

**SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK
ETKİ MEKANİZMASININ AYDINLATILMASINDA
BİYOENFORMATİK YAKLAŞIMLAR**

**BIOINFORMATIC APPROACHES TO ELUCIDATE THE
MECHANISM OF CYTOTOXIC ACTION OF
CYCLODEXTRIN NANOPARTICLES**

IŞIL VAROL

DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELEBİER

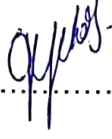
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

İŞİL VAROL'un hazırladığı "Siklodekstrin Nanopartiküllerin Sitotoksik Etki Mekanizmasının Aydınlatılmasında Biyoenformatik Yaklaşımlar" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

PROF. DR. GÜLBERK UÇAR
Başkan




.....

DOÇ. DR. MUSTAFA ÇELEBİER
Danışman



.....

PROF. DR. İNCİLAY SÜSLÜ
Üye




.....

DOÇ. DR. EMİRHAN NEMUTLU
Üye



.....

DOÇ. DR. İSMAİL MURAT PALABIYIK
Üye



.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA 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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 25/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

19 / 06 / 2018

Işıl VAROL

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/05/2018

IŞIL VAROL

ÖZET

SİKLODEKSTRİN NANOPARTİKÜLLERİN SİTOTOKSİK ETKİ MEKANİZMASININ AYDINLATILMASINDA BİYOENFORMATİK YAKLAŞIMLAR

Işıl VAROL

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Mayıs 2018, 86 sayfa

Bu tez çalışmasında amaç, daha önceden üretilmiş farklı kimyasal yapılara ve yüzey yüklerine sahip amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki mekanizmasının metabolomik çalışmalar sonucu gerçekleştirilecek farklı biyoenformatik yaklaşımlarla tespit edilmesidir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları, ilaç taşıyıcı sistem olarak önerilmiş siklodekstrin nanopartiküller ile işlem görmüş ve hücre çoğalmasını önleyici etkinin (antiproliferatif etki) en yüksek miktarda gözlemlendiği nanopartikül ve doz üzerinden çalışılmıştır. Çoğalmanın siklodekstrin nanopartikül ile önlemlendiği hücre hatları işlem görmüş hücre hatları olarak kullanılmış ve T grubu şeklinde isimlendirilmiştir. Hiçbir şekilde nanopartiküllerle işlem görmeden çoğalmanın önlenmediği grup ise kontrol grubu olarak kullanılmış ve C grubu şeklinde isimlendirilmiştir. T ve C gruplarından elde edilen hücreden arındırılmış lizat çözeltisinden sitozolik fraksiyonlar elde edilmiş ve bu fraksiyonların metabolit profillemesi amacıyla sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS) bazlı metabolomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Metabolit profillemeye sonucu herhangi bir şekilde kanser ilacı taşımayan siklodekstrin nanopartiküllerin etkisi ile çoğalmanın önlemlendiği gruplar (T grupları) ile kontrol grupları (C grupları) arasında metabolom düzeylerindeki değişimler karşılaştırılmıştır.

LC-MS yöntemiyle elde edilen ham verinin içerisinde metabolitlerin bulunarak profillenmesi (tanımlanması) ve T ile C grupları için miktarlarının karşılaştırılması ancak uygun yazılım ve veribankası desteği ile mümkündür. Bu amaçla farklı biyoenformatik yaklaşımlar denenmiş ve metabolit profillemede R programlama dili altında çalışan serbest erişimli bir platform olan XCMS'in CentWave ve MatchedFilter algoritmaları ile metabolitlere ait pikler tanımlanmaya çalışılmıştır. Bununla birlikte Human Metabolome Database (HMDB) ve Metlin Database veribankaları kullanılarak ortak bulunan metabolit pikleri birbiri ile karşılaştırılmıştır. Ham verilerin değerlendirilmesinde, XCMS Centwave algoritması ve MatchedFilter algoritmasının kesişim kümesi MetaboAnalyst ile ilişkilendirilmiştir.

Metabolit profilleme sonucu T ve C grupları için farklılaşan en yüksek miktarda metabolit teşhis edilmiştir. Elde edilen veriler siklodekstrin nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Siklodekstrin nanopartiküller, İlaç taşıyıcı sistemler, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS), Metabolomik, Biyoenformatik, XCMS, MatchedFilter, CentWave, HMDB, MetaboAnalyst.

ABSTRACT

BIOINFORMATIC APPROACHES TO ELUCIDATE THE MECHANISM OF CYTOTOXIC ACTION OF CYCLODEXTRIN NANOPARTICLES

Işıl VAROL

Master, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER

June 2018, 86 Pages

This thesis aims to determine the cytotoxic effect of previously manufactured cyclodextrin nanoparticles on cancer cells by metabolomic studies with different bioinformatic approaches.

MDA-MB-231 breast cancer cell lines are treated with cyclodextrin nanoparticles which have been proposed as drug delivery system and the research continued over the maximum amount observed nanoparticle which has the inhibitory effect (antiproliferative effect) on cell proliferation. Cell lines in which proliferation inhibited by cyclodextrin nanoparticles is used as treated cell lines and be referred as T set. The group without treatment in which the proliferation is not prevented by nanoparticles in any way is used as control group and is designated as the group C. The cytosolic fractions is obtained from the lysates solution purified from group T and group C and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) based metabolomics will be performed in order to metabolite profiling of these fractions. Based on metabolite profiling results, changes in metabolite levels is compared between the group T and the group C.

Metabolite profiling (identification) from the raw data obtained by the LC-MS method and their comparison is only possible with the support of appropriate software and data bank. For this purpose, different bioinformatics approaches

have been tried: The metabolites have been tried to be identified by CentWave and MatchedFilter algorithms of XCMS, a freely accessible platform which runs under R programming language in metabolite profiling. Besides, the number of identified metabolites is compared with each other using Human Metabolome Database (HMDB) and Metlin Database. During the processing of the raw data, the intersection set of the XCMS Centwave algorithm and MatchedFilter algorithm is associated with MetaboAnalyst.

As a result of metabolite profiling, the highest amount of metabolite is identified from the groups T and C. The resulting data is used to elucidate the mechanism of cytotoxic action of cyclodextrin nanoparticles on cancer cells by performing metabolic pathway analysis.

Keywords: Cyclodextrin nanoparticles, Drug delivery systems, High performance liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), Metabolomics, Bioinformatics, XCMS, MatchedFilter, CentWave, HMDB, MetaboAnalyst.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının gerçekleőtirilmesinde, değerli bilgilerini paylaőarak, kendisine ne zaman danıősam kıymetli zamanını ayırarak büyük bir sabır ve ilgiyle yol gösteren danışmanım sayın Doç. Dr. Mustafa ELEBİR'e, siklodekstrin nanopartiküllerin hazırlanmasında değerli katkıları için sayın Prof. Dr. Erem Bilensoy'a, hücre kültürü çalışmaları için sayın Doç. Dr. Ayşe Ercan'a, LC-MS çalıőmalarıyla katkı sağlayan sayın Uzm. Kim. Ozan Kaplan'a, 115S456 numaralı proje ile destek sağlayan TÜBİTAK'a, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, yoğun çalıőmalarım sırasında motivasyon desteği sağlayarak her zaman yanımda olan değerli arkadaőlarım Ayşe Aycan BAYHAN, Bensu CİHAN ve Osman KNDEYİ'ye, çok değerli annem Süreyya VAROL, babam Selahattin VAROL, kardeőim Gl VAROL'a iten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL BİLGİLER	4
2.1. Metabolomik	4
2.2. Metabolitler ve Metabolizma	7
2.3. Metabolitlerin Yapısal Çeşitliliği	9
2.3.1. Metabolitlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	11
2.3.2. Primer ve Sekonder Metabolizma	12
2.4. Bir Biyolojik Sistemdeki Metabolitlerin Sayısı	13
2.5. Kromatografi	15
2.5.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemleri	16
2.5.2. Kromatografi Parametreleri	18
2.6. Kütle Spektroskopisi	19
2.6.1. Kütle Spektrometre Cihazlarının Genel Yapısı	19
2.6.2. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF)	21
2.7. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği	22
2.7.1. XCMS ve MatchedFilter Algoritması	23
2.7.2. XCMS CentWave Algoritması	25
2.7.3. MetaboAnalyst	30
2.7.4. Reactome	30
2.8. Meme Kanseri (MDA-MB) Hücreleri	32
2.9. Siklodekstrin Nanopartiküller	36
2.10. Siklodekstrin Nanopartiküllerin Kanser Tedavisi Alanında Kullanımı	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar	40

3.1.4. LC-Q-TOF-MS Analizlerinde Uygulanan Metodoloji	42
4. DENEYSEL	45
4.1. Ham Veri Dosyası Hazırlanması	45
4.1.1. CentWave Algoritması.....	46
4.1.2. MatchedFilter Algoritması.....	48
4.2. CentWave ve MatchedFilter Algoritma Analiz Sonuçlarının Görüntülenmesi	50
5. SONUÇLAR	51
5.1. Filtrasyon ve Pik Tanımlama	51
5.2. Önerilen Metabolitler	58
5.2.1. CentWave ve MatchedFilter Pikleri için Önerilen Metabolitler	59
5.2.2. CentWave ve MatchedFilter Pikleri için Önerilen Ortak Metabolitler	66
5.2.3. İsonikotinamid	67
5.2.4. Niasinamid.....	68
5.2.5. 2-Asetilpirazin.....	69
5.2.6. Nikotinamid Adenin Dinükleotid.....	69
5.3. Metabolomik Verinin MetaboAnalyst Aracılığı ile Değerlendirilmesi	70
5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	78
6. KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	86

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.	16
Çizelge 2. 2. Metabolomik çalışmalarda kullanılan yazılımlar.....	23
Çizelge 3. 1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.....	41
Çizelge 3. 2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.	41
Çizelge 3. 3. LC-Q-TOF-MSparametreleri.....	43
Çizelge 5. 1. CentWave ve MatchedFilter ortak pikler.	52
Çizelge 5. 2. CentWave ve MatchedFilter pik şekillerine göre ortak pikler.	53
Çizelge 5. 3. CentWave ve MatchedFilter özet sonuçlar.	53
Çizelge 5. 4. Normalizasyon sonrası CentWave ve MatchedFilter özet sonuçlar.	57
Çizelge 5. 5. Normalizasyon sonrası CentWave ve MatchedFilter ortak pikler.....	58
Çizelge 5. 6. CentWave ve MatchedFilter M123T11 pikleri için önerilen metabolitler.....	59
Çizelge 5. 7. CentWave M218T1_3 ve MatchedFilter M218T1 pikleri için önerilen metabolitler.....	60
Çizelge 5. 8. CentWave M253T1 piki için önerilen metabolitler.....	61
Çizelge 5. 9. MatchedFilter M253T1 piki için önerilen metabolitler.....	62
Çizelge 5. 10. CentWave M428T11 piki için önerilen metabolitler.....	62
Çizelge 5. 11. MatchedFilter M428T11 piki için önerilen metabolitler.....	63
Çizelge 5. 12. CentWave M664T11 piki için önerilen metabolitler.....	63
Çizelge 5. 13. MatchedFilter M664T11 piki için önerilen metabolitler.....	64
Çizelge 5. 14. CentWave M214T5 piki için önerilen metabolitler.....	64
Çizelge 5. 15. MatchedFilter M214T5 piki için önerilen metabolitler.....	65
Çizelge 5. 16. CentWave ve MatchedFilter pikleri için önerilen ortak metabolitler	66
Çizelge 5. 17. M123T11 ve M664T11 pikleri için endojen metabolitler.....	67

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. Fonksiyonel genomik ve metabolomik teknikler.....	5
Şekil 2. 2. Örnek metabolik yolak [16].	8
Şekil 2. 3. Farklı kimyasal sınıflardan bir dizi metabolit.	10
Şekil 2. 4. Örnek fosfat metabolizma ağı [16].	15
Şekil 2. 5. HPLC cihaz şeması [28].	17
Şekil 2. 6. Kütle spektrometrelerinin genel şeması [28]......	20
Şekil 2. 7. Q-TOF/MS cihazların genel şematik gösterimi [28].	22
Şekil 2. 8. XCMS MatchedFilter çalışma algoritması.....	24
Şekil 2. 9. Örnek XCMS kromatogram çıktısı [28].	25
Şekil 2. 10. Centroid modda kaydedilmiş örnek ardışık kütle spektrumu [46]......	27
Şekil 2. 11. Örnek LC-MS numunesi için ROI saptama algoritması sonucu [46]. .	29
Şekil 2. 12. Örnek Reactome biyolojik görselleştirme [54]......	32
Şekil 2. 13. Duktal karsinoma in situ [56]......	34
Şekil 2. 14. İnvaziv duktal karsinoma [56].	35
Şekil 2. 15. İnvaziv lobüler karsinoma [56].	35
Şekil 2. 16. Siklodekstrinin yapısı.	36
Şekil 2. 17. α , β , γ siklodekstrinlerin kimyasal yapıları.....	37
Şekil 2. 18. Paclitaxel için pH duyarlı asetalatlı α -siklodekstrin nanopartikülat ilaç taşıyıcı sistem [61]......	37
Şekil 4. 1. XCMS arayüzü.	45
Şekil 4. 2. CentWave C grubu veri seti girişi.....	46
Şekil 4. 3. CentWave T grubu veri seti girişi.	47
Şekil 4. 4. CentWave algoritması için parametre girişi.	47
Şekil 4. 5. CentWave algoritması için iş girişi.	48
Şekil 4. 6. MatchedFilter algoritması için parametre girişi.	49
Şekil 4. 7. MatchedFilter algoritması için iş girişi.	49
Şekil 4. 8. CentWave ve MatchedFilter algoritmaları için analiz sonuçlarının görüntülenmesi.....	50
Şekil 5. 1. CentWave M123T11 ve MatchedFilter M123T11.....	54
Şekil 5. 2. CentWave M218T1_3 ve MatchedFilter M218T1.	54
Şekil 5. 3. CentWave M253T1 ve MatchedFilter M253T1.	55

Şekil 5. 4. CentWave M428T11 ve MatchedFilter M428T11.	55
Şekil 5. 5. CentWave M664T11 ve MatchedFilter M664T1.	55
Şekil 5. 6. CentWave M665T11_1 ve MatchedFilter M665T11.	56
Şekil 5. 7. CentWave M214T5 ve MatchedFilter M214T5.	58
Şekil 5. 8. Isonikotinamid.....	68
Şekil 5. 9. Niasinamid.....	68
Şekil 5. 10. 2-Asetilpirazin	69
Şekil 5. 11. Nikotinamid adenin dinükleotid	70
Şekil 5. 12. Excel formatında, değişen metabolitlere ait liste.....	71
Şekil 5. 13. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnalyst'e girilmesi 1. Basamak.	71
Şekil 5. 14. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnalyst'e girilmesi 2. Basamak.	72
Şekil 5. 15. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnalyst'e girilmesi 3. Basamak.	72
Şekil 5. 16. MetaboAnalyst değerlendirmesi sonucu ilgili metabolit m/z değerlerine karşılık gelen metabolit listesi.....	73
Şekil 5. 17. MetaboAnalyst ile moleküler yolak analizi yapılması.	73
Şekil 5. 18. KEGG metabolit kodlarının MetaboAnalyst'e yüklenmesi.....	74
Şekil 5. 19. KEGG metabolit kodları karşılığı eşleşen metabolitler.....	75
Şekil 5. 20. MetaboAnalyst değerlendirmesi sonucu etkilendiği görülen metabolik yolları gösteren ekran görüntüsü çıktısı.	76
Şekil 5. 21. Nikotinat ve nikotinamid metabolizması.	77
Şekil 5. 22. Pürin metabolizması	78
Şekil 5. 23. F1 kodlu siklodekstrin nanopartikülün MDA-MB-231 hücrelerine 1/16 oranında seyreltme ile tatbiki sonrası 24. ve 48. saatte elde edilen hücre görüntüleri.	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔG	Negatif Gibbs serbest enerjisi
k'	Alıkonma veya kapasite faktörü
m/z	kütle/yük
mz_{max}	En büyük kütle/yük
mz_{med}	Ortanca kütle/yük
mz_{min}	En küçük kütle/yük
μ	Kütle spektrometresinin kütle hassasiyeti
N	Eşdeğer teorik tabaka sayısı
p_{min}	Minimum kromatografik pik genişliği
ROI	İlgi alanları
R_s	Ayırıcılık çözücü ve kolon etkinliğinin ortak gösterimi
rt_{max}	En büyük alıkonma zamanı
rt_{med}	Ortanca alıkonma zamanı
rt_{min}	En küçük alıkonma zamanı
t_0	Hareketli fazın alıkonma zamanı
t_R	Analitin kolon içerisinde kalma süresi
W	Pikin zeminden %10 yükseklikteki genişliği

Kısaltmalar

APCI	Atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaştırma
APPI	Atmosfer basınçlı foto iyonlaştırma
ATP	Adenozin trifosfat
CE	Kapiler elektroforez
CE-MS	Kapiler elektroforez-kütle spektrometrisi
CPU	Merkezi İşlem Birimi
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
EI	Elektron çarpışması

ESCI	Elektrosprey kimyasal iyonlaştırma
ESI	Elektrosprey iyonizasyonu
FWHM	Pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği
GC	Gaz kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GHz	Gigahertz
HILIC	Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi
HMDB	Human Metabolome Database
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LC	Sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
MDA-MB	M.D. Anderson metastaz meme kanseri
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle spektrometrisi
MS QC	Kütle spektrometrisi kalite kontrol
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PCA	Temel bileşenler analizi
PLS-DA	Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi
Q-TOF/MS	Kuadropol-uçuş zamanlı kütle spektrometresi
TOF	Uçuş zamanlı analizör
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi

1.GİRİŞ

Amfifilik siklodekstrinler nanokürecik veya nanokapsül gibi kendiliğinden nanopartikül oluşturabilen moleküllerdir. Bu özellikleri, siklodekstrinlerin nano ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Siklodekstrin nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak önerilmesiyle ilgili ilk çalışmalar 90'lı senelerin ikinci yarısında başlamıştır. Kanser ilaçlarının siklodekstrin nanopartiküllerle taşınmasına yönelik çalışmalar ise son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan siklodekstrin nanopartiküllerin kendi başlarına da kanser hücreleri üzerinde çoğalmayı önleyici (antiproliferatif) etkileri bulunmaktadır. Ancak bu etki mekanizmasının hangi metabolik yolak üzerinden meydana geldiği kaynaklarda tam olarak açıklanmamıştır [1-2]. Bu tez çalışmasında siktodekstrin nanopartiküllerin sitotoksik etki mekanizmasının aydınlatılması için metabolomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla amfifilik siklodekstrinler MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine uygulanmış ve siklodekstrin uygulanmayan grup kontrol grubu olarak seçilmiştir. Kontrol (C) grubu ve siklodekstrin uygulanmış (T) grup arasında metabolom düzeyinde meydana gelen değişiklikler incelenerek siklodekstrinlerin moleküler düzeyde kansere karşı çoğalmayı önleyici etkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Gerçekleştirilen metabolomik çalışmalar sonrası farklı biyoenformatik yaklaşımlar denenerek siklodekstrinlerin etkisi sonucu metabolom düzeyinde meydana gelen değişikliğin en optimum şekilde yani en fazla metabolit taranarak bulunması amaçlanmıştır. Günümüzde metabolomik çalışmalarda veri değerlendirilmesi ile ilgili tek ve standardize edilmiş bir evrensel yöntem henüz bulunamamıştır. Kullanılan analitik teknikten, deney koşullarından, numune hazırlama koşullarından ve en önemlisi veri işleme ve tarama koşullarından dahi, bulunan ve değişim gözlenen metabolitlerin sayısı anlamlı derecede etkilenmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, siklodekstrin nanopartiküllerin çoğalmayı önleyici etki mekanizması anlaşılmasına çalışılırken ayrıca biyoenformatik açıdan farklı teknikler de birbiri ile karşılaştırılmıştır.

Metabolitler, hücre içerisindeki metabolik yollardaki biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir. Peptit, oligonükleotid, şeker, nükleozid, organik asit, keton, aldehit, amin, amino asit, lipid, steroit ve alkaloid gibi moleküller birer metabolittir [3].

Belirli bir zaman aralığında hücre, doku ve fizyolojik sıvılarda işleyişi olan metabolitlerin yüksek hassasiyetli analitik teknikler kullanılarak tespit edilmesi, tanımlanması ve miktarının belirlenmesine metabolomik denir. Metabolit seviyesi, hücresel fonksiyonun bütünsel şekilde bilgisini temsil ederek kalıtsal veya çevresel değişikliklere yanıt olarak bir hücre veya dokunun fenotipini tanımlar. Kalıtsal ve çevresel etkenlerin canlının dış görünüşündeki yansımalarına fenotip adı verilir. Klinik fenotipin bilgisi hücredeki metabolitlerde saklıdır. Transkriptom ve proteoma benzer olarak metabolom da hücresel fonksiyonlara bağımlıdır; ancak mRNA ve proteinlerin tersine genler ile metabolitler arasında doğrudan bağlantı kurulması mümkün değildir [3].

Genomik, transkriptomik, ve proteomik yüksek verimli analiz yöntemlerinin halen hızlı bir gelişme halinde ve mevcutta kullanımda olmalarına karşın metabolomik yaklaşımlara ait analiz metodları halen daha az yaygındır ve mevcut durumda metabolomun analizini sağlayan tek ve temel bir yöntem bulunmamaktadır [4].

Tıbbi teşhise yönelik metabolit çalışmaları uzun süredir uygulanmaktadır; ancak tedavi ve tedavi sürecinin incelenmesi amacıyla çok sayıda hücre içi metabolitin taranması için yöntemler geliştirilmesine yönelik çalışmalar yeni yeni artmaktadır [5].

Metabolit profilleme çalışmaları için LC-MS adı verilen yöntem ile elde edilen verinin önce enformatik destekli bir analizden geçirilmesi, zaman kaybını ve olası hataları en aza indirmektedir. Bu amaçla çeşitli yazılımlar bulunmaktadır. Metabolit profilleme çalışmalarının yazılım-veribankası desteği kullanılmadan ve uygun bir biyoenformatik yaklaşımdan yararlanılmadan yapılamayacağı gerçeği ortadadır [6].

Profilleme çalışmalarında yüzlerce metabolitin kütle değerlerinin tek tek taranması zaman ve iş gücünün verimsiz kullanılmasına sebep olmaktadır. Öte yandan, metabolitlerle ilgili klinik bilgi, yayın ve bu metabolitlerin dahil olduğu metabolik yollarla ilgili bilgilere tek kaynak üzerinden ulaşılabilmesi, veribankalarının kullanımını avantajlı hale getirmektedir [7].

Metabolomik veribankaları genel olarak; metabolik yolak veribankaları, karşılaştırmalı metabolomik veribankaları, kimyasal özellikler ve spesifik kimyasallara ait veribankaları, spektral veribankaları, ilaç ve metabolitleri

veribankaları olarak ayrılrsa da çoğu veribankası birden fazla amaca hizmet ettiğinden bu gruptandırma çoğu veribankası için iç içe durumdadır [8].

Dolayısıyla LC-MS bazlı metabolit profillemeye çalışmalarında tek bir doğru yol bulunmamaktadır. Her bir veri işleme yazılımı ve her bir veribankasının birbirine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. İki farklı grup için dışarıdan etki ile farklılaştırılan metabolitlerin ve miktarlarının bulunmasında farklı biyoenformatik yaklaşımlar ile en yüksek sayıda farklılaşan metabolitin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır [8].

2.KURAMSAL BİLGİLER

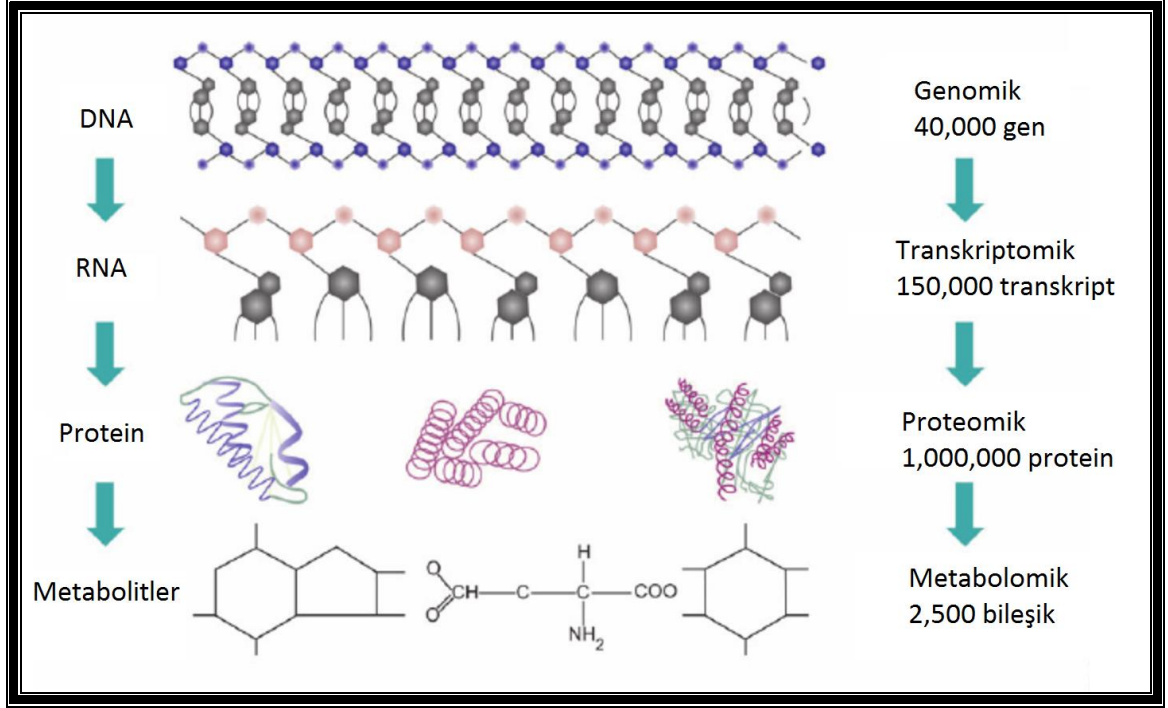
2.1. Metabolomik

Biyokimyasal reaksiyonların ara ürünü olan metabolitler, canlı bir hücre içinde çalışan birçok farklı yolağın birbirine bağlanmasında ve işleminde önemli rol oynamaktadır. Metabolit seviyesi, hücresel fonksiyonun bütünsel şekilde bilgisini temsil ederek genetik veya çevresel değişikliklere yanıt olarak bir hücre veya dokunun fenotipini tanımlar. Hücresel işlevin moleküler seviyede analizi, birkaç farklı analitik tekniğin birlikte kullanılmasını gerektirir. Transkripsiyonel düzeyde (transkriptom) ve translasyonel düzeyde (proteom) kapsamlı analiz yöntemleri halen hızlı bir gelişme halindedir ve yüksek verimli analitik yöntemler halihazırda kullanılmaktadır; ancak metabolomik yaklaşımların detaylı analiz yöntemlerine günümüzde daha az rastlanmaktadır ve şu anda metabolomun analizini sağlayan tek ve evrensel bir yöntem bulunmamaktadır. Metabolit profillemesi, tıbbi teşhis amaçlı olduğu kadar fenotip karakterizasyonu için de uzun süredir uygulanmıştır. Ancak; yakın geçmişe kadar tıbbi teşhis, tedavi ve tedavi sürecinin incelenmesi amacıyla çok sayıda hücre içi metabolitin taranması için yöntemler geliştirilmesi yönünde çaba gösterilmemiştir [9].

Metabolom analizi, farklı analitik teknikler kullanarak 3000 Da'dan düşük molekül kütlesi olan tüm hücre içi ve dışı metabolitlerin tanımlanması ve nicelenmesini kapsar. Her metabolitin seviyesi; hücrenin, dokunun veya organizmanın fizyolojik, gelişimsel ve patolojik durumuna bağlıdır. Bununla birlikte, önemli bir fark da, mRNA ve proteinlerin tersine genler ile metabolitler arasında doğrudan bağlantı kurulması mümkün olmamasıdır. Aynı metabolitin birçok farklı yoldan katıldığı hücre metabolizmasının karmaşık doğası, metabolit verilerinin yorumlanmasını zorlaştırır [10].

Genom, transkriptom ve proteom yapısı, genom ve transkriptom için dört farklı nükleotidin veya proteom için 22 amino asitten oluşan molekülerin kimyasal analizlerine dayanır. Metabolom içerisinde, metabolitlerin kimyasal yapılarında ve özelliklerinde büyük bir farklılık vardır. Dolayısıyla metabolom, hidrofilik karbonhidratlardan iyonik inorganik türlere, ketonlardan uçucu alkollere, hidrofobik lipitlerden amino ve nonamino organik asitlere kadar kompleks doğal ürünlerden oluşan çok çeşitli kimyasal bileşiklerden oluşur. Bu karmaşıklık, aynı anda tüm metabolomun tam anlamıyla belirlenmesini neredeyse imkansız hale getirir [10].

Şekil 2.1.'de fonksiyonel genomik ve metabolomik teknikler arasında bilgi akışını gösteren şematik diyagram verilmiştir.



Şekil 2. 1. Fonksiyonel genomik ve metabolomik teknikler.

Metabolomun analizi için tek bir analitik yöntem olmadığından, metabolomik alanlarında sıklıkla farklı terimler kullanılır. Metabolom teriminin, belirli bir biyolojik sistemin metabolizmasında kullanabileceği veya oluşturduğu metabolitlerin toplamını tanımladığı konusunda genel bir görüş birliği vardır. Metabolom, çoğunlukla ekzometabolom ve endometabolom'a ayrılır; buradaki ekzo, hücrenin dışındaki metabolitleri temsil eder ve ikincisi, hücre içi metabolitleri temsil eder. Ekzo ve endometabolom arasındaki bu ayırım, hücreleri hücre dışı ortamdaki ayırmanın kolay olduğu mikrobik sistemler için oldukça yararlı olsa da, hücreleri komple dokudan izole etmenin zor olabileceği çok hücreli sistemler için daha az faydalıdır. Bununla birlikte, bu ikisinin ayırt edilmesi kavramsal olarak önemlidir; çünkü ekzometabolom, endometabolomdan çok daha farklı fizyolojik bir rol oynamaktadır [11].

Metabolomun bir bölümünün analizini tanımlamak için sıklıkla kullanılan iki terim, metabolit profillemesi ve metabolik parmak izi yöntemidir. Bu iki terim, açık bir ayırım yapılmaksızın eşanlamlı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tanımlara göre,

metabolit profillemesi belirli bir metabolit seti; örneğin bir amino ve organik asit kümesinin analizi iken, metabolik parmak izi bir numunenin spesifik bir analizi; örneğin kütle spektrometresi ile elde edilen bir kütle pik aralığıdır. Birincisi doğrudan fizyolojik bilgi sağlayarak verileri metabolik modellerle bütünleştirebilirken ikincisi, yalnızca küme analizi kullanarak farklı numunelerin gruplanması için kullanılabilen bir bilgi sağlar. Metabolik ayak izi terimi, mikrobiyal kültürlerdeki ekzometabolomun analizini tanımlamak için sunulmuştur. Ayak izi terimi, besin maddelerini alıp büyüme süreciyle bağlantılı olarak metabolitleri salgılayan, mikrobiyal hücrelerin hücre dışı ortamda ayak izi bıraktığını gösterir [12].

Metabolik parmak izi (veya ayak izi), spesifik metabolitlerin seviyeleri hakkında bilgi veremese de, bu analiz teknikleri mutantların (veya büyüme koşullarının) sınıflandırılması için kullanılabilir. Bununla birlikte, bu tür verileri diğer veri türleriyle (örneğin, transkriptomu verileri) bütünleştirmek zordur ve işlevsel genomikte kullanılabilir olsa da niceliksel verilerin gerekli olduğu sistem biyolojisinde daha az faydalıdır.

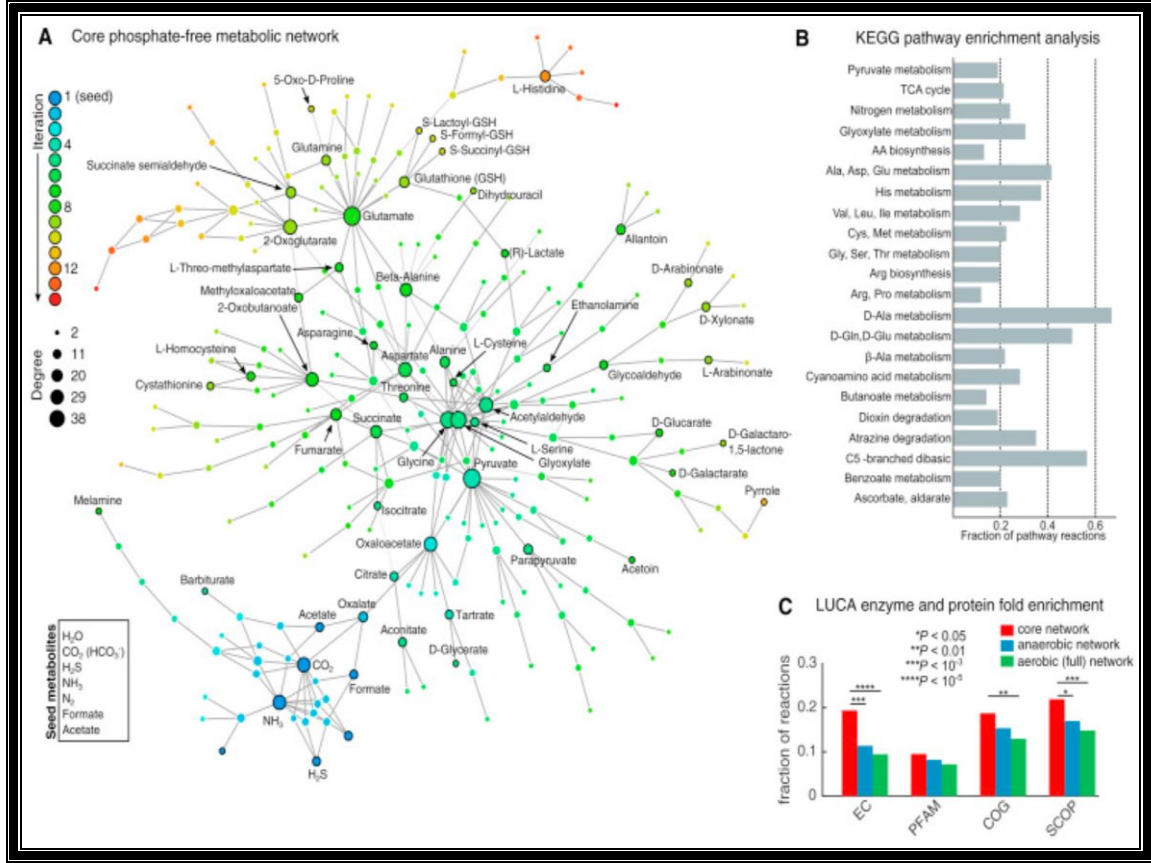
Metabolomik analizlerde en çok kullanılan metotlar kütle spektrometresi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR)'dır. Özellikle NMR, bilinmeyen bileşiklerin yapı karakterizasyonu için çok yararlıdır ve biyolojik sıvılardaki ve hücre ekstraktlarındaki metabolitlerin analizi için uygulanmıştır. ¹³C NMR spektroskopisi nispeten düşük hassasiyete sahiptir. Buna ek olarak, ¹³C NMR analizi, düşük duyarlılığının bir sonucu olarak tek bir numune için birkaç saat sürebilir ve teçhizat maliyetleri, MS tabanlı tekniklerle karşılaştırıldığında çok daha yüksektir [10].

MS'in en önemli avantajları, karmaşık biyolojik numunelerde bulunan bileşenlerin kimliğini teyit etme imkanı ile birlikte yüksek duyarlılık ve yüksek verim ile bunların çoğunun tespit edilmesini sağlamasıdır. Dahası, MS ile ayırma teknikleri (örneğin kromatografi) kombinasyonu, son derece kompleks biyolojik numunelerin kimyasal analiz kapasitesini muazzam bir biçimde genişletmektedir. Kütle spektrumlarının temel bilgileri basittir ve karakterizedir. Spektrum, iyonize edilmiş molekülün ve parçalarının kütlelerini gösterir ve bu kütleler sadece bileşen atomlarının kütlelerinin toplamıdır. Bununla birlikte, kütle spektrumlarını tanımlamak nispeten basittir ve kütle spektrometri verisinin yorumlanmasını kolay hale getiren birkaç mevcut yazılım uygulaması vardır [10].

2.2. Metabolitler ve Metabolizma

Tüm yaşayan hücreler, küçük kimyasal bileşiklerin daha düşük serbest enerji içeriğine sahip başka bir kimyasal bileşik grubuna dönüştürülmesiyle büyüme ve bakım için gerekli enerji ve yapı bloklarını üretir. Kimyasalların bu dönüşümü birçok kimyasal ara maddeyle çok sayıda kimyasal reaksiyon içerir, bu reaksiyonların tamamına metabolizma denir ve metabolizmaya katılan kimyasallara metabolit denir. Yaşam süreçlerinin karmaşıklığı, metabolizmaya katılan metabolitlerin sayısının oldukça yüksek olmasını gerektirir. Böylece, herhangi bir canlı hücrede, hücre için karbon ve enerji kaynağı önce öncül metabolitler olarak adlandırılan bir kümeye dönüştürülür ve bu öncül metabolitler daha sonra biyokütle sentezi için yapı taşları ve diğer metabolitleri oluşturan metabolitlere dönüştürülür [15]. Metabolitlerin özellikleri ve doğal çevre içinde etkileşimde bulunduğu işlevleri yaşamın kimyasını belirler. Metabolitler, canlı hücrelerde doğal olarak bulunan enzim tarafından katalize edilen reaksiyonların ürünleridir. Her şeyden önce, bir metabolit, örneğin, hücrenin altyapısına veya enerji gereksinimine katkıda bulunarak, hücrelerin bakımı ve hayatta kalması bakımından vazgeçilmez bir işlev yerine getirmek amacıyla hücre tarafından sentezlenir. Doğrudan bir biyolojik fonksiyonu yerine getirmese, yapısal bir modifikasyondan sonra, biyolojik açıdan aktif bir bileşiğe dönüşme için bir habercilik görevi görür. Bir metabolitin bir diğer önemli özelliği de kimyasal tepkimeler vasıtasıyla özelliklerini değiştirecek olan enzimler tarafından tanınması ve bunlarla harekete geçmesidir [10].

Bir canlı hücredeki birçok farklı reaksiyon, normal olarak, hücre içinde koordine edilmiş bir işleve hizmet eden bir dizi reaksiyona göre düzenlenir. Bu tür reaksiyonlara yolak denir ve yolaklar ara maddeler olarak değişen çok sayıda metabolit içerebilir. Ana bileşik, örneğin su ve/veya karbondioksit oluşumuna neden olabilecek oksidasyon reaksiyonları sırasında sistematik bozunmaya maruz kalırsa daha küçük metabolitler üretilir. Bununla birlikte bu süreçte hücre, ana metabolitteki ve diğer metabolitlerdeki serbest enerjinin büyük kısmını yakalamaktadır [10]. Şekil 2.2.'de reaksiyonların açıkça gösterilmeyen sonuç ağının basitleştirilmiş bir görünümünü ve genişlemeden sorumlu olan reaksiyonlar yoluyla birbirlerine dönüştürüldüğünde metabolitlerin bağlantılı olduğunu gösteren örnek diyagram verilmiştir.



Şekil 2. 2. Örnek metabolik yolak [16].

Metabolitlerin önemli bir özelliği, sonlu yarılanma ömrüne sahip olmalarıdır. Bu da, hücrenin sürekli alması, üretmesi, bozunması veya atması anlamına gelir. Son olarak, pek çok metabolit, kendinin ve diğer metabolitlerin dönüşüm hızını kontrol etmek için etkileşim yollarındaki karbon akışının düzenleyicileri olarak hizmet edebilir [17-18].

Yukarıda tarif edildiği gibi, metabolitler, canlı bir hücre içindeki kimyasal reaksiyonlarda sürekli olarak transforme olan ve değiştirilen moleküllerdir. Bu reaksiyonlara yolak denir ve tüm yolakların toplamına metabolizma denir. Genel olarak, metabolizma kavramını tanımlamak için birkaç önemli nokta özetlenebilir:

- (i) Yaşamın tüm kimyasal reaksiyonları, organize edilmiş ve bir metabolik yol ağına bağlanmıştır.
- (ii) Metabolizma, canlı hücreye sürekli kaynak sağlanması amacıyla muhafaza edilir ve düzenlenir, dolayısıyla hücrenin hayatta kalabilmesi için çevreye oldukça bağımlıdır.

(iii) Hücrelerin serbest enerjisi, bazı metabolitlerin içerisinde depolanırken, diğer metabolitler hücrenin yapısal bileşenleri ile bağlanır.

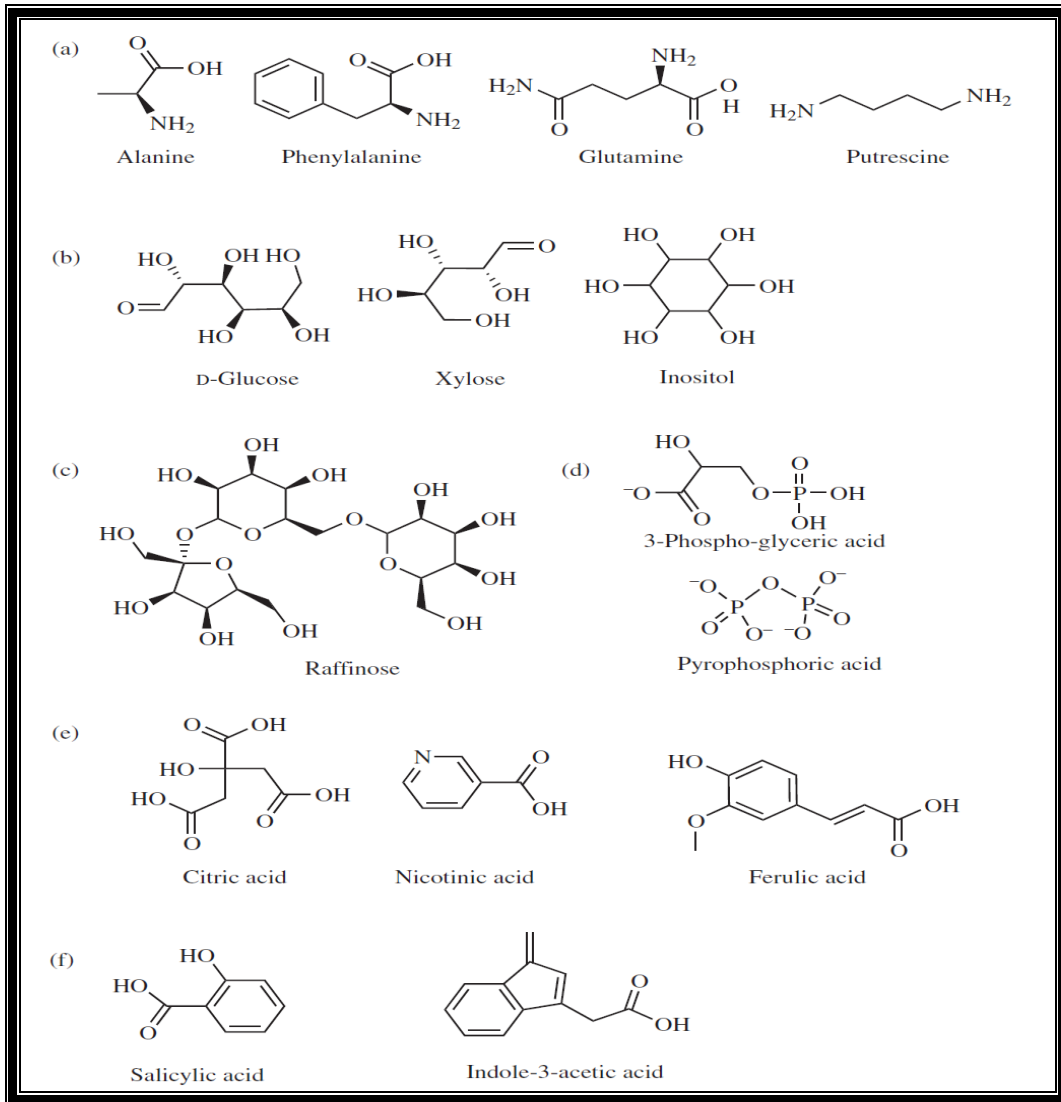
(iv) Metabolik reaksiyonlar, metabolitlerin bir takım spesifik kontrol mekanizmaları tarafından etkilenir.

(v) Metabolizma, merkezi (veya birincil) metabolizma ve sekonder metabolizmaya ayrılabilir. Merkezi metabolizma, öncelikli olarak, hücre içindeki temel yapıların enerji ve üretimiyle ilgilidir. Merkezi metabolizma türler arasında pek çok benzerliği paylaşır ve merkezi metabolizmanın çoğunun metabolitleri doğada yaygındır. İkincil metabolizma, çok daha özel metabolitlerin üretimi ile ilgilidir. Bazıları tek bir türe özgüdür. Bu metabolitler genelde bilinmeyen bir fonksiyon olup, savunma ve çok hücreli bir çevrede (organizma) işlev veya sağ kalımı artıran diğer amaçlar için sinyal bileşeni gibi davranabilirler.

(vi) Metabolizma anabolik ve katabolik metabolik reaksiyonlara ayrılabilir. Anabolizma, kompleks moleküllerin basit bileşiklerden enerji depolamak için sentezlenmesi anlamına gelirken, enerji salınması için kompleks moleküllerin bozunmasına katabolizma denir. Genelde, anabolik reaksiyonlar enerji gerektirirken, katabolik reaksiyonlar enerjiyi serbest bırakır. Metabolik enerji yakalama, büyük ölçüde, ATP, NADH veya NADPH, biyolojik iş için enerji sağlamak üzere tasarlanan en önemli moleküllerin sentezi yoluyla oluşur [19].

2.3. Metabolitlerin Yapısal Çeşitliliği

Her metabolit, fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirleyen kendi kimyasal yapısı ile karakterizedir. Bu nedenle, her metabolit benzersizdir ve özellikleri spesifiktir. Metabolik bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde olan bu büyük çeşitlilik, bir metabolomik yaklaşım içinde metabolitlerin doğru ve kapsamlı ölçümünü sağlayan çeşitli prosedürler gerektirir [20]. Şekil 2.3.'de amino asit ve aminler (a), monosakkaritler (b), trisakkarit (c), çok küçük fosforlanmış önemli bileşikler (d), birincil ve ikincil organik asitler (e), fitohormonlar (f) gibi farklı metabolitlerin ve bunların kimyasal yapılarının bir örneği sunmaktadır.



Şekil 2. 3. Farklı kimyasal sınıflardan bir dizi metabolit.

2.3.1. Metabolitlerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Her metabolitin davranışını belirleyen ve aynı zamanda analiz edilebilme kabiliyetini belirleyen çok çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere neden olan bir dizi hedef vardır [21].

(i) Moleküler ağırlık - Molekül ağırlığı, molekülü oluşturan tüm atomların ağırlıklarının toplamı ile hesaplanır. Metabolitler, proteinler veya nişasta gibi polimerlere kıyasla küçük molekül ağırlıklı bileşiklerdir [10].

(ii) Moleküler boyut - Bir molekülün molekül boyutu, özel hacmi ve üç boyutlu yapısıyla temsil edilir [10].

(iii) Polarite - Bir molekülün polaritesi, bir bileşiğin fiziksel bir özelliğidir ve metabolomik bağlamda, su molekülleri ve diğer polar bileşikler ile polar etkileşimler (özellikle hidrojen bağlarında kovalent olmayan bağlar) oluşturma kabiliyeti ile ilgilidir. Erime ve kaynama noktaları, çözünürlük ve farklı moleküller arasındaki etkileşimler gibi diğer fiziksel özelliklerle ilgilidir. Çoğu durumda, bir molekülün polaritesi ile molekülde bulunan polar veya apolar olmayan kovalent bağların sayıları ve türleri arasında yakın bir ilişki vardır. Genel olarak, bazı istisnalar dışında, bir bağ içindeki atomlar arasındaki elektronegatiflik farklılıkları ne kadar yüksek olursa, bağ o kadar çok polardır [10].

(iv) Uçuculuk - Bir bileşiğin uçuculuğu, kaynama veya erime noktasına, yani katı veya sıvı halden gaz haline değişen sıcaklığına bağlıdır. Yukarıda tarif edildiği gibi, bir bileşiğin polaritesi ve kaynama noktası arasında ve dolayısıyla molekülün polaritesi ve volatilitesi arasında güçlü bir korelasyon vardır: Daha büyük polarite, daha az değişkenlik anlamına gelir [10].

(v) Çözünürlük - Bir çözeltinin çözünürlüğü, belirli bir sıcaklıkta belirli bir miktarda çözücü veya çözeltide çözünebilen maksimum çözünen miktardır. Bu özellik çoğunlukla polarite, pKa, sıcaklık, çözücü ve hacimle ilgilidir. Çözünürlüğü etkileyen birkaç önemli faktör vardır. İlk olarak, çözünen maddenin ve çözücünün doğası, çözünürlüğü belirleyen ana faktördür. Bu, bir çözücü molekülünün pozitif ucu bir çözünen molekülün negatif ucuna yaklaştığında olur. Polar çözücüler genellikle iyonik olan çözeltileri çözebilir. İkinci olarak, çözünen parçacıkların boyutu çözünen maddenin çözünürlüğünü ve oranını etkiler. Çözünmüş parçacıkların toplam yüzey alanı arttıkça, çözünen madde daha çabuk çözülür.

Çözünen maddenin daha küçük parçalara bölünmesi yüzey alanını ve dolayısıyla çözüm hızını artırır. Bu nedenle, bir hücrenin çok küçük parçalara ayrılması birçok metabolik bileşiğin çözünürlüğünü artıracaktır. Üçüncü olarak, çözeltinin sıcaklığındaki bir artış katı bir çözünen maddenin genellikle çözünürlüğünü artırır; ancak, gazlar için çözelti sıcaklığı arttıkça çözünürlük düşer. Dördüncüsü, basınçtaki değişiklikler gaz halindeki çözünenlerin çözünürlüğü üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Basıncın artması çözünürlüğü artırır ve basıncın düşürülmesi çözünürlüğü azaltır [10].

(vi) pKa, birçok metaboliti tanımlamak için önemli bir parametredir. pKa, hangi pH'da asidik veya alkalik fonksiyonel grubun protonlanacağını ve hangi pH'da protonlanmayacağını açıklar. Dolayısıyla pKa değerinin üstünde veya altında, metabolitler iyonlaşmış veya nötr olabilir [10].

(vii) Kararlılık - Bir kimyasalın kararlılığı, iç veya dış reaksiyonlara bağlı kimyasal reaksiyonlara, değişikliklere veya bozulmaya karşı dirençle tanımlanır. Kararlılığı etkileyen iki faktör vardır: Termodinamik ve kinetik. Termodinamik olarak kararsız (veya enerjik olarak dengesiz) olan bir madde, daha negatif Gibbs serbest enerjisine (ΔG) sahiptir. Bir maddenin reaksiyona girmesi için gereken süre, kinetik kararlılığının bir ölçüsüdür. Reaksiyon ne kadar yavaşsa, kinetik kararlılık o kadar büyük olur. Bu, metabolit analizi açısından özellikle önemlidir. Birçok metabolik bileşik, özellikle hücresel ortamlarından çıkarıldığında son derece kararsızdır. Bu nedenle, termodinamik ve kinetik kararlılığı arttırmak için doğru koşullar ekstraksiyon işleminde seçilmelidir. Birçok metabolik bileşik, daha yüksek sıcaklığa maruz kaldığında bozunur; oda sıcaklığı bile olabilir. Kararlılığı etkileyen diğer bir faktör de çok fazla ışığın neden olduğu ışık etkisiyle zamanla bozunmadır (fotodegradasyon). Son olarak, bazı bileşikler oksidatif veya indirgeyici koşullara duyarlıdır. Bu nedenle, hücresel bileşiklerin ekstraksiyonu için doğru koşullar ve herhangi bir analitik yöntem için numune hazırlığı dikkatli seçilmelidir [10].

2.3.2. Primer ve Sekonder Metabolizma

Canlı bir organizmadaki bileşikler birincil ve ikincil metabolitlere ayrılır. Birincil metabolitler genelde tüm canlı organizmalar içinde dağılır ve temel yaşam süreçleriyle yakından bağlantılıdır. Şekerler, amino asitler veya organik asitler gibi her yerde bulunan bileşikler içerir. Bunlar, glikoliz, solunum veya fotosentez gibi birincil metabolik süreçler tarafından üretilir. Ek olarak, evrensel yapı taşları ve

proteinler, nükleik asitler veya polisakaritler gibi enerji kaynakları, bir organizmadan diğerine yapısal ayrıntıda farklı olmasına rağmen birincil metabolizmaya aittir. Buna karşılık, sekonder metabolitler yalnızca dağılımları sınırlandırır ve genellikle bireysel organizmaların ve türlerin spesifik bir özelliğidir. Genel olarak, birincil metabolitlerin her hücredeki beslenme ve gerekli metabolik süreçlere katıldığı söylenebilir. Aksine, ikincil metabolitler doğrudan büyümeye ve gelişmeye katılmazlar ve bu nedenle, organizmalar için önemli oldukları halde, organizmalar ile çevreleri arasındaki ekolojik etkileşimler için yaşamsal öneme sahip değildirler. İkincil metabolitler, birincil metabolik yollardan türetilen ve muazzam bir kimyasal çeşitlilik ile karakterize edilen yollarla üretilir. Bu çeşitliliğe rağmen, ikincil metabolitler esasen az sayıda temel birincil metabolitten sentezlenir [22].

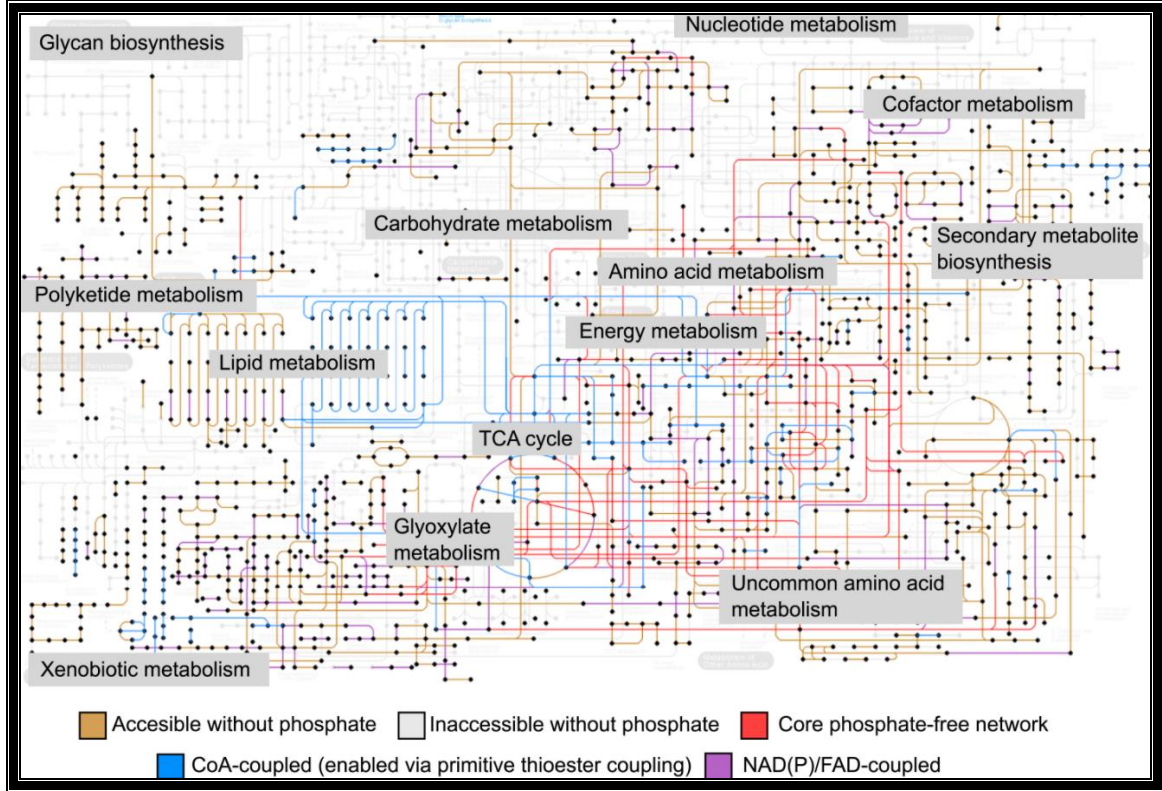
2.4. Bir Biyolojik Sistemdeki Metabolitlerin Sayısı

Bir biyolojik sistemdeki metabolit sayısını tahmin etmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Metabolomun boyutu, incelenen organizmaya bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Birçok farklı türün tam genom dizilerinin tamamlanması, metabolit sayısının tahmin edilmesini sağlamıştır; ancak dizilenmiş genomlarda eksiksiz gen açıklamaları bulunmaması nedeniyle olası tüm metabolik reaksiyonlar tahmin edilememektedir. Örneğin; ökaryotik organizma olan *Saccharomyces Cerevisiae* modeli için şu ana kadar sadece yaklaşık %70 araştırma yapılmış ve 6000'den fazla gen içerdiği bulunmuştur. Bu nedenle fonksiyonu bilinmeyen yaklaşık 2000 gen mevcuttur [23].

Genel olarak, bir hücrede olası metabolitlerin sayısının, bir hücredeki tüm genlerin ve proteinlerin sayısından düşük olduğu belirtilmiştir. Bu varsayımın çeşitli sebepleri vardır. Birincisi; genler, transkriptler ve proteinler arasında doğrudan bağlantı olmadığı gibi bir gen ve bir kimyasal reaksiyon arasında bire bir ilişki yoktur. İkincisi; pek çok metabolit birkaç yola katılır ve bu nedenle yine farklı gen tarafından kodlanan farklı enzimlere etki eder. Üçüncüsü; bazı daha karmaşık metabolitler, özellikle de sekonder metabolitler, çoğunlukla büyük enzim kompleksleri tarafından üretilmeleri için birçok gen gerektirirler. Poliketidlerde, büyük enzim komplekslerinde bir araya getirilen, katlanmış ve modifiye edilmiş uzun asetil grup zincirlerinden sentezlenen bir örnek bulunur. Bu enzimler, farklı genlerle kodlanmış birden fazla protein zinciri içeren oligomerik komplekslerdir.

Kompleksler, kovalent olmayan bağlarla veya birkaç farklı protein molekülünün statik veya geçici birleşmesiyle oluşur. Çoğu durumda, bu protein kompleksleri sadece çok spesifik reaksiyonlar için sorumludur ve bu nedenle yalnızca iki metabolik molekül, substrat ve ürün içerebilir [19].

Pek çok bakteri ve ayrıca fırın mayası gibi bazı ökaryotlarda ayrıntılı geniş genom analizleri, bu nispeten basit hücresel organizmaların gerçek karmaşıklığı hakkında daha fazla bilgi edinmek açısından büyük ilerleme kaydetmiştir. Örneğin; *E. coli* bakterisinde yaklaşık 4400 gen vardır ve sadece 442 metabolik bileşik üretildiği tahmin edilmektedir [24], ökaryot *Saccharomyces Cerevisiae*'nin, yaklaşık 6200 gen içerdiği ve 700'den biraz fazla metabolit içerdiği tahmin edilmektedir [23]. Bu iki nispeten basit organizmadaki metabolitlerin çoğu, enerji dönüşümü, hücre yaşam döngüsü ve üreme için merkezi metabolizma ile ilgilidir. Bu organizmaların hiçbiri daha karmaşık metabolitler üretmemekte ve nispeten daha az sayıda ikincil metabolit üretmektedir. Her iki durumda da, bu sayılar, bu mikroorganizmaların yaşam döngüsü içerisinde şimdiye kadar yapılabilen tüm metabolik bileşenleri temsil etmektedir. Yüksek organizmalarda durum çok daha karmaşık hale gelir. Doku özgülüğü veya organ yapıları gibi ek boyutlar, doğru tahminleri son derece zorlaştırır [10]. Şekil 2.4.'de metabolitlerin bağlantılı olduğunu gösteren örnek diyagram verilmiştir.



Şekil 2. 4. Örnek fosfat metabolizma ağı [16].

Herhangi bir organizmadaki metabolit havuzu çevrenin bir yansımasıdır. Bu nedenle, hücre veya organizma tarafından alınan tüm metabolitler, herhangi bir şekilde kullanılsalar bile metabolomun bir parçası olacak ve hücresel bozulmadan kaynaklanan metabolitler de metabolomun karmaşıklığına katkıda bulunacaktır [25].

2.5. Kromatografi

Kromatografi, kimyasal maddelerin karışımını bileşenlerine ayırmak için yaygın olarak kullanılan analitik bir tekniktir; böylece tek tek bileşenler önce ayrılıp daha sonra miktar tayini yapılarak analiz edilebilirler. Sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi gibi birçok kromatografi türü olmasına rağmen bunların tümü aynı temel prensipleri kullanır. Hepsinde de bir hareketli faz ve bir sabit faz olmak üzere iki fazlı bir sistem hakimdir [26].

Kromatografik sistemler, söz edildiği gibi hareketli faz (mobil faz) ve sabit faz adı verilen iki faz (sabit faz ve hareketli faz) arasında dağılıma uğrar. Bu iki faz birbiriyle temas halinde olmasına karşın karışmamaktadır ve hareketli olan faz

sabit fazın üzerinden akarak ilerlemektedir. Karışımdaki bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirinden ne kadar farklılaşır, karışım o kadar iyi ayrılabilir. Kromatografik sistemlerde daha az alıkonan bileşen daha önce, daha güçlü alıkonan bileşen ise daha geç çıkmaktadır. Sabit faz sıvı veya katı; hareketli faz ise sıvı veya gaz halde bulunabilmektedir [27].

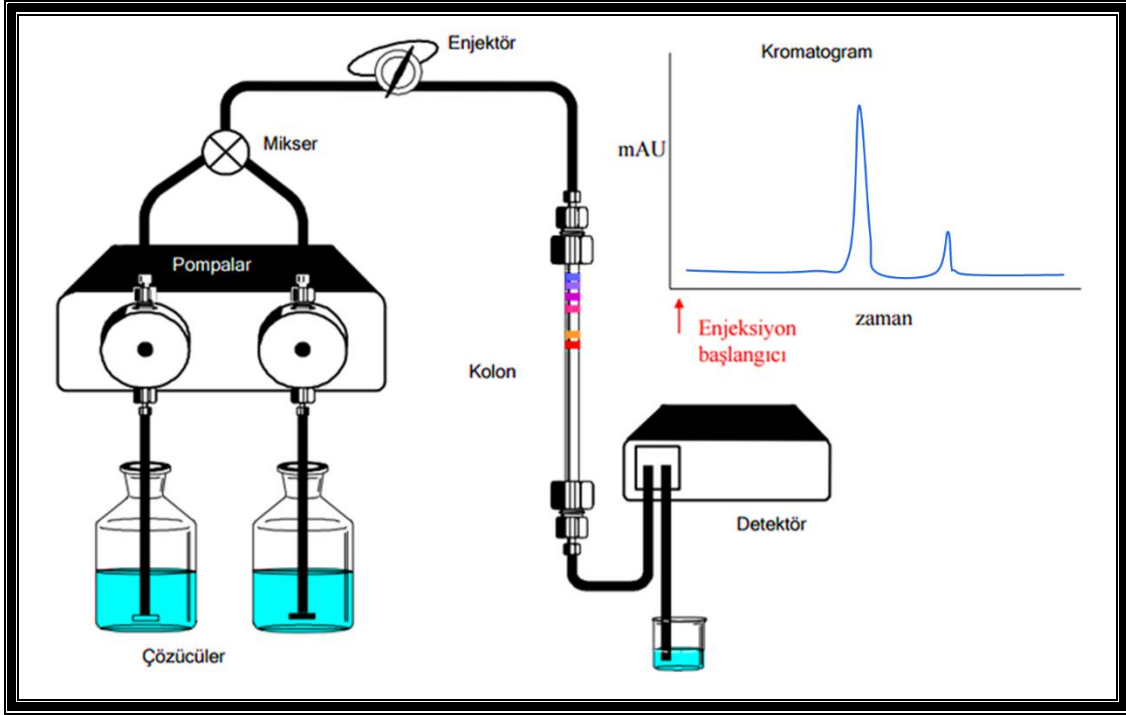
Kromatografik yöntemler faz tiplerine, uygulama biçimlerine ve ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Çizelge 2.1.'de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.



2.5.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemleri

HPLC cihazları "hareketli fazla birlikte sürüklenen analitin sabit fazla etkileşimi" prensibine dayalı olarak çalışmaktadır. HPLC cihazları günümüzde kromatografik yöntemlerde en yaygın olarak kullanılan analitik cihazdır. Bir HPLC cihazı Şekil 2.5.'de belirtilen kısımlardan oluşur.



Şekil 2. 5. HPLC cihaz şeması [28].

(i) Hareketli faz rezarvuarları - Hareketli faz için kullanılan kimyasal ve çözeltilerin bulunduğu kısımdır [29].

(ii) Pompa - HPLC pompasının ana işlevi, hareketli faz olarak da bilinen bir sıvıyı, belirli bir akış hızında bir sıvı kromatografi yoluyla, dakikada mililitre (mL/dak) cinsinden ifade etmek üzere, çözücünün yüksek basınç kullanılarak kolondan geçirilmesini sağlamaktır. Pompalar, HPLC sistemlerinin hayati bir parçasıdır ve akış hızları ile yüksek basıncı korumaktadırlar. Bir molekülün kolondaki tanecikler ile nasıl reaksiyona girdiğine ek olarak akış oranı, belirli bir kimyasal maddenin kolondan ne kadar hızlı geçeceğini belirler. Alıkonma zamanı, tek tek kimyasalları tanımlamak için nitel amaçla da kullanılabilir [29].

(iii) Enjektör sistemi - Enjektör, sıvı numunenin hareketli fazın akışına verilmesi görevini yerine getirir. Esas olarak bir numunenin kolondan akan çözücü yani hareketli faz akımına verilmesi için kullanılır. Enjektör, bir sıvı numuneyi mümkün olduğunca az dağılım ile çözücü akımına yani hareketli faz akışına yerleştirmek için özel olarak tasarlanmıştır [29].

(iv) Kolon - Kolon, çeşitli fiziksel ve kimyasal parametreler sonucu ilgili numune bileşenlerini ayıran kromatografin en önemli parçasıdır. Kolon, analiz edilen

kimyasallar için belirli bir afiniteye sahip olan küçük boncuklar ile doldurulmuş bir tüp şeklinde bir metal silindir koruyucudan oluşur. Kimyasallar, bir çözücü yani hareketli faz içinde kolondan geçerken boncuk olarak tabir ettiğimiz sabit faz tanecikleri ile etkileşir. Bileşiklerdeki moleküler farklılıklar, kolonda farklı hızlarda hareket etmelerine ve farklı zamanlarda kolondan elüe olmalarına neden olur. Kolon ayrıca, çözücünün içinden akmasına izin veren ancak sabit fazın kolondan ayrılmamasını sağlayan bir filtreye sahiptir [29].

(v) Dedektör sistemi - Kolondan çıkan molekülleri tespit etme işini yapar. Kimyasal maddenin kolondan çıktığında yani elüe olduğunda hangi özelliklerinden yararlanarak tespit edileceğine göre kullanılan farklı dedektör çeşitleri vardır. Örneğin; optik HPLC dedektörleri (UV dedektör vb.), belirli bir kimyasal maddenin kolondan ne zaman elüe olduğunu belirlemek için bir ışın kullanır. Çözücü, kolondan çıktığında dedektörün ışık yolundan geçer. Daha sonra, ilgili kimyasalın neden olduğu ışığın Emilimi yani absorpsiyonu veya salınımı yani emisyonu kaydedilerek maddenin miktarı ve hatta bazen yapısı belirlenebilir. Kimyasalın neden olduğu ışın ile etkileşim, kimyasalın varlığına işaret etmektedir. Mevcut olan diğer dedektörler, refraktif indeks (kırılma indisi) dedektörleri, elektrokimyasal dedektörler, kütle dedektörleri ve yeni teknoloji diğer dedektörlerdir [29].

2.5.2. Kromatografi Parametreleri

(i) Alıkonma zamanı - Analitin kolon içerisinde kalma süresini ifade etmektedir ve (t_R) ile gösterilir. Alıkonma zamanı kullanılan yöntemle birlikte maddenin kimyasal özellikleriyle de ilgilidir. Hareketli fazın alıkonma zamanına “ölü hacim (t_0)” denir. Analitin kolonla etkileşimini dolayısı ile alıkonma süresini etkileyen başlıca parametreler kolonun yani sabit fazın özellikleri, kolonun sıcaklığı, hareketli fazın bileşimi, sabit faz-hareketli faz-analit arasındaki moleküller arası etkileşimler olarak sayılabilir. Optimum çalışma şartları tüm bu parametreler dikkate alınarak değerlendirilmeli ve belirlenmelidir [30].

(ii) Kapasite faktörü - Alıkonma veya kapasite faktörü (k'), analitin kromatografik kolon üzerindeki kalıcılığını ölçmek için kullanılan bir parametredir. Hareketli faz (ölü hacim) pikini (t_0) belirlemenin en etkili yöntemi enjeksiyondan hemen sonra görülen ilk kırılmayı almaktır. Kapasite faktörü akış hızından etkilenmemektedir [31]. Kapasite faktörü aşağıdaki eşitlikle (Eşitlik 2.1) hesaplanmaktadır.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.1)$$

(iii) Seçicilik - İki maddenin kapasite faktörleri oranına 'seçicilik (α)' denir. Seçicilik aşağıdaki (Eşitlik 2.2) eşitlikle hesaplanmaktadır.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) \quad (2.2)$$

(iv) Kolon etkinliği - Kolon etkinliği, piklerin ne derece keskin olduğu ve ayırımın ne derece düzgün gerçekleşebileceğinin matematiksel ifadesidir. Eşdeğer "teorik tabaka sayısı (N)" ile gösterilmektedir ve aşağıdaki (Eşitlik 2.3) eşitlikle hesaplanmaktadır. Eşitlikte w, pikin zeminden %10 yükseklikteki genişliğine denktir [32].

$$N = 16 \times (t_R / w)^2 \quad (2.3)$$

(v) Ayırıcılık - Ayırıcılık çözücü ve kolon etkinliğinin ortak gösterimi olarak ifade edilmektedir ve " R_s " şeklinde adlandırılmaktadır. Aşağıdaki (Eşitlik 2.4) eşitlikle hesaplanmaktadır.

$$R_s = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.4)$$

2.6. Kütle Spektroskopisi

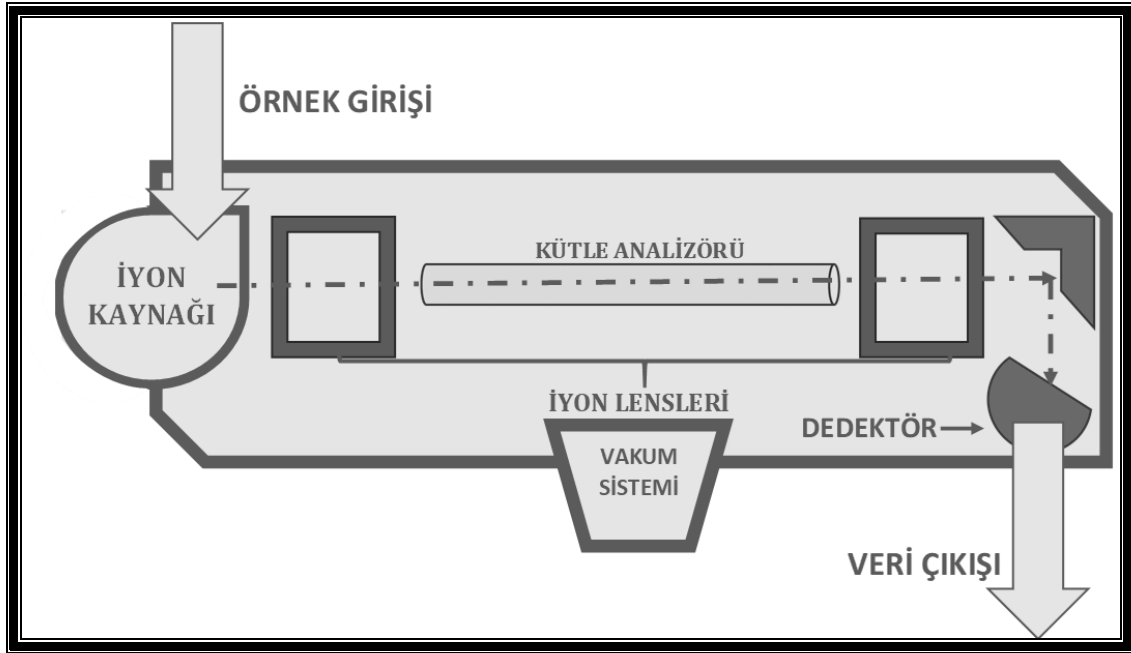
Maddelerin bağlı kütleleri üzerinden atom dizilimi ve bileşimini bulmak için kullanılan analitik tekniğe kütle spektroskopisi adı verilmektedir [33]. Molekülleri iyonlara dönüştürerek dış elektrik ve manyetik alanlar tarafından hareket ettirilip kütle/yük oranlarına (m/z) göre belirlenmesi şeklinde çalışır. İyonlaşma basamağı ve kütle analizöründe yaşanan bilimsel ve teknolojik gelişmelerle birlikte MS cihazları çok sayıda farklı moleküllerin analizini sağlayabilir hale gelmiştir [34].

Kütle spektromelerinin, Elektrosprey İyonlaştırma (ESI), Elektrosprey Kimyasal İyonlaştırma (ESCI), Atmosfer Basıncılı Foto İyonlaştırma (APPI) ve Atmosfer Basıncılı Kimyasal İyonlaştırma (APCI) gibi kullandığı farklı iyonlaştırma teknikleri bulunmaktadır [34].

2.6.1. Kütle Spektrometre Cihazlarının Genel Yapısı

Kütle spektrometreleri, kromatografik bir ayırımdan veya direk enjeksiyon sonucu gelen analitin, iyon kaynağında iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilmesinin ardından genellikle yüklü bir kapiler aracılığıyla kütle analizörüne taşınarak kütle

analizöründen dedektöre ulaştırılmasıyla yüksek vakum altında çalışan analitik cihazlardır [10]. Şekil 2.6.'da bir kütle spektrometre cihazının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 6. Kütle spektrometrelerinin genel şeması [28].

(i) İyon kaynağı - İyon kaynağındaki temel işlemler, numunenin gaz fazına aktarılması, iyonlaştırılması ve vakuma aktarılmasıdır. Numuneler, direkt olarak bir gaz kromatografisinden (gaz fazında olduğu yerde) bir gaz numunesi olarak, aletin içine sıvı bir numune olarak ya da hareketli fazda çözülmüş bir sıvı kromatografından elüe edilerek, iyon kaynağına doğrudan iletilebilir. Numune tipine (gaz / sıvı) ve iyonizasyon yöntemine bağlı olarak, bu işlemler ters sırada da, yani, çözücü içinde iyonizasyonun ardından iyonların gaz fazına aktarılmasıyla gerçekleştirilebilir. Genel olarak, iyon kaynağı hem operasyon hem de bakım açısından en çok dikkat gerektiren kütle spektrometresinin önemli bir parçasıdır. Birçok iyonizasyon parametresi, elde edilen sonuçlar için, özellikle çözücü bileşeninin iyonizasyon işlemi çekirdek bir parça olması nedeniyle örnek giriş için kullanılan çözücü için önemli bir rol oynamaktadır [10].

(ii) Kütle analizörü - Kütle-yük oranının belirlenmesi için elektrik ve/veya manyetik alanların bir kombinasyonu kullanılarak yapılır ve günümüzde piyasada çeşitli tipte kütle analizörleri bulunmaktadır. Tüm kütle analizörlerinin, iyonların yüksüz moleküller veya birbirleriyle çarpışmaması için yüksek vakumda çalıştırılması

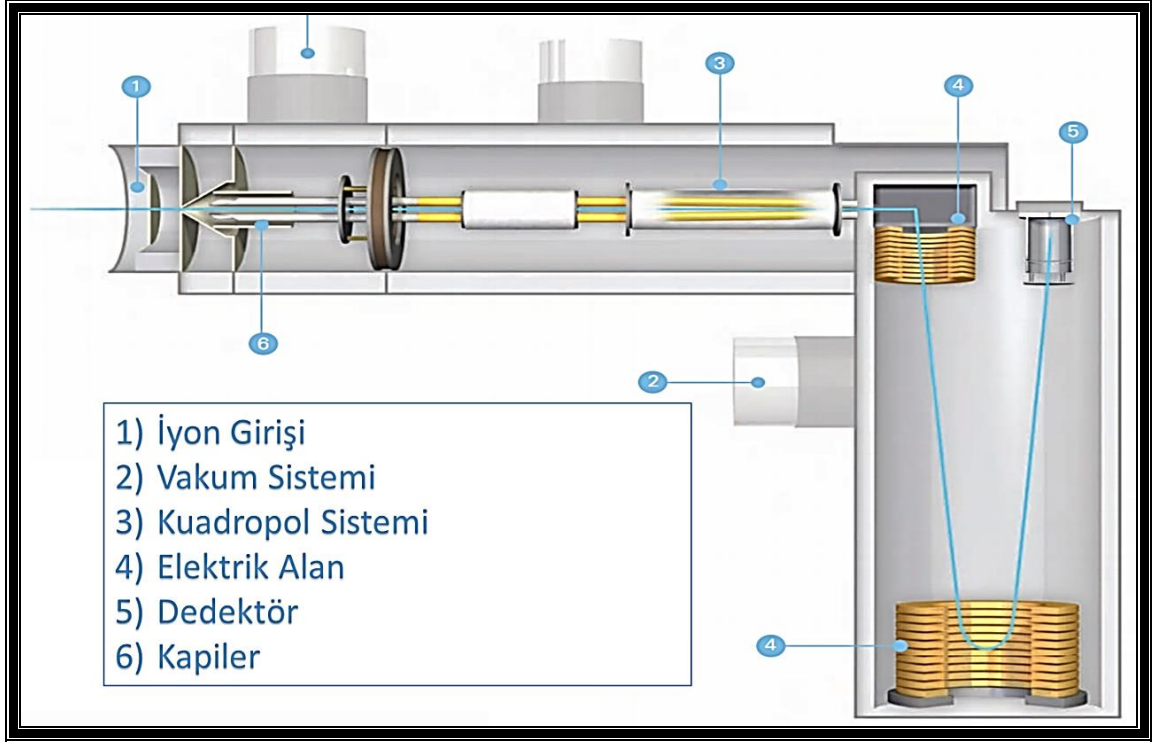
gerekmektedir. Kütle analizörleri genellikle performanslarına göre gruplandırılırlar. Kütle çözünürlüğünün birim kütle ayrımı olduğu nominal kütle analizörleri 1:1000-2000 civarında çözünürlük ve tamsayı kütle doğruluğu sunarlar. Çözünürlük 1:7000'den daha yüksek olan 1:100.000'e ulaşan yüksek çözünürlüklü kütle analizörleri, 1 ppm'nin altında kütle doğruluğunu sunarlar. İkinci tip kütle analizörü, tüm formülleri ve izotopik bileşimleri, yaklaşık 1000 Da'nın altındaki metabolomlarla ilgili olarak ayırabilir [10].

(iii) Dedektör - Akımı (iyon miktarı) veya sayıyı zamanın bir fonksiyonu olarak ölçer. Kütle analizörünün m/z aktarımı zamanla değiştikçe, dedektör kütleyle m/z fonksiyonu olarak ölçer [10].

(iv) Diğer cihaz bileşenleri - Kütle spektrometri cihazları kullanılan yöntemlere göre numune enjeksiyon sistemleri içermektedirler. Kromatografik bir cihazla veya manuel ya da otomatik enjeksiyon sistemleri içerebilmektedirler. İyonlaşma kaynağının çalışmasına bağlı olarak helyum veya azot jeneratörleri kurutucu gaz olarak kullanılabilir. Ayrıca yüksek vakum altında çalıştıkları için vakum sistemleri kullanılmaktadır [10].

2.6.2. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF)

Uçuş zamanlı kütle spektrometre cihazları, iyonların elektrik alan altında kinetik enerji ile yüklenerek, uçuş sürelerinden kütleleri arasındaki farka ulaşılmasını sağlayan sistemlerdir. Aynı elektrik alanda aynı yüke sahip iyonlar, kütle farkından ötürü farklı kinetik enerjiye ulaşmaktadırlar. Bu kinetik enerjilerindeki farkı uçuş sürelerini belirlemektedir [35]. Şekil 2.7. Q-TOF/MS sistemlerinin bölümlerini göstermektedir.



Şekil 2. 7. Q-TOF/MS cihazların genel şematik gösterimi [28].

Kütle Spektrometrelerinde moleküller iyonlaşma basamağında pozitif veya negatif yüklü olarak iyonlaşabilir; ancak hangi maddenin pozitif, hangi maddenin negatif olarak iyonlaşabileceğinin tam olarak bilinmemektedir. Bazı maddeler ise hem pozitif hem negatif olarak iyonlaşabilmektedir. Kapilerin negatif yüklü olarak sisteme pozitif yüklü iyonların alınmasına “pozitif mod”, kapilerin pozitif yüklü olarak sisteme negatif yüklü iyonların alınmasına “negatif mod” denmektedir [36].

2.7. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği

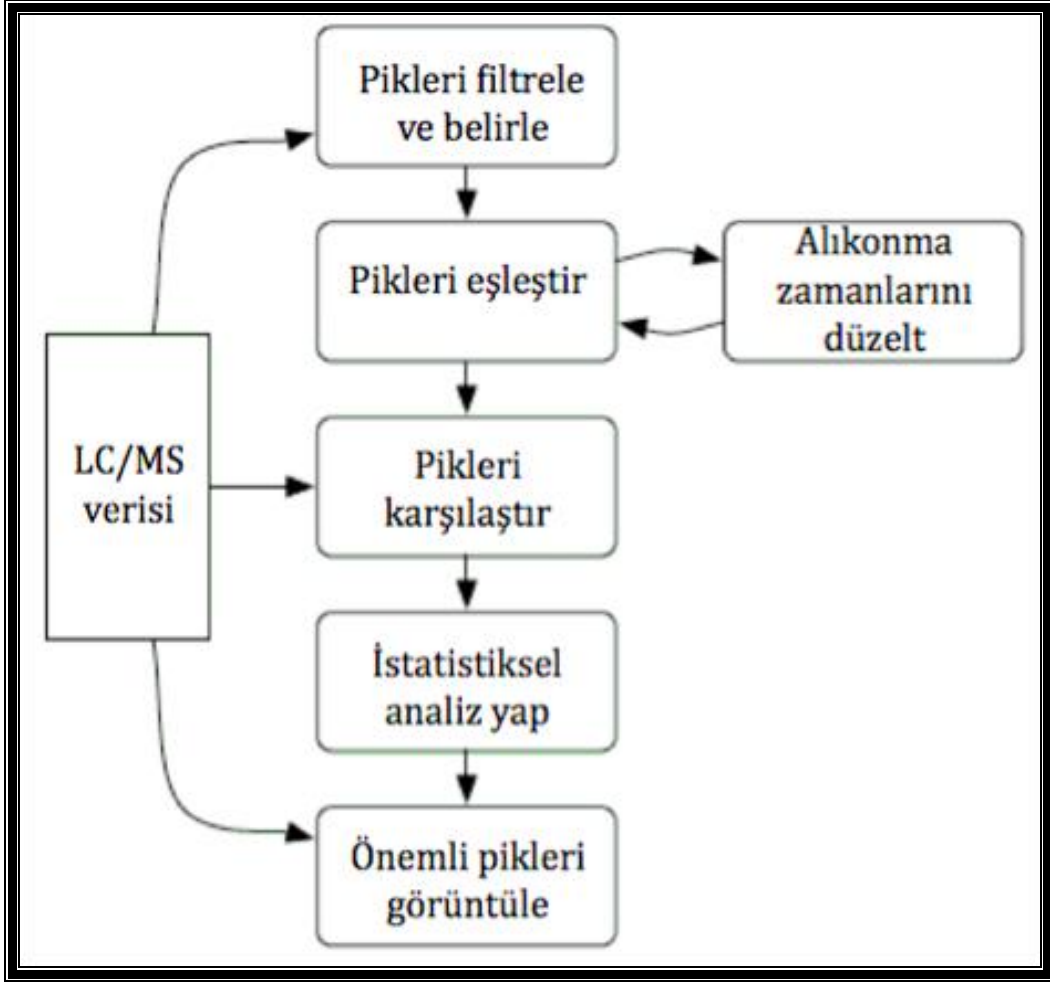
Metabolomik çalışmalar; biyolojik temelli hipotezlerin deney verilerine ve bunların matematiksel modellemeye çevrilmesi ile biyolojik bilgiye ulaşılmasını sağlamaktadır. Metabolomik deneylerde analiz edilmesi gereken verinin hacmi fazladır. Bu sebepten verilerin matematiksel verilere dönüştürülmesi için yazılım desteği şart olmaktadır [8-37]. Metabolit olduğu düşünülen piklerin belirlenmesi, farklı numunelerle eşleştirilmesi, yoğunluklarının karşılaştırılması, metabolitlerin ve metabolit yollarının tanımlanması gibi işlemlerde yazılım ve veri bankaları desteğine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple metabolomik çalışmalar için çok sayıda ticari ve açık erişimli yazılım geliştirilmiştir [38]. Çizelge 2.2.’de metabolomik çalışmalarda genellikle kullanılan yazılım ve veri bankaları verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Metabolomik çalışmalarda kullanılan yazılımlar.

Yazılım	Kullanım
XCMS [39]	Pik belirleme, eşleştirme, yoğunluklarını karşılaştırma, istatistiksel testler
MzMine [40]	Pik belirleme, eşleştirme, yoğunluklarını karşılaştırma, istatistiksel testler
MetaboloAnalyst [41]	İstatistiksel testler, metabolit tanımlama, yolak analizleri
METLIN [42]	Metabolit veri bankası
HMDB [43]	Metabolit veri bankası

2.7.1. XCMS ve MatchedFilter Algoritması

XCMS metabolomik çalışmalarda için geliştirilmiş "R" yazılım dili tabanlı açık kaynak kodlu bir yazılımdır. XCMS, manuel olarak girilen parametrelerle birlikte ham datadan matematiksel modellemeler elde edilmesini sağlar. XCMS, piklerin belirlenmesi, diğer numunelerin pikleriyle eşleştirilmesi ve piklerin karşılaştırılmasında kullanılır [44]. Şekil 2.8.'de XCMS'in çalışma algoritması verilmiştir.

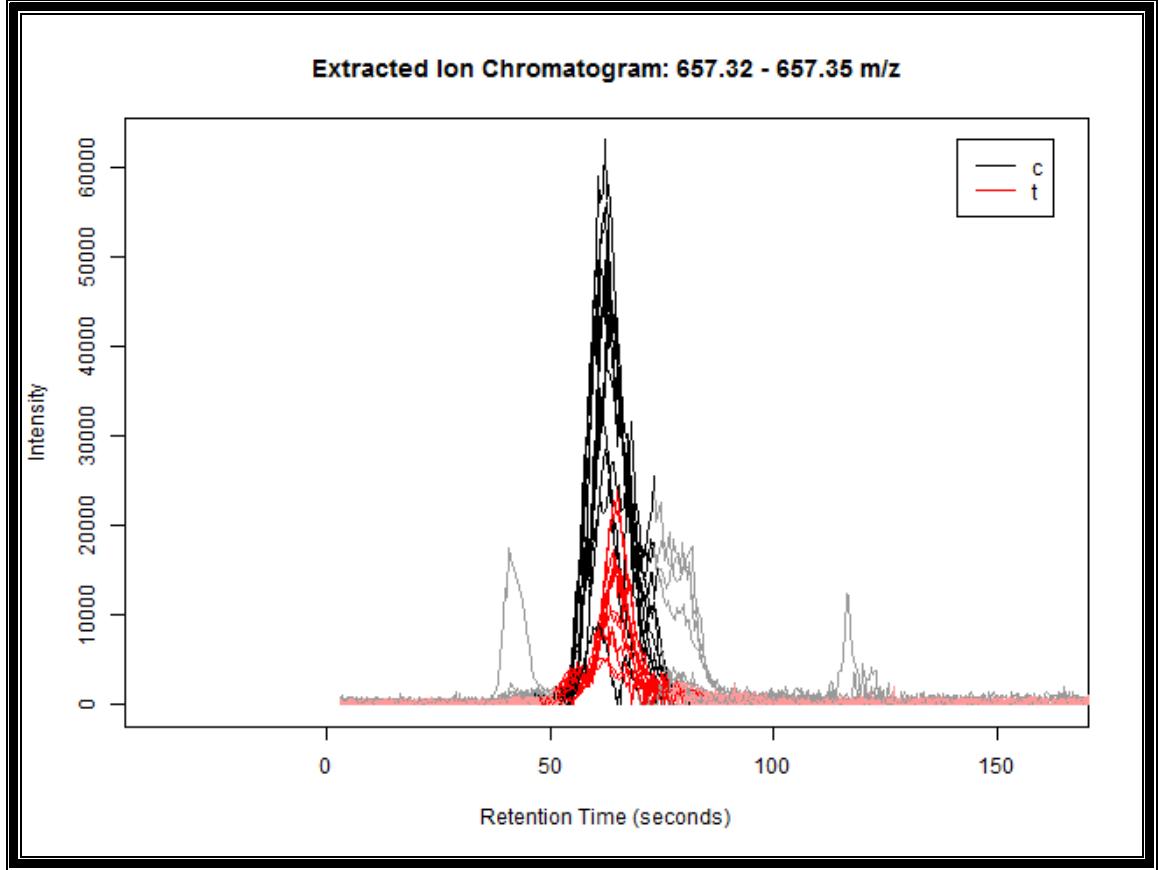


Şekil 2. 8. XCMS MatchedFilter çalışma algoritması.

Ham datanın XCMS'e uygun hale getirilmesi için analitik platformdan alınan veri dosyaları XCMS'e uygun dosya formatına dönüştürülür. Analitik cihazlar kendi yazılımlarını kullanırlar ve bu yazılımlarda elde edilen dosyaların uzantıları "ProteoWizard" gibi dosya dönüştürücü yazılımlar vasıtasıyla dosya formatı XCMS'e uygun olan .mzXML formatı şekline getirilir [45]. Piklerin belirlenmesi ve filtrelenmesi amacıyla XCMS'e yüklenen dosyalardaki her pik ayrılmış kütle spektrumları şeklinde ayrılır ve belirlenen gürültü değerinin altındaki pikler filtrelenir. Ayrıştırılmış pikler, örnek setler boyunca taranarak m/z ve alıkonma zamanına göre eşleştirilir. XCMS bu aşamada kullanıcının belirlediği "CentWave" ve "MatchedFilter" adı verilen iki farklı algoritmadan birisini kullanır. m/z ve alıkonma zamanlarının hata aralıkları da kullanıcı tarafından belirlenmektedir. Eşleştirilmiş pikler, aynı maddenin pikleri olarak farklı numuneler ile karşılaştırılarak pik şiddetindeki değişimler gözlenir. XCMS t testi, normalizasyon

dönüşümleri gibi işlemleri seçim doğrultusunda sonuçlara uygulayabilmektedir [44].

XCMS belirlenen her pike ait bir kromatogram verir. Şekil 2.9.'da örnek bir XCMS çıktı kromatogramı bulunmaktadır. Tüm bu işlemlerin neticesinde XCMS ham datanın ve istatistiksel dönüşüme uğramış datanın sonuçlarını excel formatında her örnek grubu için ayrı ayrı verebilir [44].



Şekil 2. 9. Örnek XCMS kromatogram çıktısı [28].

2.7.2. XCMS CentWave Algoritması

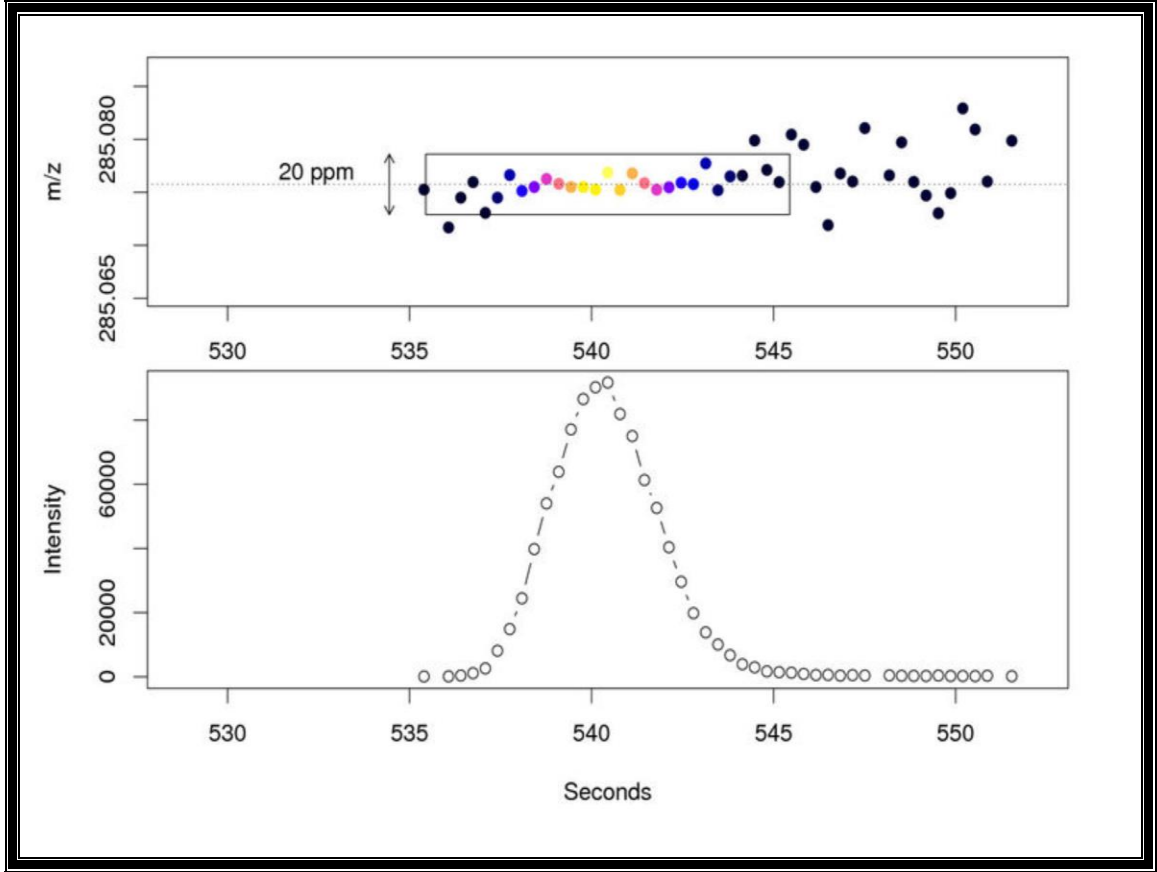
LC-MS metabolomik deneyler için önemli bir analitik teknolojidir. LC-MS ham verilerindeki iki boyutlu sinyallerin sınırlarının, merkezlerinin ve yoğunluklarının belirlenmesi özellik tespiti olarak adlandırılır [46]. Binlerce özelliğe sahip yüzlerce bileşiği içerebilen karmaşık örneklerin nihai analizi için güvenilir bir özellik tespiti gereklidir [47].

Ham veride kısmi kütle izlerini toplayan yüksek çözünürlüklü LC-MS veri setleri için yeni bir özellik tespit algoritması CentWave geliştirilmiştir. Geliştirilen özellik

algılama algoritmasının mevcut metabolomik deneylerin gereksinimlerini karşıladığı, yakın ve kısmen örtüşen özellikleri algılayabildiği ve XCMS'in orijinal algoritması olan MatchedFilter gibi diğer algoritmalara kıyasla en yüksek toplam pik bulma ve hassasiyet değerlerine sahip olduğu düşünülmektedir [46].

LC-MS verilerinin işlenmesi için yaygın olarak kullanılan bu yaklaşım, ham verileri m/z , alıkonma zamanı ve şiddeti ile matris temsiline dönüştürmektedir. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrumlarını bu gösterime dönüştürmek için, m/z eksenini kütle spektrometresinin çözünürlüğüne, örneğin 0.1 m/z genişliğine bağlı olarak eşit parçalara bölmek gerekir. Bu prosedür genellikle binning olarak adlandırılır [48]. Bu yöntemin dezavantajlarından biri özellikle belirli veri seti için en uygun kutu boyutunun belirlenmesinin zor olmasıdır. Kutu boyutu çok küçük seçilirse, kromatografik piklerin kutular arasında geçişli olmasından ötürü kromatografik şeklin kaybına bağlı olarak bazı pikler tespit edilemez. Kutu boyutu çok büyük olursa, pikler birbirinin üzerine binebilir ve küçük pikler ve geniş olmayan pikler artan kromatografik gürültü seviyesi sebebiyle kaybolabilir. Yöntemin olumlu tarafı ise, "binning" yaklaşımının her amaca uygun olması ve hızlı bir şekilde veri işlemeyi sağlamasıdır [49].

Centwave algoritmasında, "binning" tekniğinin bahsi geçen sorunlarını azaltmak için, alternatif hesaplama yaklaşımları da kullanılmaktadır. Şekil 2.10.'da, ekstraksiyona tabi tutulmuş iyon kromatogramını ve karşılık gelen m/z merkezlerini, "centroid modda" kaydedilmiş halde ardışık kütle spektrumunda göstermektedir [46].



Şekil 2. 10. Centroid modda kaydedilmiş örnek ardışık kütle spektrumu [46].

Kromatografik pik ortaya çıktığı zaman, ardışık merkezler, m/z değerleri ve sinyal şiddetine bağlı bir yükseklik ve alıkonma zamanı ile sınırlı bir pik oluştururlar. m/z sapması, kütle spektrometresinin kütle doğruluğu ile orantılıdır ve tipik olarak düşük sinyal yoğunlukları ile varyasyonlar artar [46].

Kütle spektrometresinin kütle hassasiyeti (μ , ppm cinsinden) ve minimum kromatografik pik genişliğinin bilinmesi sayesinde, sapma ile en azından p_{\min} centroid'lerin bulunduğu bölgeleri doğrudan taramak mümkündür. Bu görev, $s = 1, \dots, S$: numaralı taramalarla, centroid mod'daki örnekler için aşağıdaki algoritma ile elde edilir:

- 1.Başlangıç:

(a) İlk taramadan tüm m/z mz_i^s değerlerini kullanarak bir liste ROI başlatır:

$$\forall i = 1, \dots, N, N = |mz^{s=1}|: ROI(j).values(1) = mz_i^{s=1}$$

(b) Gerçekte işlenen her bölge için m/z ortalama değeri başlangıç durumuna getirilir:

$$\text{ROI}(i).\text{mzmean} = \text{mz}_i^s, i = 1, \dots, N, N = |\text{mz}^{s=1}|$$

- Her tarama için $s = 2, \dots, S$:

(a) Her bir m/z mz_i^s değeri için, $i = 1, \dots, N, N = |\text{mz}^s|$ mevcut taramada s:

$$j = 1, \dots, J, J = |\text{ROI}|, |\text{ROI}(j).\text{mzmean} - \text{mz}_i^s| \leq \mu ?$$

- Evet ise; mz_i^s değerini $\text{ROI}(j)$ değerine ekleyerek m/z ortalama değeri güncellenir.

$$K = |\text{ROI}(j).\text{values}| + 1, \text{ROI}(j).\text{values}(K) = \text{mz}_i^s$$

$$\text{ROI}(j).\text{mzmean} = 1/K \sum_{k=1}^K \text{ROI}(j).\text{values}(k)$$

- Hayır ise; yeni bir ROI oluşturulur ve listeye eklenir.

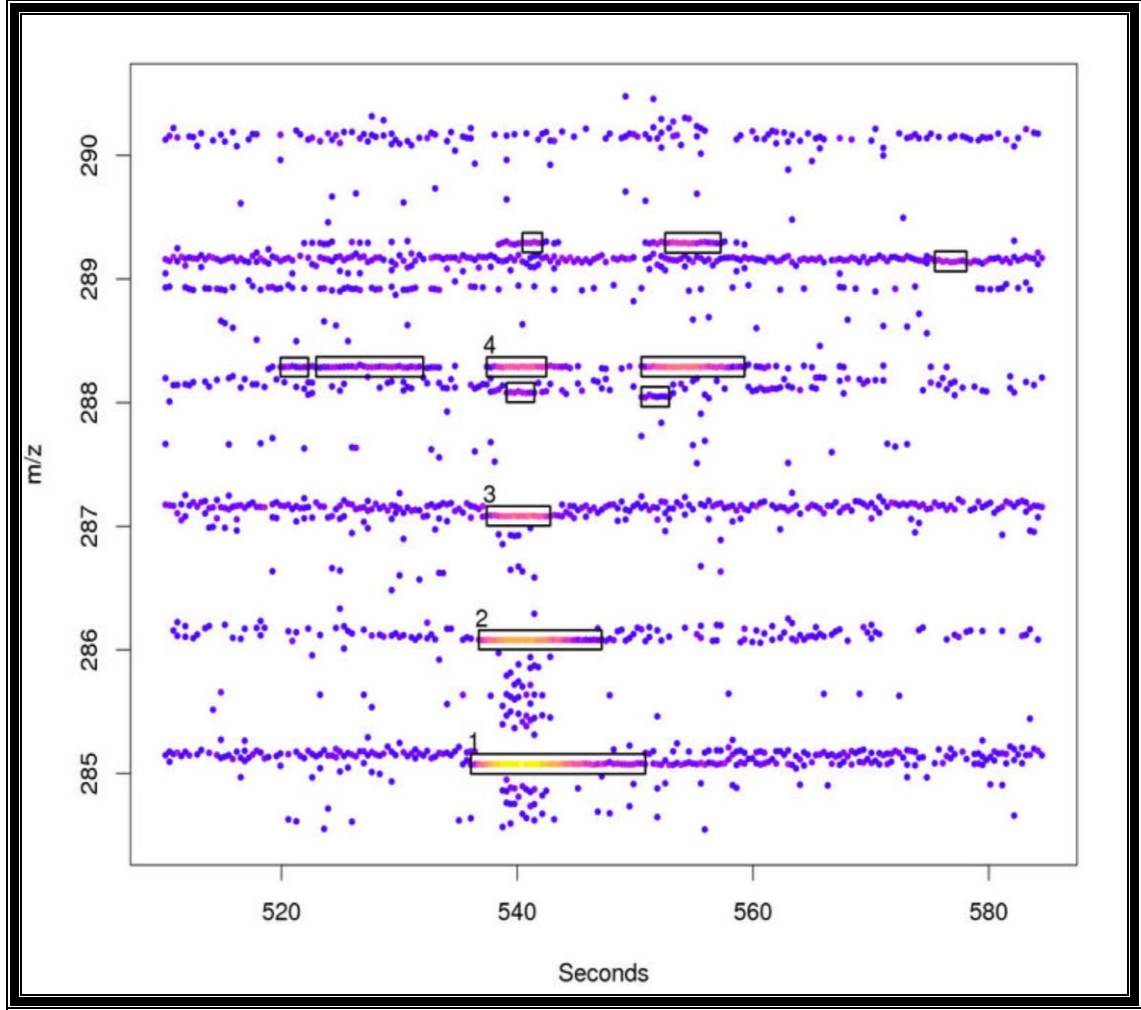
$$J = |\text{ROI}| + 1, \text{ROI}(J).\text{values}(1) = \text{mz}_i^s, \text{ROI}(J).\text{mzmean} = \text{mz}_i^s$$

(b) Kontrol ve temizleme:

- 2(a) adımında genişletilmeyen ve p_{\min} değerinden daha az centroid içeren tüm ROI'lar kaldırılır.
- Genişletilmeyen ancak en az p_{\min} centroid içeren ROI'lar tamamlanmış olarak işaretlenir.

İsteğe bağlı olarak bir yoğunluk filtresi (ön filtre = (k, l) , örneğin ön filtre = $(2, 100)$) küçük yoğunluğun erken bölgelerini atmak üzere ayarlanabilir. Daha sonra sadece ROI yoğunluğu ile en az k ardışık değerler içeren, yalnızca ROI (adım 2(b)'de) korunur. Bu ön filtre genel işlem süresini büyük ölçüde hızlandırır [46].

Her m/z değerinin sadece bir kez dikkate alınması gerekir, bu nedenle ROI algoritması hızlıdır (3000 taramada bir ölçüm için 2.5 GHz CPU'da yaklaşık 10-20 saniye). Şekil 2.11, karmaşık bir LC-MS numunesinin küçük bir bölgesi için ROI saptama algoritmasının sonucunu göstermektedir [46].



Şekil 2. 11. Örnek LC-MS numunesi için ROI saptama algoritması sonucu [46].

Bazı nadir durumlarda düşük yoğunluklu özelliklerin kütle izlerinde "boşluklar" gözlenir. Her bir ROI, kromatografik pik saptaması için yanal olarak uzatıldığından, bu özelliklerin başarılı bir şekilde saptanması için sadece küçük bir bitişik bölgenin bulunması gerekir. Belli bir dereceye kadar, algoritma bu gibi boşlukları olan özellikleri tespit edebilmektedir. Aksi takdirde, bu durumu daha sık gösteren örnekler söz konusu olduğunda, algoritma daha fazla "boşluk toleranslı" olacak şekilde kolayca modifiye edilebilir. Binning'in tersine, bu yaklaşım, sabit kutu büyüklüğünün seçilmemesi avantajına sahiptir. Her ROI ayrı ayrı tespit edilir ve binning dezavantajları atlatılabilir. Binning'in aksine, sonuç bir matris değil, farklı uzunluktaki kütle izlerinin listesidir. Kromatografi ve kütle spektrometresinin kütle doğruluğuna bağlı olarak, her bir ROI, tam olarak bir veya birden fazla farklı kromatografik pik içerir. Bu nedenle, her ROI'nın kromatografik alanda kapsamlı bir analize tabi tutulması gereklidir [46].

2.7.3. MetaboAnalyst

Metabolomik, NMR, kromatografi ve kütle spektrometresi kullanılarak çok sayıda metabolitin karakterize edilmesiyle ilgili yeni ortaya çıkan bir “bilim dalıdır”. Biyobelirteç (biyomarker) tanımlamada ve hücrelerin, dokuların veya organizmaların metabolik profillenmesinde sıklıkla kullanılır. Metabolizmada veri işleme oldukça zordur ve çoğu zaman özel veya pahalı veri analiz yazılımı ve cheminformatics, biyoinformatik ve istatistik hakkında ayrıntılı bilgi gerektirir [50]. Metabolomik veri analizini kolaylaştırmak için, aynı zamanda kullanıcı erişilebilirliğini kolaylaştırmak amacıyla, MetaboAnalyst adı verilen metabolomik veri analizi için serbest erişilebilen, kullanımı kolay bir web sunucusu geliştirilmiştir. Temel olarak, MetaboAnalyst, günümüzün web tabanlı mikrodizi analiz paketlerinin çoğundan farklı olarak web tabanlı bir metabolomik veri işleme aracıdır. Çok çeşitli formatlarda çeşitli girdi verilerini (NMR pik listeleri, MS pik listeleri, bileşik/derişim verileri) kabul eder. Ayrıca metabolomik veri işleme, veri normalleştirme, çok değişkenli istatistiksel analiz, grafikleme, metabolit tanımlama ve metabolik yolak haritası için bir dizi seçenek sunar. Özellikle, MetaboAnalyst farklılaşmalar, t-testleri, PCA, PLS-DA, hiyerarşik kümeleme ve bir dizi daha karmaşık istatistiksel veya makine öğrenme yöntemleri gibi teknikleri destekler. Aynı zamanda, çoğu giriş spektrumundan bileşik tanımlamayı kolaylaştırmak için geniş bir referans spektrumları kütüphanesi kullanır. MetaboAnalyst, kullanıcılara çeşitli menüler ve onay kutularını kullanarak adım adım analiz yönlendirir. Tamamlandığında, sunucu, grafik ve tablo çıktılarından oluşan ayrıntılı bir rapor oluşturur. MetaboAnalyst birçok metabolomik veriyi idame edebilir ve yaygın olarak kullanılan metabolomik veri analizlerinin çoğunu gerçekleştirmek için tasarlanmıştır [51].

MetaboAnalyst hem eşleştirilmiş hem de eşleştirilmemiş veri analizlerini destekler. Tipik bir MetaboAnalyst çalışması altı adımdan oluşur: (i) veri yükleme, (ii) işleme, (iii) normalizasyon, (iv) istatistiksel analiz, (v) ek açıklama ve (vi) özet rapor indirme [51].

2.7.4. Reactome

Biyolojik bilgiler son yıllarda oldukça karmaşık bir hale gelmiştir. Uzman bireyler için geleneksel yayın formatlarında ve mevcut bilgi yönetim araçlarında tüm bilgiye ulaşmak ve bir bütün halinde değerlendirmek imkansız olmasa bile zor olmaktadır.

Araştırmacıların kendi alanlarındaki araştırma gelişimlerini güncel tutmaları ve çok fazla zaman ayırmadan kendi çalışmalarını desteklemek için konularıyla ilgili güncel bilgiyi derlemeleri günümüzde artan bir sorundur. Şöyle ki; herhangi bir hastalık veya herhangi bir işlevsel bozuklukta ne çıkan genler, proteinler ve metabolom düzeyinde meydana gelen değişikliklerin tamamına tek bir kaynaktan ulaşabilmek veya tüm kaynakları kontrol ederek rafine bir bilgi oluşturabilmek kimi durumda zaman alıcı ve zor bir süreçtir. <http://www.reactome.org> adresinde bulunan Reactome, sistem biyolojisi ile ilgili verilere daha verimli bir erişim sağlayarak ve depolanan bilgilere tek bir tuşla ulaşmak ve eldeki veriyi organize etmek için elektronik medyanın özelliklerini kullanan yeni bir kaynaktır [52]. Farklı veribankalarından çekilen bilgi bir bütün olarak tek bir kaynakta görsellik ön plana çıkarılarak sunulmaktadır.

Bir organizmanın genetik yapısı göz önüne alındığında, olası reaksiyonların tamamı, onun tepkisini oluşturur. Reaksiyonlara katılan türler (nükleik asitler, proteinler, kompleksler, aşılar, anti-kanser terapötikler ve küçük moleküller), biyolojik etkileşimlerin bir ağını oluşturur ve yolaklar halinde gruplanır. Reactome veri modeli, insan metabolizması, düzenleyici yollar ve sinyal iletimi yolları ve hücre döngüsü gibi yüksek seviyeli süreçler dahil olmak üzere insan sistemindeki birçok farklı sürecin görsel olarak birbirleriyle ilişkili bir Şekilde temsil edilmesini sağlar. Reactome, nicel verilerin üst üste gelebileceği ve sonuçlarının çıktı olarak verilebileceği bir bakış açısı sunar. Reactome'daki araçlar, uzman kişilerin uygun veriyi sisteme girmeleri sayesinde bitmiş verinin sonuç kümeleri Şeklinde sunulmasını, elde edilen bilginin görselleştirilmesini sağlamak için geliştirilmiştir. Veri tabanı, açık kaynak kodları altında herkese açıktır; bu, hem içeriğinin hem de yazılım altyapısının serbestçe kullanılmasına ve yeniden dağıtılmasına olanak tanımaktadır [53]. Şekil 2.12., Reactome üzerinde örnek bir biyolojik görselleştirmeyi vermektedir. Őekilden de görüleceği üzere genler, proteinler ve metabolitler kendileriyle ilişkili yolaklar üzerinde gösterilmişlerdir. Bir hastalık durumu veya herhangi bir duruma bağlı olarak genom, transkriptom, proteom ve metabolomdaki değişim bunların hepsi veya bazıları sisteme tanımlanarak ilişkili olduğu metabolik yolaklar görülebilir ve görsel olarak ulaşılabilir. Ayrıca tek tek her bir bileşenin örneğin bir proteinin, bir genin, bir metabolitin hangi hastalıkla ilişkili olduğu yolak üzerinden işaretilenerek uygun veri bankalarından aranabilir.



Şekil 2. 12. Örnek Reactome biyolojik görselleştirme [54].

2.8. Meme Kanseri (MDA-MB) Hücreleri

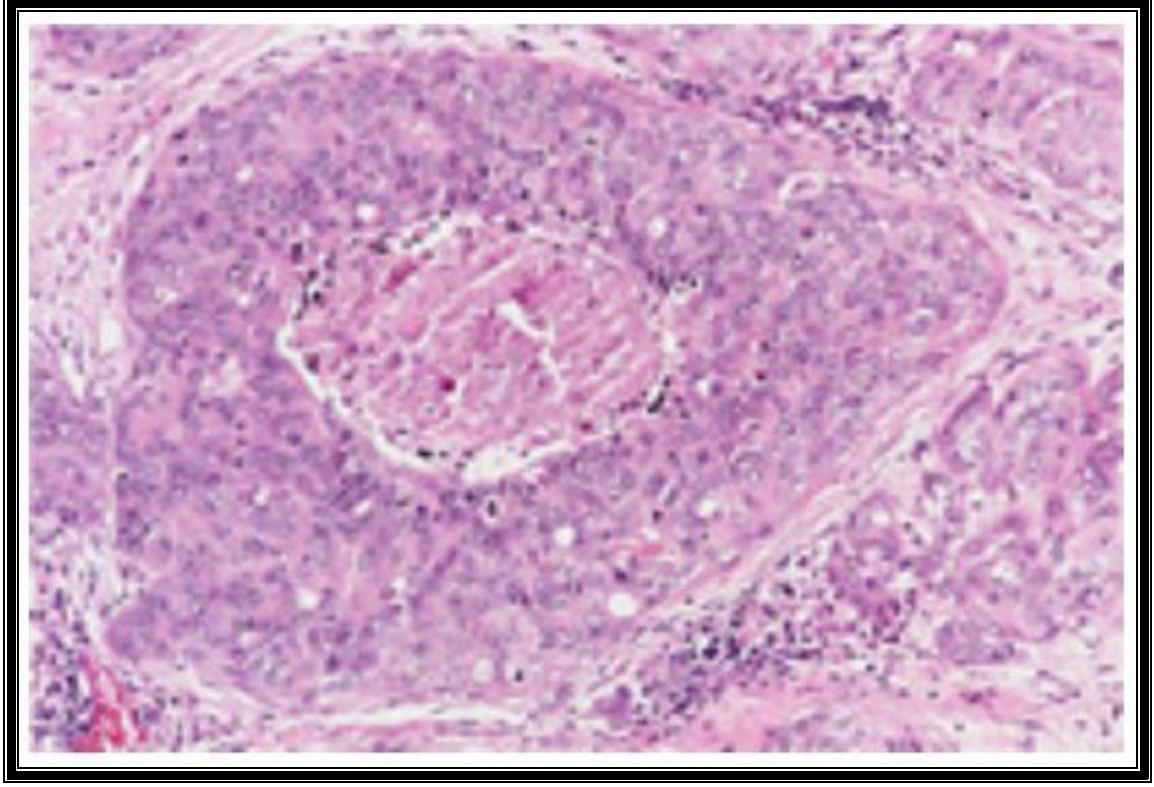
Meme kanseri en yaygın kanser türlerin biridir ve dünya genelinde kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini ve batı yaşam tarzına sahip gelişmiş ülkelerdeki kanserlerin %27'sini karşılamaktadır. Meme kanseri erkeklerde de ortaya çıkabilmesine karşın kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden 100 kat daha yaygındır. Tanıdaki gecikmeler nedeniyle genellikle kötü prognoza sahip kanser türüdür [55].

Meme kanseri, meme bezinin herhangi bir hücresinde meydana gelir ve geniş bir morfolojik özellikler, farklı immünohistokimyasal profiller ve spesifik klinik seyri ve sonucu olan benzersiz histopatolojik alt tipler sergiler. Meme sarkomları en sık görülen malign lezyonlardır. Günümüzde, bir tarama aracı olarak mamografinin

geniş kullanımı ile, daha fazla yayılmamış meme lezyonu olgusu tespit edilmiştir [55].

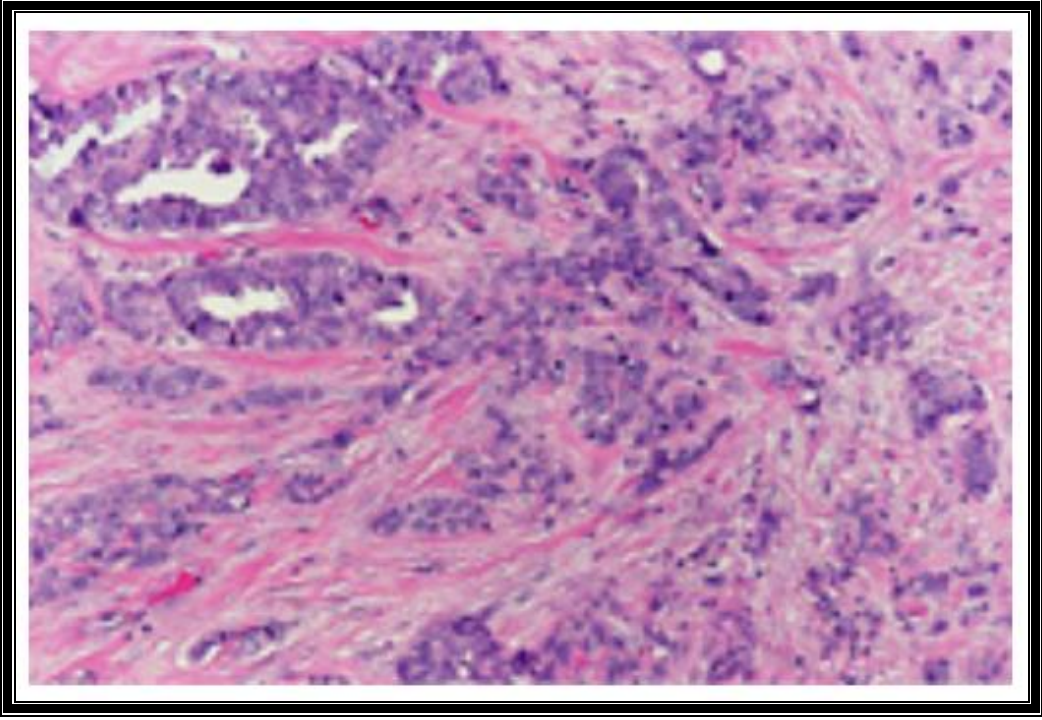
Meme kanserleri iki ana gruba ayrılabilir: karsinomlar ve sarkomlar. Karsinomlar, memenin epitelyum bileşeninden kaynaklanan kanserlerdir. Epitel bileşeni, lobülleri ve terminal kanallarını hizalayan hücrelerden oluşur. Normal koşullar altında, bu epitel hücreleri süt üretmekten sorumludur. Karsinomlar tüm meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Sarkomlar, memenin stromal (bağ dokusu) bileşenlerinden kaynaklanan nadir kanserlerdir. Bu stromal bileşen hücreler miyofibroblastlar ve kan damarı hücrelerini içerir ve bu "destekleyici" hücrelerden kaynaklanan kanserler, filloides tümörleri ve anjiyosarkomu içerir. Sarkomlar, birincil meme kanserlerinin% 1'inden daha azını oluşturur [56].

Büyük karsinom grubu içinde birçok farklı tipte meme kanseri vardır. İlk büyük bölüm *in situ* ve invaziv karsinomadır. *In situ* karsinomu, henüz meme dokusunu işgal etmemiş "pre-invaziv" karsinomdur. Bu *in situ* kanser hücreleri, lobül veya kanalların içinde büyür. *In situ* karsinomun invaziv kanser olma potansiyeli yüksektir ve bu nedenle hastanın invaziv kanser geliştirmesini önlemek için yeterince tedavi edilmesi gerekir. İnvaziv kanserler, normal meme lobüllerinin dışına sızan kanser hücrelerine ve göğüs bağ dokusuna yayılacak kanallara sahiptir. İnvazif karsinomlar, lenf nodları veya diğer organlar gibi vücudun diğer bölgelerine metastaz şeklinde yayılma potansiyeline sahiptir [56]. Şekil 2.13.'de *in situ* karsinom örneği verilmiştir.

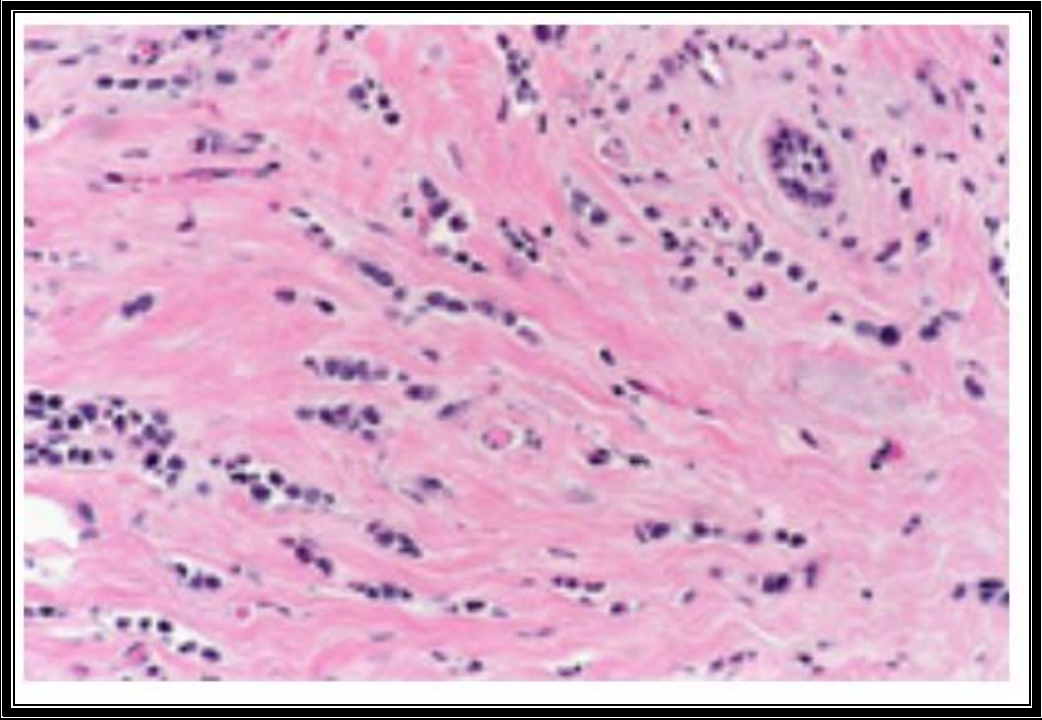


Şekil 2. 13. Duktal karsinoma in situ [56].

Meme karsinomlarının yaklaşık %80'i invaziv duktal karsinomdur ve bunu takiben olguların yaklaşık %10-15'ini oluşturan invaziv lobüler karsinomlardır. İnvazif duktal karsinomlar ve invaziv lobüler karsinomlar farklı patolojik özelliklere sahiptir. Spesifik olarak, lobüler karsinomlar tek tek hücreler halinde, tek bir tabaka halinde düzenlenmiş tek hücreler olarak büyürler ve duktal karsinomlardan ayıran farklı moleküler ve genetik sapmalara sahiptirler. Duktal ve lobüler karsinomlar, belirli kanserin tüm diğer özelliklerine bağlı olarak farklı prognoz ve tedavi seçeneklerine sahip olabilir [56]. Şekil 2.14.'de invaziv duktal karsinoma ve Şekil 2.15.'de invaziv lobüler karsinoma örneği verilmiştir.



Şekil 2. 14. İnvaziv duktal karsinoma [56].



Şekil 2. 15. İnvaziv lobüler karsinoma [56].

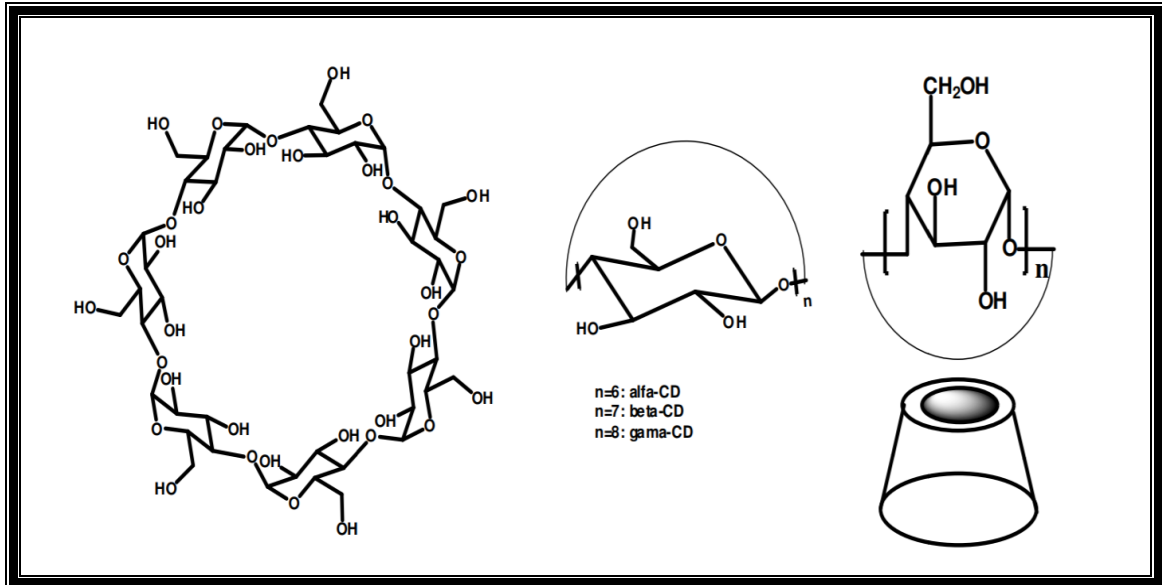
Geriye kalan invaziv karsinom vakaları, farklı patolojik bulgular ile karakterize edilen diğer özel meme kanseri tiplerinden oluşmaktadır. Bu özel tipler arasında

kolloid (müsin), medullar, mikropapiller, papiller ve tübüler bulunur. Bu çeşitli alt tipler arasında ayırım yapmak önemlidir, çünkü farklı prognozları ve tedavi sonuçlarını içerebilirler [56].

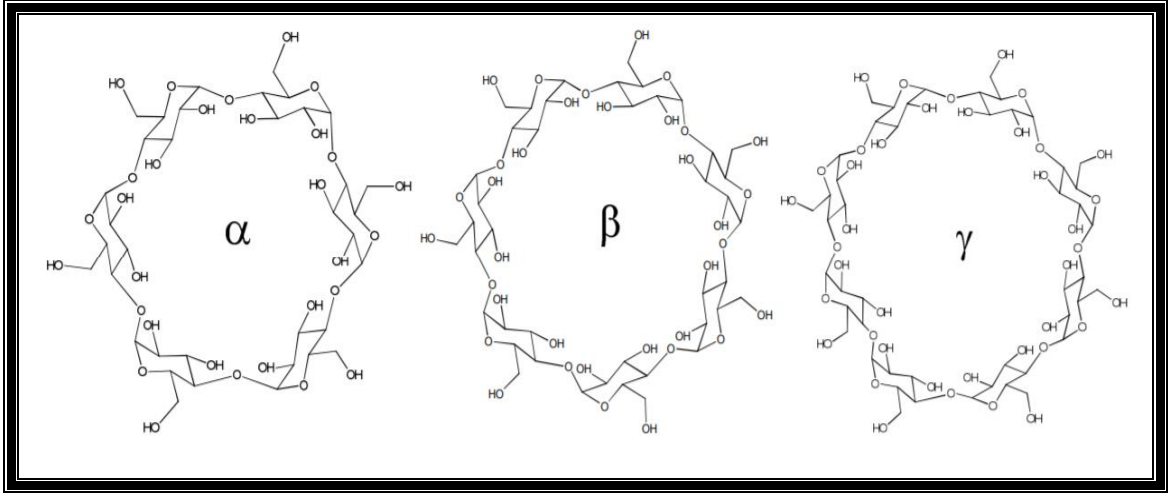
2.9. Siklodekstrin Nanopartiküller

Bir oligosakkarit çeşidi olan siklodekstrinler, nişastanın transglukozilaz enzimi ile parçalanması sonucu elde edilmektedirler [1]. Halka yapıda konik şekle sahip siklodekstrinler; 6, 7, 8 veya daha fazla glukopiranoz yapıtaşının birbirlerine (α -1,4) bağı ile bağlanmasıyla oluşurlar. Altı adet glukopiranoz içerenlere alfa (α), yedi adet içerenlere beta (β) ve sekiz adet içerenlere gama (γ) siklodekstrin adı verilir (Şekil 2.16) [57].

Siklodekstrinler, 1891 yılında Viliers tarafından keşfedilmiş ve "cellulosine" adı verilmiştir. Zamanla, halkalı oligosakkaritler oldukları karakterize edilmiştir. Nişastadan kristalin dekstrinlerin elde edilebildiği görülmüş ve bunlar α ve β siklodekstrinler olarak adlandırılmıştır. 1935 yılında ise γ -siklodekstrin bulunmuştur (Şekil 2.17). İlerleyen yıllarda, X-ışını kristalografisi çalışmalarında siklodekstrinlerin halkalı yapısının içinde farklı organik yapıdaki kimyasal maddeleri barındırabilen inklüzyon kompleksi oluşturabildikleri görülmüştür. Daha sonraları, siklodekstrinlerin molekül ağırlıkları tespit edilmiş ve 1961 yılında daha fazla glukopiranoz yapıtaşına sahip siklodekstrinler bulunmuştur [58].



Şekil 2. 16. Siklodekstrinin yapısı.

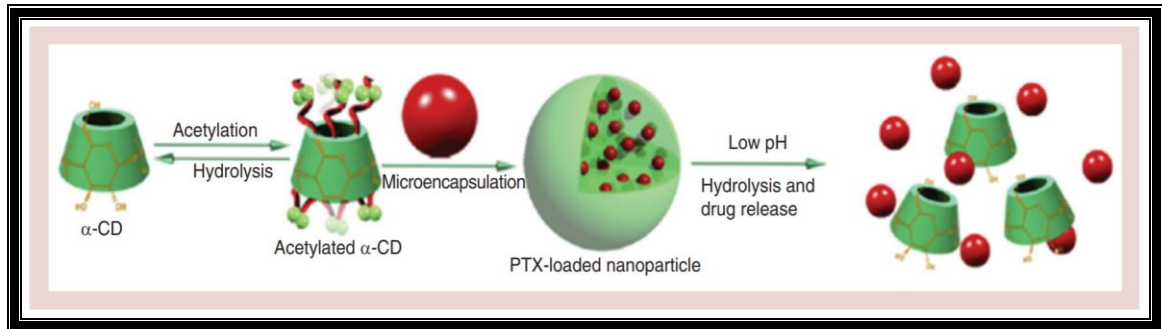


Şekil 2. 17. α , β , γ siklodekstrinlerin kimyasal yapıları.

2.10. Siklodekstrin Nanopartiküllerin Kanser Tedavisi Alanında Kullanımı

Siklodekstrinler son on yılda ilaç alanında devrim yaratmışlardır [59]. Doğal ve modifiye edilmiş siklodekstrinler (α -siklodekstrin ve β -siklodekstrin) üzerinde çalışılmış ve bazıları ABD Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi) onayı kazanmış veya “Genel olarak Güvenli” statüsü kazanmıştır. Siklodekstrinlerin bir başka özelliği, ilaç dağıtımında kullanımı için supramoleküler yapılar oluşturmak üzere indüklenebilmeleridir [60]. Polimerler ile aşılınmış veya çapraz bağlanmış siklodekstrinler, özellikle hidrofobik ilaçlar için etkili hedefli ilaç verme için akıllı sistemlerle geliştirilmektedir. Amfifilik siklodekstrinler, basit bir nanopresipitasyon tekniği ile nanokürecikler veya nanokapsüller oluşturma yeteneğine sahiptir [61].

pH tetiklemeyle hızlandırılmış asetile α -siklodekstrin nanopartikülat ilaç dağıtım sistemi antikanser ilaç Paclitaxel’in hedeflendirilmesi için çalışılmış ve hem in vitro hem de in vivo olarak çalışılan diğer sistemlerden daha iyi yükleme kapasitesine sahip olduğu kanıtlanmış [62] ve Şekil 2.18’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 18. Paclitaxel için pH duyarlı asetalatlı α -siklodekstrin nanopartikülat ilaç taşıyıcı sistem [61].

Önemli bir antikanser ilacı olan Docetaxel; prostat, meme ve akciğer kanserleri tedavisinde kullanılan ancak intravenöz dozaj formülasyonu konusunda zorluklarla karşılaşılan bir ilaçtır. (2-O-oligo- [etilen oksit] -6- hexadecylthio) - β -siklodekstrin (SC16OH) amfifilik siklodekstrin sistemi Docetaxel'in kapsüllenmesi için geliştirilmiştir. Hep-2 hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, Docetaxel yüklü nanopartiküllerin boş Docetaxel ile karşılaştırıldığında kontrollü ve uzun dönemli salınım sağlaması sebebiyle daha yüksek oranda hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür [63].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında amaç, daha önceden üretilmiş farklı kimyasal yapılara ve yüzey yüklerine sahip amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki mekanizmasının metabolomik çalışmalar sonucu gerçekleştirilecek farklı biyoenformatik yaklaşımlarla tespit edilmesidir. Daha önceki çalışmalarda kanser ilaçları yüklenmiş siklodekstrin nanopartiküllerin kanser hücresi çoğalmasını önleyici etkileri incelenirken bu etki üzerinde nanopartiküllerin katkısı göz ardı edilmiştir ve sadece taşıyıcı sistem olarak katkı sağladığı düşünülmüştür. Ancak 2014 yılında sunulan bir bildiri [64] Paclitaxel yüklü nanopartiküllerin tek başına da hücre üzerinde çoğalmayı önleyici etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Tez çalışmasında bu etkinin metabolomik çalışmalarla moleküler düzeyde ortaya çıkarılması planlanmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde çalışma yöntemleri kısmında da söz edildiği üzere tezin asıl amacı çerçevesinde farklı biyoenformatik yaklaşımlardan yararlanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar Microsoft Excel programı üzerine aktarılmış piklerin alıkonma zamanı, kütle/yük oranları, pik alanları değerleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Siklodekstrin nanopartiküllerin etkisiyle oluşan sitotoksik aktivite sonucu T ve C grupları için miktarlarında farklılaşma olan metabolitlerin tespitinde, metabolit piki olduğuna karar verilmiş olan her bir pik için pik alanı değerleri bütün tanımlanan metabolitlerin toplam pik alanı değerlerine bölünerek standardizasyon yapılmıştır. Ayrıca çeşitli iç standartlar (metabolit standartları) kullanılarak cihazdan gelen sapmalar da önlenmiştir. Her bir grup için 6 analiz içerisinde %95 güven seviyesinde standardize edilmiş pik alanı değeri aynı olan metabolitler T ve C grupları için karşılaştırılmıştır. Bu amaçla pik alanı değerlerinin ortalaması T ve C grupları için karşılaştırılarak en az 2 kat farklılaşmış metabolitler ortaya çıkarılmıştır.

Metabolomik çalışmalarda yazılım ve veribankası desteği kaçınılmazdır. Yaklaşık 40.000 adet metabolitten hangilerinin miktarının sitotoksik etki sonucu arttığı ve azaldığının saptanabilmesi için ileri analitik teknikler (LC-MS) ve bu teknikler sonrası elde edilen verinin işlenmesinde farklı biyoenformatik yaklaşımlar ortaya konulmuştur. Metabolit profillemesi sonucu T ve C grupları için farklılaşan en yüksek miktarda metabolit teşhis edilmiştir. Elde edilen veriler siklodekstrin

nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılmıştır.

Metabolik yolak analizleri gerçekleştirmek için ise miktarı 2 kat farklılaşmış ve istatistiksel olarak anlamlı piklere ait eşleşen metabolitler MetaboAnalyst ve Reactome veri tabanlarına girilerek bu metabolitlerin eşleştiği metabolik yollar bulunmaya çalışılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan siklodekstrin nanopartikül F1 olarak kodlanmıştır. İlgili siklodekstrin nanopartikül, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Erem Bilensoy'un yönetiminde Dr. Gamze Varan tarafından hazırlanmıştır. Siklodekstrin nanopartikülün MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulanması Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Ayşe Ercan yönetiminde Araş. Gör. Dr. Selin Öncül tarafından gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonucu C grubu yani siklodekstrin nanopartikül uygulanmamış grup ve siklodekstrin nanopartikül uygulanmış gruptan (T Grubu) elde edilmesi gereken sitozolik fraksiyonlar da yine aynı grup tarafından hazırlanmıştır. Elde edilen sitozolik fraksiyonlar, Hacettepe Üniversitesi İlaç ve Kozmetik AR-GE ve Kalite Kontrol Laboratuvarı (HÜNİKAL) bünyesinde bulunan LC-Q-TOF-MS ile analiz edilmiş ve analiz sonucu elde edilen ham veri bu tez çalışması kapsamında farklı biyoenformatik yaklaşımlarla veri işleme ve yorumlama süreçlerine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar F1 kodlu siklodekstrin nanopartikülün MDA-MB-231 meme kanseri üzerine uygulanması sonucu, metabolom düzeyindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bu tez çalışması "Sistem Biyolojisi Yaklaşımıyla Siklodekstrin Nanopartiküllerin MCF7 Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli Doç. Dr. Mustafa Çelebier'in yürütücüsü olduğu TÜBİTAK 115S456 Nolu 1001 projesi ile desteklenmiştir.

3.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 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
Amicon Ultrafiltrasyon Kartuşu (3 kDa)	Merck	Metabolit ekstraksiyonu
Formik Asit (LC-MS Grade)	Sigma	LC-MS hareketli faz tamponu hazırlama
Amonyum Format (LC-MS Grade)	Sigma	LC-MS hareketli faz tamponu hazırlama
Amonyum Asetat (LC-MS Grade)		
G1969-85000 ESI-TOF Tuning Mix	Agilent	MS tune çözeltisi

Çizelge 3. 2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.

Cihaz, Yazılım ve Sarf Malzemeleri	Marka	Kullanım Amacı
Q-TOF/MS	Agilent 6530	Metabolit profillemeye, hedeflenmiş metabolomik
UPLC	Agilent 1260 Infinity	Metabolit profillemeye, hedeflenmiş metabolomik

Mass Hunter	Agilent	LC-Q-TOF-MS kontrol yazılımı
XCMS	Ücretsiz Yazılım	Metabolit eşleştirme ve profilleme
ProteoWizard	Ücretsiz Yazılım	MS dosya uzantısı dönüştürücü
'R' istatistik programı	Ücretsiz Yazılım	XCMS programının çalışması için kullanılan yazılım
Vakum santrifüj	Labconco Refrigerated CentriVap Concentrator	Numune ve çözeltilerin uçurulması
Zorbax HILIC Plus (2.1 x 50 mm, 1.8-Micron)	Agilent	HPLC Kolonu
X Select C18 (4.6 x 100 mm, 3.5-Micron)	Waters	HPLC Kolonu

3.1.4. LC-Q-TOF-MS Analizlerinde Uygulanan Metodoloji

Çalışmalar, Agilent 1260 Infinity Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) ve Agilent 6530 Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF/MS) cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Firmanın "Agilent MassHunter" isimli ticari yazılımı kullanılmıştır. 1260 Infinity UPLC sistemi, otomatik pompalı ve otomatik enjektörlü bir sistemdir. Yazılım aracılığıyla kolon fırını sıcaklığı kontrol edilebilmektedir. UPLC sistemi, kütle spektrometre cihazı ile bağlantıyı elektrosprey iyonlaştırıcı (ESI) başlığı aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Sistem kurutucu gaz olarak azot gazını kullanmaktadır, bu sebepten cihaza bağlı bir azot jeneratörü mevcuttur. LC-Q-TOF-MS sistemi için gerekli vakum ortamının sağlanabilmesi için ön vakum cihazı (kaba vakum) ve yüksek vakum için ikinci bir vakum sistemi kullanılmaktadır.

- 1) Analiz için yapılan ilk işlem gerekli kimyasalların ve çözeltilerin hazırlanmasıdır. Sıvı kromatografisi hareketli fazı olarak asetonitril ve 10 mM pH 5 amonyum asetat tamponu kullanılmıştır. 77.08 mg amonyum asetat içeren çözelti 1 litreye tamamlanmış ve fosforik asit kullanılarak çözeltinin pH'ı 5 olarak ayarlanmıştır. LC-Q-TOF-MS cihazı için referans ve kalibrasyon çözeltileri Agilent firmasından temin edilmiştir.
- 2) LC-Q-TOF-MS cihazı, her açılışında bir saat kadar hareketli faz geçişi ile yıkamaya bırakılmıştır. Süre sonunda cihazın vakum, kurutucu gaz ve kapiler voltajı değerleri kontrol edilerek cihazın kütle analizörünü kalibre ettiği 'autotune' işlemi denilen basamağa geçilmiştir. Cihaz "autotune" işleminde firmadan temin edilen tune çözeltisine göre kendisini otomatik olarak kalibre etmekte ve kalibrasyon değerlerini veren "Tune Raporu" isimli bir dosya oluşturmaktadır. Bu değerlerin 0.1 ppm'lik sapmanın altında olması durumunda cihazın kalibrasyonunun başarılı olduğu kabul edilir.
- 3) Daha sonra, kullanılacak Zorbax HILIC Plus kolon takılarak 1 saat kadar hareketli faz geçirilir. Çizelge 3.3.'de cihaz parametreleri verilmiştir.
- 4) Enjeksiyonlar iki tekrarlı olarak yapılmıştır. 25 dakikalık bir analiz süresiyle %10 asetonitril ile başlayıp, 13. dakikada %90 asetonitril oranına ulaşan, daha sonra 20. dakikada başlangıç koşullarına dönen ve 5 dakikalık "post-run" süresi içeren bir gradient programı kullanılmıştır.
- 5) Örnekler aynı anda hazırlanmış ve analiz sırasından kaynaklı varyasyonların önüne geçmek amacıyla karışık sıralamada enjeksiyonu yapılmıştır.

Çizelge 3. 3. LC-Q-TOF-MSparametreleri.

Kolon	Zorbax HILIC Plus
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

Kapiler Voltajı	4000 V
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Akış Hızı	0.2 mL/dakika

4. DENEYSEL

4.1. Ham Veri Dosyası Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları için MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ticari olarak temin edilmiştir. “Gereç ve Yöntem Bölümü’nde” söz edildiği üzere daha önceden üretilmiş siklodekstrin nanopartiküllerden F1 kodlu olanı, hücre kültürü ortamında çoğaltılan MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. Bu çalışma sonrasında çoğalmada (proliferasyonda) azalmanın gözlemlendiği grup işlenmiş grup olarak (T Grubu) tanımlanmıştır. İşlenmiş grup (T Grubu) ile hiçbir şekilde işlem görmemiş kontrol grubuna (C Grubu) ait hücre hatları üzerinde metabolomik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Metabolomik çalışmalar için kaynaklardaki yöntemde belirtildiği şekilde ultrasantrifüj tekniği ile filtrelenerek metabolit çözeltileri hazırlanmıştır. Numuneler, “Gereç ve Yöntem Bölümü’nde” altında belirtildiği şekilde LC-Q-TOF-MS ile analiz edilmiştir [65]. Daha sonrasında optimum sayıda farklılaştığı tespit edilen metabolit piki farklı biyoenformatik yaklaşımlardan yararlanılarak profillenmeye çalışılmıştır [3].

LC-Q-TOF-MS cihazından elde edilen ham veri (6’şar adet T ve C grubu analiz sonuçları) sırasıyla XCMS CentWave ve MatchedFilter metabolit profillemeye programları ile analiz edilerek metabolitlere ait pikler tanımlanmaya çalışılmıştır (Şekil 4.1.).

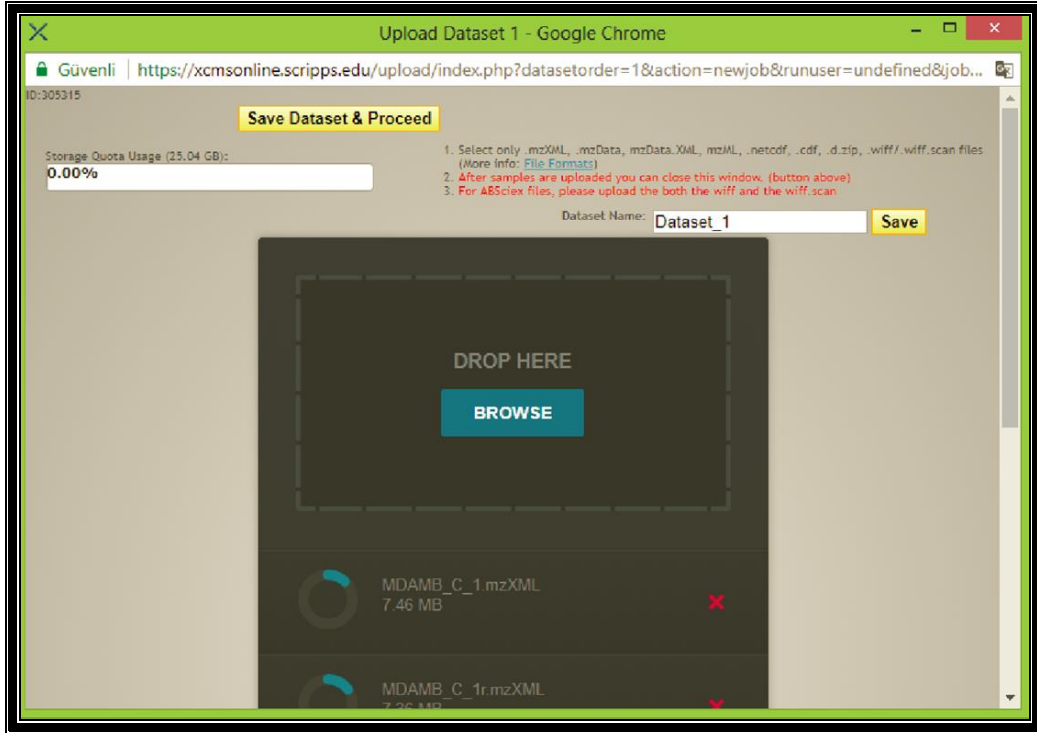


Şekil 4. 1. XCMS arayüzü.

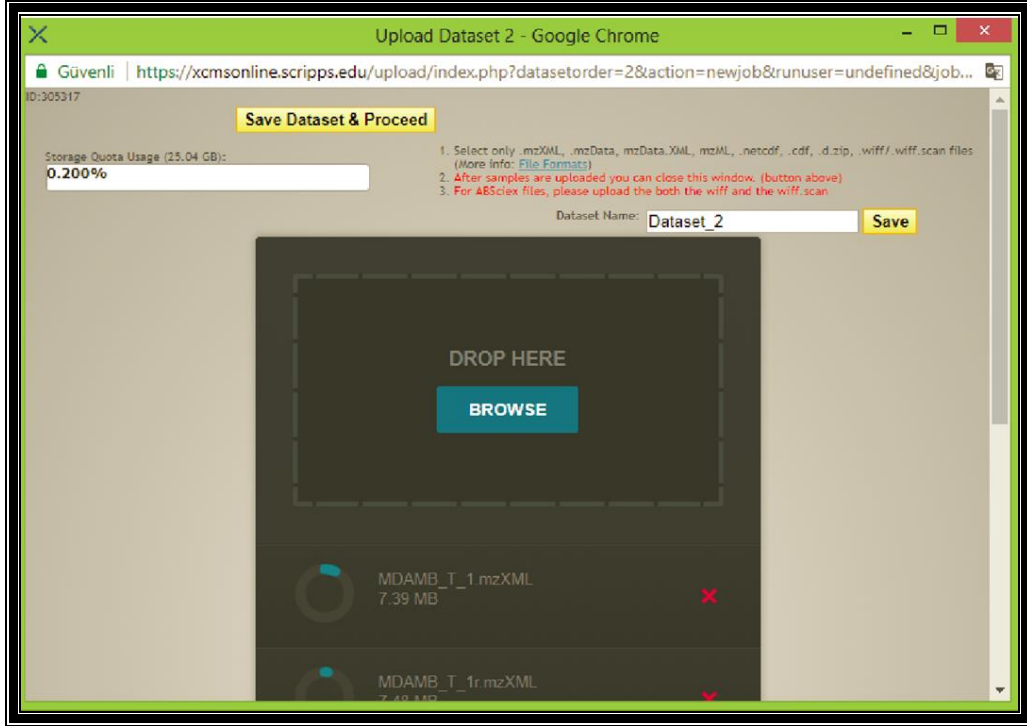
Analiz işlemi sırasında kullanılan her bir algoritma için farklı parametreler denenmiştir (örneğin pik genişliği, pik yüksekliği, kütle/yük oranına ait standart sapma vb.) ve T ve C grupları için farklılaştığı tespit edilen olası metabolit pikleri tespit edilmiştir.

4.1.1. CentWave Algoritması

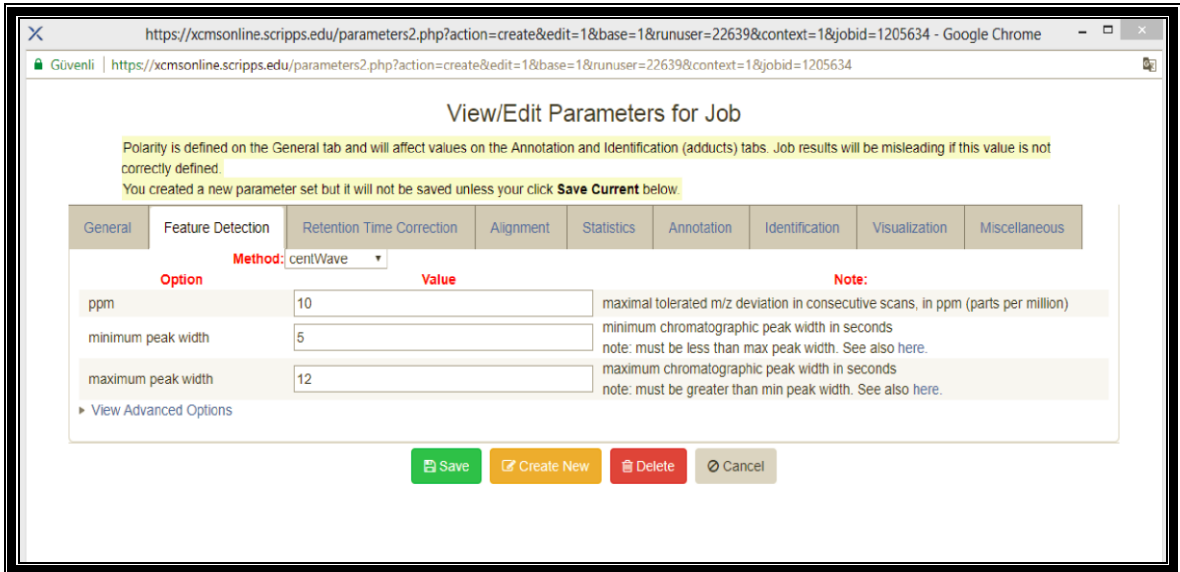
T ve C grubu için veri setlerinin XCMS üzerinde CentWave algoritması ile analiz edilmesi amacıyla "Create Job" ana menüsü üzerinden T ve C grubu veri setleri XCMS'e eklenmiş (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.), parametre değerleri ppm değeri için 10, minimum pik genişliği için 5 ve maksimum pik genişliği için 12 olarak girilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 2. CentWave C grubu veri seti girişi.

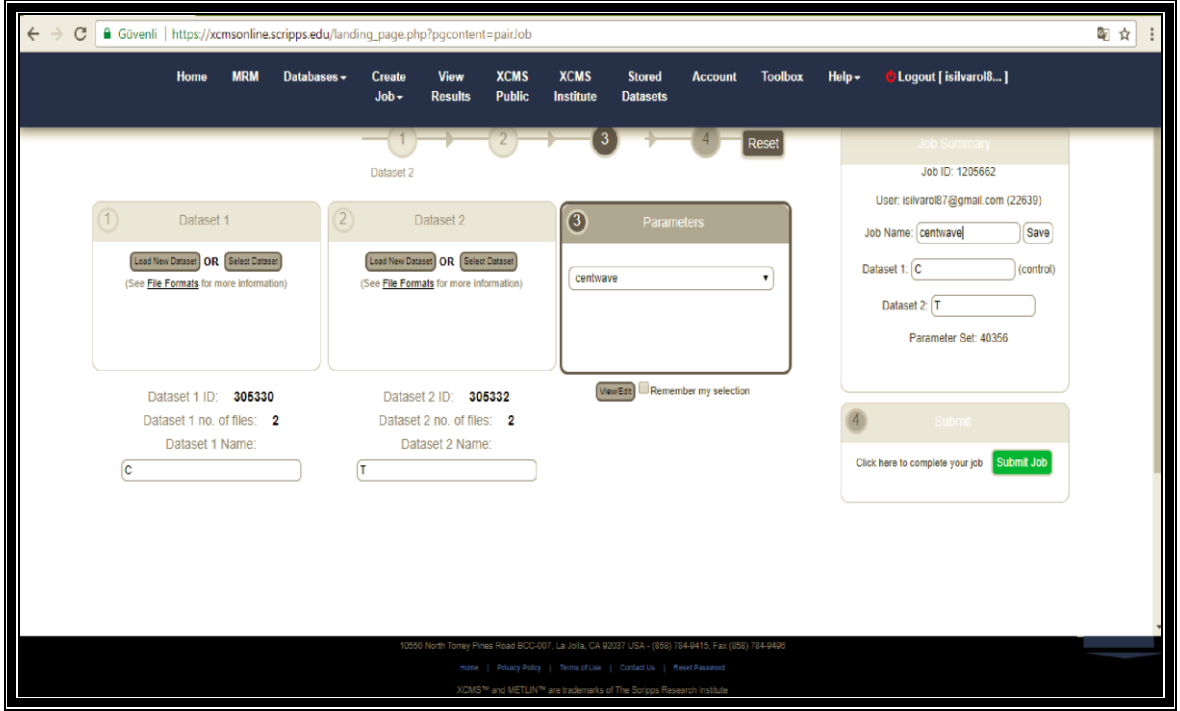


Şekil 4. 3. CentWave T grubu veri seti girişi.



Şekil 4. 4. CentWave algoritması için parametre girişi.

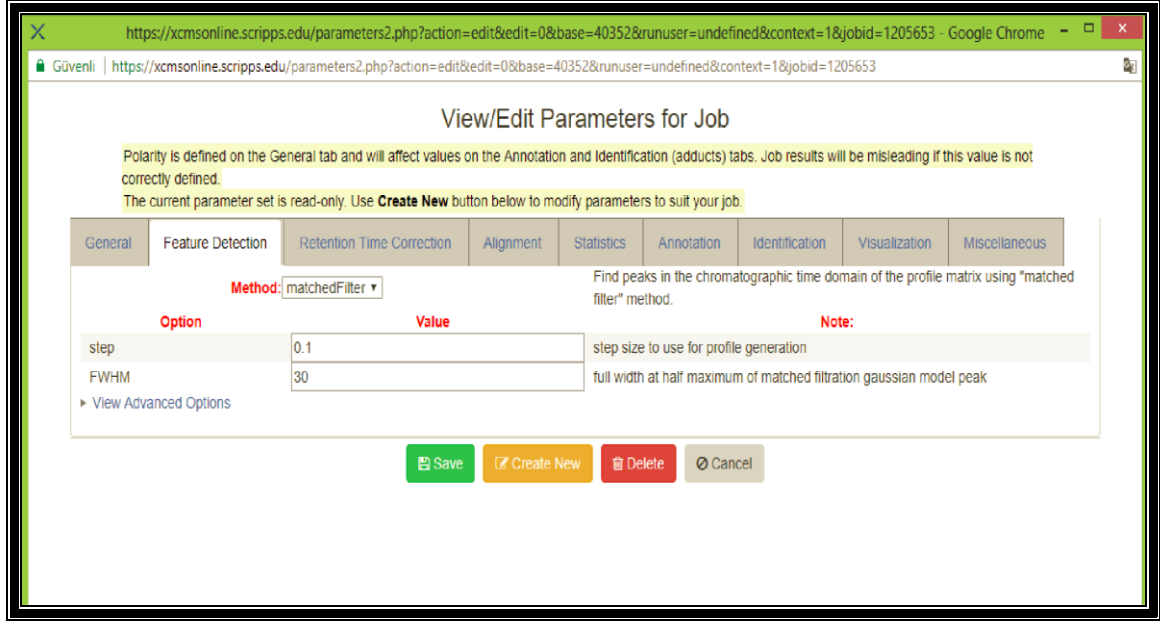
Şekil 4.5.'de görüldüğü üzere XCMS'e yüklenen T ve C grubu veri setleri seçilen parametrelerle CentWave algoritması ile analiz sonuçlarının alınması için iş girişi yapılmıştır.



Şekil 4. 5. CentWave algoritması için iş girişi.

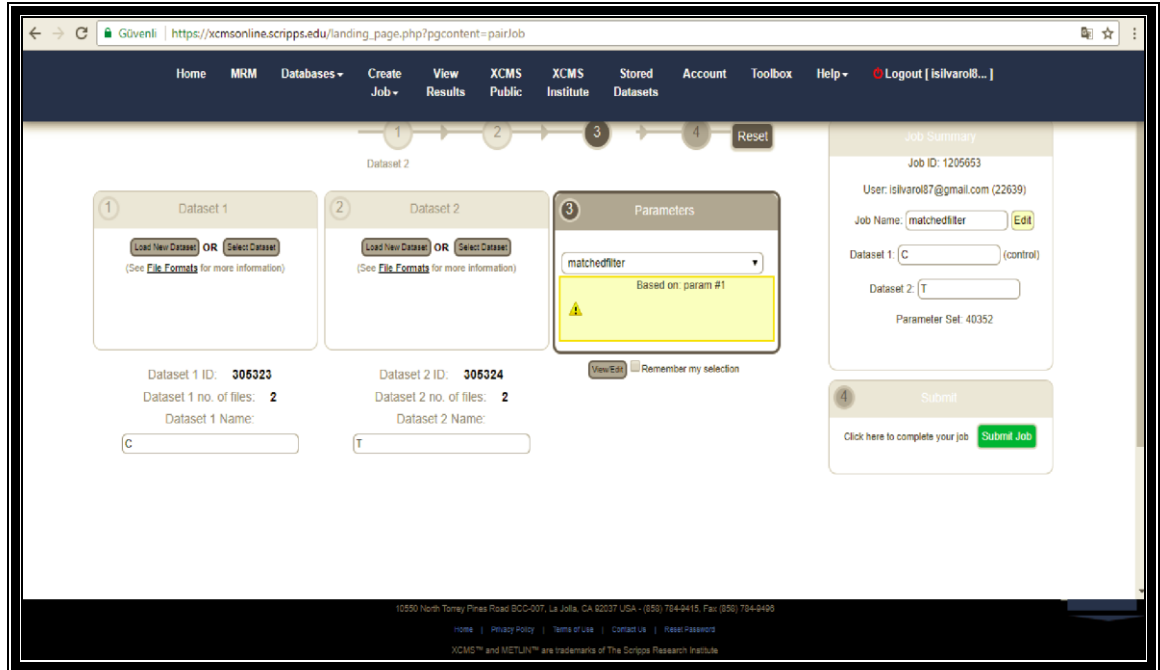
4.1.2. MatchedFilter Algoritması

T ve C grubu için veri setlerinin XCMS üzerinde MatchedFilter algoritması ile analiz edilmesi amacıyla "Create Job" ana menüsü üzerinden T ve C grubu veri setleri XCMS'e eklenmiş, parametre değerleri step değeri için 0.1 ve "pik yarı yüksekliğindeki pik genişliğini" ifade eden FWHM (full width at half maximum) değeri için 30 olarak girilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. MatchedFilter algoritması için parametre girişi.

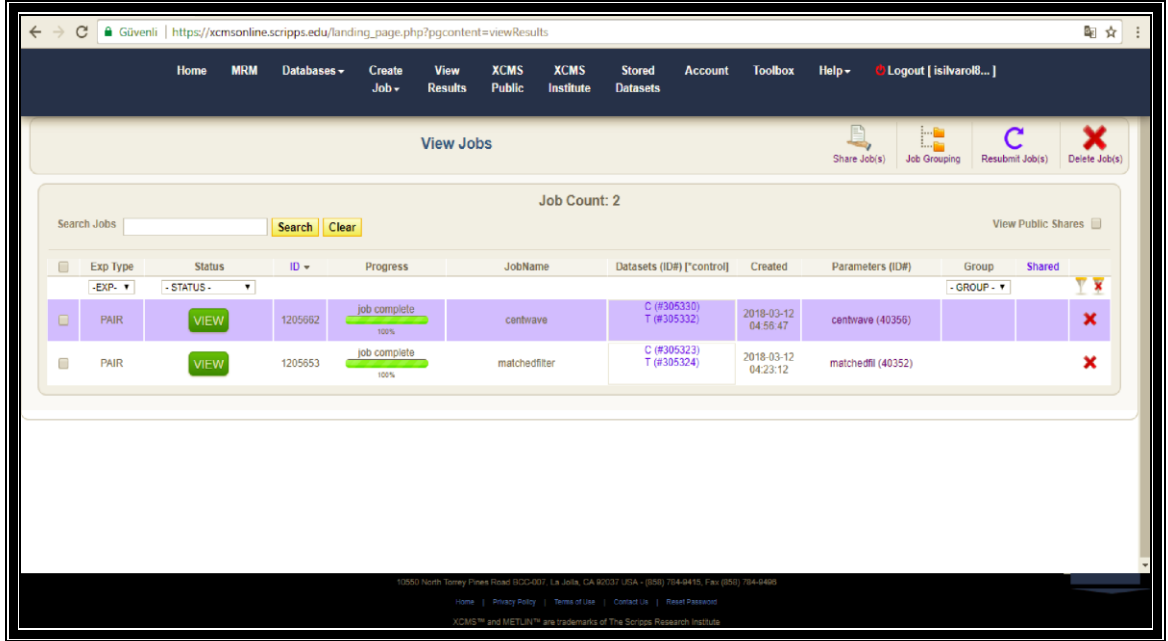
Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere XCMS'e yüklenen T ve C grubu veri setleri seçilen parametrelerle MatchedFilter algoritması ile analiz sonuçlarının alınması için iş girişi yapılmıştır.



Şekil 4. 7. MatchedFilter algoritması için iş girişi.

4.2. CentWave ve MatchedFilter Algoritma Analiz Sonuçlarının Görüntülenmesi

Veri setlerinin CentWave ve MatchedFilter analizleri için başlatılan işler çevrimiçi olarak sıraya alınmaktadır. İşin durumu “View Results” ana menü üzerinden görüntülenebilmekte olup başarılı olarak tamamlanan analizlerin sonucu her bir algoritma için Şekil 4.8.’de “View” sekmelerinden görüntülenmiştir.



The screenshot displays the XCMSonline web interface for viewing job results. The page title is "View Jobs" and the job count is 2. The interface includes a search bar, a table of job results, and a footer with contact information.

Exp Type	Status	ID	Progress	JobName	Datasets (ID#) [control]	Created	Parameters (ID#)	Group	Shared
PAIR	VIEW	1205662	job complete 100%	centwave	C (#305330) T (#305332)	2018-03-12 04:56:47	centwave (40356)		
PAIR	VIEW	1205653	job complete 100%	matchedfilter	C (#305323) T (#305324)	2018-03-12 04:23:12	matchedfil (40352)		

Şekil 4. 8. CentWave ve MatchedFilter algoritmaları için analiz sonuçlarının görüntülenmesi.

5. SONUÇLAR

5.1. Filtrasyon ve Pik Tanımlama

XCMS üzerinde CentWave algoritması ile yapılan analiz sonucunda 2758 pik elde edilirken MatchedFilter algoritması ile yapılan analiz sonucunda 208 pik elde edilmiştir. “mzmed, mzmin, mzmax ve rtmed, rtmin, rtmax” denilen ve XCMS tarafından bulunan değerler vardır. Bu değerlerden mzmed, mzmin ve mzmax; C ve T grubu için kromatogramlarda herhangi bir pike ait bulunmuş olan, daha doğrusu cihaz tarafından gözlenmiş olan en ortanca, en küçük ve en büyük kütle/yük yani m/z değerlerini temsil eder. rtmed, rtmin, rtmax ise aynı pik için alıkonma zamanlarındaki ortanca, en küçük ve en büyük bulunan değerleri ifade eder. Her iki algoritmada bileşenlerin mzmed, mzmin, mzmax ve rtmed, rtmin, rtmax değerleri aynı kalacağı için (çünkü en nihayetinde ham veri ortaktır), bu değerler baz alınarak CentWave ve MatchedFilter algoritmalarının ham verileri üzerindeki pikler kesiştirildiğinde 197 pikin her iki algoritmada ortak olduğu görülmüştür. 197 pikin 37 adedinin değişimi bir algoritmada azalan; ancak diğer algoritmada artan yönde olması sebebiyle değerlendirmeye alınmamış, geriye kalan her iki algoritmada ortak görülen 160 pik üzerinden analizlere devam edilmiştir. Bu da demektir ki; CentWave algoritması ile 2758 pik bulunduğu halde ancak bunun 160 tanesi MatchedFilter algoritması ile ortak sonuçları ifade etmektedir. Bu tez çalışmasında 160 pikin temel alınarak çalışmaya devam edilmesinin sebebi, her iki algoritmanın da hatalı bulmuş olduğu yani pik olduğunu düşündüğü ancak pik olmayan şekillerin baştan çıkarılarak gerçekten pik olan ve metabolit piki olan kromatogramdaki sinyaller üzerinden yol devam etmektir.

CentWave algoritması analizi sonucunda elde edilen veriler için anlamlılık düzeyini ifade eden p değeri 0.05'ten düşük 1321 pik bulunmaktadır. MatchedFilter algoritması sonucu elde edilen veriler için ise 143 adet p değeri 0.05'ten düşük pik bulunmaktadır. Bu da demektir ki; pik olarak tanımlanan şekillerden CentWave için %48.9'u, MatchedFilter için ise %72.5'i istatistiksel anlamda anlamlıdır. Yani gerçekten pik olduğu düşünülen ve analizler arası varyasyona uğramamış pik sayısı MatchedFilter algoritması için daha yüksektir.

CentWave ve MatchedFilter algoritmalarında elde edilen 160 ortak pik üzerinde p değeri 0.05'ten küçük yani istatistiksel olarak anlamlı olanlar incelendiğinde ortak piklerin sayısı 71'e inmiştir. Bu 71 adet pik üzerinden CentWave ve MatchedFilter

için her iki analizde de “fold değeri (değişim katsayısı)” 0.5’ten küçük veya eşit ortak 1 adet pik bulunmaktadır. “Fold değeri (değişim katsayısı)” 2 ve 2’den büyük değerler incelendiğinde her iki algoritma için ortak 14 pik elde edilmiştir. Sonuç olarak her iki algoritmanın ortak bileşeni olan ve F1 kodlu siklodekstirin nanopartikülün etkisiyle T grubunda azalan 14 pik ve T grubunda artan 1 pik olmak üzere toplam 15 pike ait liste Çizelge 5.1.’de sunulmuştur.

Tespit edilen 15 pikin (14 tanesi artan, 1 tanesi azalan), XCMS üzerinde pik şekilleri gözden geçirildiğinde gerçek anlamda pik olduğu düşünülen ve her iki algoritmada ortak olan 6 pik görülmüştür. Bu 6 pik de T grubunda azalma göstermektedir (Çizelge 5.2.). T grubunda artan değer gösteren pikin, pik şeklinin gerçek bir pik olmadığı anlaşılmıştır.

Özet olarak; CentWave algoritması analizi sonucu p değeri 0.05’ten düşük ve fold değeri 0,5’ten küçük 295 ve fold değeri 2’den büyük 180 adet pik bileşen varken yine MatchedFilter algoritması için de sırasıyla 17 ve 2 adet pik bulunmaktadır. Bu piklerden sadece 6 tanesi, pik şekilleri incelendiğinde gerçek bir pike benzemektedir. Dolayısıyla sadece 6 adet C grubunda azalan pik tespit edilebilmiştir. İlgili sayılar her iki algoritmanın da çizelge üzerinden birbirlerine göre avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılabilmesi amacıyla Çizelge 5.3.’de sunulmuştur.

Çizelge 5. 1. CentWave ve MatchedFilter ortak pikler.

Algoritma	Fold (Değişim Katsayısı)	p Değeri	mzmed	rtmed	İntensite	C Grubu Pik Alanı	T Grubu Pik alanı	Pik Kodu
CentWave	24,99	3,63775E-06	118,0869	8,96	39150,461	603545,035	24154,504	M118T9
MatchedFilter	26,11	1,40376E-08	118,0869	8,96	39150,461	631004,420	24165,028	M118T9
CentWave	2,35	2,77746E-06	123,0560	10,63	41024,926	445987,260	189457,614	M123T11
MatchedFilter	2,53	3,62123E-10	123,0561	10,68	41024,926	604916,577	239188,854	M123T11
CentWave	26,79	4,21885E-15	140,0687	8,96	45357,738	721700,433	26934,661	M140T9
MatchedFilter	23,44	2,89657E-12	140,0687	8,97	45357,738	726879,647	31003,819	M140T9
CentWave	0,01	9,86854E-04	191,0412	8,57	9838,907	0,000	95297,888	M191T9
MatchedFilter	0,41	3,55182E-05	191,0412	8,67	9838,907	0,000	138251,908	M191T9
CentWave	3,41	3,50102E-06	195,0036	9,61	16354,289	125827,311	36931,315	M195T10
MatchedFilter	3,22	1,45759E-10	195,0035	9,54	16354,289	203321,059	63120,538	M195T10
CentWave	11,66	1,95388E-06	203,0536	2,23	11118,447	136148,316	11681,344	M203T2_1
MatchedFilter	11,92	2,05098E-06	203,0537	2,20	11118,447	185465,173	15563,735	M203T2
CentWave	6,87	2,83517E-04	216,0644	9,60	12458,429	67954,666	9886,948	M216T10
MatchedFilter	8,37	3,32093E-08	216,0642	9,55	12458,429	99443,211	11885,352	M216T10
CentWave	21,16	6,72410E-07	218,2118	1,12	29651,678	212716,938	10053,465	M218T1_3
MatchedFilter	11,63	6,65246E-07	218,2096	1,12	29651,678	227794,411	19582,746	M218T1

CentWave	4,51	1,20405E-04	253,1019	1,18	123434,305	545764,558	121060,762	M253T1
MatchedFilter	4,61	2,86878E-05	253,1020	1,17	123434,305	640042,618	138806,637	M253T1
CentWave	2,70	1,88550E-06	260,0283	9,61	26670,236	217222,748	80538,837	M260T10
MatchedFilter	2,53	4,73938E-10	260,0282	9,54	26670,236	353200,870	139652,725	M260T10
CentWave	2,59	1,06470E-07	428,0397	10,63	22999,977	245950,729	94788,217	M428T11
MatchedFilter	2,72	5,72911E-10	428,0413	10,67	22999,977	318395,537	117120,781	M428T11
CentWave	3,37	2,40E-05	613,1627	10,74	66164,250	714934,294	211858,233	M613T11
MatchedFilter	2,75	1,43517E-06	613,1623	10,60	72676,063	1647497,871	598967,332	M613T11
CentWave	2,77	1,01524E-03	614,1652	10,49	18576,010	201302,293	72666,310	M614T10
MatchedFilter	2,77	1,59857E-06	614,1649	10,62	18576,010	429601,888	155110,110	M614T11
CentWave	3,25	5,18881E-08	664,1201	10,63	143240,906	1516772,760	467388,466	M664T11
MatchedFilter	3,08	3,77290E-08	664,1200	10,68	143240,906	1798806,219	583968,434	M664T11
CentWave	3,09	5,03137E-06	665,1228	10,63	36441,105	400403,223	129446,115	M665T11_1
MatchedFilter	3,02	1,84799E-08	665,1226	10,67	36441,105	457710,697	151661,620	M665T11

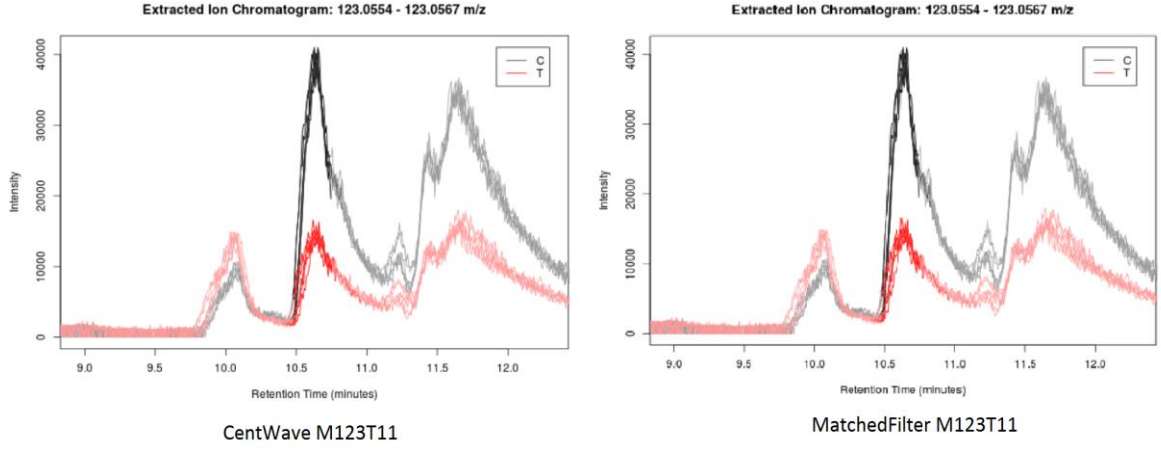
Çizelge 5. 2. CentWave ve MatchedFilter pik şekillerine göre ortak pikler.

Algoritma	Fold (Değişim Katsayısı)	p Değeri	mzmed	rtmed	İntensite	C Grubu Pik Alanı	T Grubu Pik Alanı	Pik Kodu
CentWave	2,35	2,77746E-06	123,0560	10,63	41024,926	445987,260	189457,614	M123T11
MatchedFilter	2,53	3,62123E-10	123,0561	10,68	41024,926	604916,577	239188,854	M123T11
CentWave	21,16	6,72410E-07	218,2118	1,12	29651,678	212716,938	10053,465	M218T1_3
MatchedFilter	11,63	6,65246E-07	218,2096	1,12	29651,678	227794,411	19582,746	M218T1
CentWave	4,51	1,20405E-04	253,1019	1,18	123434,305	545764,558	121060,762	M253T1
MatchedFilter	4,61	2,86878E-05	253,1020	1,17	123434,305	640042,618	138806,637	M253T1
CentWave	2,59	1,06470E-07	428,0397	10,63	22999,977	245950,729	94788,217	M428T11
MatchedFilter	2,72	5,72911E-10	428,0413	10,67	22999,977	318395,537	117120,781	M428T11
CentWave	3,25	5,18881E-08	664,1201	10,63	143240,906	1516772,760	467388,466	M664T11
MatchedFilter	3,08	3,77290E-08	664,1200	10,68	143240,906	1798806,219	583968,434	M664T11
CentWave	3,09	5,03137E-06	665,1228	10,63	36441,105	400403,223	129446,115	M665T11_1
MatchedFilter	3,02	1,84799E-08	665,1226	10,67	36441,105	457710,697	151661,620	M665T11

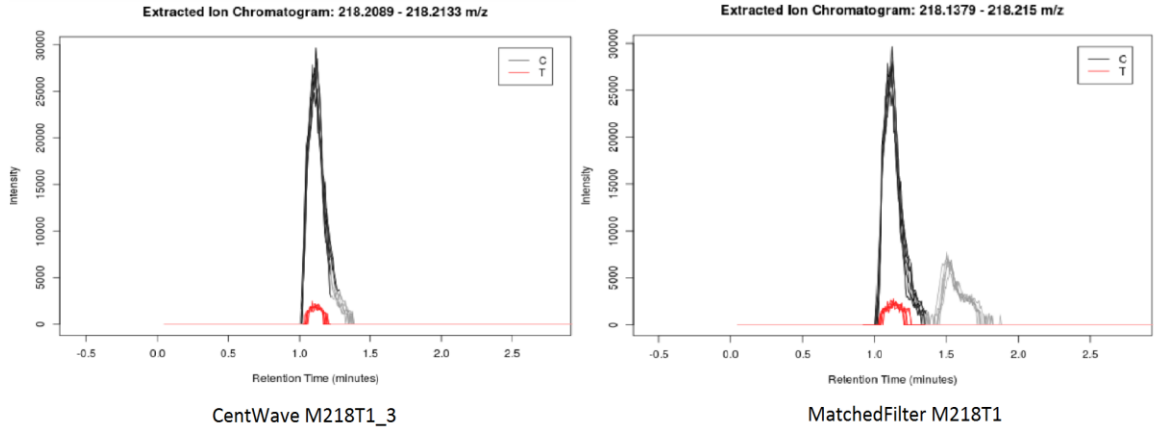
Çizelge 5. 3. CentWave ve MatchedFilter özet sonuçlar.

	CentWave	CentWave ve MatchedFilter	MatchedFilter
Ham Veri	2758	197	208
p < 0.05	1321	71	143
p < 0.05 ve fold ≤ 0.5	295	14	17
p < 0.05 ve fold ≥ 2	180	1	2
p < 0.05 ve fold ≤ 0.5 değerleri üzerinden gerçek pikler	7	6	6

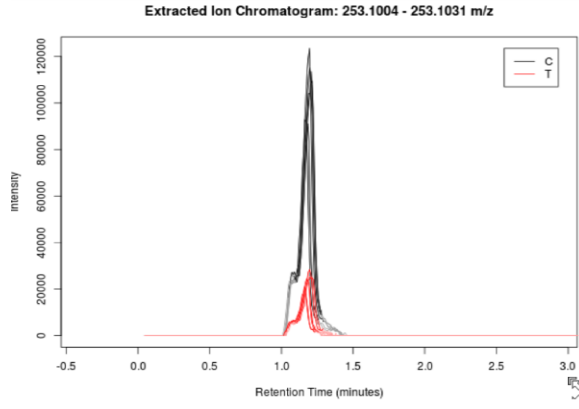
CentWave ve MatchedFilter algoritmaları kullanılarak XCMS üzerinde yapılan analizde C grubuna göre azalma gösteren pikler M123T11 (Şekil 5.1.), M218T1_3 ve M218T1 (Şekil 5.2.), M253T1 (Şekil 5.3.), M428T11 (Şekil 5.4.), M664T11 (Şekil 5.5.), M665T11_1 ve M665T11 (Şekil 5.6.) olmuştur.



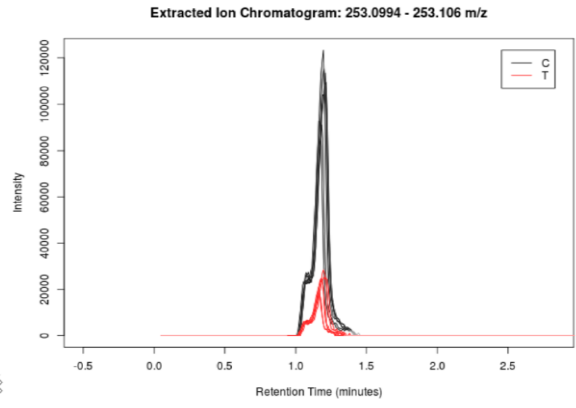
Şekil 5. 1. CentWave M123T11 ve MatchedFilter M123T11.



Şekil 5. 2. CentWave M218T1_3 ve MatchedFilter M218T1.

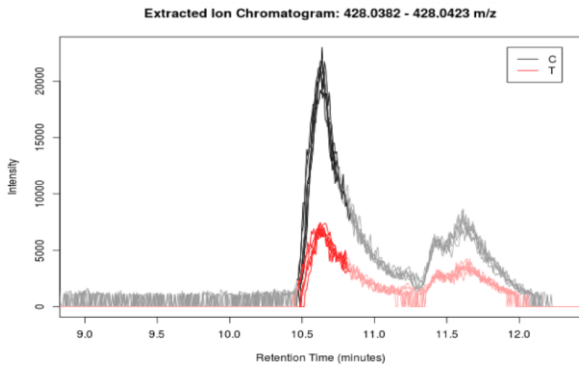


CentWave M253T1

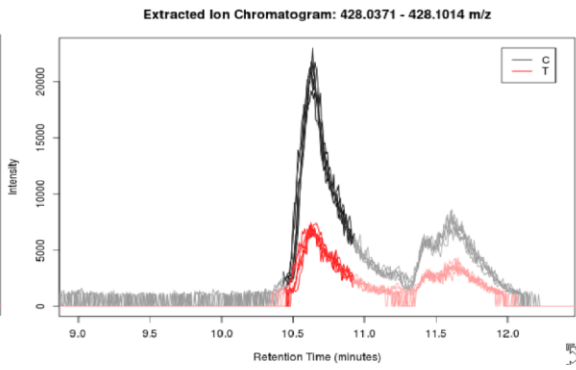


MatchedFilter M253T1

Şekil 5. 3. CentWave M253T1 ve MatchedFilter M253T1.

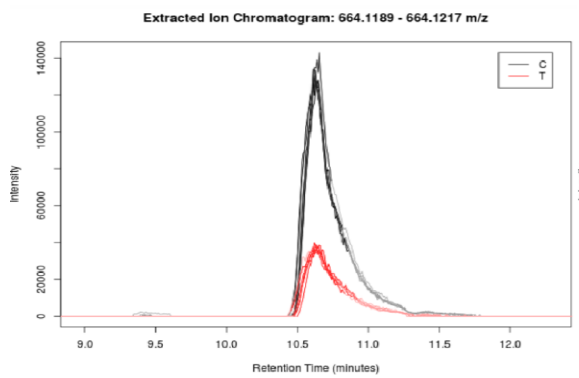


CentWave M428T11

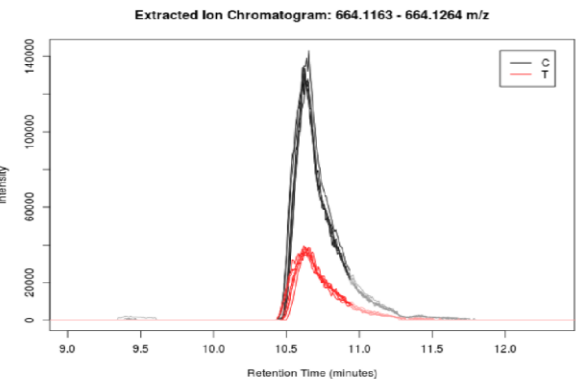


MatchedFilter M428T11

Şekil 5. 4. CentWave M428T11 ve MatchedFilter M428T11.

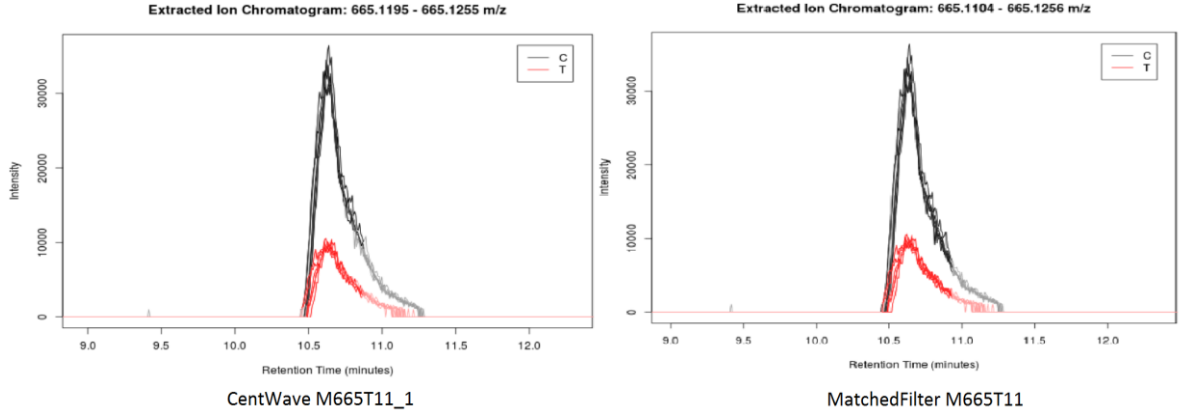


CentWave M664T11



MatchedFilter M664T11

Şekil 5. 5. CentWave M664T11 ve MatchedFilter M664T11.



Şekil 5. 6. CentWave M665T11_1 ve MatchedFilter M665T11.

Ancak; bu piklerden Şekil 5.4. ile Şekil 5.6. arasındaki her üç pikin de aslında algoritmalar sonucu farklı pik olarak tanımlanan aynı pikler olduğu açıktır. Bu durum bize her ne kadar algoritmaların işimizi kolaylaştırırsa da aslında insan kontrolüne muhtaç yapılar olduğunu ortaya koymaktadır. Oysa; her iki algoritma da bu pikleri alıkonma zamanı ve kütlesi birbirinden farklı pikler olarak tanımlamaktadır.

Ham verinin yani kromatogramların veri analizi yapılabilmesi için XCMS algoritmaları ile düzenlenmesi ve tablolar haline getirilmesi aslında analitik açıdan çok önemli bir bileşen olan normalizasyonun önüne geçmektedir. Şöyle ki; XCMS, her iki grubun da herhangi bir biyolojik varyasyonu olmadığını düşünerek hareket eder. Oysa T ve C grubu birbirinden tamamen bağımsız iki gruptur ve içerisindeki metabolitlerin toplam miktarı, proteinlerin toplam miktarı doğal olarak birbirinden tamamen farklıdır. Tamamen farklı olan iki grubu karşılaştırabilmek için birbirleriyle sanki aynı miktarda proteini, metaboliti vb. bileşeni içeriyor pozisyona getirmek şarttır. Bu amaçla ya numunelerde baştan protein miktar tayini yapılır ve derişik olan numune seyreltilir ya da veriler üzerinden bir normalizasyon işlemi gerçekleştirilir.

Veriler üzerinden normalizasyon yapmak daima daha avantajlıdır [66]; çünkü numunelerden derişik olan seyreltilse dahi bu seyreltme numune hazırlama basamağı, analitik süreç vb. süreçteki rastgele hataları normalize edemez. Veri üzerinden normalizasyon ile ilgili tartışmalar sürse de en uygun normalizasyonun, her bir metabolitin pik alanının bütün metabolitlerin pik alanına bölünmesi olduğu ile ilgili güncel kaynaklar bulunmaktadır [66]. Bu tez çalışmasında da; veri

üzerinden normalizasyona gidilmiş, C ve T grubu için her bir metabolitin pik alanı, bütün metabolitlerin pik alanına bölünerek normalize edilmiştir.

XCMS üzerinden elde edilen CentWave ve MatchedFilter analiz sonuçları değerleri arasında her iki algoritma sonucu için p değeri 0.05'ten küçük değerler üzerinde tüm pik alanlarına (dataset hacimlerine) göre normalizasyon yapılarak yeniden fold değeri hesaplatıldığında, elde edilen ortak piklerin sayısı normalizasyon öncesi değerlere göre 1 pik artış göstermiştir. Bu değerlerin CentWave ve MatchedFilter sonuçlarındaki pik şekli incelendiğinde gerçek anlamda pik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu pikin C grubunda azalan 6 pikten farklı olarak C grubunda artan bir pik olduğu görülmüştür. Tek başına bu sonuç bile normalizasyonun önemini vurgulamaktadır. Her iki algoritma için normalizasyon sonrası özet sonuçlar Çizelge 5.4.'de verilmiştir.

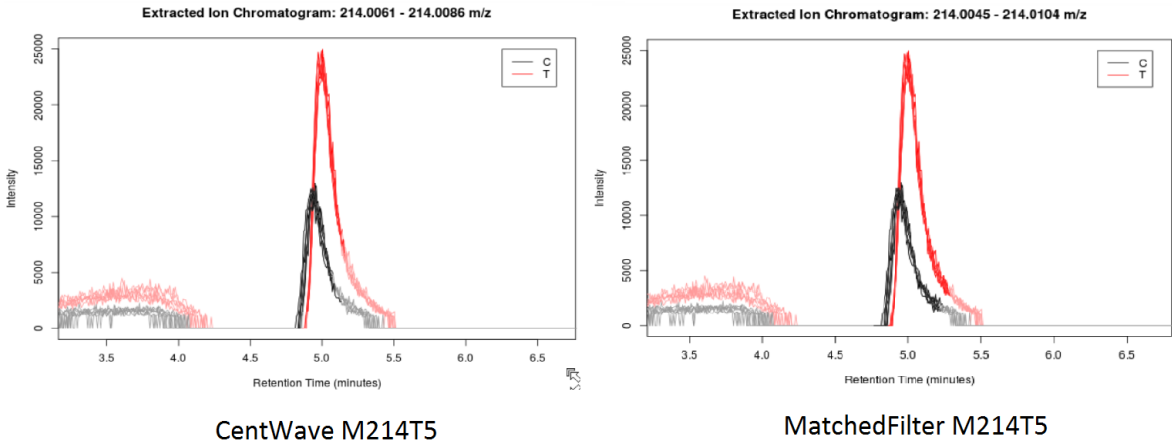
Çizelge 5. 4. Normalizasyon sonrası CentWave ve MatchedFilter özet sonuçlar.

	CentWave	CentWave ve MatchedFilter	MatchedFilter
Ham Veri	2758	197	208
$p < 0.05$	1321	71	143
$p < 0.05$ ve $fold \leq 0.5$	279	14	16
$p < 0.05$ ve $fold \geq 2$	174	2	2
$p < 0.05$ ve $fold \leq 0.5$ üzerinden gerçek pikler	1	1	1
$p < 0.05$ ve $fold \leq 2$ değerleri üzerinden gerçek pikler	7	6	6

Çizelge 5.5.'de CentWave ve MatchedFilter algoritmaları kullanılarak XCMS üzerinde yapılan analizde C grubuna göre azalma gösteren M123T11, M218T1_3 ve M218T1, M253T1, M428T11, M664T11, M665T11_1 M665T11 ile C grubuna göre artış gösteren M214T5 pikine (Şekil 5.7.) ait değerler verilmiştir.

Çizelge 5. 5. Normalizasyon sonrası CentWave ve MatchedFilter ortak pikler.

Algoritma	Fold (Değişim katsayısı)	p Değeri	Mzmed	rtmed	İntensite	C Grubu Pik Alanı	T Grubu Pik Alanı	Pik Kodu
CentWave	0,45	2,78E-06	123,056	10,63	41024,926	1,70E-03	7,62E-04	M123T11
MatchedFilter	0,42	3,62E-10	123,0561	10,68	41024,926	2,30E-03	9,62E-04	M123T11
CentWave	0,05	6,72E-07	218,2118	1,12	29651,678	8,10E-04	4,04E-05	M218T1_3
MatchedFilter	0,09	6,65E-07	218,2096	1,12	29651,678	8,68E-04	7,88E-05	M218T1
CentWave	0,23	1,20E-04	253,1019	1,18	123434,305	2,08E-03	4,87E-04	M253T1
MatchedFilter	0,23	2,87E-05	253,102	1,17	123434,305	2,44E-03	5,58E-04	M253T1
CentWave	0,41	1,06E-07	428,0397	10,63	22999,977	9,37E-04	3,81E-04	M428T11
MatchedFilter	0,39	5,73E-10	428,0413	10,67	22999,977	1,21E-03	4,71E-04	M428T11
CentWave	0,33	5,19E-08	664,1201	10,63	143240,906	5,78E-03	1,88E-03	M664T11
MatchedFilter	0,34	3,77E-08	664,12	10,68	143240,906	6,85E-03	2,35E-03	M664T11
CentWave	0,34	5,03E-06	665,1228	10,63	36441,105	1,53E-03	5,21E-04	M665T11_1
MatchedFilter	0,35	1,85E-08	665,1226	10,67	36441,105	1,74E-03	6,10E-04	M665T11
CentWave	2,10	3,74E-08	214,0074	4,96	24980,391	4,23E-04	8,89E-04	M214T5
MatchedFilter	2,09	4,05E-07	214,0074	5,02	24980,391	5,01E-04	1,05E-03	M214T5



Şekil 5. 7. CentWave M214T5 ve MatchedFilter M214T5.

5.2. Önerilen Metabolitler

Tespit edilen metabolit piklerin hangi metabolite ait olduğunun belirlenmesinde Metlin ve HMDB veritabanları taranmıştır. Veri bankası taramasında gerçekten pik olduğuna;

- 1) Ham verilerin XCMS CentWave algoritması ile işlenmesi,
- 2) Ham verilerin XCMS MatchedFilter algoritması ile işlenmesi,
- 3) Her iki algoritma sonucunda ortak piklerin bulunması,

- 4) Her iki algortima sonucunda $p < 0.05$ olan istatistiksel olarak anlamlı ortak piklerin bulunması,
- 5) Her iki algortima sonucunda $p < 0.05$, $fold \leq 0.5$ ve $fold \geq 2$ olan ortak piklerin bulunması,
- 6) Pik şekli uygun görülmeyen piklerin göz taraması ile atılması ve dikkate alınmaması,
- 7) Dikkate alınan pikler için normalizasyon sonrası $p < 0.05$, $fold \leq 0.5$ ve $fold \geq 2$ olan ortak piklerin tespiti,

sonucu elde edilen 7 pik üzerinden gidilmiştir. Bu 7 pikin 3 tanesinin ise algoritmanın işleyiş döngüsüne ait tabiatı gereği ortak pik olduğu düşünüldüğünde aslında F1 kodlu siklodekstrin nanopartikülün MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine tatbiki sonucu metabolom düzeyinde C grubunda azalma gösteren 3 pik, C grubunda miktarı fazla olan yani T grubunda azalma gösteren 1 pikin hangi metabolitler olduğunun tespitinin önemi görülmektedir.

İlgili piklerin hangi metabolitlere ait olduğunun tespiti için “mzmed” yani ortalama m/z değeri Metlin veri bankasına girilmiştir. Metlin veribankasına giriş sonucu ilgili pikin m/z değerine göre önerilen metabolitler Bölüm 5.2.1.’de çizelgeler halinde sunulmaktadır.

5.2.1. CentWave ve MatchedFilter Pikleri için Önerilen Metabolitler

CentWave ve MatchedFilter M123T11 pikleri için önerilen metabolitler Çizelge 5.6.’da verilmiştir.

Çizelge 5. 6. CentWave ve MatchedFilter M123T11 pikleri için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Isonicotinamide	266202
Niacinamide	266633
Benzenediazonium hydroxide	289494
6-Aminopyridine-3-carbaldehyde	289619
1-(Pyridazin-3-yl)ethanone	306414
Acetylpyrazine	316989
Propanedinitrile, (ethoxymethylene)-	335653
2-Pyridinecarboxamide	343391
1-(Pyrimidin-4-yl)ethanone	350775
4-Nitrosoaniline	355995
1-(5-Pyrimidinyl)ethanone	367422

[14C]-Nicotinamide	391430
3-Pyridinecarboxaldehyde, 2-amino-	392006
4-aminonicotinaldehyde	450090
3-Aminoisonicotinaldehyde	452464
3,5-Dimethyl-1,2-oxazole-4-carbonitrile	459272
Di-2-propynylamine, N-nitroso-	462932
2-methylpyrimidine-5-carbaldehyde	479227
N-(2-Pyridyl)formamide	485284
N-Pyridin-3-yl-formamide	485746
Nitrous amide, N-phenyl-	500161
NSC219505	560526
2-AMINO-4-METHYL-3-FURONITRILE	608536
5-(aminomethyl)furan-2-carbonitrile	611056
5,6-Dihydro-7H-pyrrolo[1,2-c]imidazol-7-one	614030
5-(aminomethyl)furan-3-carbonitrile	629900
2,4-Diazabicyclo[4.2.0]octa-1(6),3-dien-5-one	633804
3-Aminopicolinaldehyde	636874
AGN-PC-0NIATQ	639793
2-Nitrosoaniline	651516

CentWave M218T1_3 ve MatchedFilter M128T1 pikleri için önerilen metabolitler Çizelge 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 7. CentWave M218T1_3 ve MatchedFilter M218T1 pikleri için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Dodecanoic acid, ammonium salt	289881
Ethanol, 2,2'-(octylimino)bis-	358620
Octanoic acid, compd. with 1-butanamine (1:1)	359696
Tripropylamine propionic acid salt	376264
Decylamine, acetate	449518
SBB060808	490129
2,2'-[(2-ethylhexyl)imino]diethanol	530256
n-(2,2-diethoxyethyl)-n-(propan-2-yl)propan-2-amine	539828
2,2'-(octan-2-ylimino)diethanol	541001
2-Aminododecane-1,3-diol	658192
5-Amino-2,2,8-trimethylnonane-3,7-diol	697210
Acetic acid--N-pentylpentan-1-amine (1/1)	739575
6,6'-Azanediyl(di(hexan-1-ol))	744960
1,1'-Azanediyl(di(hexan-2-ol))	753166

CentWave M253T1 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.8.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 8. CentWave M253T1 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Hexylthiofos	305220
1(2H)-Naphthalenone, 2-[(3-fluorophenyl)methylene]-3,4-dihydro-	309589
1(2H)-Naphthalenone, 2-[(2-fluorophenyl)methylene]-3,4-dihydro-	309605
2-Fluoro-4-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	336906
2-Fluoro-5-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	336912
3-Fluoro-4-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	337026
3-Fluoro-5-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	337030
1-Fluoro-2-(2-methoxyphenyl)naphthalene	342467
1-Naphthalenemethanol, 2-(trimethylsilyl)-	614910
Diethyl {1-[(trimethylsilyl)oxy]ethenyl}phosphonate	663054
Azulene, 1-(ethylthio)-4,6,8-trimethyl-	640963
3-Phenyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2H-cyclohepta[b]thiophene	648557
2-Pentyl-5-phenylthiophene	671785
O-Decyl phosphorothioate	781832
2,2'-{[6-(Hydroxyamino)-1,3,5-triazine-2,4-diyl]diazanediyl}di(ethan-1-ol)	833483
1,4,7,10-Tetraazacyclododecane--hydrogen bromide (1/1)	866664
4-Phenyl-1-(trimethylsilyl)penta-1,4-dien-3-one	878321
4-[Dimethyl(phenyl)silyl]cyclohex-2-en-1-one	880293
(Cyclopent-1-en-1-yl)[dimethyl(phenyl)silyl]methanone	907871
[3-(Ethenyloxy)-3-phenylprop-1-yn-1-yl](trimethyl)silane	962917
[(3R)-3-(Ethenyloxy)-3-phenylprop-1-yn-1-yl](trimethyl)silane	962926
[4-(4-Methoxyphenyl)but-3-en-1-yn-1-yl](trimethyl)silane	967858
1-Phenyl-5-(trimethylsilyl)penta-1,4-dien-3-one	977267
Dipropyl [2-(ethylsulfanyl)ethenyl]phosphonate	941325
2-(Undeca-1,3-diyn-1-yl)thiophene	926428

MatchedFilter M253T1 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.9.'da verilmiştir.

Çizelge 5. 9. MatchedFilter M253T1 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
BENZO[a]PYRENE	44176
Benzo[e]pyrene	70058
Benz[j]aceanthrylene	72923
Benzo[j]fluoranthene	72924
Benz[l]aceanthrylene	73042
Benzo[a]fluoranthene	73047
Perylene	73189
Benzo[b]fluoranthene	69964
Benzo[k]fluoranthene	69965
Benzo(a)pyrene	265212
Benzo(e)pyrene	280633
Benzo(b)fluoranthene	280939
Benzo(k)fluoranthene	280948
Azuleno(1,2,3-cd)phenolene	286351
Perylene	319057
Hexylthiofos	305220
1(2H)-Naphthalenone, 2-[(3-fluorophenyl)methylene]-3,4-dihydro-	309589
1(2H)-Naphthalenone, 2-[(2-fluorophenyl)methylene]-3,4-dihydro-	309605
2-Fluoro-4-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	336906
2-Fluoro-5-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	336912
3-Fluoro-4-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	337026
3-Fluoro-5-(4-methylnaphthalen-1-yl)phenol	337030
1-Fluoro-2-(2-methoxyphenyl)naphthalene	342467
2,4-Pentadien-1-one, 1-(4-fluorophenyl)-5-phenyl-, (2E,4E)-	462398
Diethyl {1-[(trimethylsilyl)oxy]ethenyl}phosphonate	663054
O-Decyl phosphorothioate	781832
[Chloro(dimethylsilyl)methylene]bis(trimethylsilane)	886525
1,4,7,10-Tetraazacyclododecane--hydrogen bromide (1/1)	866664
{[(Chloromethyl)silanediy]bis(methylene)}bis(trimethylsilane)	888999
Dipropyl [2-(ethylsulfanyl)ethenyl]phosphonate	941325

CentWave M428T11 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.10.'da verilmiştir.

Çizelge 5. 10. CentWave M428T11 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Zidovudine diphosphate	3069
Deoxyguanosine diphosphate (dGDP)	3532
Adenosine 3',5'-bisphosphate (PAP)	3533

ADP	34522
Adenosine 2',5'-bisphosphate	66062
N-[4-[2-[(3,4-dichlorophenyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl]phenyl]butanamide	278782
Adenosine 3'-(trihydrogen diphosphate)	299434
ADP-alpha-32P	391401
Diamminecyclobutane-1,1-dicarboxylatodihydroxyplatinum(IV)	405371
ST50973908	418888
ZINC01191411	421077
AC1LUNGJ	426567
2'-Deoxyguanosine 3',5'-diphosphate	436742
4H-1-Benzopyran-2-carboxanilide, 4-oxo-4'-(2-thiazolylsulfamoyl)-	448403
Benzeneacetic acid, 4-(4-(3,4-dichlorophenyl)-5-ethoxy-2-oxazolyl)-, methyl ester	510708
2-[N-(2-methylsulfonyloxyethyl)-3-(trifluoromethyl)anilino]ethyl methanesulfonate	546124
3-triphenylstannylpropanenitrile	553202
1,1-Dibromo-N,N,N',N',N'',N''-hexaethyl-lambda~5~-phosphanetriamine	656849
N-(3-Chloro-2,4,6-trinitrophenyl)-9H-carbazol-9-amine	779631
4-(5-Bromothiophen-2-yl)-4-cyclohexyl-1,2-dimethylpiperidin-3-one--hydrogen chloride (1/1)	788243
2-Amino-4-(3-bromophenyl)-6-[4-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl]pyridine-3-carbonitrile	864991
N-[4-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-2-fluorophenyl]-7-chloroquinolin-4-amine	865997

MatchedFilter M428T11 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.11.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 11. MatchedFilter M428T11 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
N-(3-Chloro-2,4,6-trinitrophenyl)-9H-carbazol-9-amine	779631
2-Amino-4-(3-bromophenyl)-6-[4-fluoro-2-(methoxymethoxy)phenyl]pyridine-3-carbonitrile	864991

CentWave M664T11 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.12.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 12. CentWave M664T11 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	101
Fenugreekine	93995
Nadide	311969

Nicotinamide arabinoside adenine dinucleotide	402200
Fura F	434677
N-benzyl-8-(1,2,3,4,7,7-hexachloro-6-octyl-5-bicyclo[2.2.1]hept-2-enyl)octanamide	549394
2-[(8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,15-Heptadecafluoro-2,2-dimethylpentadecan-5-yl)oxy]carbonyl}hydrazine-1-carboxylate	964331

MatchedFilter M664T11 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.13.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 13. MatchedFilter M664T11 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	101
Fenugreekine	93995
Nadide	311969
Nicotinamide arabinoside adenine dinucleotide	402200
Fura F	434677
2-[(8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,15-Heptadecafluoro-2,2-dimethylpentadecan-5-yl)oxy]carbonyl}hydrazine-1-carboxylate	964331

CentWave ve MatchedFilter M665T11_1 pikleri için veribankalarında önerilen metabolit bulunmamaktadır.

CentWave M214T5 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.14.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 14. CentWave M214T5 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
5-(Aminoxy)pentanoic acid--hydrogen bromide (1/1)	270911
Sodium D-glutamate	472271
5-[(2-methoxyethyl)thio]-1,3,4-thiadiazol-2-amine	482133
6-isothiocyanatohexanoyl chloride	560506
piperidine;hydroiodide	636513
Ethyl thiophene-3-carboximidate--hydrogen chloride (1/1)	638064
Benzenethiol, 2-amino-6-methoxy-, hydrochloride	639816
4,5,6,7-Tetrahydrothieno[3,2-c]pyridin-7-ol--hydrogen chloride (1/1)	648049
4,5,6,7-Tetrahydrothieno[2,3-c]pyridin-4-ol--hydrogen chloride (1/1)	648052
1-(2,4-Dimethyl-1,3-thiazol-5-yl)ethan-1-one--	654423

hydrogen chloride (1/1)	
6-Chloro-4-(propan-2-yl)-2H-1,4-thiazin-3(4H)-one	673893
2-Chloro-4-(propan-2-yl)-2H-1,4-thiazin-3(4H)-one	673899
2-Amino-1-(5-methylthiophen-2-yl)ethan-1-one--hydrogen chloride (1/1)	698950
tert-Butyl ethylphosphonotrithioate	753156
5-Chloro-4-fluoro-1H-indole-2-carboxylic acid	766066
2-tert-Butyl-5-chloro-1,2-thiazol-3(2H)-one	768129
5,6,7,7a-Tetrahydrothieno[3,2-c]pyridin-2(4H)-one--hydrogen chloride (1/1)	782905
4-Nitrosopiperazine-1-carbodithioic acid	817195
6-Chloro-5-fluoro-1H-indole-3-carboxylic acid	817960
Bromanyl--1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (1/1)	847897
4,5,6,7-Tetrahydrothieno[3,2-c]pyridin-2(3H)-one--hydrogen chloride (1/1)	864827
1,2,3-Trimethyl-2,3-dihydro-1H-imidazol-1-ium bromide	892801
2-(Methanesulfinyl)aniline--hydrogen chloride (1/1)	928177

MatchedFilter M214T5 piki için önerilen metabolitler Çizelge 5.15.'de verilmiştir.

Çizelge 5. 15. MatchedFilter M214T5 piki için önerilen metabolitler

İsim	Metlin
1,3,5-Trinitrobenzene	268205
5-(Aminoxy)pentanoic acid--hydrogen bromide (1/1)	270911
2-Chloro-6-ethoxy-1,3-benzothiazole	302265
6H-1,3,5-Oxathiazine, 4-(4-chlorophenyl)-	315446
2(3H)-Benzothiazolone, 4-chloro-3-ethyl-	394257
2-chloro-4-ethoxy-1,3-benzothiazole	429642
2-Chloro-4-methoxy-7-methyl-1,3-benzothiazole	429680
7-Chloro-5-methyl-2H-1,4-benzothiazin-3(4H)-one	432440
4-(Chloromethyl)-5-methyl-2-(thiophen-2-yl)-1,3-oxazole	497037
2(3H)-Benzothiazolone, 6-chloro-3-ethyl-	546802
3-(2-Chloro-ethyl)-3H-benzothiazol-2-one	548312
5-chloro-3-methylsulfanyl-1,3-dihydroindol-2-one	566606
1,4-Benzoxazepine-5(2H)-thione, 7-chloro-3,4-dihydro-	643646
(3Z)-6-Chloro-3-(methylimino)-1,3-dihydro-2-benzothiophene-1-ol	646123
1-(1,3-Benzothiazol-3(2H)-yl)-2-chloroethan-1-one	656894
piperidine;hydroiodide	636513

4-Chloro-2-ethoxy-1,3-benzothiazole	663958
2-(Chloromethyl)-2H-1,4-benzothiazin-3(4H)-one	704008
8-Chloro-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one	704701
5-Chloro-6-fluoro-1H-indole-2-carboxylic acid	745978
tert-Butyl ethylphosphonotrithioate	753156
6-Chloro-2-ethoxy-1,3-benzothiazole	757194
4-Chloro-3-(methylsulfanyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one	765647
6-Chloro-3-(methylsulfanyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one	765648
5-Chloro-4-fluoro-1H-indole-2-carboxylic acid	766066
6-Chloro-5-fluoro-1H-indole-3-carboxylic acid	817960

5.2.2. CentWave ve MatchedFilter Pikleri için Önerilen Ortak Metabolitler

CentWave ve MatchedFilter analizlerinde elde edilen pikler için önerilen metabolitler incelenmiş ve ortak metabolitler listelenerek Çizelge 5.16.'da sıralanmıştır. İlgili metabolitlerin Metlin ID kodları verilmektedir.

Çizelge 5. 16. CentWave ve MatchedFilter pikleri için önerilen ortak metabolitler

M123T11	M218T1_3 ve M218T1	M253T1	M428T11	M664T11	M214T5
Metlin ID	Metlin ID	Metlin ID	Metlin ID	Metlin ID	Metlin ID
266202	289881	305220	864991	101	270911
266633	358620	336906		311969	745978
289494	359696	336912		402200	753156
289619	376264	337026		434677	766066
306414	449518	337030		93995	817960
316989	490129	309589		964331	
335653	530256	309605			
343391	539828	663054			
350775	541001	781832			
355995	658192	866664			
367422	697210	941325			
391430	739575				
392006	744960				
450090	753166				
452464					
459272					
462932					
479227					
485284					
485746					
500161					

560526					
608536					
611056					
614030					
629900					
633804					
636874					
639793					
651516					

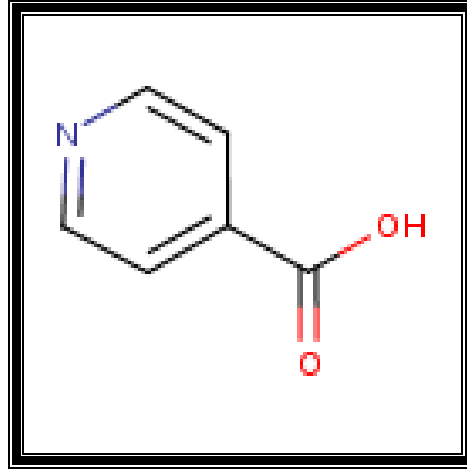
CentWave ve MatchedFilter analizlerinde elde edilen pikler için ortak metabolitler incelenerek endojen metabolitler filtrelenmiştir. Burada amaç eksojen metabolitlerin göz ardı edilmesi ve hücre içerisinde F1 kodlu siklodekstrin nanopartikülün yapmış olduğu etkinin ortaya çıkarılmasıdır. Filtreleme sonucunda M218T1_3 ve M218T1, M253T1, M428T11, M214T5 pikleri için endojen metabolit görülmemiş olup M123T11 ve M664T11 pikleri için elde edilen endojen metabolitler Çizelge 5.17’de verilmiştir. Her iki metabolit de siklodekstrin nanopartikül etkisi sonucu miktarı azalan metabolittir.

Çizelge 5. 17. M123T11 ve M664T11 pikleri için endojen metabolitler

M123T11			M664T11		
İsim	Metlin ID	HMDB ID	İsim	Metlin	HMDB ID
Isonikotinamid	266202	HMDB0060665	Nikotinamid Adenine Dinükleotid (NAD)	101	HMDB0000902
Niasinamid	266633	HMDB0001406			
Asetilpirazin	316989	HMDB0031861			

5.2.3. İsonikotinamid

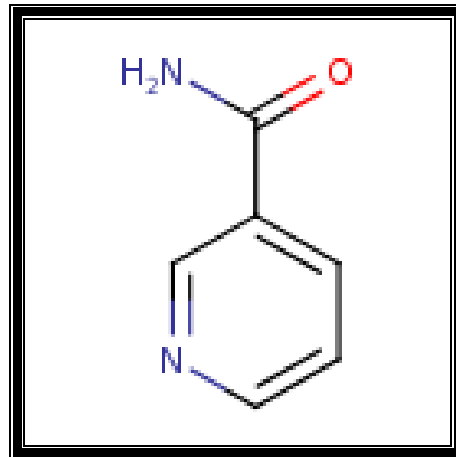
Bu bileşik piridinkarboksilik asitler olarak bilinen organik bileşiklerin sınıfına ait olan isonikotinic asit, bir izoniazid metabolitidir. İsonikotinic asit, bir piridin halkası üzerinde bir karboksil grubu ile oluşan organik bir bileşiktir. Nikotinic asidin bir izomeridir [67]. İsonikotinic asitin moleküler yapısı Şekil 5.8.’de verilmiştir.



Şekil 5. 8. Isonikotinamid

5.2.4. Niasinamid

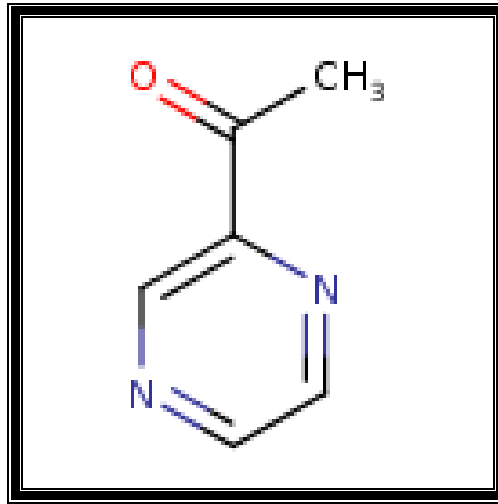
Niasinamid veya vitamin B3, koenzim NAD'nin bir bileşeni olarak işlev gören önemli bir bileşiktir. Çoğu hayvan bu bileşiği yeterli miktarlarda üretmediği için diyet alımı yoluyla desteklenmelidir. Niasinamid radyasyon tedavisinin tümör hücreleri üzerindeki etkisini arttırmak için kullanılır. Niasin (nikotinik asit) ve niasinamid, her ikisi de B3 vitamini olarak etiketlenirken farklı uygulamalara da sahiptir. Niasinamid, artrit ve erken başlangıçlı tip I diyabetlerde yararlı olurken, niasin yüksek kolesterol düzeylerinin etkili bir redüktörüdür [68]. Niasinamidin moleküler yapısı Şekil 5.9.'da verilmiştir.



Şekil 5. 9. Niasinamid

5.2.5. 2-Asetilpirazin

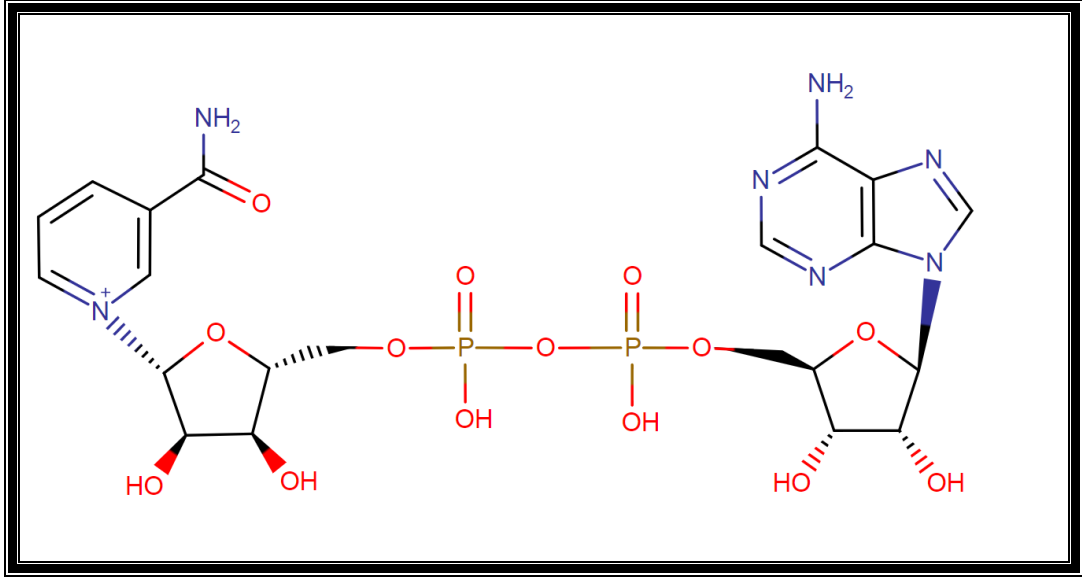
1-(2-pirazinil)-etanon veya fema 3126 olarak da bilinen 2-asetilpirazin, aril alkil ketonları olarak bilinen bileşiklerin sınıfının bir üyesidir. Aril alkil ketonları, ketonlar R=aril grubu ve R'=alkil grubu olan $RC(=O)R'$ jenerik yapısına sahiptir. 2-asetilpirazin, suda çözünür ve çok zayıf asidik bir bileşiktir (pKa'sına dayanarak). 2-asetilpirazin ekmek kabuğu ve talaş tadına sahiptir. 2-asetilpirazin, tohum, kuruyemiş ve et gibi gıdalarda bulunur. Dondurma gibi dondurulmuş süt ürünlerinde kullanılır. ABD Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından genel olarak güvenli olarak kabul edilir. 2-Asetilpirazin, kavrulmuş susam çekirdeği aromasının bir bileşenidir [69]. 2-Asetilpirazinin moleküler yapısı Şekil 5.10.'da verilmiştir.



Şekil 5. 10. 2-Asetilpirazin

5.2.6. Nikotinamid Adenin Dinükleotid

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), glikolizde ve hücre solunumunun sitrik asit döngüsünde yaygın olarak kullanılmaktadır. NADH'de depolanan indirgeme potansiyeli, elektron taşıma zinciri yoluyla ATP'ye dönüştürülebilir veya anabolik metabolizma için kullanılabilir. Bir organizmanın yaşaması için ATP enerjisi gereklidir. Yeşil bitkiler, ATP'yi fotosentez yoluyla alırken, diğer organizmalar hücre solunumuyla elde ederler. NAD, pirofosfat bağlantısı ile adenosin 5'-fosfata bağlanmış ribosilnikotinamid 5'-difosfattan oluşan bir A koenzimdir. Doğada yaygın olarak bulunur ve alternatif olarak oksitlenmiş (NAD⁺) ve indirgenmiş (NADH) bir elektron taşıyıcısı olarak hizmet ettiği sayısız enzimatik reaksiyonlarda yer alır [70]. NAD'nin moleküler yapısı Şekil 5.11.'de verilmiştir.



Şekil 5. 11. Nikotinamid adenin dinükleotid

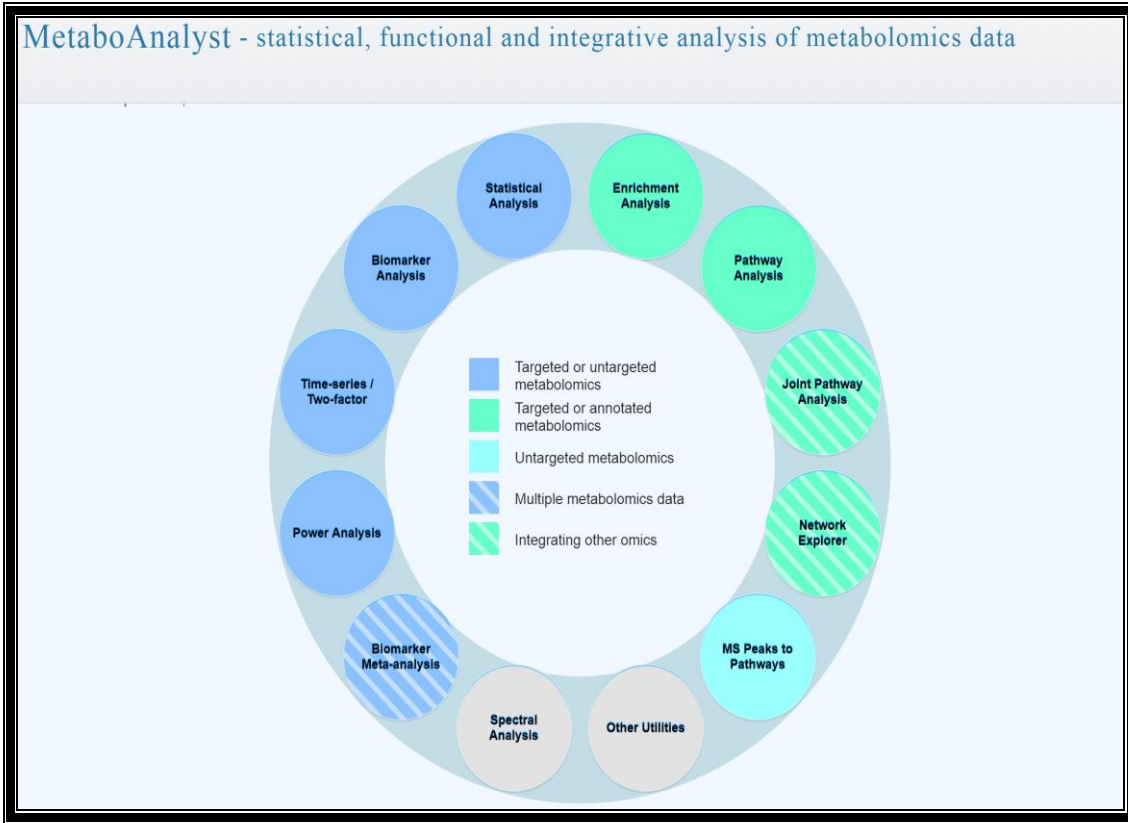
5.3. Metabolomik Verinin MetaboAnalyst Aracılığı ile Değerlendirilmesi

Burada amaç, XCMS ile verilerin değerlendirilmesi sonucu siklodekstrin nanopartikül etkisi ile nihai olarak değişim gösterdiği tespit edilen ve el ile “manuel” tarama sonucu önerilerde bulunan Çizelge 5.19.’da sunulan metabolitlere ait listenin “MetaboAnalyst” ile de tarama yapılarak teyit edilmesi ve ayrıca “manuel” taramadan farklı olarak metabolik yollar ile eşleştirilmesidir.

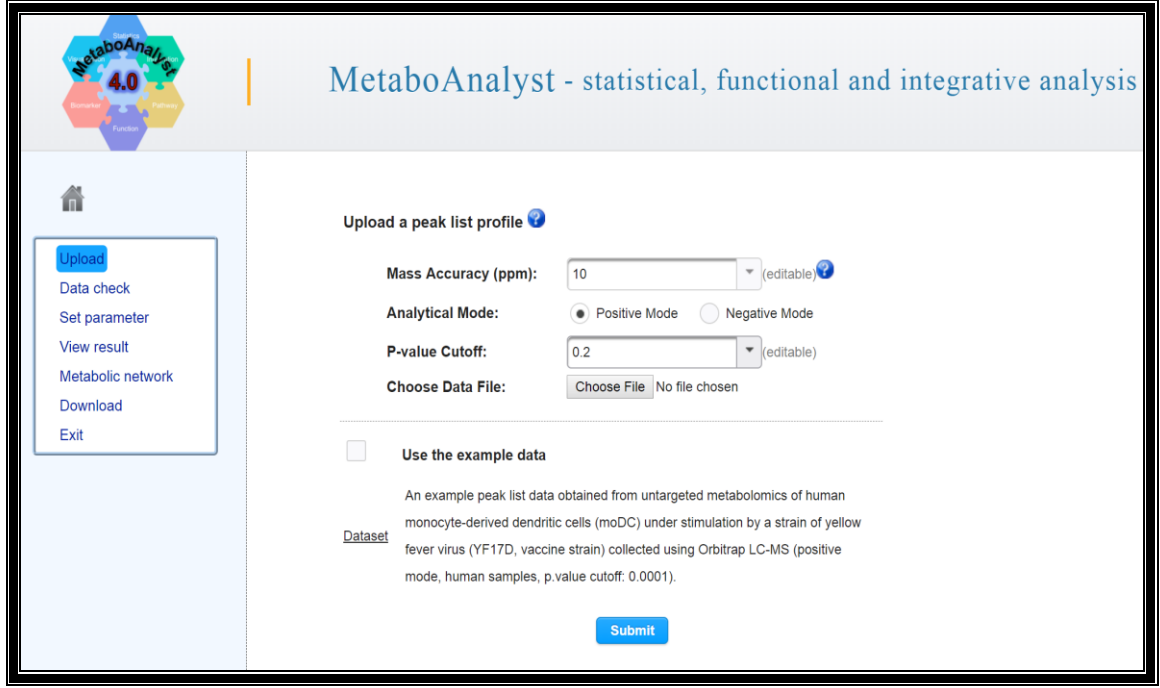
6 adet üzerinde düşünülen ve değişim gözlenen metabolitlere ait liste, Excel formatında Şekil 5.12.’ye göre hazırlanmış ve MetaboAnalyst’e girilmiştir. Bu amaçla, MetaboAnalyst altyapısında “MS Peaks to Pathways” seçeneği seçilmiştir (Şekil 5.13.). Şekil 5.14.’de verilen parametreleri seçerek Şekil 5.12.’deki dosya yüklenerek sisteme işlenmek üzere iletilmiştir. Şekil 5.15.’de belirtildiği şekilde metabolitlerin “KEGG veribankası”ndan seçilmesi için komut verilmiştir.

A	B	C
m.z	p.value	t.score
123,0560	0,00E+00	1
218,2118	0,00E+00	1
253,1019	0,00E+00	1
428,0397	0,00E+00	1
664,1201	0,00E+00	1
665,1228	0,00E+00	1

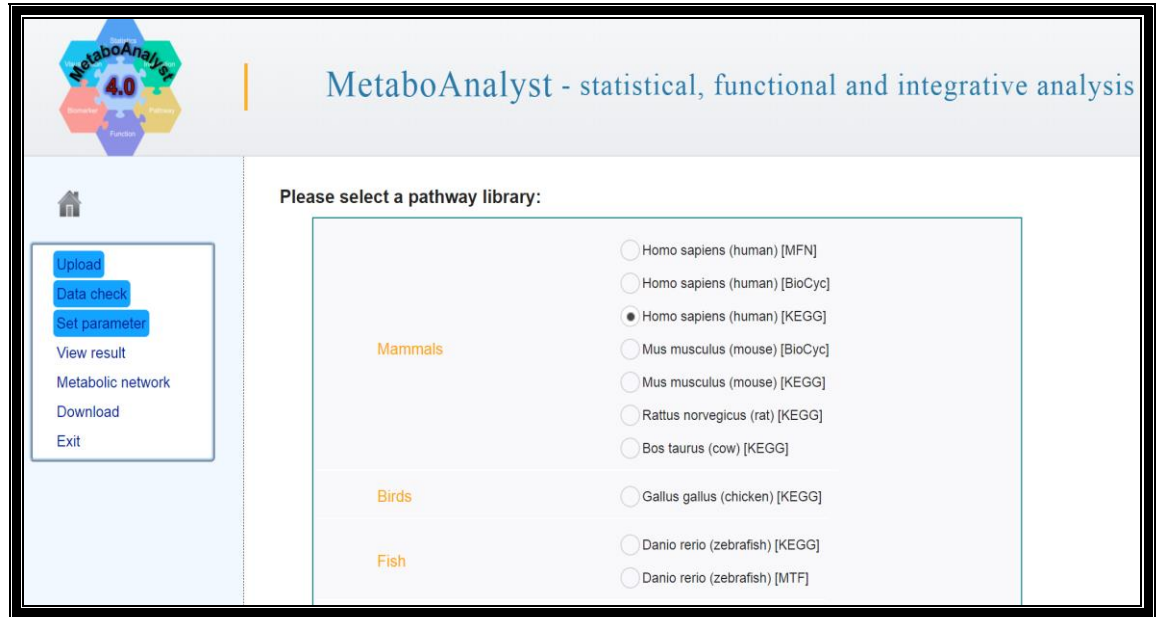
Şekil 5. 12. Excel formatında, değişen metabolitlere ait liste.



Şekil 5. 13. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnalyst'e girilmesi 1. Basamak.



Şekil 5. 14. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnayst'e girilmesi 2. Basamak.



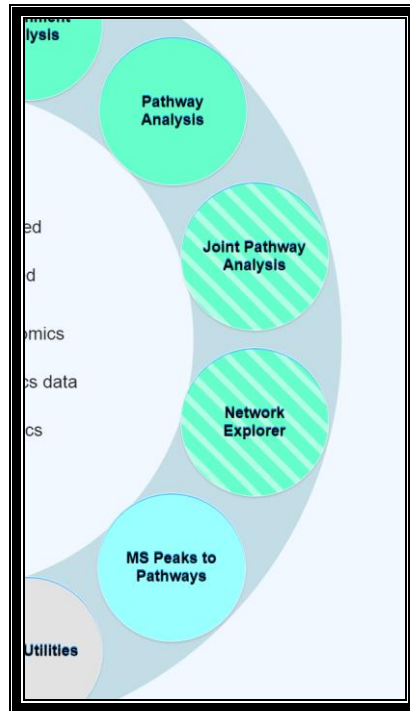
Şekil 5. 15. İlgili piklere ait verilerin MetaboAnayst'e girilmesi 3. Basamak.

MetaboAnalyst değerlendirmesi sonucu ilgili metabolit "m/z değerlerine" karşılık gelen metabolit listesi Şekil 5.16.'daki gibi bir Excel tablosunda sistemden çıktı olarak alınmıştır. Burada amaç, daha önceden "manuel" yani el yordamıyla bulduğumuz metabolit listelerini MetaboAnalyst'e buldurmak ve süreci en aza indirmektir.

	A	B	C	D
1	Query.Mass	Matched.Compound	Matched.Form	Mass.Diff
2	123.056	C00153	M+H[1+]	0.000723533230001294
3	123.056	C01279	M-NH3+H[1+]	0.000623533229997975
4	123.056	C01929	M-NH3+H[1+]	0.000623533229997975
5	123.056	C01950	M+H[1+]	0.000723533230001294
6	123.056	C02421	M+H[1+]	0.000723533230001294
7	123.056	C01109	M-H4O2+H[1+]	0.000823533230004614
8	123.056	C02221	M+H2O+H[1+]	0.000723533230001294
9	123.056	C02234	M+H2O+H[1+]	0.000723533230001294
10	2.182.118	C02487	M-HCOOK+H[1+]	0.00202353323001603
11	2.531.019	C01418	M+H[1+]	0.00117646677000494
12	4.280.397	C00008	M+H[1+]	0.00302353322996396
13	4.280.397	C00054	M+H[1+]	0.00302353322996396
14	4.280.397	C00361	M+H[1+]	0.00302353322996396
15	4.280.397	C03850	M+H[1+]	0.00302353322996396
16	6.641.201	C00003	M[1+]	0.0031999999999254
17	6.651.228	C00003	M+H[1+]	0.00137646677001158
18	6.651.228	C00004	M[1+]	0.00200000000006639
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

Şekil 5. 16. MetaboAnalyst değerlendirmesi sonucu ilgili metabolit m/z değerlerine karşılık gelen metabolit listesi.

Elde edilen Excel dosyası, bu sefer sisteme “Pathway Analysis” sekmesi kullanılarak yüklenmiştir (Şekil 5.17.). “Pathway Analysis” sekmesine Şekil 5.16.’daki KEGG metabolit kodları girilmiştir (Şekil 5.18.).



Şekil 5. 17. MetaboAnalyst ile moleküler yolak analizi yapılması.

MetaboAnalyst - statistical, functional and integrative analysis

Please enter a one-column compound list:

```
C00153
C01279
C01929
C01950
C02421
C01109
C02221
C02234
C02487
C01418
C00008
C00054
C00361
C03850
C00003
C00003
```

Input Type: KEGG ID

Use our example data

Submit

Şekil 5. 18. KEGG metabolit kodlarının MetaboAnalyst'e yüklenmesi.

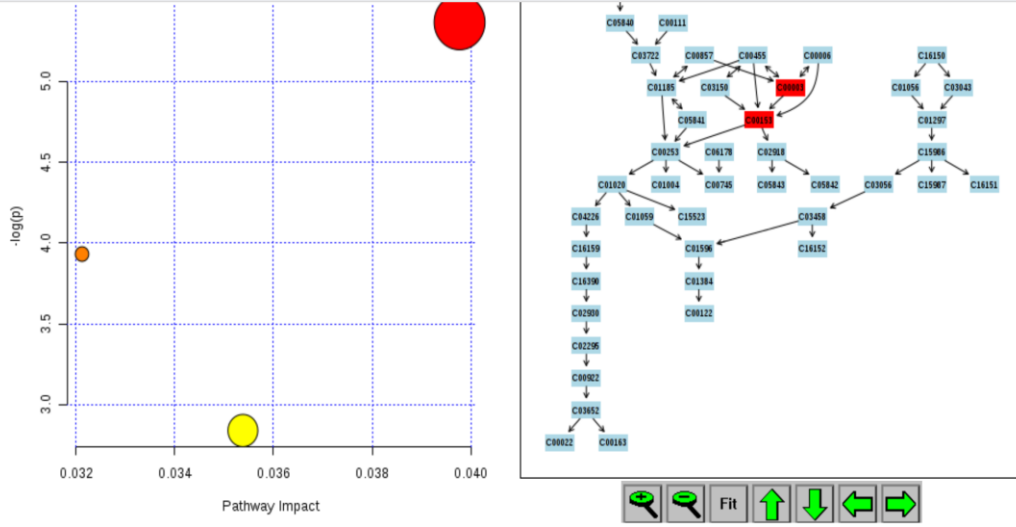
KEGG metabolit kodları karşılığı eşleşen metabolitlere ait ekran görüntüsü Şekil 5.19.'da verilmiştir. Burada eşleşen metabolitlerden aynı metabolik yolak üzerinde olamayanlar yani istatistiksel olarak anlam ifade etmeyenler kırmızı ile işaretlidir.

Query	Hit	HMDB	PubChem	KEGG	Details
C00153	Niacinamide	HMDB0001406	936	C00153	
C01279	4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine	METPA0166	-	C01279	
C01929		-	-	-	View
C01950		-	-	-	View
C02421		-	-	-	View
C01108		-	-	-	View
C02221		-	-	-	View
C02234		-	-	-	View
C02487		-	-	-	View
C01418		-	-	-	View
C00008	ADP	HMDB0001341	6022	C00008	
C00054		-	-	-	View
C00361	dGDP	HMDB0000960	439220	C00361	
C03850		-	-	-	View
C00003	NAD	HMDB0000902	5893	C00003	
C00003	NAD	HMDB0000902	5893	C00003	
C00004	NADH	HMDB0001487	928	C00004	

Şekil 5. 19. KEGG metabolit kodları karşılığı eşleşen metabolitler.

Analiz çıktıları incelendiğinde (Şekil 5.20.) eşleşen metabolitlerin nikotinat ve nikotinamid metabolizması (Şekil 5.21.) ve purin metabolizması (Şekil 5.22.) ile ilişkili olduğu görülmüştür.

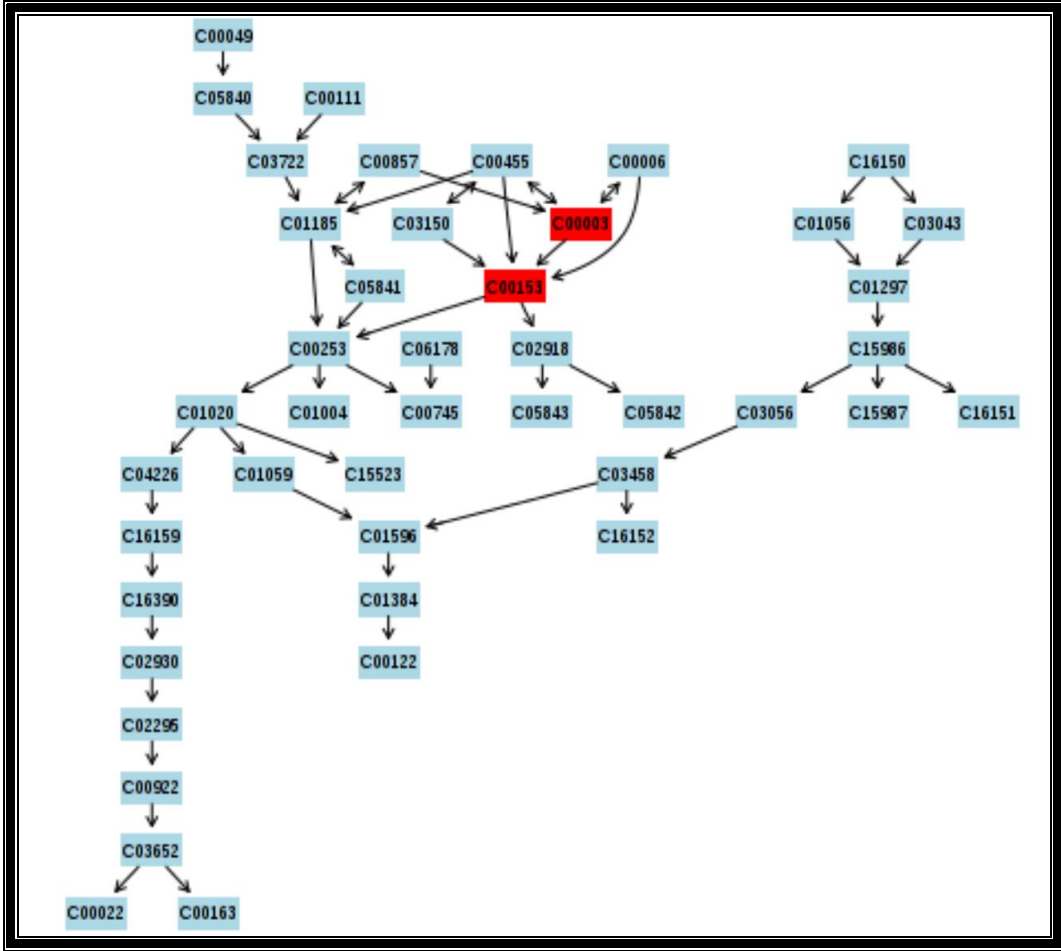
MetaboAnalyst - statistical, functional and integrative analysis of metabolomics data



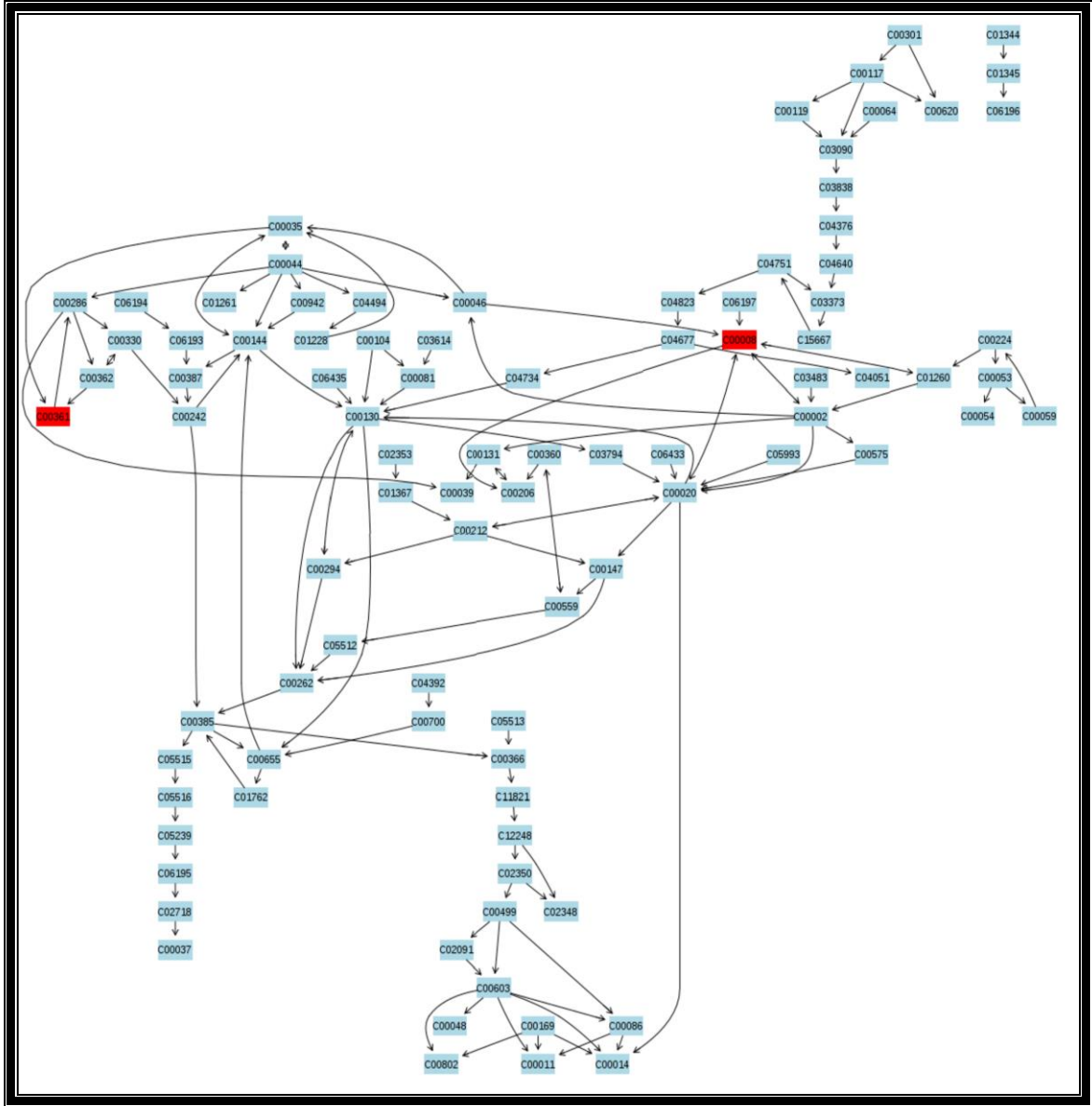
Click the corresponding **Pathway Name** to view its graphical presentation; click **Match Status** to view the pathway compounds (with matched ones highlighted).

Pathway Name	Match Status	p	$-\log(p)$	Holm p	FDR	Impact	Details
Nicotinate and nicotinamide metabolism	2/44	0.0046766	5.3652	0.37413	0.37413	0.03977	KEGG SMP
Purine metabolism	2/92	0.019609	3.9318	1.0	0.78436	0.03212	KEGG SMP

Şekil 5. 20. MetaboAnalyst değerlendirmesi sonucu etkilendiği görülen metabolik yolları gösteren ekran görüntüsü çıktısı.



Şekil 5. 21. Nikotinat ve nikotinamid metabolizması.



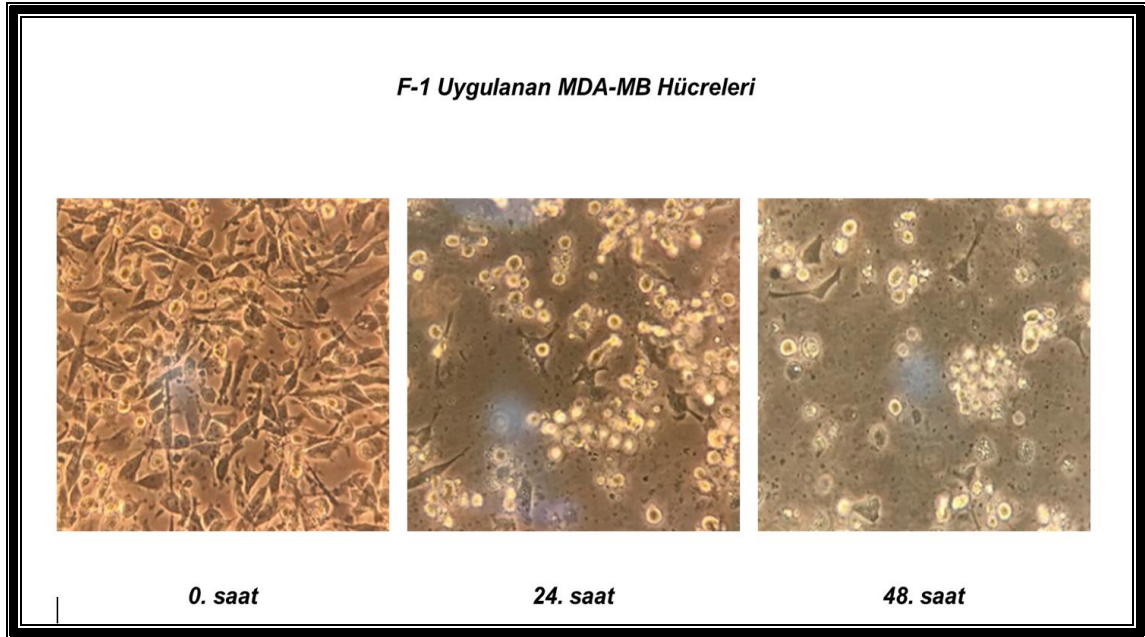
Şekil 5. 22. Pürin metabolizması

5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında “Gereç ve Yöntem Bölümü’nde” anlatıldığı üzere F1 kodlu siklodekstrin nanopartikül ile eşleştirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde siklodekstrin nanopartiküllerin sitotoksik aktivitesi metabolom düzeyinde gösterilmeye ve bu amaçla da farklı biyoenformatik teknikler denenmeye çalışılmıştır.

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri folat reseptörüne sahip hücrelerdir. Bu amaçla hazırlanan F1 kodlu siklodekstrin nanopartikül de folat grubuna sahip bir nanopartiküldür. Folat grubuna sahip bir nanopartikülün, folat reseptörlü bir hücreye uygulanması sonucu tezin desteklediği TÜBİTAK 1001 projesi

kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar çerçevesinde 1/16 oranında seyreltme ile tatbik sonucu hücrelerde 24. ve 48. saatte Şekil 5.23.'de görülen değişimler meydana gelmiştir.



Şekil 5. 23. F1 kodlu siklodekstrin nanopartikülün MDA-MB-231 hücrelerine 1/16 oranında seyreltme ile tatbiki sonrası 24. ve 48. saatte elde edilen hücre görüntüleri.

Sitozolik fraksiyonlarda “Gereç ve Yöntem Bölümü’nde” anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen LC-Q-TOF-MS analizleri sonrası elde edilen ham veriler XCMS ile değerlendirildiğinde CentWave için 2758, MatchedFilter için 208 pik bulunduğu halde ancak bunlardan ortak olan 6 tanesinin C grubunda azalan metabolit pikleri olduğu sonucuna varılmış ve Çizelge 5.4. ve Çizelge 5.5.’de sunulmuştur.

Bu piklerin hangi metabolitlere ait olduğunun tespiti için öncelikle “manuel” tarama yapılmış (HMDB ve Metlin veribankalarında) ve daha sonrasında eksojen metabolitler listeden çıkarıldığında Çizelge 5.19.’da verilen metabolitlere ait nihai listeye ulaşılmıştır.

Aynı işlem MetaboAnalyst ile de yapıldığında Şekil 5.19.’da sunulan ekran görüntüsündeki metabolitlerin ancak piklerle eşleştiği ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde metabolik yollarda görev aldığı bulunmuştur.

Sonuç olarak “manuel” tarama ile MetaboAnalyst’in taraması sonucunda nikotinat ve nikotinamid metabolizması ve purin metabolizması ile ilişkili olduğu görülen

metabolitlerin miktarlarındaki değişim, 24. saatte gözlenmeye başlanan hücre yapısındaki bozulmalar ile ilişkilidir. Bu bozulmaların aynı zamanda hücrenin içerisindeki moleküler enerji değişimi ile de eşzamanlı seyrettiği bilinmektedir.

Dolayısıyla hücrenin değişime uğrayan metabolik yolları doğal olarak hayatta kalım fonksiyonlarını da tetiklemektedir. Hücrelerin folat reseptörüne etkili bir siklodekstrin nanopartikül ile işleme tabi tutulması, sitotoksik aktivite ve morfolojik değerlendirme ile birlikte ele alındığında metabolom düzeyindeki belirlenen değişimin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması, metabolomik çalışmalar için ham verilerin değerlendirilmesinde, XCMS Centwave algoritması ve MatchedFilter algoritmasının kesişim kümesinin MetaboAnalyst ile ilişkilendirildiğinde bulunan sonuçların, sistotoksik aktivite ile ilişkilendirilebileceğini ve dolayısıyla uygulanan biyoenformatik sürecin doğru çalıştığını göstermektedir.

İleriki çalışmalarda isteğe bağlı olarak sadece CentWave algoritması ile benzer değerlendirmeler yapıp daha fazla metabolit üzerinden etkileşim gösteren ve etkilenen farklı metabolik yollar da ortaya çıkarılabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Işık, G., *Meme Kanseri Tedavisinde Paklitaksel Yüklü Polikasyonik ve Anyonik Siklodekstrin Nanoküre Formülasyonu ve In Vitro Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [2] Varan, G., Öncül, S., Ercan, A., Benito, J. M., Ortiz Mellet, C., Bilensoy, E., Cholesterol-Targeted Anticancer and Apoptotic Effects of Anionic and Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 3172 - 3182, **2016**.
- [3] Çelebier, M., *HT29 Ve K562 Kanser Hücrelerinde Protein Ve Metabolitlerin Analizi İçin Çeşitli Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [4] Tyers, M., Mann, M., From genomics to proteomics, *Nature*, 422, 193-197, **2003**.
- [5] *Genomics and World Health*, World Health Organization Report of the Advisory Committee on Health Research, Geneva, **2002**.
- [6] Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, 405, 837-846, **2000**.
- [7] Casado-Vela, J., Cebrian, A., Gomez del Pulgar, M.T., Lacal, J.C., Approaches for the study of cancer: towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics, *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 13, 617-628, **2011**.
- [8] Çelebier, M., Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veritabanı Desteği: LC-MS Verilerinin Değerlendirilmesinde XCMS Kullanımı, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23, 168-185, **2014**.
- [9] Fiehn, O., Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolic networks, *Comperative and Functional Genomics*, 2, 155–168, **2001**.
- [10] Villas-Bôas, S.G., Roessner, U., Hansen, M.A.E., Smedsgaard, J., Nielsen, J., *Metabolome Analysis: An Introduction*, Wiley, USA, **2007**.
- [11] Nielsen, J., Oliver, S., The next wave in metabolome analysis, *Trends in Biotechnology*, 23, 544–546, **2005**.
- [12] Allen, J., Davej, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting, *Nature Biotechnology*, 21, 692–696, **2003**.
- [13] Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., Nishioka, T., Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry, *Journal of Proteome Research*, 2, 488–494, **2003**.
- [14] Weckwerth, W., Loureiro, M.E., Wenzel, K., Fiehn, O., Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes, *Proceedings of National Academy of Science*, 101, 7809–7814, **2004**.

- [15] Suhre, K., Shin, S. Y., Petersen, A. K., Mohny, R. P., Meredith, D., Wägele, B., Altmaier, E., CARDIoGRAM, Deloukas, P., Erdmann, J., Grundberg, E., Hammond, C. J., de Angelis, M. H., Kastenmüller, G., Köttgen, A., Kronenberg, F., Mangino, M., Meisinger, C., Meitinger, T., Mewes, H. W., Milburn, M., Prehn, C., Raffler, J., Ried, J. S., Römisch-Margl, W., Samani, N. J., Small, K. S., Wichmann, H. E., Zhai, G., Illig, T., Spector, T. D., Adamski, J., Soranzo, N., Gieger, C., Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research, *Nature*, 477, 54-60, **2011**.
- [16] Goldford, J.E., Hartman, H., Smith, T.F., Segrè, D., *Remnants of an Ancient Metabolism without Phosphate*, *Cell*, 168, 1126-1134, **2017**.
- [17] Winter, G., Krömer, J. O., Fluxomics—connecting 'omics analysis and phenotypes, *Environmental Microbiology*, 15, 1901-1916, **2013**.
- [18] Cortassa, S., Caceres, V., Bell, L. N., O'Rourke, B., Paolocci, N., Aon, M. A., From Metabolomics to Fluxomics: A Computational Procedure to Translate Metabolite Profiles into Metabolic Fluxes, *Biophysical Journal*, 108, 163–172, **2015**.
- [19] Stryer, L., *Biochemistry*, 5. Baskı, W.H. Freeman, New York, **1995**.
- [20] Dandekar, T., Schmidt, S., Metabolites and pathway flexibility, *In Silico Biology*, 5, 103-110, **2005**.
- [21] Nielsen, J., It is all about metabolic fluxes, *Journal of Bacteriology*, 185, 7031–7035, **2003**.
- [22] Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z.N., Barabasi, A.L., The large-scale organization of metabolic networks, *Nature*, 407, 651–654, **2000**.
- [23] Forster J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O., Nielse, J., Genome-scale reconstruction of the *saccharomyces cerevisiae* metabolic network, *Genome Research*, 13, 244–253, **2003**.
- [24] Edwards, J.S., Palsson, B.Ø., The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities, *Proceedings of National Academy of Science*, 97, 5528–5533, **2000**.
- [25] Kasap, H., Pazarıcı, P., Erkoç, M. A., Sistem Biyolojisi, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19, 25-35, **2010**.
- [26] Anonim, Principals of chromatography, <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/separations-purifications/a/principles-of-chromatography>, (Nisan, **2018**).
- [27] Gülçin Akkoç, Kromatografi nedir, <http://www.bilgiustam.com/kromatografi-nedir/>, (Mayıs, **2018**).
- [28] Kaplan, O., *Assit Ayırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini için Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemi Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2017**.
- [29] Anonim, Overview about the important parts of HPLC instruments, <http://ctshplc.canalblog.com/archives/2012/08/07/24851399.html>, (Nisan, **2018**).

- [30] Orhan Çakan, Sıvı Kromatografi Sisteminde Önemli Parametreler, <http://labakademi.com/sivi-kromatografi-sisteminde-onemli-parametreler/>, (Nisan, **2018**).
- [31] Anonim, The Theory of HPLC Chromatographic Parameters, http://www.chromacademy.com/lms/sco2/Theory_Of_HPLC_Chromatographic_Parameters.pdf, (Nisan, **2018**).
- [32] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., *Analitik Kimya Temel İlkeler*, (çev: Kılıç, E., Yılmaz, H.), Bilim Yayıncılık, İstanbul, **2011**.
- [33] Anonim, Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometrisi, <https://merlab.metu.edu.tr/tr/yuksek-cozunurluklu-kutle-spektrometresi>, (Nisan, **2018**).
- [34] William Reusch, Mass Spectrometry, <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectry/massspec/masspec1.htm>, (Nisan, **2018**).
- [35] Anonim, Introduction to Time-of-Flight Mass Spectrometry, <http://www.kore.co.uk/tutorial.htm>, (Nisan, **2018**).
- [36] Rosu, F., Pirotte, S., De Pauw, E., Gabelica, V., Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes, *International Journal of Mass Spectrometry*, 253, 156-171, **2006**.
- [37] Nielsen, J., Oliver, S., The next wave in metabolome analysis, *Trends in Biotechnology*, 23, 544-6, **2005**.
- [38] Griffiths, W.J., Karu, K., Hornshaw, M., Woffendin, G., Wang, Y., Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments, *European Journal of Mass Spectrometry*, 13, 45-50, **2007**.
- [39] XCMS, https://xcmsonline.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage
- [40] MzMine, <http://mzmine.github.io/>, (Mart, **2018**).
- [41] MetaboAnalyst, <http://www.metaboanalyst.ca/>, (Mart, **2018**).
- [42] Metlin, https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage, (Mart, **2018**).
- [43] HMDB, <http://www.hmdb.ca/>, (Mart, **2018**).
- [44] Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Analytical Chemistry*, 78, 779-787, **2006**.
- [45] ProteoWizard, <http://proteowizard.sourceforge.net/>, (Mart, **2018**).
- [46] Tautenhahn, R., Böttcher, C., Neumann, S., Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS, *BMC Bioinformatics*, 9, 1, **2008**.
- [47] Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R., Willmitzer, L., Metabolite profiling for plant functional genomics, *Nature Biotechnology*, 18, 115, **2000**.

- [48] Smith, C., Want, E., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification, *Analytical Chemistry*, 78, 779–787, **2006**.
- [49] Stolt, R., Torgrip, R., Lindberg, J., Csenki, L., Kolmert, J., Schuppe-Koistinen, I., Jacobsson, S., Second-Order Peak Detection for Multicomponent High-Resolution LC/MS Data, *Analytical Chemistry*, 78, 975–983, **2006**.
- [50] Wishart, D.S., Quantitative metabolomics using NMR, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 228–237, **2008**.
- [51] Xia, J., Psychogios, N., Wishart, D.S., MetaboAnalyst: A Web Server for Metabolomic Data Analysis and Interpretation, *Nucleic Acids Research*, 37, 652–660, **2009**.
- [52] Reactome, <https://reactome.org/what-is-reactome>, (Mart, **2008**).
- [53] Joshi-Tope, G., Gillespie, M., I. Vastrik, D'Eustachio, P., Schmidt, E., De Bono, B., Jassal, B., Gopinath, G.R., Wu, G.R., Matthews, L., Lewis, S., Birney, E., Stein, L., Reactome: a knowledgebase of biological pathways, *Nucleic Acids Research*, 33, 428–432, **2005**.
- [54] Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., Jassal, B., Jupe, S., K€orninger, F., McKay, S., Matthews, L., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Shamovsky, V., Webber, M., Weiser, J., Williams, M., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., The Reactome pathway Knowledgebase, *Nucleic Acids Research*, 44, 481–487, **2016**.
- [55] Makki, J., Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance, *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, 23–31, **2005**.
- [56] Anonim, Types of Breast Cancers, <http://pathology.jhu.edu/breast/types.php>, (Nisan, **2018**).
- [57] Şengöz, N.G., Öztanır, İ., Siklodekstrinler ve Tekstil Uygulamaları, *Tekstil ve Mühendis*, 16, 73–74, **2009**.
- [58] Erdoğar, N., *Paklitaksel yüklü folat konjuge amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin tümör spesifik taşınımı ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2015**.
- [59] Bilensoy, E., (Ed.), *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*, Wiley, USA, **2015**.
- [60] Hirayama, F., Uekama, K., Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36, 125–141, **1999**.
- [61] Lakkakula, J., Krause, R., A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications, *Nanomedicine*, 9, 877–894, **2014**.
- [62] He, H., Chen, S., Zhou, J., Dou, Y., Song, L., Che, L., Zhou, X., Chen, X., Jia, Y., Zhang, J., Li, S., Li, X., Cyclodextrin-derived pH-responsive nanoparticles for delivery of paclitaxel, *Biomaterials*, 34, 5344–5358, **2013**.

- [63] Quaglia, F., Ostacolo, L., Mazzaglia, A., Villari, V., Zaccaria, D., Sciortino, M.T., The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 30, 374–382, **2009**.
- [64] Erdoğar, N., İskit, A.B., Eroğlu, H3, Sargon, M.F., Mungan, N.A., Bilensoy, E., Cationic core-shell nanoparticles for intravesical chemotherapy in tumor-induced rat model: safety and efficacy, *International Journal of Pharmaceutics*, 471, 1-9, **2014**.
- [65] Ibáñez, C., Valdés, A., García-Cañas, V., Simó, C., Celebier, M., Rocamora-Reverte, L., Gómez-Martínez, A., Herrero, M., Castro-Puyana, M., Segura-Carretero, A., Ibáñez, E., Ferragut, J.A., Cifuentes, A., Global Foodomics strategy to investigate the health benefits of dietary constituents, *Journal of Chromatography A*, 1248, 139-153, **2012**.
- [66] Wu, Y., Li, L., Sample normalization methods in quantitative metabolomics, *Journal of Chromatography A*, 1430, 80-95, **2016**.
- [67] Anonim, Showing metabocard for Isonicotinic acid (HMDB0060665), <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0060665>, (Mayıs, **2018**).
- [68] Anonim, Showing metabocard for Niacinamide (HMDB0001406), <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0001406>, (Mayıs, **2018**).
- [69] Anonim, Showing metabocard for 2-Acetylpyrazine (HMDB0031861), <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0031861>, (Mayıs, **2018**).
- [70] Anonim, Showing metabocard for NAD (HMDB0000902), <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000902>, (Mayıs, **2018**).

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Işıl Varol
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Yılı : 1987

Eğitim

Lise : 2001-2005 İzmir Özel Saint Joseph Fransız Lisesi
Lisans : 2005-2012 Galatasaray Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği

Yabancı Dil ve Düzeyi

Fransızca : İleri
İngilizce : İleri

İş Deneyimi

2017-Devam : Garanti Bankası, Teftiş Kurulu, Bilgi Sistemleri Müfettişi
2013-2017 : Türk Telekom, IP/MPLS Ağ ve Sistem Uzman Mühendisi

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Teden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Siklodekstrin Nanopartiküllerin Sitotoksik Etki Mekanizmasının Aydınlatılmasında Biyoenformatik Yaklaşımlar

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 102 sayfalık kısmına ilişkin, 18/06/2018 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.


 19.06.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Işıl VAROL
Öğrenci No: N13223629
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Programı: Nanoteknoloji ve Nanotıp - Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.


Doç. Dr. Mustafa Çelebier

(Unvan, Ad Soyad, İmza)