kemotaksis, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, endotel hücrelerinin artan sıkı bağlantı geçirgenliği, indüksiyon gibi birçok farklı hücre tipinde geniş bir yanıt aralığını uyarabilen biyolojik olarak aktif lipitlerdir. Gliserolfosfolipitlerin, özellikle fosfatidilkolinin PA'lara dönüşümünü ve N-arakidonoil-fosfatidiletanolamin'in anandamide ve PA'lara dönüşümünü katalize eden fosfolipaz D'ler, bradikinin, ATP ve glutamat dahil olmak üzere çeşitli inflamatuar aracılar tarafından aktive edilir [131].

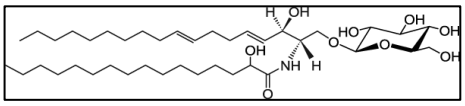


Şekil 4.59. PA(16:0/16:0) genel yapısı [131].

4.5.38. Glukozilseramid

Glukozilseramid, memeli hücrelerinde genellikle belirsiz bir role sahiptir. Seramid üzerine bir glukozil parçası yerleştiren enzim olan glukozilseramid sentazın aktivasyonu, laktosilseramid ve gangliosidler gibi daha karmaşık glikosfingolipitlerin üretimine yönelik ilk yola bağlı adımdır. Glukosilseramid seviyesindeki değişiklikler, kardiyovasküler hastalık, diyabet, cilt bozuklukları ve kansere yanıt olarak hücre ve dokularda birikir. Genel olarak, glukosilseramidin yukarı regülasyonu, hücresel

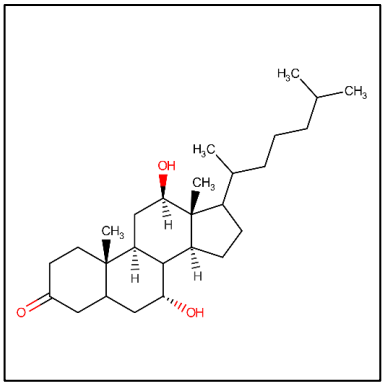
koruma sağlar ve belirli hücreleri çoğalma için hazırlar. Uzun süreli glukozilseramid fazlalığı insanda Gaucher hastalığında görülür [132].



Şekil 4.60. Glukozilseramid genel yapısı [132].

4.5.39. 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on

7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on, safra asidi biyosentezinde bir ara maddedir. Safra asitleri, ağırlıklı olarak memelilerin safrasında bulunan steroid asitlerdir. Farklı safra asitleri arasındaki ayrım, yalnızca 3, 7 ve 12. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak çok küçüktür. Safra asitleri, bağırsakta ve karaciğerde yağların ve sterollerin atılımını, emilimini ve taşınmasını kolaylaştıran bileşiklerdir. Safra asitleri ayrıca kolesterol katabolizmasından türetilen steroidal amfipatik moleküllerdir. Safra akışını ve lipit sekresyonunu düzenler, diyetteki yağların ve vitaminlerin emilimi için esastırlar ve kolesterol homeostazında yer alan tüm anahtar enzimlerin düzenlenmesinde rol oynarlar [133].

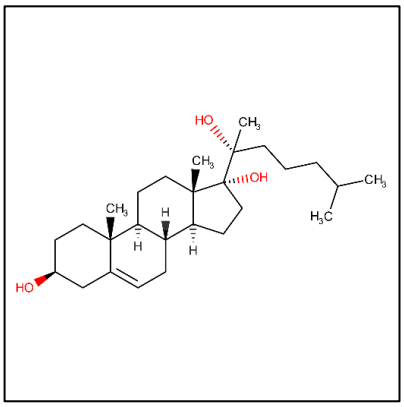


Şekil 4.61. 7α,12α-dihidroksi-5α-kolestan-3-on genel yapısı [133].

4.5.40. 17α,20α-dihidroksi kolesterol

3β,17,21-trihidroksi-pregn-5-en-20-on olarak da bilinen 17α,21-dihidroksipregnenolon, 21-hidroksisteroidler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, steroid omurgasının 21 konumunda bir hidroksil grubu taşıyan steroidlerdir. Bu nedenle, 17α,21-dihidroksipregnenolon, bir steroid lipit molekülü

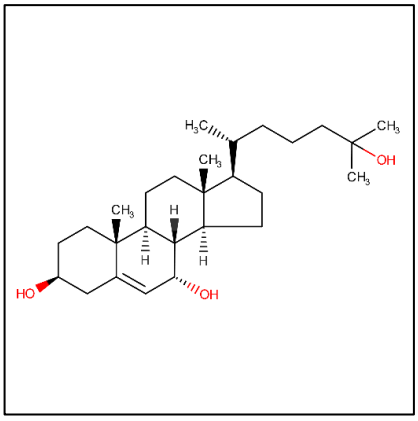
olarak kabul edilir. 17α,21-dihidroksipregnenolon çok hidrofobik bir moleküldür, pratik olarak suda çözünmez ve nispeten nötrdür [134].



Şekil 4.62. 17α,20α-dihidroksi kolesterol genel yapısı [134].

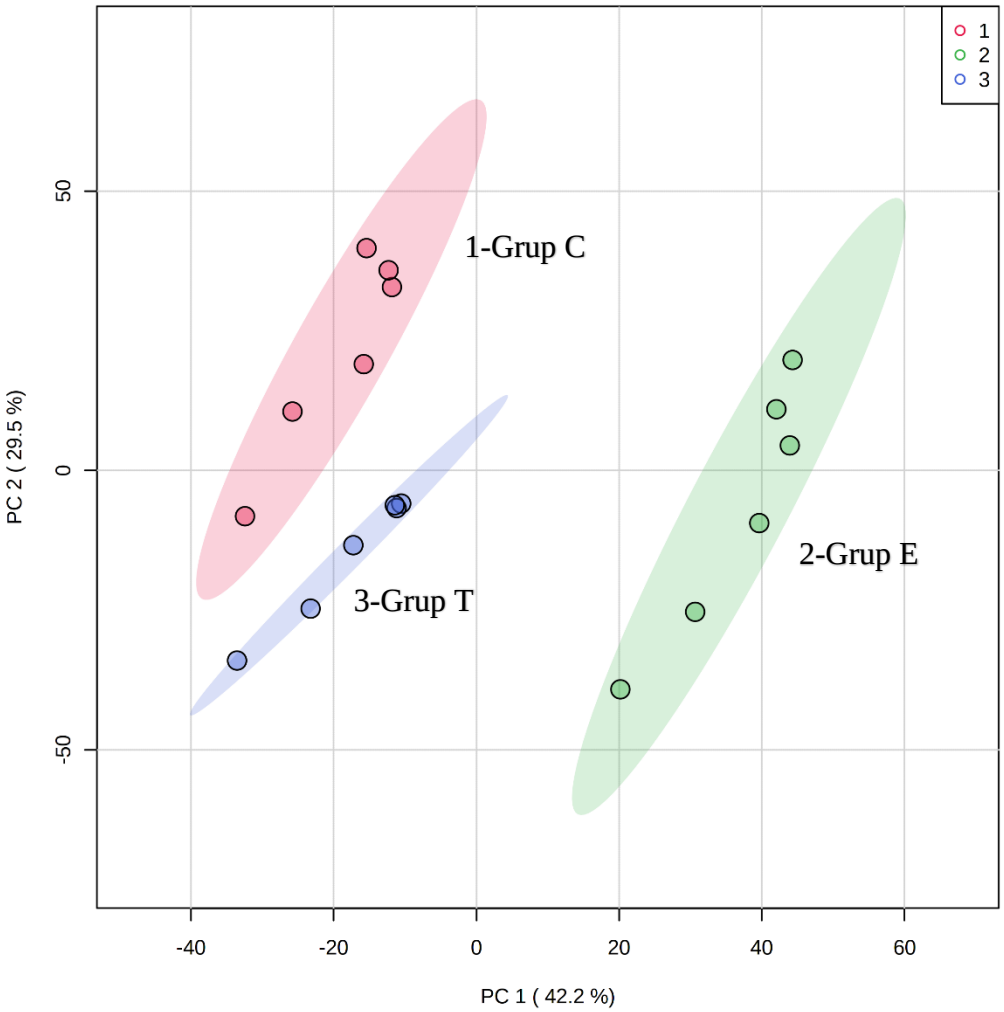
4.5.41. 7α,25-dihidroksi kolesterol

7α-hidroksilasyon, HMG-CoA redüktaz aktivitesinin baskılayıcıları olarak 25- veya 27-hidroksi kolesterolün etkisinde pozitif veya negatif olarak doğrudan yer almaz. İnsan diploid fibroblastlarındaki 25-hidroksi kolesterolün 7α-hidroksilasyonu, deksametazon ve kortizol tarafından uyarılmakta ve metirapon tarafından inhibe edilmektedir. Tanımlanamayan, muhtemelen 4-hidroksillenmiş bir metabolit, 90VA-VI hücreleri tarafından ve polar, muhtemelen konjuge bir metabolit, WiDr hücreleri tarafından oluşturulmuştur. 25-hidroksi kolesterolün 7α-hidroksile metaboliti, HMG-CoA redüktazın aktivitesini insan diploid fibroblastlarındaki 25-hidroksi kolesterol ile benzer ölçüde bastırırken, 90VA-VI hücrelerinde değil, 27-hidroksi kolesterolün 7 alfa-hidroksile metaboliti aktiviteyi azaltmıştır [135].

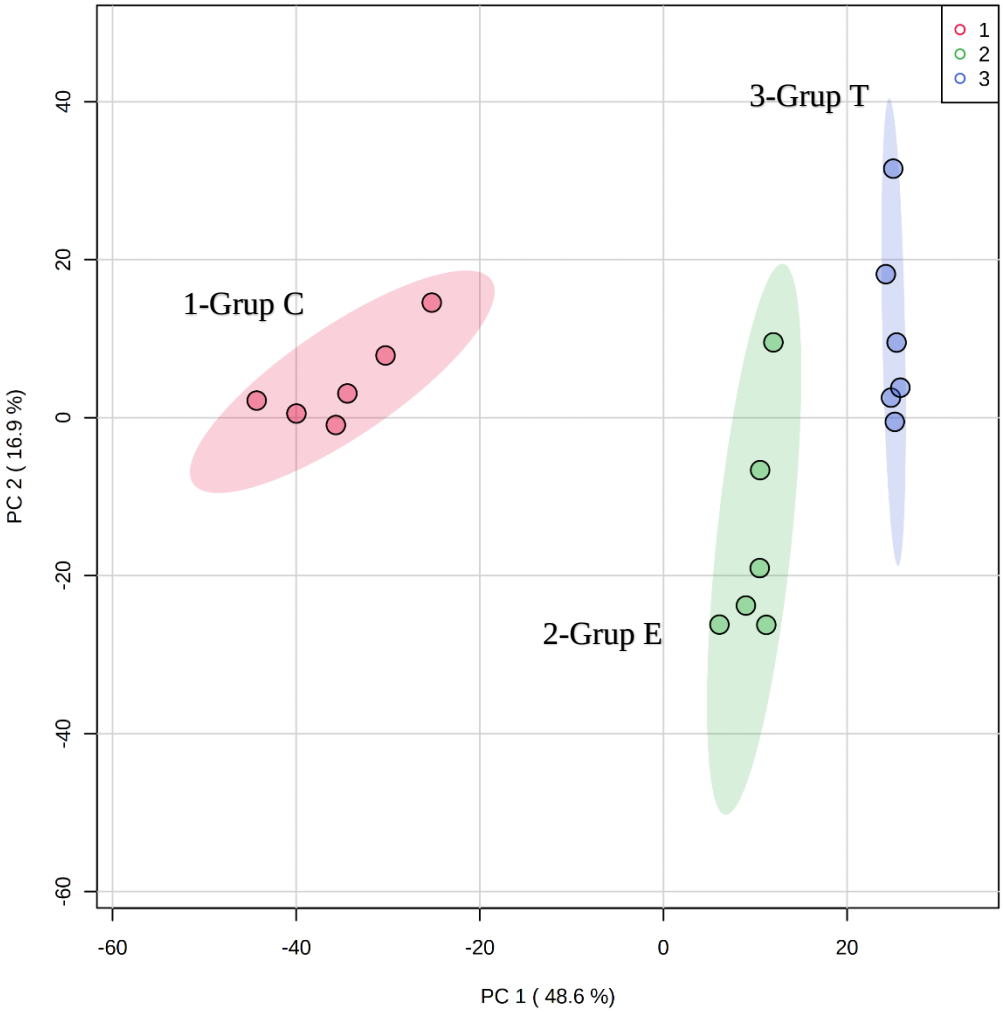


Şekil 4.63. 7α,25-dihidroksi kolesterol genel yapısı [135].

4.6. Metabolomik ve Lipidomik Çalışma Sonucu Grup C, Grup T ve Grup E Arasında Farklılaşmayı Gösteren PCA Grafikleri



Şekil 4.64. Metabolomik çalışmaya ait PCA grafiği.



Şekil 4.65. Lipidomik çalışmaya ait PCA grafiği.

PCA analiz sonucunda elde edilen her iki grafikte Grup C, Grup E ve Grup T arasında belirgin ayırım görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hastalığı (NAFLD), genel nüfusun %6-45 oranında etkilenmesine sebep olan global bir halk sağlığı problemidir [136]. Karaciğer yağlanması, alkolik veya alkolik olmayan herhangi bir nedene bağlı olarak ortaya çıkan karaciğer yağlanması için kullanılan genel bir terimdir. NAFLD ilaç, endüstriyel toksinler, alkol vb. unsurlar ile değil obezite, tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve insülin direnciyle ilişkili olup sıklıkla metabolik sendrom özellikleri ile ortaya çıkar [137, 138].

Hastalık, asemptomatik yüksek karaciğer enzim düzeylerinden karaciğer yetmezliği ve hepatosellüler karsinom komplikasyonları ile siroza kadar ilerleyebilir [139, 140]. Makro ve mikro yağ vezikülleri, ağırlıklı olarak trigliseritler, belirgin hepatik inflamasyona, karaciğer hücre ölümüne veya skarlaşmaya neden olmadan hepatositlerde birikir. NAFLD görülme sıklığı, obezitenin dünya genelinde hızla artan prevalansı ile paralel olarak artmaktadır [141].

NAFLD'ye sahip hastalarda üçüncü önde gelen ölüm nedeni olan sirozun, karaciğer nakli için en yaygın endikasyon olacağı tahmin edilmektedir. Ufukta umut vadeden birkaç ilaç olmasına rağmen, mevcut tedavi önerileri sınırlıdır [142]. İlaç kullanımından önce egzersiz ve diyet gibi yaşam tarzı değişiklikleri önerilmektedir, hastalığın ilerleyen durumlarında insülin direncini hedefleyen ilaçlar (metformin, glitazonlar gibi), ursodeoksikolik asit (UDCA) ve antioksidanlar (E vitamini, lesitin, β-karoten, selenyum gibi) kullanılmaktadır [143].

Karaciğerdeki NAFLD gibi hasarlar hastaların serum düzeylerindeki alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalen fosfataz (ALP) gibi enzimlerin yükselmesine yol açar [13, 144]. 1996 yılında Nanji, A. A. ve ark. yaptıkları çalışmada NAFLD hastalarına uygulanan E-vitamini tedavisinin histolojik iyileşmeye yol açtığını kanıtlamışlardır [145].2000 yılında Lavine, J. E. yaptığı benzer bir çalışmasında NAFLD'de hastalara oral yolla verilen E vitamininin serum düzeyinde ALT ve ALP enzimlerini normalleştirdiğini göstermiştir [146]. Benzer çalışmaların artmasıyla birlikte artık E vitamini uygulamasının NAFLD'ye karşı iyileştirici etkisi kanıtlanmıştır [13, 21].

Bu tez çalışması ile HEPG2 karaciğer kanseri hücre hatlarında insan serum albumin nanopartiküller (İSA) kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin etkisi LC/Q-TOF MS temelli metabolomik ve lipidomik çalışmalarla incelenmiştir. Bu amaçla 3 grup hücre hattı kullanılmıştır. İlk grup kontrol grubu (Grup C) olarak tasarlanmış ve sadece İSA ile işleme tabi tutulmuştur. İkinci grup (Grup T) ise test grubudur ve de yükleme etkinliğinin hesaplanması ile birlikte 300 µM E vitamini içerecek şekilde son hacime seyreltilmiş İSA tatbik edilmiş gruptur. Üçüncü grup ise 300 µM E vitamini içerecek şekilde hazırlanmış çözelti ile tatbik edilmiştir (Grup E). Pédeboscq ve arkadaşları, a-tokoferolün antioksidan özelliklerinin kansere karşı yararlı bir kemopreventif rol oynadığını öne sürüldüğünü belirtmiştir. Bununla birlikte, E vitamini gıda takviyesi olarak verildiğinde kemoterapi tedavisinin etkinliği üzerinde hastalar için istenmeyen yan ektilere olabileceğini göstermektedir [147]. Bu nedenle Grup T ve Grup E için nihai E Vitamini konsantrasyonu 300 µM olarak ayarlanmıştır. Hâlihazırda E vitaminin NAFLD'ye karşı etkinliği bilindiği için bu tez çalışmasında sınamaya tabi tutulacak temel hipotez İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E Vitamininin HEPG2 karaciğer kanseri üzerinde lipit ve metabolit profilinde sağladığı "iyileştirici" değişikliğin, sadece E vitamini kullanımından daha etkin olmasıdır. Bu amaçla 24 saat süresince tatbik sonucunda Ercan ve ark. Tarafından yapılan çalışmalara paralel şekilde [144] surfaktan kullanılmadan hazırlanan sitozolik fraksiyonların önce lipit ve metabolit fraksiyonlarına sıvı-sıvı ekstraksiyon ile ayrılması ve daha sonrasında metabolit ve lipit fraksiyonlarının LC/Q-TOF MS ile hedeflenmemiş şekilde profillenmesi sağlanmıştır. Lipidomik ve metabolomik çalışmalar için piklerin ayrılması, gruplanması, normalize edilmesi ve tanımlanmasını da kapsayan en güncel veri analizi tekniklerinden yararlanılmıştır [8, 90].

"Grup C, Grup T ve Grup E arasında metabolit ve lipit profillerinde değişim vardır" hipotezinin sınanmasında kullanılacak olan iki yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan ilki, değişim gösteren metabolit ve lipitlerin neler olduğunu incelemeden basitçe sadece miktarı değişen pikler üzerinden her üç grup birbirinden istatistiksel olarak farklıdır yaklaşımını kontrol etmektir. Bu amaçla Temel Bileşen Analizi (PCA) son on yılda öne çıkan ve metabolomik-lipidomik verilerin değerlendirilmesinde önem arz eden bir istatistik yöntemdir [148]. PCA'da temel mantık, tek bir bileşen üzerinden

istatistik analiz yapmak değil, birden fazla bileşen (pik alanı farklılaşan ve de farklılaşmayan tüm metabolitler-lipitler) üzerinden grupları kümelendirmektir. Bu tez çalışmasında metabolomik ve lipidomik çalışmalardan elde edilen hedeflenmemiş verinin yani LC/Q-TOF MS kromatogramlarının XCMS ve MS Excel ile işlenmiş son hali (ki bu işleme piklerin ayrılması, gruplanması ve normalizasyonunun içeren bir ön işlemdir) PCA analizi ile karşılaştırıldığında metabolit ve lipit profili düzeyinde her üç grubun da birbirinden tamamen ayrıştığı gösterilmiştir (**Şekil 4.63, Şekil 4.64**). Bu durum, HEPG2 karaciğer kanseri hücre hatlarında İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin ve boş E vitamininin metabolit ve lipit profilini değiştirdiğini ve bu durumun NAFLD tedavisinde *in vivo* düzeyde de etkinlik açısından farklılık oluşabileceği ile ilgili bir gösterge olarak kabul edilmiştir.

Metabolomik çalışmalarda LC/Q-TOF MS ile toplam 1969 adet potansiyel metabolit pik tespit edilmiştir. Bu piklerden sadece 619 adedi ardışık seyreltme yöntemi ile yapılan işlem sonrasında seyrelmeye bağlı olarak alanında seyrelme faktörü ile orantılı azalma gözlenen piktir ve dolayısıyla sadece bu 619 pik üzerine gruplar arası istatistik değerlendirme yapılmıştır. Grup C ve Grup T arasında 617 pikin 247 adedi istatistiksel olarak farklıdır ($p<0.05$) ve de en az 1,5 kat artmış veya azalmıştır (DK>1,5). Artış veya azalış, normalize edilmiş pik alanları üzerinden hesaplanmıştır. Normalizasyon tekniği olarak bütün tespit edilen piklerin alanının ortalaması hesaplanarak her bir pik alanı, ortalama pik alanına bölünmüştür. Böylece numune hazırlama, enjeksiyon ve kromatografik şartlardan kaynaklı varyasyonlar elimine edilmeye çalışılmıştır [149]. 247 pik, MetaboAnalyst 5.0'a yüklendiğinde toplam 118 metabolit (Ek 2) ile eşleşme sağlanmıştır. Ancak bu metabolitlerden bazılarının kütle/yük (m/z) değerleri C13 izotoplu metabolitlerle eşleşmiştir. Bazıları ise ortamda bulunmayan ve oluşabilmesi mümkün olmayan bileşenlerle fragment iyonlar oluşturduğu için liste dışına alınmıştır ve toplam 18 pik ile eşleşen 44 metabolit tespit edilmiştir. LC/Q-TOF MS temelli metabolomik çalışmalarda hedefsiz analizler yapıldığında herhangi bir m/z değerine sahip pik, 10 ppm hata payı çerçevesinde birden fazla metabolit ile eşleşebilmektedir. Dolayısıyla 18 pikin eşleştiği ve bulgular bölümünde detayları sunulan metabolitler tek tek değerlendirilmeye tabi tutulmuştur.

1. Pik ile eşleşme sonucu 5 adet metabolit tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden 2-oksoarjinin ve L-histidin için eşleşme sağlanan formlar sırasıyla M+H[1+], M+H_2O+H[1+] formlarıdır. Diğer eşleşme sağlanan formlara göre bu iki formun doğru eşleşme ihtimali daha yüksek görünmektedir; çünkü ortamda amonyak ve de sodyum bulunma ihtimali ve dolayısıyla eşleşen forma dönüşme ihtimali daha azdır. 2-oksoarjinin, arginin katabolizmasına ait bir üründür ve de obeziteyle ilgili insülin direncinde bir belirteçtir [150]. Histidin ise bir aminoasittir ve de NAFLD'de karaciğer kanseri-siroz dönüşümünde yüksek miktarda olduğu tespit edilen metabolitlerdendir [151]. Dolayısıyla ilgili eşleşmenin, 2-oksoarjinin ve L-histidin ile olması bu tez çalışmasında E vitamininin "iyileştirici" etkisi ile ilgili herhangi bir çıkarımda bulunamamıza sebebiyet vermektedir. Dikkate değer nokta ise İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin etkisinin, sadece tek başına E vitaminine göre daha az oluşudur. Eğer ki; ilgili metabolit miktarındaki artış hepatotoksisite açısından incelenecek olursa bu durum İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin toksik etkisinin daha az olduğu (tek başına E vitamininde 2,32 kat artışa karşılık 1,63 kat artış) şeklinde yorumlanabilir.

2. Pik ile eşleşme sonucu aspartilglukozamin miktarında İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin etkisi ile 1,71 katlık bir artış olmasına rağmen sadece E vitamininde bu artış 3,07 kattır. Hepatik lipogenez, glukoz metabolizması ile yakından ilişkilidir. Hepatik glukoz düzeylerinin arttığı koşullarda, fazla glukoz yağ asitlerine dönüştürülerek karaciğerde lipit birikimine neden olmaktadır. Park ve arkadaşları, glukozaminin, glukoz seviyesine göre hepatik lipit birikimini etkilediğini ifade etmiştir. Glukozaminler, vücut içinde aminosakkaridlerden sentezlenen bileşiklerdir. Glukozaminlerin karaciğer lipit profilini düzenleme etkisi ile ilgili bir çalışmada bu etkinin glukoz düzeyine karşı hassasiyetin bir sonucu olarak ortaya konulduğu bildirilmiştir [152-154]. Bu tez çalışmasında Grup T ve Grup E için kontrol grubuna karşı aspartilglukozamin düzeyindeki artış sonucu NAFLD üzerinde olumlu etki gösterebileceği değerlendirilmiştir.

3. Pik ile eşleşme sonucu dihidrolipoamid düzeylerinde değişim olduğu tespit edilmiştir. Dihidrolipoamid dihidrolipolil dehidrojenaz tarafından okside edilerek lipoamide dönüşmektedir. Dihidrolipolil dehidrojenaz eksikliğinin karaciğerde akut hasara yol açtığı bildirilmiştir [155]. Dolayısıyla Grup T'de gözlenen 1,57 katlık artışın Grup E deki 2,50 katlık artışa göre daha az oluşu oksidasyon sonucu lipoamide dönüşümün nanopartikül aracılığıyla daha da hızlandığının bir göstergesidir. Oksidasyon mekanizmasındaki bu kazanım, lipit metabolizması açısından yararlıdır.

4. Pik ile eşleşme sonucu pantetin miktarında Grup T ve Grup E için benzer azalmalar dikkat çekmektedir. Pantetin, vücutta eksojen olarak bulunan bir metabolit olduğundan ilgili sonuç lipit metabolizmasındaki değişim açısından dikkate alınmamıştır.

5. Pik ile eşleşmeler glutatyon türevleri ile ilişkilidir. Glutatyon, karaciğer hasarında hasara karşı etkinin önlenmesinde rol alan bir metabolittir. Glutatyon miktarının Grup T'de azalması (3,21 kat) ancak Grup E'de sabit kalması İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin etkinliği açısından dikkate değer bir sonuç olarak kabul edilmiştir.

6. Pik ile eşleşmeler prostaglandin molekülleri üzerinedir. Ancak bu eşleşmelerde Grup T ve Grup E için değişim benzer miktarlarda (1,67 kat ve 1,46 kat) ancak Grup T için negatif, Grup E için ise pozitif yöndedir. İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin, sadece E vitamini uygulamasına karşı bir üstünlüğünden söz edebilmek için karaciğer rejenerasyonunda görev alan prostaglandinlerin [156] nanoenkapsül yapısıyla birlikte kısa zamanda hızlıca harcandığı hipotezi üzerinde durulabilir. 6. Pik ile diğer eşleşmeler, karaciğer rejenerasyonu ile doğrudan ilişkili olan prostaglandin eşleşmesi yanında dikkate alınmamıştır.

7. Pik ile eşleşme bir kanser ilacı olan irinotekanın bir metabolitidir. Dolayısıyla hatalı pozitif bir eşleşme olarak kabul edilmiş ve çalışma kapsamında değerlendirmeye alınmamıştır.

8. Pik ile eşleşmeler kolesterol miktarında Grup T için azalmaya, Grup E için ise eser miktarda azalmaya işaret etmektedir. Bu durumda İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle E vitamininin lipit metabolizması üzerine etkinliğinin E vitaminine kıyasla dikkate değer ölçüde farklı olduğu görülmektedir.

9. Pik ile eşleşmede M+NaCl[1+] eşleşme formu M+HCOOK[1+] eşleşme formuna göre daha olası görünmektedir; çünkü deney ortamında ve vücutta potasyum miktarının sodyuma göre daha az olduğu bilinmektedir. 3α,7α,12α-trihidroksi-5β-kolestanoik asit yani diğer adı ile koprokolik asit bir safra asididir. Safra asitleri, safra akışını oluşturan lipitlerin, besinlerin ve vitaminlerin bağırsak emilimini ve taşınmasını kolaylaştıran fizyolojik surfaktanlardır. Safra asitlerinin miktarının karaciğer hastalıklarında değiştiği bilinmektedir [139, 157]. Grup T'de 6,00 katlık azalışa karşı Grup E'de 1,33 katlık azalış; nano enkapsüle yapının tedavi etkinliği açısından önemini gözler önüne sermektedir.

10. Pik ile eşleşmede tespit edilen kenodeoksikolik asit değişimi Grup T için 1,86 kat azalma, grup E için ise 1,14 kat azalma şeklindedir. Yine benzer şekilde primer bir safra asidi olan kenodeoksikolik asit miktarındaki değişimin nanoenkapsüle yapı ile daha da azalmış olması E vitamininin, nanoenkapsüle yapılar aracılığıyla NAFLD tedavisinde hedefe yönelik kullanımının önemini gözler önüne sermektedir.

11. Pik K1 Vitamini ile eşleşmiştir ve bu eşleşme eksojen bir metabolit olduğu için hatalı pozitif eşleşme olarak kabul edilmiştir.

12. Pik ve 14. Pik aynı metabolit ile eşleşmiş (urobilinojen) farklı eşleşme formlarıdır. Ancak pik şekilleri ve değişim katsayıları birbirinden farklıdır. Bu durumda sağlıklı bir değerlendirme yapılabilmesi mümkün olmamaktadır.

13. Pik, 17. Pik ve 18. Pik, kromatogramlar incelendiğinde aynı piki işaret etmektedir. Dolayısıyla değişim katsayıları arasında gözlenen yakınlık dikkate alındığında sadece yağ asitleri miktarında önemli bir azalışın nanoenkapsüle E vitamini ile sağlanabildiği çıkarımında bulunulmuştur. Ayrıca; E vitaminin fosfolipaz D ve kanser ilişkisi yönünden ileri zamanlarda değerlendirme yapılması gereklidir. Bildirildiği gibi, glukozilseramid sentazın aktivitesi, hücrelerdeki glukozilseramid

(sfingolipitlerin bir üyesi) seviyesini doğrudan etkiler ve bu da hücrelerin işlevini etkilemektedir. [158]. Yüksek aktiviteye sahip glukozilseramid sentaz, hepatoma hücrelerinin çoğalmasına neden olabilir. Ayrıca hepatoma hücrelerinin çoğalma hızı, glukozilseramid sentaz inhibitörü uygulandıktan sonra da önemli ölçüde düşebilir [158, 159]. Grup T'de, Grup E'ye göre karşılaştırıldığında glukozilseramid seviyesi önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

15. Pik ve 16. Pik için eşleşmenin sağlandığı Koproporfinojen (CPI ve CPIII), farklı diyet ve cerrahi kaynaklı hastalarda plazma ve karaciğer derişimi artan bir metabolittir. Bu nedenle CP I ve III, klinik öncesi çalışmalarda NASH (alkole bağlı olmayan steatohepatit) ilerlemesini izleyebilen potansiyel biyobelirteçlerdir [160]. Ancak; Grup T ve Grup E arasında değişim katsayısı yönünden önemli bir fark görünmemesi nanoenkapsüle E vitamini kullanımının bir avantaj sağlamadığını göstermektedir.

Farmasötik bakımda konvansiyonel ilaçların kulanım periyotları oldukça değişiklik gösterebilmektedir ve bu durum etken madde konsantrasyonunun yeterli miktarın altına düşmesi veya toksik seviyelere çıkması gibi istenmeyen durumlara neden olabilir. Bu beklenmedik durumlardan kaçınmak için etkin maddenin hedef bölgeye verilmesi, ilaca sık maruziyetten kaçınmak için dozunun azaltılmasına ve doz aralığının uzamasına yardımcı olabilir. Vitamin E, doz kontrolü uygun şekilde ayarlandığında karaciğer hastalıklarında güvenle kullanıldığı bildirilen antioksidan ekzojen bir bileşiktir. İSA nanopartikülleri, ilaç dağıtımı için sıkça tercih edilen ve toksik olmayan özelliktedir. Sonuç olarak, bu tez çalışması ile E vitamininin NAFLD tedavisinde bilinen etkinliğinin sınırlı ancak önemli sayıda tespit edilen metabolit için İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle yapı aracılığıyla daha da arttığı ortaya konulmuştur. PCA grafikleri, İSA kullanılarak geliştirilen nano-enkapsüle yapının, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımında umut verici sonuçlar alınabileceğini *in vitro* düzeyde sergilemiştir. Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalar, farklı saat aralıkları ve farklı dozlar ile tedavi etkinliğinin izlenmesi yönünde olan yeni yaklaşımları içerecek şekilde tasarlanacak ve *in vivo* modellemeler bu bilgiler ışığında geliştirilecektir.

6.KAYNAKLAR

1. Jurowski, K., et al., *Analytical techniques in lipidomics: state of the art.* Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2017. **47**(5): p. 418-437.
2. Rotroff, D.M. and A.A. Motsinger-Reif, *Embracing integrative multiomics approaches.* International journal of genomics, 2016. **2016**.
3. Likić, V.A., et al., *Systems biology: the next frontier for bioinformatics.* Advances in bioinformatics, 2010. **2010**.
4. Subramaniam, S., et al., *Bioinformatics and systems biology of the lipidome.* Chemical reviews, 2011. **111**(10): p. 6452-6490.
5. Krawetz, S.A. and S.A. Krawetz, *Bioinformatics for systems biology*. 2009: Springer.
6. Larijani, B., et al., *OMICs profiling of cancer cells*, in *Genomics, Proteomics, and Metabolomics*. 2019, Springer. p. 141-157.
7. Heidari-Keshel, S., et al., *Genomics, Proteomics, and Metabolomics for Stem Cells Monitoring in Regenerative Medicine*, in *Genomics, Proteomics, and Metabolomics*. 2019, Springer. p. 51-66.
8. Kaplan, O. and M. Çelebier, *Evaluation of Recent Data Processing Strategies on Q-TOF LC/MS Based Untargeted Metabolomics.* Mass Spectrometry Letters, 2020. **11**(1): p. 1-5.
9. Tokushige, K., et al., *Serum metabolomic profile and potential biomarkers for severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease.* Journal of gastroenterology, 2013. **48**(12): p. 1392-1400.
10. Mosca, A., et al., *Antioxidant activity of Hydroxytyrosol and Vitamin E reduces systemic inflammation in children with paediatric NAFLD.* Digestive and Liver Disease, 2021. **53**(9): p. 1154-1158.
11. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tsochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).* Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-1048.
12. Sumida, Y., et al., *Role of vitamin E in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis.* Free Radical Biology and Medicine, 2021. **177**: p. 391-403.
13. Nagashimada, M. and T. Ota, *Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease.* IUBMB life, 2019. **71**(4): p. 516-522.
14. Younossi, Z. and L. Henry, *The Burden of NAFLD Worldwide*, in *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. 2020, Springer. p. 15-24.
15. Reid, A.E., *Nonalcoholic steatohepatitis.* Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 710-723.
16. Litwack, G., *Vitamin E*. 2007: Elsevier.
17. Sumida, Y., et al., *Role of vitamin E in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis.* Free Radical Biology and Medicine, 2021.

18. Vvedenskaya, O., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease stratification by liver lipidomics.* Journal of lipid research, 2021. **62**.

19. Yoneda, M., T. Hasegawa, and K. Sato, *Vitamin E therapy for NAFLD/NASH.* Nutrition, 2015. **31**(6): p. 898-9.

20. Puri, P., et al., *A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 2007. **46**(4): p. 1081-1090.

21. Perumpail, B.J., et al., *The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD.* Diseases, 2018. **6**(4): p. 86.

22. Brunt, E.M., *Pathology of nonalcoholic fatty liver disease.* Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2010. **7**(4): p. 195-203.

23. Brunt, E.M. and D.G. Tiniakos, *Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.* World journal of gastroenterology: WJG, 2010. **16**(42): p. 5286.

24. Naik, A. and D. Rozman, *Genomic aspects of NAFLD pathogenesis.* Genomics, 2013. **102**(2): p. 84-95.

25. Evans, H.M. and K.S. Bishop, *On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction.* science, 1922. **56**(1458): p. 650-651.

26. Birrenbach, G. and P. Speiser, *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology.* Journal of pharmaceutical sciences, 1976. **65**(12): p. 1763-1766.

27. Manchanda, S., *In vitro Release Study of Drug from Nano Particle.* Challenges and Advances in Chemical Science Vol. 3, 2021: p. 87-91.

28. Sharma, S., R. Parveen, and B.P. Chatterji, *Toxicology of Nanoparticles in Drug Delivery.* Current Pathobiology Reports, 2021: p. 1-12.

29. Elsupikhe, R.F., et al., *Fabrication of Albumin/Ag Nanoparticles by Using Ultrasonic Irradiation and Estimation of their Influence on Cell Division and Cyto-toxicity of Allium Cepa Roots.* J Nanosci Nanotechnol Appl, 2021. **5**: p. 104.

30. Wilczewska, A.Z., et al., *Nanoparticles as drug delivery systems.* Pharmacological reports, 2012. **64**(5): p. 1020-1037.

31. Haley, B. and E. Frenkel. *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*. in *Urologic Oncology: Seminars and original investigations*. 2008. Elsevier.

32. Roos, C., et al., *Mechanistic modelling of intestinal drug absorption–The in vivo effects of nanoparticles, hydrodynamics, and colloidal structures.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2018. **133**: p. 70-76.

33. Gul, A.R., et al., *Grass-mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles and their drug delivery evaluation: A biocompatible anti-cancer therapy.* Chemical Engineering Journal, 2021. **407**: p. 127202.

34. Sugarbaker, P.H. and O.A. Stuart, *Pharmacokinetics of the intraperitoneal nanoparticle pegylated liposomal doxorubicin in patients with peritoneal metastases.* European Journal of Surgical Oncology, 2021. **47**(1): p. 108-114.

35. Park, J., et al., *PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009. **5**(4): p. 410-418.

36. Barenholz, Y.C., *Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned.* Journal of controlled release, 2012. **160**(2): p. 117-134.

37. Fassas, A. and A. Anagnostopoulos, *The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia.* Leukemia & lymphoma, 2005. **46**(6): p. 795-802.

38. Hwang, D., et al., *Bioequivalence assessment of high-capacity polymeric micelle nanoformulation of paclitaxel and Abraxane® in rodent and non-human primate models using a stable isotope tracer assay.* Biomaterials, 2021. **278**: p. 121140.

39. Faraji, A.H. and P. Wipf, *Nanoparticles in cellular drug delivery.* Bioorganic & medicinal chemistry, 2009. **17**(8): p. 2950-2962.

40. Misel. *Misel*. [cited 2021 12 Aralık]; Available from: https://stringfixer.com/tr/Micelle.

41. Lomis, N., et al., *Human serum albumin nanoparticles for use in cancer drug delivery: process optimization and in vitro characterization.* Nanomaterials, 2016. **6**(6): p. 116.

42. Lee, H.J., et al., *Enzyme delivery using the 30Kc19 protein and human serum albumin nanoparticles.* Biomaterials, 2014. **35**(5): p. 1696-1704.

43. An, F.-F. and X.-H. Zhang, *Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery.* Theranostics, 2017. **7**(15): p. 3667.

44. Sun, T., et al., *Mass spectrometry-based lipidomics in food science and nutritional health: A comprehensive review.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020. **19**(5): p. 2530-2558.

45. Züllig, T. and H.C. Köfeler, *High resolution mass spectrometry in lipidomics.* Mass spectrometry reviews, 2021. **40**(3): p. 162-176.

46. Sud, M., et al., *Lmsd: Lipid maps structure database.* Nucleic acids research, 2007. **35**(suppl_1): p. D527-D532.

47. Fahy, E., et al., *LIPID MAPS online tools for lipid research.* Nucleic acids research, 2007. **35**(suppl_2): p. W606-W612.

48. Fahy, E., et al., *Lipid classification, structures and tools.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2011. **1811**(11): p. 637-647.

49. Meikle, T.G., et al., *Clinical lipidomics: realizing the potential of lipid profiling.* Journal of lipid research, 2021. **62**.

50. Lederberg, J. *'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words*. 2001 6.06.2017]; Available from: http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/13313/title/-Ome-Sweet--Omics---A-Genealogical-Treasury-of-Words/.

51. Griffiths, W., et al., *Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments.* European Journal of Mass Spectrometry, 2007. **13**(1): p. 45-50.

52. Becker, S., et al., *LC–MS-based metabolomics in the clinical laboratory.* Journal of Chromatography B, 2012. **883**: p. 68-75.

53. Griffiths, W.J., et al., *Targeted metabolomics for biomarker discovery.* Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(32): p. 5426-5445.

54. Venter, J.C., *A part of the human genome sequence.* 2003.

55. Xiao, J.F., et al., *LC–MS based serum metabolomics for identification of hepatocellular carcinoma biomarkers in Egyptian cohort.* Journal of proteome research, 2012. **11**(12): p. 5914-5923.

56. Zhou, B., et al., *LC-MS-based metabolomics.* Molecular BioSystems, 2012. **8**(2): p. 470-481.

57. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Current Opinion in HIV and AIDS, 2010. **5**(6): p. 463.

58. Han, X., *Lipidomics: Comprehensive mass spectrometry of lipids*. 2016: John Wiley & Sons.

59. Lagoutte-Renosi, J., et al., *Influence of antiplatelet agents on the lipid composition of platelet plasma membrane: A lipidomics approach with ticagrelor and its active metabolite.* International journal of molecular sciences, 2021. **22**(3): p. 1432.

60. Yan, L., et al., *Discovery of lipid profiles of type 2 diabetes associated with hyperlipidemia using untargeted UPLC Q-TOF/MS-based lipidomics approach.* Clinica Chimica Acta, 2021. **520**: p. 53-62.

61. Ding, M. and K.M. Rexrode, *A review of lipidomics of cardiovascular disease highlights the importance of isolating lipoproteins.* Metabolites, 2020. **10**(4): p. 163.

62. Bian, L., H. Chen, and X. Zhou, *Untargeted lipidomics analysis of Mori Fructus polysaccharide on acute alcoholic liver injury in mice using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap-high resolution mass spectrometry.* International Immunopharmacology, 2021. **97**: p. 107521.

63. Brügger, B., *Lipidomics: analysis of the lipid composition of cells and subcellular organelles by electrospray ionization mass spectrometry.* Annual review of biochemistry, 2014. **83**: p. 79-98.

64. Schwudke, D., et al., *Shotgun lipidomics on high resolution mass spectrometers.* Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(9): p. a004614.

65. van der Greef, J. and A.K. Smilde, *Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future.* Journal of Chemometrics, 2005. **19**(5-7): p. 376-386.

66. Institute, U.o.T.B. and C.F.f. Research, *Individual Metabolic Patterns and Human Disease: An Exploratory Study Utilizing Predominantly Paper*

Chromatographic Methods, from the Biochemical Institute and the Dept. of Chemistry, the University of Texas, and the Clayton Foundation for Research, Austin. Vol. 4. 1951: University of Texas.

67. Gates, S.C. and C.C. Sweeley, *Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography.* Clinical chemistry, 1978. **24**(10): p. 1663-1673.

68. Horning, E.C. and M.-G. Horning, *Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites.* Clinical chemistry, 1971. **17**(8): p. 802-809.

69. Games, D.E., et al., *Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography—mass spectrometry and field desorption mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1984. **294**: p. 269-279.

70. Niemelä, P.S., et al., *Bioinformatics and computational methods for lipidomics.* Journal of Chromatography B, 2009. **877**(26): p. 2855-2862.

71. Cang, S., et al., *Integrated DIA proteomics and lipidomics analysis on non-small cell lung cancer patients with TCM syndromes.* Chinese Medicine, 2021. **16**(1): p. 1-20.

72. Lam, S.M., et al., *High-coverage lipidomics for functional lipid and pathway analyses.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1147**: p. 199-210.

73. Ettre, L. and K. Sakodynskii, *MS Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903).* Chromatographia, 1993. **35**(3): p. 223-231.

74. Kazakevich, Y.V. and R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007: John Wiley & Sons.

75. Ahuja, S., *Chromatography and separation science*. Vol. 4. 2003: Academic Press.

76. Li, M., et al., *Analytical methods in lipidomics and their applications.* Analytical chemistry, 2014. **86**(1): p. 161-175.

77. Dong, M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*. 2006: John Wiley & Sons.

78. Muddiman, D.C., *Jürgen H. Gross: Mass spectrometry: a textbook*. 2018, Springer.

79. Glish, G.L. and R.W. Vachet, *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century.* Nature reviews drug discovery, 2003. **2**(2): p. 140-150.

80. Villas-Bôas, S.G., et al., *Mass spectrometry in metabolome analysis.* Mass spectrometry reviews, 2005. **24**(5): p. 613-646.

81. Medhe, S., *Mass spectrometry: detectors review.* Chem Biomol Eng, 2018. **3**: p. 51-58.

82. Dole, M., et al., *Molecular beams of macroions.* The Journal of chemical physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.

83. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme.* The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.

84. Stephens, W., *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Disaersion.* Phys. Rev., 1946. **69**: p. 691.

85. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers.* Applied Spectroscopy Reviews, 2009. **44**(3): p. 210-230.

86. *What is R?* 2021 [cited 2021 Aralık]; Available from: https://www.r-project.org/about.html.

87. Smith, C.A., et al., *XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification.* Analytical chemistry, 2006. **78**(3): p. 779-787.

88. Tarhini, M., et al., *Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method.* Materials, 2018. **11**(3): p. 394.

89. Tarhini, M., et al., *Human serum albumin nanoparticles as nanovector carriers for proteins: application to the antibacterial proteins "neutrophil elastase" and "secretory leukocyte protease inhibitor".* International journal of pharmaceutics, 2020. **579**: p. 119150.

90. Pang, Z., et al., *MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights.* Nucleic acids research, 2021.

91. Daszykowski, M., et al., *Robust statistics in data analysis—A review: Basic concepts.* Chemometrics and intelligent laboratory systems, 2007. **85**(2): p. 203-219.

92. Varga, N., et al., *Vitamin E-loaded PLA-and PLGA-based core-shell nanoparticles: synthesis, structure optimization and controlled drug release.* Pharmaceutics, 2019. **11**(7): p. 357.

93. Nag, S., et al., *Tannic acid and vitamin E loaded PLGA nanoparticles ameliorate hepatic injury in a chronic alcoholic liver damage model via EGFR-AKT-STAT3 pathway.* Nanomedicine, 2020. **15**(3): p. 235-257.

94. Simon, L.C., R.W. Stout, and C. Sabliov, *Bioavailability of orally delivered alpha-tocopherol by poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles and chitosan covered PLGA nanoparticles in F344 rats.* Nanobiomedicine, 2016. **3**: p. 8.

95. *L-Hisitidine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000177.

96. *N-Methyltyramine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003633.

97. *N-Methylphenylethanolamine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001387.

98. *2-Oxoarginine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004225.

99. *N(omega)-Hydroxyarginine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004224.

100. *Aspartylglycosamine*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000489.

101. *S-(2-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006869.

102. *S-(3-Methylbutanoyl)-dihydrolipoamide-E*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006867.

103. *Pantetheine* [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003426.

104. *S-(2-Chloroacetyl)glutathione*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0060505.

105. *2-(S-Glutathionyl)acetyl chloride*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0060342.

106. *Prostaglandin H2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001381.

107. *Prostaglandin E2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001220.

108. *Prostaglandin D2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001403.

109. *Prostaglandin I2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001335.

110. *Thromboxane A2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001452.

111. *(13E)-11a-Hydroxy-9,15-dioxoprost-13-enoic acid*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001320.

112. *13,14-Dihydro-15-keto-PGE2*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002776.

113. *20-Hydroxy-leukotriene B4*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001509.

114. *Lipoxin A4*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004385.

115. *Lipoxin B4*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0005082.

116. *NPC* [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0060499.

117. *3a,7a-Dihydroxy-5b-cholestan-26-al*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006894.

118. *7a,12a-Dihydroxy-5b-cholestan-3-one*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006887.

119. *20a,22b-Dihydroxycholesterol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006763.

120. *7-a,27-Dihydroxycholesterol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006281.

121. *(24S)-7alpha,24-Dihydroxycholesterol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0060136.

122. *3a,7a,12a-Trihydroxy-5b-cholestanoic acid*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000601.

123. *alpha-Tocotrienol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0006327.

124. *Chenodeoxyglycocholic acid*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006898.

125. *Chenodeoxycholic acid glycine conjugate*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000637.

126. *Vitamin K1*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0003555.

127. *Urobilinogen*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004158.

128. *PA(P-16:0/18:2(9Z,12Z))*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0011155.

129. *Coproporphyrinogen III*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001261.

130. *Coproporphyrinogen I*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0002158.

131. *PA(16:0/16:0)*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000674.

132. Messner, M.C. and M.C. Cabot, *Glucosylceramide in humans*. Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules, 2010: p. 156-164.

133. *7a,12a-Dihydroxy-5a-cholestan-3-one*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006886.

134. *17a,20a-Dihydroxycholesterol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006764.

135. *7alpha,25-dihydroxycholesterol*. [cited 2021 Aralık]; Available from: https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0006280.

136. Oğuz, E., *Alkolik Olmayan karaciğer yağlanması Olan Hastalarda bağırsaktaki Faecalibacterium Prausnitzii Ve Eubacterium Rectale Bakterilerinin değişimlerinin Uygulanan Diyet Modeli Ile ilişkilendirilmesi*. 2019, Marmara Universitesi (Turkey).

137. Akif, A., *Non alkolik yağlı karaciğer hastalığında güncel medikal tedavi*. Kocatepe Tıp Dergisi, 2015. **16**(1): p. 67-76.

138. GÖREN, B. and T. FEN, *Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı*. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2005. **25**(6): p. 841-850.

139. Gottlieb, A. and A. Canbay, *Why bile acids are so important in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression.* Cells, 2019. **8**(11): p. 1358.

140. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease.* New England Journal of Medicine, 2002. **346**(16): p. 1221-1231.

141. Angulo, P., *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease.* Nutrition reviews, 2007. **65**(suppl_1): p. S57-S63.

142. Rinella, M.E., *Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review.* Jama, 2015. **313**(22): p. 2263-2273.

143. Diehl, A., *Fatty liver, hypertension, and the metabolic syndrome.* Gut, 2004. **53**(7): p. 923-924.

144. Ercan, A., 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**: p. 377-386.

145. Nanji, A.A., et al., *Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established experimental alcoholic liver disease.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996. **277**(3): p. 1694-1700.

146. Lavine, J.E., *Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study.* The Journal of pediatrics, 2000. **136**(6): p. 734-738.

147. Pédeboscq S, Rey C, Petit M, Harpey C, De Giorgi F, Ichas F, et al. Non-antioxidant properties of α-tocopherol reduce the anticancer activity of several protein kinase inhibitors in vitro. PloS one. 2012;7(5):e36811.

148. Worley, B. and R. Powers, *Multivariate analysis in metabolomics.* Current Metabolomics, 2013. **1**(1): p. 92-107.

149. Ejigu, B.A., et al., *Evaluation of normalization methods to pave the way towards large-scale LC-MS-based metabolomics profiling experiments.* Omics: a journal of integrative biology, 2013. **17**(9): p. 473-485.

150. Al-Sulaiti, H., et al., *Metabolic signature of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes.* Journal of translational medicine, 2019. **17**(1): p. 1-11.

151. Teilhet, C., et al., *Specificities of human hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic fatty liver disease in absence of cirrhosis revealed by tissue extracts 1H-NMR spectroscopy.* Metabolites, 2017. **7**(4): p. 49.

152. Park, J., et al., *Glucosamine regulates hepatic lipid accumulation by sensing glucose levels or feeding states of normal and excess.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2020. **1865**(10): p. 158764.

153. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001;50(8):1844-50.

154. Park J, Lee Y, Jung E-H, Kim S-M, Cho H, Han I-O. Glucosamine regulates hepatic lipid accumulation by sensing glucose levels or feeding states of normal

and excess. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2020;1865(10):158764.

155. Brassier, A., et al., *Dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency: a still overlooked cause of recurrent acute liver failure and Reye-like syndrome.* Molecular genetics and metabolism, 2013. **109**(1): p. 28-32.

156. Tsujii, H., et al., *Prostaglandin E2 and rat liver regeneration.* Gastroenterology, 1993. **105**(2): p. 495-499.

157. Zhu, L., et al., *Bile acids and the gut microbiome as potential targets for NAFLD treatment.* Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2018. **67**(1): p. 3-5.

158. Gan J, Zheng SJ, Mao XR, Li JF. The role of glucosylceramide and glucosylceramide synthase in liver disease: from bench to bedside. Acta Biochimica Polonica. 2021;68(1):33-9.

159. Guri Y, Colombi M, Dazert E, Hindupur SK, Roszik J, Moes S, et al. mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis. Cancer cell. 2017;32(6):807-23. e12.

160. Chatterjee, S., et al., *Transporter Activity Changes in Nonalcoholic Steatohepatitis: Assessment with Plasma Coproporphyrin I and III.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2021. **376**(1): p. 29-39.

7. EKLER

Ek 1. MS Excel Veri İşleme Sonucu Elde Edilen 247 Pik

Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z
1	134,0889	51	428,323	101	563,2866	151	664,4845	201	884,6256
2	158,0856	52	444,3456	102	563,3196	152	665,4876	202	885,6271
3	173,084	53	445,3477	103	569,2499	153	666,4901	203	886,6296
4	174,0876	54	446,3512	104	576,4289	154	667,4929	204	887,6329
5	186,0795	55	449,2996	105	577,432	155	669,4413	205	905,5535
6	188,1815	56	449,3024	106	578,4349	156	670,4458	206	928,6555
7	199,0495	57	450,2985	107	579,4367	157	671,4469	207	929,6544
8	208,1249	58	450,3063	108	579,5367	158	678,5004	208	930,6571
9	212,2433	59	451,3266	109	581,2668	159	694,4226	209	972,6806
10	225,1516	60	465,2773	110	581,3861	160	695,3928	210	973,0162
11	227,1363	61	466,2804	111	589,3516	161	696,3972	211	974,0177
12	229,1228	62	473,3419	112	590,3532	162	697,3663	212	974,9954
13	230,1074	63	474,313	113	590,4087	163	698,3622	213	977,4784
14	230,2547	64	475,2304	114	591,3669	164	699,3722	214	1016,706
15	231,258	65	475,2696	115	594,3706	165	705,3693	215	1017,709
16	233,1969	66	487,3766	116	597,3598	166	708,5126	216	1044,802
17	234,2003	67	488,3732	117	598,3623	167	709,5158	217	1044,814
18	242,109	68	489,3758	118	599,3649	168	710,5183	218	1061,733
19	247,1351	69	490,3787	119	603,4309	169	711,5205	219	1198,886
20	248,1387	70	491,3767	120	606,3062	170	713,4683	220	1273,651
21	263,0347	71	495,3514	121	606,3558	171	714,4715	221	1274,652

Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z
22	265,1498	72	502,3528	122	606,3816	172	715,4748	222	1290,675
23	266,1634	73	503,3156	123	620,4568	173	719,3445	223	1291,679
24	271,1633	74	509,282	124	621,3325	174	720,3484	224	1292,684
25	273,2333	75	509,3004	125	621,4598	175	729,4434	225	1293,68
26	286,3199	76	510,3066	126	622,4624	176	730,4467	226	1295,632
27	287,3216	77	511,3059	127	623,4646	177	731,445	227	1296,635
28	290,1329	78	516,3793	128	625,4137	178	739,6441	228	1297,637
29	290,2776	79	518,2511	129	626,4191	179	746,4485	229	1299,812
30	291,1329	80	518,3057	130	627,4196	180	752,5402	230	1301,84
31	291,2801	81	518,3409	131	637,3268	181	753,5433	231	1316,823
32	314,3495	82	530,3841	132	638,3305	182	754,5463	232	1317,828
33	317,0949	83	531,3869	133	638,3642	183	755,5487	233	1318,836
34	334,3049	84	532,4011	134	639,3353	184	757,4972	234	1318,865
35	335,3076	85	533,4041	135	639,3665	185	758,4994	235	1319,837
36	353,2788	86	534,4069	136	640,3383	186	766,5553	236	1321,78
37	356,29	87	536,3028	137	641,3872	187	789,4739	237	1322,784
38	356,3612	88	537,358	138	642,3912	188	790,4761	238	1323,788
39	357,3644	89	538,3647	139	643,3896	189	796,5685	239	1324,793
40	367,0382	90	539,3749	140	650,4001	190	797,5721	240	1331,706
41	367,3491	91	539,3814	141	650,4221	191	798,5746	241	1609,333
42	375,214	92	546,3807	142	651,3798	192	801,5281	242	1610,338
43	400,3177	93	547,3379	143	654,3543	193	802,5277	243	1611,323
44	400,3844	94	547,3833	144	655,3576	194	817,4986	244	1614,29
45	401,3172	95	553,2766	145	656,3614	195	818,5034	245	1615,293
46	405,2738	96	553,3314	146	657,362	196	833,5023	246	1616,295
47	406,2791	97	554,3351	147	659,3096	197	840,5963	247	1627,368

Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z	Pik	m.z
48	407,2948	98	559,4027	148	660,3127	198	841,6006		
49	415,159	99	560,4079	149	661,3171	199	842,6033		
50	421,2509	100	562,3643	150	664,4041	200	861,5266		

Ek 2. KEGG Veri Bankası Sonuçları

Query.Mass	Matched. Compound	Matched.Form	Mass.Diff
1.340.889.273	C06103	M(C13)+H[1+]	0.000349167
1.730.839.892	CE2153	M-NH3+H[1+]	0.000424683
1.740.875.628	C03771	M+H[1+]	0.000286333
1.740.875.628	C05933	M-NH3+H[1+]	0.000186333
1.740.875.628	C02442	M+Na[1+]	0.001413667
1.740.875.628	C03711	M+Na[1+]	0.001413667
1.740.875.628	C00135	M+H2O+H[1+]	0.000186333
1.860.795.056	C00718	M+2H[2+]	0.001531867
1.860.795.056	C05796	M+2H[2+]	0.001531867
2.291.227.531	CE3481	M+2H[2+]	0.001630633
2.421.089.928	C02090	M+3H[3+]	0.000249667
2.711.633.405	CE1936	M+HCOONa[1+]	0.000543033
2.711.633.405	CE5820	M+H2O+H[1+]	0.000585815
2.901.328.888	C04540	M-HCOOH+H[1+]	0.001887667
2.911.328.849	C05118	M[1+]	0.0001849
2.911.328.849	C05119	M[1+]	0.0001849
3.170.948.729	C03221	M(C13)+3H[3+]	0.0023369
3.170.948.729	C02944	M(C13)+3H[3+]	0.0023369
3.170.948.729	C00831	M+K[1+]	0.002096433
3.670.381.959	C14864	M-NH3+H[1+]	0.002019433
3.670.381.959	C14865	M-NH3+H[1+]	0.002019433
3.673.490.691	CE2513	M(C13)+H[1+]	0.003563055
3.673.490.691	nrvnc	M(C13)+H[1+]	0.003563055
3.752.140.353	C16549	M(C13)+H[1+]	0.000841167
3.752.140.353	C16547	M(C13)+H[1+]	0.000841167
3.752.140.353	C00696	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	C04853	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	CE6466	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6467	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6465	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6462	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6463	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6460	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6461	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	C06315	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	C06314	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	C00584	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	CE6459	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6458	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6457	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6455	M[1+]	0.0031277

Query.Mass	Matched. Compound	Matched.Form	Mass.Diff
3.752.140.353	CE6454	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	CE6452	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	C04654	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	C04671	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	C01312	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	CE6456	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	C02198	M+Na[1+]	0.000241167
3.752.140.353	CE6464	M[1+]	0.0031277
3.752.140.353	C00427	M+Na[1+]	0.000241167
4.003.176.969	tmndnccrn	M-HCOOH+H[1+]	0.003388441
4.003.176.969	c226crn	M-C3H4O2+H[1+]	0.003348567
4.003.176.969	CE2890	M-HCOOH+H[1+]	0.003320433
4.283.230.032	CE7074	M(C13)+H[1+]	0.001058267
444.345.603	c226crn	M-CO+H[1+]	0.001542467
444.345.603	q10h2	M+H+Na[2+]	0.002465967
444.345.603	CE5986	M-H2O+H[1+]	0.001582469
444.345.603	CE5017	M+H+Na[2+]	0.002465967
4.492.995.999	CE7074	M+Na[1+]	0.003061567
4.493.023.928	CE7074	M+Na[1+]	0.000268667
4.503.063.012	CE2513	M+HCOOK[1+]	0.004230955
4.503.063.012	nrvnc	M+HCOOK[1+]	0.004230955
4.513.265.796	C05462	M(C13)+H[1+]	0.001786133
4.513.265.796	C05466	M(C13)+H[1+]	0.001803133
4.513.265.796	CE5560	M+H2O+H[1+]	0.002680709
4.652.773.087	CE7074	M+K[1+]	0.001147233
4.733.418.668	c226crn	M(C13)+H[1+]	0.003678667
4.733.418.668	C01628	M+Na[1+]	0.002798333
4.733.418.668	C02059	M+Na[1+]	0.002790333
4.752.303.591	CE2959	M[1+]	0.002834
4.752.303.591	CE5756	M[1+]	0.002834
4.752.303.591	C16543	M-CO2+H[1+]	0.003617367
4.752.303.591	retnglc	M[1+]	0.002834
4.873.765.538	tettet6crn	M-NH3+H[1+]	0.001681862
5.033.156.045	C06341	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C05458	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C05453	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	CE5530	M+HCOOK[1+]	0.002332033
5.033.156.045	C05501	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C15520	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C15518	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C05499	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.033.156.045	C05445	M+HCOOK[1+]	0.002328033
5.093.003.581	C04722	M+NaCl[1+]	1.84E-05

Query.Mass	Matched. Compound	Matched.Form	Mass.Diff
5.183.056.939	C05462	M+HCOONa[1+]	0.003099567
5.183.056.939	C05466	M+HCOONa[1+]	0.003082567
5.473.378.537	CE5840	M+HCOOK[1+]	0.00163286
5.473.378.537	CE5838	M+HCOOK[1+]	0.00163286
5.623.642.593	tettet6crn	M+NaCl[1+]	0.000923638
5.633.196.358	C05791	M-CO+H[1+]	0.003040667
5.764.289.471	CE5747	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5755	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5754	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5753	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5752	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5775	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.764.289.471	CE5776	M-NH3+H[1+]	0.003669856
5.784.348.767	nrvnccrn	M+HCOONa[1+]	0.004209154
5.903.531.644	CE4754	M-H2O+H[1+]	0.001079933
6.214.598.062	C15647	M-H4O2+H[1+]	0.004361346
6.513.798.227	C04884	M(C13)+2H[2+]	0.005856233
6.593.096.281	C05791	M+HCOONa[1+]	0.004551633
6.603.126.814	C03263	M[1+]	0.0032186
6.603.126.814	CE4993	M+H2O+H[1+]	0.003413067
6.603.126.814	CE6245	M+H2O+H[1+]	0.003413067
6.603.126.814	CE6241	M+H2O+H[1+]	0.003413067
6.603.126.814	CE6250	M+H2O+H[1+]	0.003413067
6.603.126.814	C05768	M[1+]	0.0032186
6.603.126.814	CE6236	M+H2O+H[1+]	0.003413067
6.613.171.316	C03263	M+H[1+]	0.006044867
6.613.171.316	C05768	M+H[1+]	0.006044867
6.654.876.055	C00416	M-H4O2+H[1+]	0.002776797
6.664.900.781	C01190	M+Na[1+]	0.001517367
6.983.622.462	CE2916	M-H2O+H[1+]	0.001097156

Ek 3. Turnitin Ekran Görüntüsü

Yasin Şenol YL Tez

ORİJİNALLİK RAPORU

%15	%14	%10	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	%1
3	Ozan KAPLAN, Mustafa ÇELEBİER. "Past, Present and Future of Metabolomic Studies", Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2020 Yayın	%1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
5	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	www.wjgnet.com İnternet Kaynağı	<%1
7	www.atamanchemicals.com İnternet Kaynağı	<%1
8	zfin.org İnternet Kaynağı	<%1

Ek 4. Turnitin Dijital Makbuz

turnitin

Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Yasin Şenol
Ödev başlığı:	Yasin Şenol YL Tez
Gönderi Başlığı:	Yasin Şenol YL Tez
Dosya adı:	Yasin_enol_Tez_revize.docx
Dosya boyutu:	4.35M
Sayfa sayısı:	140
Kelime sayısı:	22,245
Karakter sayısı:	159,817
Gönderim Tarihi:	23-Şub-2022 10:41ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1769004701

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOLE BAĞLI OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI TEDAVİSİNDE NANO-ENKAPSÜLE İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİN LC/Q-TOF MS İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN METABOLOMİK VE LİPİDOMİK ÇALIŞMALARLA İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Yasin ŞENOL

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2021

Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

8. ÖZGEÇMİŞ