

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇALIŞMALAR İLE KOLON
KANSERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERE KARŞI DİRENCİN İN
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gürkan ÖZEN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2019**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇALIŞMALAR İLE KOLON
KANSERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERE KARŞI DİRENCİN İN
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gürkan ÖZEN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU**

**ANKARA
2019**

**METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇALIŞMALAR İLE KOLON KANSERİNDE
KEMOTERAPÖTİKLERE KARŞI DİRENCİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gürkan ÖZEN

Danışman: Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU

Bu tez çalışması 29.05.2019 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Bengi USLU
(Ankara Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞÇI
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Sedef KIR
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Erol ŞENER
(Anadolu Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ
(Hacettepe Üniversitesi)



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

18 Haziran 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

11 /06/2019

(imza)

Gürkan Özen

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

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

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

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

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

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

ETİK BEYAN

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

 Gürkan ÖZEN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya.

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Sedef KIR ve Sayın Doç. Dr. Erol ŞENER'e.

Tez çalışmasını yönlendiren ve hücre kültürü çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan Sayın Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU, Açelya ERİKÇİ ve İpek BAYSAL'a.

Tez çalışmalarım sırasında analitik yöntemlerin uygulanmasında yardımlarından dolayı Cemil Can EYLEM'e.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'mızdaki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma.

Tüm tez çalışmam boyunca beni destekleyen AİLEME teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Özen G., Metabolomik ve Fluksomik Çalışmalar İle Kolon Kanserinde Kemoterapötiklere Karşı Direncin İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2019. Günümüzdeki yenilikçi teknolojiler sayesinde omiks (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve fluksomik) gibi karmaşık analizler yapılabilmektedir. Omik analizlerden elde edilen detaylı bilgi; hastalıkların mekanizmasını anlamak, erken teşhisini kolaylaştırmak, bireysel tedavi stratejilerini seçmek ve bunların etkinliğini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Metabolomik fenotipinin belirlenebilmesi için çok sayıdaki metabolitin eş zamanlı ve kapsamlı analizlerinin yanı sıra döngü hızlarının da belirlenmesini gerektirir. Tez çalışmaları kapsamında kolorektal kanseri *in-vitro* modeli olan insan kolon adenokarsinom hücre hatlarına (Caco-2) ve kontrol olan insan fetal kolon hücre hatlarının (FHC) kemoterapötiklere karşı gözlenen direnç gelişimine bağlı olarak fenotipde gözlenen değişimler metabolomik, lipidomik ve fluksomik analizler ile incelenmiştir. Fluksomik analizlerde kararlı ¹⁸O izotopunu işaretleme ajanı olarak kullanılmıştır. Metabolomik, lipidomik ve fluksomik analizlerin gerçekleştirilmesinde GC-MS ve LC-qTOF-MS analitik cihazları kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda 300'ün üzerinde metabolit/lipit ve 38 metabolitin ¹⁸O işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. Tez kapsamında ilk kez ¹⁸O kararlı izotopunu ile Krebs döngüsü metabolitleri, aminoasitler, yağ asitleri ve oligofosfonükleotitlerin işaretlenme yüzdeleri belirlenmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bulunan metabolitler ile gerçekleştirilen yolak analizlerinde malat-aspartat mekiği, aminoasit, amonyak metabolizmaları ile glikoz-alanin ve üre döngülerine ait yolakların dirence bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen kapsamlı omiks (metabolomik, lipidomik ve fluksomik) verileri, kemoterapötiklere karşı izlenen direncin hücre dinamiklerindeki farklılıklarını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Fluksomik, Metabolomik, Lipidomik, LC-qTOF-MS, GC-MS, Caco-2, kolon adenokarsinom

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK 1001 Projesi (116Z292)

ABSTRACT

Özen G., In Vitro Analysis of Resistance to Chemotherapeutics in Colon Cancer by Metabolomic and Fluxomic Studies, Hacettepe University Graduate of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Ph.D. Thesis, Ankara, 2019. Today's innovative technologies permits to perform complex analyses like omics (genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and fluxomics). Detailed information obtained from omics analysis has great potential to understand the mechanism of diseases, to facilitate early diagnosis, to choose individual treatment strategies and to assess their effectiveness. Characterization of metabolic phenotype requires simultaneous and comprehensive analysis of a large number of metabolites and their turnover rates. Within the scope of thesis studies, changes in phenotype of human colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2) which are in vitro models of colorectal cancer and human fetal colon cell lines (FHC) based on resistance development to chemotherapeutics were investigated by metabolomic, lipidomic and fluxomic analyzes. ^{18}O isotope were used as a marking agent in fluxomic analyzes. GC-MS and LC-qTOF-MS analytical instruments were used in the analysis of metabolomics, lipidomic and fluxomic. As a result of these analyzes, the more than 300 metabolites / lipids and ^{18}O labeling percentages of 38 metabolites were calculated. In thesis studies, incorporation ^{18}O in to Krebs cycle's metabolites, amino acids, fatty acids and oligophosphonucleotides were determined for the first time. The pathways analyses based on the significantly altered metabolites ($p < 0.05$) showed that alteration in the malate-aspartate shuttle, amino acid, ammonia metabolism, glucose-alanine and urea cycles pathways changed depending on the resistance. The data obtained from comprehensive omics (metabolomics, lipidomics and fluxomics) studies of these cell lines showed differences in cell dynamics of resistance to chemotherapeutics.

Keywords: Fluxomics, Metabolomics, Lipidomics, LC-qTOF-MS, GC-MS, Caco-2, colon adenocarcinoma

Supported by: TÜBİTAK 1001 Support Project (116Z292)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iiiv
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Omiks Analizleri	5
2.1.1. Metabolomik	7
2.1.2. Lipidomiks	18
2.1.3. Fluksomiks	19
3. DENEYSEL KISIM	28
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	29
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	30
3.5.1. Kemoterapötiklere Dirençli Caco-2 ve FHC Hücre Hatlarının Geliştirilmesi	31

3.5.2. Hücre Hatlarının 18O ile İşaretlenmesi	32
3.6. Metabolomik Analizler	32
3.6.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler	32
3.6.2. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizler	33
3.6.3. Lipidomiks Analizler	34
3.7. Fluksomiks Analizler	35
3.7.1. Fosfonükleotitlerin 18O İzotop Analizleri	38
4. BULGULAR	40
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	40
4.2. Kemoterapötiklere Dirençli Caco-2 Hücre Hatlarının Geliştirilmesi:	40
4.3. Metabolomik ve Lipidomik Analizler	41
4.4. Veri Analizi	43
4.5. Yolak Analizleri	72
4.6. Fluksomiks Analiz	83
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	104
7. KAYNAKLAR	105
EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK 2. Orjinallik Raporu	
Ek 3. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

\bar{x}_i	Metabolitlerin Ortalama Alanı
S_i	Standart Sapma
x_{ij}	Metabolitin Alanı
x_{imaks}	Metabolit Veri Matriksinde En Yüksek Değer
x_{imin}	Metabolit Veri Matriksinde En Küçük Değer
5-FU	5-Florürurasil
ADP	Adenosin Difosfat
AMP	Adenosin Monofosfat
ATP	Adenosin Trifosfat
BBS	Bağıl Standart Sapma
Caco-2	İnsan Kolon Karsinoma Hücre Hattı
CDP	Sistidin Difosfat
CIS	Sisplatin
CMP	Sistidin Monofosfat
CTP	Sistidin Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
FHC	Fötal İnsan Kolon Hücre Hattı
G1P	Glikoz-1-Fosfat
G3P	Gliserol-3-Fosfat
G6P	Glikoz-6-Fosfat
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GDP	Guanosin Difosfat
GMP	Guanosin Monofosfat
GP	Gliserofosfolipitler
GTP	Guanosin Trifosfat
IDP	Inozin Difosfat
IMP	Inozin Monofosfat
ITP	Inozin Trifosfat
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi

LC-qTOF-MS	Sıvı Kromatografisi-Kuatropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
M	Molar
MA	Moleküler Ağırlık
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Kütle Spektroskopisi
MSTFA	N-Metil-N-Trimetilsilil Trifloroasetamid
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCA	Temel Bileşen Analizi
PE	Fosfoetanolamin
PG	Gliserofosfolezler
PI	Fosfomiyoinozitolüdür
PLS	Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi
PS	Gliserofosfosinler
Q²	Tahmin Edebilme
R²	Tanımlayıcılık Katsayısı
SH	Standart Hata
SM	Sfingomyelin
SS	Standart Sapma
TDP	Timidin Difosfat
TMCS	Trimetilklorosilan
TMP	Timidin Monofosfat
TPN	Toplam Pik Alanı Normalizasyonu
TTP	Timidin Trifosfat
UDP	Üridin Difosfat
UMP	Üridin Monofosfat
UTP	Üridin Trifosfat
Mg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

μm	Mikrometre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Omiks analizleri.	6
2.2.	Metabolomik analiz basamakları: Numune hazırlama (sıvı, doku, hücre ekstraktları), metabolomik analiz (GC-MS, LC-MS, H-NMR gibi) ve veri analizi (tek değişkenli ve çok değişkenli).	9
2.3.	¹⁸ O işaretleme mekanizmasının ve işaretlenen metabolitlerin hangi yolak analizlerinde kullanıldığının şematik gösterimi.	21
2.4.	Doku, organ ve hücre hatlarının işaretlenmesi.	22
2.5.	¹⁸ O işaretlemenin izlenmesinde kullanılan analitik teknikler A) NMR ve B) kütle dedektörü.	23
2.6.	Termal kararlılığı olmayan ATP ve CrP'ın GC-MS ile analizleri.	24
2.7.	Krebs döngüsündeki metabolitlerin ¹⁸ O ile işaretlenme başlangıç noktaları.	25
2.8.	Krebs döngüsündeki metabolitlerin birincil döngü sonundaki işaretlenen metabolitleri ve işaretlenme yerleri.	26
2.9.	Krebs döngüsündeki metabolitlerin ikincil döngü sonundaki işaretlenen metabolitleri ve işaretlenme yerleri.	26
4.1.	5-FU'in Caco-2 hücrelerinin % canlılığına etkisi	40
4.2.	Farklı derişimlerde CIS'nin Caco-2 hücrelerinin % canlılığına etkisi	41
4.3.	Caco-2 hücre hattına ait numune GC-MS kromatogramı.	42
4.4.	Metabolomiks analizleri için elde edilen LC-qTOF-MS kromatogramları A) Negative iyonizasyon modu, B) Pozitif iyonizasyon modu.	42
4.5.	Lipidomiks analizleri için elde edilen LC-qTOF-MS kromatogramları A) Negative iyonizasyon modu, B) Pozitif iyonizasyon modu.	43
4.6.	Ham veri üzerine ölçeklendirme etkisi.	44
4.7.	Ortanca normalizasyon tekniği üzerine ölçeklendirme etkisi.	45

4.8.	TPN tekniği üzerine ölçeklendirme etkisi.	46
4.9.	Caco-2 ve FHC hücre hatlarına ait GC-MS metabolomik profillerine ait PLS-DA skor grafiği.	48
4.10.	Caco-2 ve FHC hücrelerine ait bütünleşik omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verilerine ait PCA skor grafiği.	68
4.11.	Caco-2 ve FHC hücrelerinin bütünleşik omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verilerine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.96 ve Q^2 :0.73), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	69
4.12.	Caco-2 hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen bütünleşik omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verisine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.95 ve Q^2 :0.76), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	70
4.13.	FHC hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen bütünleşik omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verisine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.99 ve Q^2 :0.87), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.	71
4.14.	5-FU direncine bağlı olarak Caco-2’de etkileşen yolaklar.	72
4.15.	CIS direncine bağlı olarak Caco-2’de etkileşen yolaklar.	74
4.16.	5-FU ve CIS direncine bağlı olarak Caco-2’de etkileşen yolaklar.	76
4.17.	5-FU direncine bağlı olarak FHC’de etkileşen yolaklar.	78
4.18.	CIS direncine bağlı olarak FHC’de etkileşen yolaklar.	80
4.19.	5-FU ve CIS direncine bağlı olarak FHC’de etkileşen yolaklar.	82
4.20.	Krebs Döngüsü metabolitlerinin kontrol ve ^{18}O işaretlenmiş hücre hatlarından analizlerine ait örnek GC-MS kromatogramlar.	84
4.21.	Hücre hatlarında ^{18}O ile işaretlenmiş ATP, ADP ve AMP metabolitlerine ait LC-qTOF-MS spektrumlar.	85
4.22.	Caco-2 ve FHC hücre hatlarında yapılan analizler sonucunda farklı metabolitler için elde edilen ^{18}O işaretlenme yüzdeleri (1, 2 ve 5 dak)	86
4.23.	Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan Krebs döngüsü metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri.	87

- 4.24.** Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan fosfat içeren metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri. 88
- 4.25.** Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan fosfat içermeyen metabolitlerin ^{18}O ile işaretlenme yüzdeleri. 89
- 4.26.** Hücre hatlarında ^{18}O ile işaretlenmiş fosfonükleotitlerin işaretlenme yüzdeleri. 90

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Metabolik profillemeye için kullanılan NMR, GC-MS ve LC-MS yöntemlerinin karşılaştırılması.	11
3. 1.	GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.	33
3.2.	LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler gradient elüsyon programı.	34
3.3.	LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.	34
3.4.	Lipidomiks analizler gradient elüsyon programı.	35
3.5.	¹⁸ O izotop analizleri için GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.	36
3.6.	Monofosfat içeren metabolitlerin TMS türevlerinin ¹⁸ O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri.	37
3.7.	Krebs döngüsü'nde yer alan metabolitlerin ¹⁸ O işaretlenme yüzdesi için kullanılan m/z değerleri.	37
3.8.	Diğer fosfat içermeyen metabolitlerin ¹⁸ O işaretlenme yüzdesi için kullanılan m/z değerleri.	38
3.9.	Fosfonükleotitlerin ¹⁸ O izotop analizleri gradient elüsyon programı.	39
4.1.	Normalizasyon etkisinin temel bileşen 1'e etkisi.	47
4.2.	Normalizasyon etkisinin temel bileşen 2'ye etkisi.	47
4.3.	Normalizasyon etkisinin ilk iki temel bileşen üzerine etkisi.	47
4.4.	GC-MS analizi sonucunda tanımlanan metabolitler ve bağlı derişimleri*.	48
4.5.	LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilen metabolomiks analizler sonucunda elde edilen metabolitler ve bağlı derişimleri.	51
4.6.	LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilen lipidomiks analizler sonucunda elde edilen metabolitler ve bağlı derişimleri.*	54
4.7.	Caco-2 ve FHC hücre hatlarından elde edilen grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.	58
4.8.	5-FU direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.	73

- 4.9.** 5-FU direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 73
- 4.10.** CIS direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 75
- 4.11.** CIS direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 75
- 4.12.** 5-FU ve CIS direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 77
- 4.13.** 5-FU ve CIS direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 77
- 4.14.** 5-FU direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 79
- 4.15.** 5-FU direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 79
- 4.16.** CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 81
- 4.17.** CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 81
- 4.18.** 5-FU ve CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 83
- 4.19.** 5-FU ve CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar. 83
- 4.20.** Caco-2 ve FHC hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen döngü hızları. 90

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser hücresi normal bir dokudan farklı olarak zorlu bir ortama cevap vermek için hücre büyümesini ve proliferasyonunu arttırarak metabolizmasını değiştirir. Kanser metabolizması, çoğu normal doku hücresiyle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde belirgin olan hücresel metabolizma yollarındaki değişiklikleri ifade eder. Kanser hücrelerinde metabolik değişiklikler çoktur ve aerobik glikoliz, indirgenmiş oksidatif fosforilasyon ve hücre büyümesi ve çoğalması için ihtiyaç duyulan biyosentetik ara maddelerin oluşumunu arttırır. Buna ek olarak kanser hücrelerinin, hücre proliferasyonu ve yüksek enerji ihtiyacını karşılayabilmek için yüksek aerobik glikolitik yolak oranını ve yüksek miktarda laktat ve pirüvat üretimini korumaya devam etmesi gerekmektedir (1-3). Sağlıklı hücreler normal oksijen seviyelerinde glikozu tamamen tüketirken, kanser hücreleri düşük oksijen seviyelerinde bile glükozu kısmen parçalayabilirler. Bu nedenden dolayı normal hücreler oksijensiz ortamda fazla yaşayamazken kanser hücreleri oksijensiz ortamda büyüyüp, gelişebilirler ve çoğalabilirler. Hatta kanser hücreleri düşük oksijen seviyelerinde bile daha fazla miktarda glükoz tüketme kabiliyetine sahiptir ve bu etki kaynaklarda Warburg Etkisi olarak bilinmektedir. pO_2 'nin normal olduğu koşullarda oksidatif fosforilasyon gerçekleşir ve pirüvat krebs döngüsüne girer. Bu metabolik profil birçok kanser hücresinde yaygın olarak görülmekte ve normal hücrelere göre daha yüksek oranda proliferasyon avantajı sağlamaktadır. Kanser hücresinin, oksijen bol miktarda olsa bile oksidatif fosforilasyondan kaçınması ve aerobik glikolizi benimsemesi, sitozolde önemli ölçüde karbon iskeleti oluşumunu sağlar ve biyosentetik yollarını verimli bir şekilde aktive edilebilmesine olanak verir (4). Yapılan çeşitli çalışmalar örneğin 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz 2,6-bifosfataz gibi birçok glikolitik enzimin içeriğinde bir artış olduğunu göstermiştir. Glikolizin bu enzimler tarafından düzenlenmesi kanser hücrelerinde biyoenerjetik ve biyosentez taleplerini yerine getirmek için gerekli glikolitik akış değişikliklerini sağlar.

Kolorektal kanser türleri son yıllarda tedavisinde önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olarak kalmaktadır. 5-FU, kolorektal kanser tedavilerinde ve klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır ve olmaya devam etmektedir. 5-FU'nun

antineoplastik etkinliği, hücre büyümesinin durması ve apoptoz ile sonuçlanan DNA hasarını arttırma kabiliyetine bağlanmaktadır. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaç direncine bağlı olarak klinik etkinlikleri zamanla azalır. İlaç direnci 5-FU, CIS ve ilgili kemoterapötik ilaçların klinik uygulamasında kritik bir sınırlama olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaç direncinin üstesinden gelmek için daha fazla araştırma yapılması, kanser tedavisinin gücünü arttırmada etkili olacaktır.

Glikoliz yolağının dışında birçok farklı yolaktaki (Krebs Döngüsü, enerji iletimi gibi) değişiklerin takip edilebilmesi kanser mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunulacaktır. Ayrıca kolorektal kanser tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötik ajanlar olan 5-FU ve CIS'e tedavi sırasında sıklıkla direnç gelişmektedir. Bu iki farklı mekanizma ile etki gösteren kemoterapötik ajanlara geliştirilecek olan direncin in-vitro olarak metabolomik ve fluksomik analizlerle incelenmesi ile gelişen direnç profillerinin farklı olup olmadığı aydınlatılabilecektir.

Tezimizde kontrol hücre hattı olarak FHC hücre hattı ile kemoterapötiklere direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatlarının metabolomik profilleri ve ¹⁸O işaretlemeyle dayalı fluksomiks analizleri GC-MS ve LC-qTOF-MS yöntemleri ile belirlenmiştir. Böylece direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş hücre hatlarında fluksomik ve metabolomik çalışmalarının tamamlanması ile metabolitler açısından belirli değişikliklerin olup olmadığı ve döngü hızları açısından farklılık olup olmadığına yönelik sorulara yanıt aranmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde diğer kanser grupları gibi gittikçe artan bir insidansa sahip olan kolorektal kanser (tüm kanserlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır) en sık karşılaşılan kanser türlerinden biridir. Gastrointestinal sistem kanserleri arasında en sık rastlanan kanser türüdür ve ölüme yol açan kanserler arasında ise ikinci sırada bulunmaktadır. Avrupa' da yapılan bir araştırmaya göre her yıl yaklaşık 200 000 kişi kolorektal kanser hastalığına yakalanmaktadır ve her yıl yüzbine yakın insan hayatını kaybetmektedir. Hastaların yaklaşık %20'sinde tanı aşamasında metastaz vardır. Araştırmalar kolorektal kanserin selim poliplerden geliştiğini göstermektedir. Polip oluşumun erken tanısı ve yok edilmesi bu hastalığın tedavisi için en önemli basamaktır. Diğer yandan erken tanı konmamış ya da metastaz durumundaki hastalara uygulanan kemoterapötiklere karşı direnç gelişen hastaların tedaviye karşı yanıtı azalmıştır. Kolorektal kanser alanındaki araştırmalarda, in vitro hücre kültürü modellerinde Caco-2 insan kolon adenokarsinom hücrelerinin diferansiyasyon olarak kemoterapötiklere karşı direnç gösterildiği bildirilmiştir. Bu hücrelerin başkalaştıktan sonra metabolik profillerinin değiştiği kayanıklarda rapor edilmiştir (5). Fakat hücrenin dinamikleri hakkında herhangi bir bilgi sunulmamıştır. Ayrıca metabolik profili belirlemede hassasiyeti çok düşük olan NMR spektrumu kullanılmıştır.

Doğada, bakterilerden insan kanser hücrelerine kadar tüm canlı organizmalarda içsel ve edinilmiş ilaç direnci meydana gelir. Direnç, hücreleri doğal toksik ürünlerden ve diğer çevresel stres kaynaklarından korumak için evrimsel olarak geliştirilen doğal bir hücresel savunma mekanizmasıdır (6).

İnsan tümör hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesi, kemoterapinin başarısızlığının birincil nedenidir. İlaç hedef genlerinin amplifikasyonu veya mutasyonu, ilaç defektinin taşınması veya p170'in (çoklu ilaç direnci proteini) aşırı ekspresyonu gibi çok sayıda direnç mekanizması tanımlanmış ve esas olarak tümör hücre hatları kullanılarak çalışılmıştır (7).

İlaç direnci neredeyse tüm kolon kanseri hastalarında gelişir ve anti-kanser ajanların terapötik etkinliklerinde azalmaya yol açar. Geçtiğimiz yıllarda ilaç direncine

neden olan bir dizi temel mekanizma tanımlanarak iki ana başlık altında sınıflandırılmıştır: hücrel olmayan ve hücrel direnç mekanizmaları. Hücrel olmayan mekanizmalar, sınırlı vasküler erişilebilirlik ve tümör mikroçevresi gibi hücre dışı faktörleri içerir. Öte yandan hücrel mekanizmalar, kanser hücrelerinin içindeki ilaç hedefleri, enzimler ve taşıma sistemleri ile ilişkilidir ve 2 alt kategoriye ayrılır: klasik/transport bazlı ve klasik olmayan/non-transport bazlı mekanizmalar. Deneysel modeller *in vitro* olarak sitotoksik bileşiklerle kolayca oluşturulabildiğinden, kanserde ilaç direncinin hücrel mekanizmaları sıklıkla çalışılmaktadır (8).

Kolorektal kanser tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötik ajanlar olan 5-FU ve CIS tedavi sırasında sıklıkla direnç gelişmektedir. CIS platin içeren kemoterapötikler ailesinin ilk üyesidir ve etkilerini DNA'ya bağlanarak gerçekleştirir. CIS'in sitotoksik etkisini bütün DNA-bazlarına, özellikle guanin ve adeninin N-7-pozisyonuna bağlanarak gösterir. Bu şekilde DNA sarmallarının çapraz bağlanmasını ve takibinde de hücrenin programlı ölümünü tetikler. Pirimidin analogu olan 5-FU ise bir intihar inhibitörü olup timidilat sentezini geri dönüşümsüz inhibe ederek etki göstermektedir.

Kolon kanseri tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç olan 5-FU normal ve tümör bağırsak hücrelerinde ölümü azaltabilir. Bu nedenle, bu işlemle ilgili genlerdeki değişiklikler kemoterapi üzerinde derin etkilere sahip olabilir ve tümör hücreleri tarafından 5-FU direncinin gelişmesine katkıda bulunabilir. Apoptotik yolun genleri arasında, p53 tümör baskılayıcı gen, siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21/WAF1'in uyarılması aracılığıyla G1 büyümesinin durdurulmasında rol ve ayrıca DNA hasarına karşılık pro-apoptotik bax geninin transaktivasyonu yoluyla apoptozda rol oynar. İnsan kanserlerinin çoğunda inaktive olan p53 geni, kolon kanserinin 5-FU'ya yanıtının kesin bir indikatörü olarak önerilmiştir. Birçok çalışma, p53 durumunu prognoz ve tümörlerin tedaviye yanıtı ile ilişkilendirmiştir. Bununla birlikte, p53 durumunun kolon tümörlerinin 5-FU duyarlılığına etkisi hala tartışmalıdır (7).

DNA yanlış eşleşme onarımı proteinlerindeki değişiklikler, birçok kanser hücre hattının CIS'e karşı artan direnci ile ilişkilendirilmiştir. CIS, biyolojik aktivitesi, platin bileşiği ile DNA'daki bazı bazlar arasında kovalent eklentilerin oluşumunun bir sonucu olan güçlü bir antikanser ilaçtır. CIS birçok testis ve bazı over karsinomlarının

tedavisine katkıda bulunur. Bununla birlikte, CIS'in kolorektal kanserde etkinliği düşüktür. Kanser hücrelerinin CIS ve türevlerine karşı edinilmiş veya doğal dirençlerini açıklamak için birçok mekanizma önerilmiştir. Bunlar arasında, ilacın birikiminin azalması, glutatyon veya metalotiyoninler tarafından artan hücreSEL detoksifikasyon, CIS DNA eklentilerinin çıkarılmasının artışı ve DNA onarımında artış, platin DNA hasarına tolerans ve ilaca maruz kaldıktan sonra apoptoz aktivasyonunda rol alan sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler sayılabilir (9).

İnsan kanser hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* CIS direncinin gelişmesi sırasında, muhtemelen hücreleri çevresel toksinlere karşı koruyan birçok farklı yolun aktivasyonunu yansıtan çok sayıda epigenetik ve/veya genetik değişiklik meydana gelebilir. CIS birçok farklı hücre girişi yoluna ve çoklu hücreSEL hedeflere sahip olduğundan (yaygın olarak kabul edilen hücre öldürme mekanizması platin-DNA bağlanması yolu aracılığıyla), bu platin bileşiğine direnç, hem molekülerde hem de derinde meydana gelen hücre sağkalımı, apoptoz, gelişim yolları, endositoz, DNA metilasyonu, gen aktivasyonu/susturulması ve çoklu transkripsiyon faktörleri ve miRNA'ların aracılık ettiği mutasyonlar gibi ciddi değişikliklere gereksinim duyar (6).

Tümörlerin heterojenliği ve ilaçlara verdikleri farklı yanıtlar, *in vivo* direnç mekanizmalarının çalışmasını zorlaştırmaktadır. Tümör hücrelerin ilaç etkilerinden kendiliğinden kaçış (doğuştan gelen direnç) veya gecikmeden sonra (edinilmiş direnç) kaçma kabiliyetine dayanarak iki tip direnç tanımlanmıştır. Bu dirençlerde ne tür bir mekanizma olursa olsun, kemoterapi sırasında tümör davranışını öngörmek ve uygun bir tedaviye karar vermede yardımcı olmak için belirteçlere ihtiyaç vardır (7).

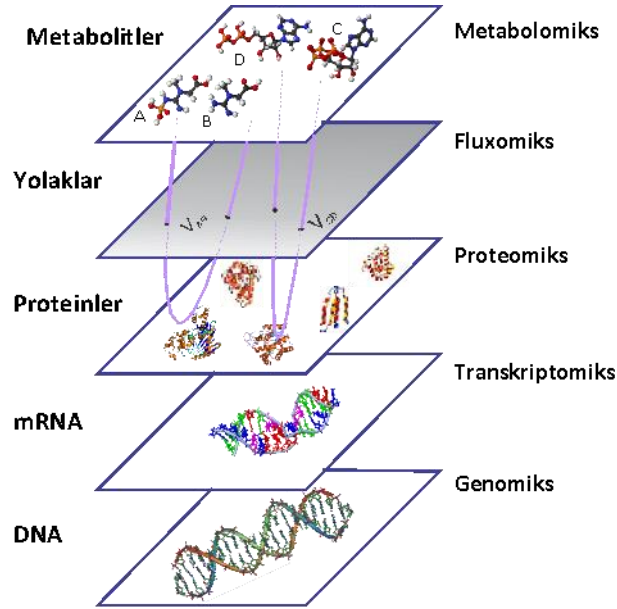
2.1. Omiks Analizleri

Teknolojik gelişmelerin ve temel bilimlerdeki keşiflerin klinik uygulamalara aktarılmasıyla birlikte sağlık bilimleri daha ileri düzeye taşınmaktadır. Günümüzdeki yenilikçi teknolojiler sayesinde genom, transkriptom, proteom, metabolom ve fluksom gibi karmaşık analizler yapılabilmektedir. "Omiks" (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve fluksomik) analizlerinden elde edilen detaylı bilgi; hastalıkların mekanizmasını anlamak, erken teşhisini kolaylaştırmak, bireysel tedavi

stratejilerinin seçilmesi ve bunların etkinliğinin değerlendirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir (10-19).

Omiks kelimesi, biyolojik bilimlerde genomik, transkriptomik, proteomik veya metabolomik gibi -omik ile biten bir çalışma alanını ifade eder. Son -om eki, sırasıyla genom, proteom, transkriptom veya metabolom gibi bu tür alanlardaki çalışma nesnelerini ele almak için kullanılır.

Bir hücrenin/organizmanın fenotipi ve fonksiyonu, bir arada olan ve etkileşen genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler ile tanımlanır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Omiks analizleri.

Canlı türlerin her hücresi gen içerir. Genler, tüm organizmaların hayatta kalması ve büyümesi için gerekli olan farklı bilgi parçalarını kodlayan DNA dizileridir. Bir organizmada bulunan bütün genler genom olarak bilinir. Bir kuşaktan diğerine geçen genler, bir organizmanın inşası ve yatkınlığımızdan hastalıklara, bazı bakterilerin aşırı sıcaklıklarda nasıl hayatta kalabileceğine kadar her şeyi belirleyen temel talimatları içerir. Daha spesifik olarak genomik, genomların yapısını, fonksiyonunu, evrimini ve haritalanmasını inceleyen ve enzimlerin ve haberci moleküllerin yardımıyla protein üretimini yönlendiren genlerin karakterizasyonu ve miktarını belirleyen bilimdir.

Transkriptom bir hücre, doku veya organizmada bulunan tüm haberci RNA moleküllerinin kümesidir. Moleküler kimliklere ek olarak her RNA molekülünün miktarını içerir. Transkriptom analiz deneyleri, araştırmacıların transkripsiyonel aktiviteyi (kodlama ve kodlama yapmayan) karakterize etmelerini, ilgili hedef genlerin ve transkriptlerin bir alt kümesine odaklanmalarını veya bir hücre fonksiyonunun bütüncül bir resmini oluşturmak için aynı anda binlerce genin profilini oluşturmalarını sağlar. Gen ekspresyonu analizi çalışmaları, çeşitli koşullar altında aktif olarak eksprese edilen genlerin ve transkriptlerin bir anlık görüntüsünü sağlayabilir.

Proteom terimi, bir hücre, doku veya organizmada bulunan tüm proteinlerin toplamını belirtir. Proteomik, bu proteinleri biyokimyasal özellikleri ve fonksiyonel rolleri ile ve bunların miktarlarının, modifikasyonlarının ve yapılarının büyüme sırasında ve iç ve dış uyaranlara cevap olarak nasıl değiştiğini inceleyen bilimdir.

Metabolom, izole edilmiş bir organizmanın, hücre sisteminin, dokusunun veya biyolojik sıvının tüm metabolitlerinin kapsamlı analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım biyolojik sistemin metabolik fenotipini sağlar. Metabolomik analiz, tüm metabolitlerin tarafsız bir şekilde tanımlanmasını ve nicelendirilmesini sağlamalıdır. Daha spesifik olarak, metabolomikler, belirli hücresel işlemlerin etkinlikleri sırasında oluşturdukları kimyasal parmak izlerinin incelenmesidir; tüm küçük moleküllü metabolit profillerinin incelenmesidir. Genel olarak, omik bilimlerinin amacı bir hücre, doku veya organizmanın yapısı, işlevi ve dinamiği ile ilgili tüm biyolojik molekülleri tanımlamak, karakterize etmek ve ölçmektir.

Tez çalışmaları kapsamında metabolomik ve fluksomik analizler gerçekleştirildiğinden bu omik teknikler detaylı olarak incelenmiştir.

2.1.1. Metabolomik

Geleneksel biyomedikal araştırmalar tek bir gen, protein, metabolit veya metabolik yolağın analizi üzerine odaklanmıştır. Bu "moleküler indirgemeci" yaklaşım genetik varyasyonları ve moleküler bileşenleri tanımlayarak hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasına yol açacağı varsayımına dayanmaktadır. Bununla birlikte, hastalıkların birçoğu karmaşık ve çok faktörlü hastalıklar olup,

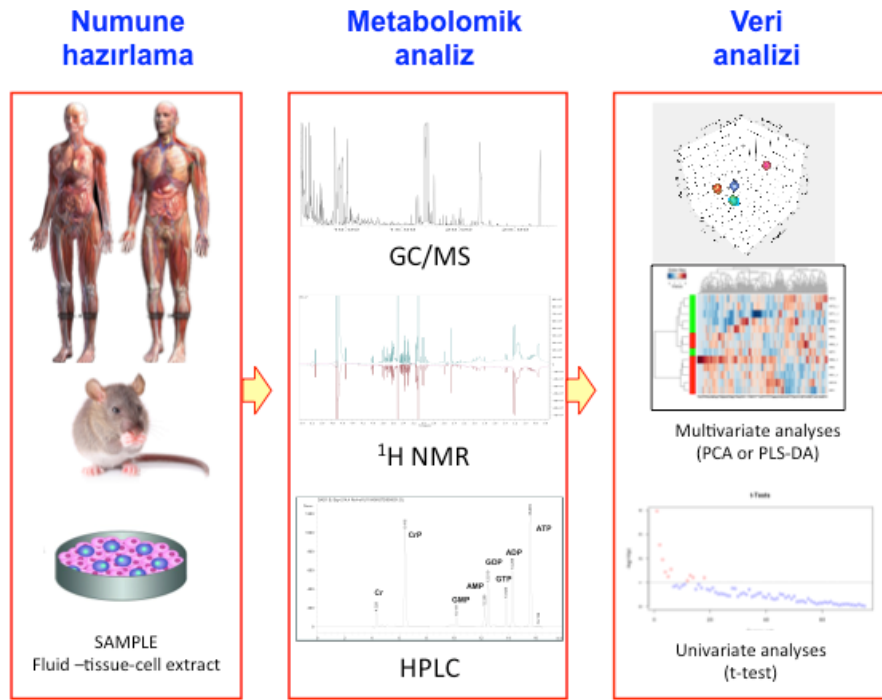
hastalığın fenotipinin belirlenmesinde, birden fazla genin, yolağın, proteinin ve metabolitin hücre, doku ve organizma seviyesinde meydana gelen değişikliklerin analiz edilmesiyle anlaşılabilir (10, 16, 18).

Hastalıkların metabolomik profillerinin çıkarılabilmesi için çok sayıda metabolitin aynı anda kapsamlı olarak analizlerinin yapılması gerekmektedir. Metabolitlerin miktarlarında oluşan değişiklikler genetik veya çevresel faktörlerin yanı sıra hastalıklardan, gut florasından, ilaçlardan, toksinlerden ve yaşam tarzından kaynaklanan hücresel ve sistemik varyasyonlardan oluşmaktadır (20-24). Bu varyasyonların izlenmesi için kullanılacak analitik platformlar, karmaşık biyolojik örneklerden yüzlerce metabolitin eş zamanlı olarak analizleri gerçekleştirebilmelidir (23, 25-27). Fakat, metabolitlerin fizikokimyasal çeşitliliğinden (hidrofilik karbonhidratlar, uçucu alkoller ve ketonlar, amino ve amino olmayan organik asitler ve hidrofobik lipidler gibi) dolayı, günümüzdeki mevcut analitik platformların hiç biri komple bir metabolomik analizin tüm gereksinimleri karşılayamamaktadır. Bu nedenle, komple metabolomik analizler için farklı tamamlayıcı analitik tekniklerin uygulanması gerekmektedir (21, 28, 29). Gelişmiş ve bilgi açısından zengin spektroskopik teknikler metabolomik çalışmalar için esastır (30). Metabolomik çalışmalarda kullanılan önemli spektroskopik teknikler NMR spektroskopisi (^1H , ^{31}P , ^{13}C , ^{17}O ve diğerleri) ve kütle spektrometrisi (doğrudan enjeksiyon ve GC veya LC ile kombine edilmiş halde) bulunmaktadır. Birbirlerine göre analitik açıdan avantaj ve dezavantajları olan bu iki teknik, birden fazla kimyasal sınıfın kapsamlı metabolomik analizlerinde eş zamanlı olarak kullanılabilir (20, 25, 30). Metabolomik analizler serum, idrar, beyin omurilik sıvısı, plazma, tükürük, gibi vücut sıvılarında yapılabilmektedir. Metabolomik analizlerin amacı; hastalık belirtisi olan veya tedavinin aşamalarının denetlenmesini sağlayan metabolitlerin belirlenmesi olup bu analizler hastalıkların teşhisinde, tedaviye yanıtın incelenmesinde, biyobelirteçlerin keşfinde gittikçe artan uygulama yolu olmuştur (18).

Metabolomik analiz belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük moleküllü metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir. Metabolomik analizler numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleri olmak üzere başlıca üç

aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3). Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik analizler de numunelerin toplanması, hazırlanma basamakları ve kromatografik sistemlerde kullanılan sabit ve hareketli fazlar aynıdır. Hedeflenmiş analizlerde analiz öncesinde hedeflenmiş metabolitlerin izotopları eklenerek iyon seçici konumda (SIM) analizleri gerçekleştirilir. Hedeflenmemiş çalışmalarda ise analizler tarama konumunda (SCAN) gerçekleştirilir.

Metabolomiks çalışmaları çok farklı biyolojik materyalde (kan, idrar, doku, tükürük, hücre vb.) gerçekleştirilebilir. Analiz yapılacak hedef metabolit tipine göre tüketme tekniği belirlenmektedir. Lipit ve türevlerinin analizinde kloroform gibi apolar çözücüler tercih edilirken, polar bileşiklerin analizinde metanol ve/veya karışımlar tercih edilmektedir. Tüm bu çözücüler içinde polar ve apolar metabolitleri çözebilen metanol metabolomik analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Metabolomik analiz basamakları: Numune hazırlama (sıvı, doku, hücre ekstraktları), metabolomik analiz (GC-MS, LC-MS, H-NMR gibi) ve veri analizi (tek değişkenli ve çok değişkenli).

Metabolik ağların ve fonksiyonlarının, kapsamlı bir karakterizasyonu için metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesi gerekir. Fiziksel ve kimyasal olarak büyük farklılıklar gösteren metabolitlerin (polar/apolar, asit/baz gibi) tek bir analitik yöntem ile analizlerinin gerçekleştirilememektedir. Bu yüzden farklı analitik yöntemlerin

kullanılması gerekmektedir (30). Metabolomiks analizler için en çok kullanılan yöntemler nükleer manyetik rezonansın (NMR) ve kütle spektroskopisinin kombine edildiği sıvı ve gaz kromatografisidir. Her üç yöntem birbirlerine göre farklı üstünlükler göstermektedir (Tablo 2.1). Genel olarak NMR ile kütle spektroskopisini karşılaştırırsak, NMR'ın kütle spektroskopisine göre en büyük dezavantajı mM seviyesindeki metabolitlerin tayini için kullanılabilmesi ve düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır. Bu da plazmaya ait bir NMR spektrumunda 30 ile 50 metabolitin tayinine imkan sağlamaktadır. GC-MS ile yapılan metabolomiks çalışmalarda tanımlanabilen metabolit sayısı 100 civarında iken LC-MS ile bu rakam 200 civarına ulaşabilmektedir.

Metabolomiks çalışmalarda MS, NMR ve diğer spektroskopik yöntemler ile gerçekleştirilse de çalışmaların çoğunluğu MS yönteminin farklı ayırma teknolojileri (GC, LC, SFC ve CE) ile kombinasyonu kullanılmıştır. Özellikle LC-MS ile yapılan çalışmalarda yapısal moleküler iyon bilgisini elde etmek için analizler önce düşük çarpışma enerjisi, ardından parça iyonlarını elde etmek için yüksek çarpışma enerjisi MS₂ koşulları kullanılır. Tipik olarak öncül iyon seçilir ve tandem kütle spektrometrisi (MS / MS) ile fragmentasyon izlenir. Bu yaklaşım, karmaşık biyolojik numunelerde daha fazla yapısal bilgi ve metabolitlerin tanımlanmasını sağlar (31).

Tablo 2.1. Metabolik profillemeye için kullanılan NMR, GC-MS ve LC-MS yöntemlerinin karşılaştırılması.

Analitik platform	Avantaj	Dezavantaj	Analiz edilen metabolit Türü
NMR	<ul style="list-style-type: none"> • Yıkıcı olmayan • Metabolit derişimi verir • Tekrarlanabilir • Basit numune hazırlama • Yüksek tekralanabilirlik (%1-5) 	<ul style="list-style-type: none"> • Diğerlerinden daha az hassas (nM) • Büyük örnek hacmi • Seçicilik • Tanımlanabilen metabolit sayısı (20-30) • Yüksek kurulum maliyeti • Yüksek idame maliyeti 	Şekerler Aminler Uçucu sıvılar Büyük metabolitler
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Kısa ayırma süresi • Yüksek çözünürlük • Yüksek kütle hassasiyeti • Basit numune hazırlama • Yüksek hassasiyet • GC-MS'den daha geniş metabolit aralığı • Kısa analiz süresi (H-NMR için <5 dak) 	<ul style="list-style-type: none"> • Yıkıcı • Kısa anaiz süresi • Tekralanabilirlik (< %20) • Spektrumun kalitesi • Moleküler iyon yoğunluğu • İyon baskılanma problemi 	Orta ila yüksek liyofilisite Nükleositler ve nükleotitler Karbonhidratlar
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Tekrarlanabilir alıkonma süreleri • Kapsamlı veritabanları • Serbest yağ asitleri için LC-MS'den daha fazla hassasiyet • İyon baskılanması yok • Düşük kurulum maliyeti 	<ul style="list-style-type: none"> • Kapsamlı numune hazırlama • Numuneler uçucu olmadığında türevlendirme gerektirir • Numune hazırlama nedeniyle oluşabilecek olası değişiklikler • Tekralanabilirlik (< %30) • Yüksek numune hazırlama maliyeti 	Esterler Fosforlanmış metabolitler Kolesterol Uçucu bileşikler

Elde edilen metabolit sayısının çok fazla olmasından dolayı metabolomiks analizlerde tek değişkenli analizlerden ziyade çok değişkenli analizler kullanılmaktadır. Çok değişkenli veri analizleri, çok sayıda değişkenler içeren veri setinin boyutlarını, verideki mevcut varyansları değiştirmeden daha az boyuta indirgenmesini sağlayan bir dönüşüm tekniğidir. Bu yöntemlerdeki amaç mevcut veriyi en az sayıda değişkenle ifade edebilmektir. Böylece veriler daha hızlı bir şekilde görselleştirilebilir ve değerlendirilebilir. Bu amaçla metabolomik veri analizlerinde PCA ve PLS-DA yöntemleri sıklıkla kullanılır.

Temel Bileşen Analizi (PCA): büyük bir değişken kümesini hala büyük kümedeki bilgilerin çoğunu içeren küçük bir kümeye indirgemek için kullanılabilen bir boyut küçültme aracıdır. PCA, bir dizi (muhtemelen) ilişkilendirilmiş değişkeni, temel bileşenler olarak adlandırılan (daha küçük) bir dizi ilişkisiz değişkene dönüştüren matematiksel bir prosedürdür. PCA'daki ilk ana bileşen, verilerdeki değişkenlikten mümkün olduğu kadar sorumludur ve takip eden her bir bileşen mümkün olan en fazla kalan değişkenlikten sorumludur.

Kısmi en küçük kareler-ayrıştırıcı analizi (PLS-DA): Kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS regresyonu), temel bileşenler regresyonu ile ilişki taşıyan istatistiksel bir yöntemdir; Tepki ve bağımsız değişkenler arasında maksimum varyans hiper düzlemleri bulmak yerine, öngörülen değişkenleri ve gözlenebilir değişkenleri yeni bir alana yansıtarak doğrusal bir regresyon modeli bulur. Hem X hem de Y verileri yeni alanlara yansıtıldığından, PLS yöntem ailesi bilinear faktör modelleri olarak bilinir. PLS-DA, Y kategorik olduğunda kullanılan bir değişkendir ve deneysel grup üyeliğinden elde edilen Y değişkeni ile doğrusal bir uzayda eşlenen PLS regresyonuna (PLS-R) dayanmaktadır. İki gruplu bir deneyde bu değerler 0 ve 1 kadar basit olabilir.

Bu yöntemde numuneler içindeki gruplar zaten bilinir (örneğin deney grupları) ve bu nedenle amaç iki şeyi belirlemektir.

1. Gruplar aslında farklı mı?
2. Gruplar arasındaki farklılıkları en iyi tanımlayan özellikler nelerdir?

Deneysel bir bağlamda bu, kontrol ve test örneklerinin farklı olup olmadığının belirlenmesi ve bu farklılığa katkıda bulunan (bilinen, ölçülen) deneysel değişkenlerin belirlenmesi anlamına gelir.

Metabolomik çalışmalarda amaç, karşılaştırma yapılacak iki veya daha fazla örnekteki metabolitlerin derişim farklılıklarını belirlemek olduğu için, bireysel numunelerin boyutları, ağırlıkları ve hacimleri göreceli ölçüm sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Numune boyutuna bağlı bu farklılıklar normalizasyonla ortadan kaldırılabılır. Numune derişim veya miktar normalizasyonu klinik alanda idrardaki metabolit ölçümünde iyi bilinen ve yaygın olarak uygulanan bir işlemdir. Çünkü, idrar örneğinin derişimi, aynı birey için, bireyin su alımına, diyet ve atımlarına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. İdrar derişimi dış faktörlerden etkilendiği için, klinik alanda, bu değişken faktör genellikle tüm idrar numunelerinde doğal olarak bulunan bir referans analit olan kreatinin kullanılarak kontrol edilir. Kreatinin derişiminin idrar derişimini yansıttığı varsayılır [15]. Seyreltilmiş bir idrar daha düşük bir kreatinin derişimine sahip olabilir. Bireylere ait idrar örneğindeki herhangi bir metabolitin derişimi aynı örnekteki kreatin derişimine bölünerek normalize edilir. Başka bir deyişle, metabolit derişimi kreatinin derişimine normalize edilir ve daha sonra normalize edilmiş metabolit derişiminin normal aralıkta olup olmadığını karşılaştırılır. Fakat, birçok başka biyolojik sıvı veya örnekte gerçekleştirilen metabolomiks çalışmalarda, numune normalizasyonun da kullanılabilecek kreatin gibi referans olarak kabul edilebilen bir bileşik yoktur. Dışkı, ter, bronş lavaj sıvılarının örnek derişimleri büyük ölçüde değişebilir. Hücre veya doku ekstraktları ayrıca örneklenen hücrelerin sayısı, hücre parçalanma verimliliği, hücrelerin bileşimi ve doku örnekleri üzerindeki doku hücre yoğunluğu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak farklı toplam metabolit miktarlarına sahip olabilir. Metabolik karşılaştırma için her bir örnekten yalnızca sabit bir hacim (örneğin, 5 µL ter), ağırlık (örneğin, 1 mg kurutulmuş dışkı) veya ebat (örneğin, 2 mm uzunluğunda x 2 mm genişliğinde ve 10 mm kalınlığında bir doku) alınırsa, bireysel metabolitlerin ölçülen derişim farklılıklarına katkıda bulunan faktörleri tanımlamak mümkün değildir. Metabolit düzeyinde görülen farklar, numune derişimlerinden veya biyolojik bir olay (örneğin hücrelerde mutasyon veya klinik numunelerde bir hastalık) gibi gerçek bir faktörden veya her ikisinin iç içe geçmiş kombinasyonundan kaynaklanabilir. Biyolojik olmayan bir faktör değil sadece

biyolojik bir olayın neden olduğu metabolit derişimi değişikliklerini belirlemek istediğimiz için, bütün bireysel örneklerin analizinden önce örnek normalizasyonu, genel metabolomik profillemeye iş akışında kritik ve gerekli bir adımdır.

Genomik ve proteomik karşılaştırıldığında, metabolomiks için numune normalizasyonu, metabolit yapılarının çeşitliliğinin yüksek olması nedeniyle çok daha zordur. Bugüne kadar proteomiks için yaygın olarak kullanılan toplam protein ölçülmesi gibi doğrudan toplam metabolitlerin ölçülmesi için standart bir yöntem yoktur. Metabolomiks için bir numune normalizasyon yöntemi geliştirirken veya uygularken, yöntemin genel performansı genellikle aynı numune grubundaki varyasyonları en aza indirmeye yöntemiyle değerlendirilir. Varyasyonları değerlendirmenin en kolay ve en yaygın yolu, PCA puan grafiğidir. Optimal bir numune normalizasyon yöntemi aynı biyolojik gruptaki numuneler arasındaki en kısa mesafeyi ve farklı gruplardan numuneler arasındaki en büyük ayrımı göstermelidir. Grup içi bağıl standart sapmaların (BSS) veya bulunan ayırt edici özelliklerin sayısının karşılaştırılması, yöntem performansını değerlendirmek için de kullanılabilir. Bir grup içinde daha küçük BSS veya daha az ayırt edici özellik istenmektedir.

Metabolomiks analizlerde belirli bir uygulama için uygun normalizasyon yöntemi seçmeden önce göz önünde bulundurulması gereken hususlar vardır. Normalizasyon işleminin analiz öncesinde mi yoksa analiz sonrasında mı uygulanacağına karar verilmesi gerekmektedir. Analiz öncesi yöntemlerde, biyolojik numunelerin hacimleri, tüm numuneler için toplam numune derişimi eşitlemek için ölçülen miktarlara (örneğin kreatinin derişimi) göre ayarlanır. Böylece her numuneden aynı hacimde aynı miktarda referans standart içeren numuneler alınarak metabolomik analizlerde kullanılır. Alternatif olarak, numune hacmini ayarlamak yerine, metabolomiks analizinde kullanılan aynı miktarı sağlamak için ölçülen miktarlara göre farklı miktarlarda örnekler alınır. Analiz sonrası yöntemlerde ise örnek miktarları deneysel olarak normalize edilememiştir ve dolayısıyla metabolomik profillemeye için kullanılan toplam enjeksiyon miktarları farklıdır, bu da farklı NMR veya MS sinyalleri ile sonuçlanmaktadır. Bireysel metabolit sinyalleri daha sonra bir numuneden bir kromatogramın toplam iyon sinyali yoğunluğu gibi belirli bir kritere dayanarak farklı örnekler için ayarlanabilir veya normalize edilebilir.

Örnek analizi için aynı miktarları kullanıldığı analiz öncesi normalizasyon yöntemlerinde tüm numuneler için benzer cihazsal tepkilerin elde edilebilmesi önemli bir avantajdır. Bu özellikle MS tabanlı yöntemler için büyük önem kazanmaktadır. Elektrosprey iyonizasyonunda (ESI), her bir metabolitin farklı iyonlaşma etkinliği, iyon baskılama dereceleri nedeniyle farklı derişimlerde genellikle aynı değildir. Sonuç olarak, analit sinyalleri karmaşık bir biyolojik matristeki metabolit derişimiyle doğrusal olarak gözlemlenmeyebilir. Böylece, tüm karşılaştırmalı örnekleri aynı toplam derişimi ayarlayarak daha kesin nicel sonuçlar üretilecektir.

Analiz öncesi normalizasyonunun dezavantajı ise genel iş akışında ek bir deneysel adımın gerekli olmasıdır. Ek olarak, miktarları ölçmek için ekstra bir miktar örnek gerekebilir ve bu örnek kısmı metabolomik analiz için kullanılamaz. Analiz sonrası normalizasyon teknikleri bu görünmez tehlikelerden kaçınır ve elde edilen verilerden sayısal bilgileri uygun şekilde çıkarmak için bir yazılım programı olduğu sürece, gerçekleştirmek için nispeten daha uygun ve hızlıdır. Bununla birlikte, analiz sonrası yöntemlerin performansının yukarıda açıklandığı gibi cihaz yanıtlarındaki varyasyonlardan dolayı tehlikeye girebileceği akılda tutulmalıdır.

Analiz öncesi normalizasyon için dikkate alınacak bir diğer faktör ise ek bir adım gerektiğinden kullanım zorluğudur. Metabolomikte geçerli istatistiksel modeller oluşturmak ve daha doğru biyolojik bilgi elde etmek için çok sayıda numune kullanılması tercih edilir. Bununla birlikte analiz edilecek numunelerin sayısı çoğu zaman sadece biyolojik numunelerin mevcudiyeti ile değil aynı zamanda gereken analitik zaman ve çabalarla sınırlandırmaktadır. Analitik çabalar, örnek hazırlama protokollerinin karmaşıklığından ve örnek başına analiz süresinin uzunluğundan etkilenir. Bu bağlamda, normalizasyon yönteminin basit, hızlı ve kolay olması, böylece metabolomik için ayarlanmış büyük bir numunelemin kullanımını kısıtlamaması istenir.

Uygun bir normalizasyon yönteminin seçimi ayrıca analiz edilecek biyolojik numunenin türüne de bağlıdır. Bazı yöntemler yalnızca belirli biyolojik ortamlara uygulanabilirken, diğerleri daha geneldir. Örneğin, kreatinin normalizasyonu glomerüler filtrasyon yoluyla kreatinin nispeten sabit atılım hızına dayanır ve bu nedenle sadece idrarda gerçekleştirilen metabolomik çalışmalar için geçerli iken, MS

ile gerçekleştirilen çalışmalarda toplam pik alanı normalizasyonunda (TPN), normalizasyon faktörü olarak incelenen tüm numunelerde mevcut olan piklerin toplam pik alanları kullanılır ve bu nedenle evrensel olarak uygulanabilir.

Bir numune normalizasyon yönteminin seçiminde, çalışılacak biyolojik numune için yöntemin uygulanabilirliği, normalizasyonun doğruluğu, uygunluğu, hızı ve gerçekleştirme maliyetini içeren çeşitli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

Metabolomiks çalışmalarda analiz sonrası veri normalizasyonu aşağıdaki seçeneklerden oluşur:

- **Numune spesifik normalizasyon:** Numune biyolojik girdilerine (yani hacim, kütle, toplam protein vb.) dayalı olarak örnek bazında gerçekleştirilir.
- **Toplam pik alanına göre normalizasyon (TPN):** Metabolomik analizler sonucunda elde edilen her bir metabolitin alanının tüm metabolitlerin toplam alanına bölünmesiyle örnek bazında gerçekleştirilir.
- **Numune ortanca değerine göre normalizasyon:** Her bir metabolit ortanca değerine bölünerek örnek bazında gerçekleştirilir.
- **Referans numune ile normalizasyon (olasılıksal bölüm normalizasyonu):** Metabolomiks analizlerde kullanılan referans bir örneğe göre numune bazında gerçekleştirilir.
- **Kalite kontrol temelli normalizasyon:** Kalite kontrol örnekleri kullanılarak örnek bazında gerçekleştirilir. Kalite kontrol numunelerinin tüm evreni mümkün olduğunca yansıtması gerekir ve numunelerle aynı anda analiz edilmelidir. Uzun süreli metabolomiks analizlerde tercih edilen bir normalizasyon tekniğidir.
- **Referans niteliğindeki bir normalizasyon:** Numune içindeki iç standarda veya kreatinin gibi bir endojen maddeye göre örnek bazında gerçekleştirilir.

Metabolomiks çalışmalarda veri dönüşümü ve ölçeklendirme, verileri daha karşılaştırılabilir kılmak için kullanılan iki farklı yaklaşımdır. Daha iyi sonuçlar elde etmek için biri veya her ikisini birden kullanabilir. Metabolomiks çalışmalarda veri dönüşümü; genelleştirilmiş \log_2 veya küp kök dönüşümü ile gerçekleştirilir. Veri ölçeklendirme ise 4 farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Bunlar;

Merkezi ortalama: Eşitlik 2.1.'de gösterildiği gibi hesaplanabilir. Merkezileştirme ölçeklendirme verilerdeki benzerliklere değil farklılıklara odaklanmayı amaçlarken veri dengesini kaldırması bir avantaj olarak ortaya çıkar. Fakat veriler değişken varyanslı olduğunda, bu ön işlem yönteminin etkisi her zaman yeterli değildir.

$$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

\tilde{x}_{ij} : Normalize edilmiş değer

x_{ij} : Metabolit pik alanı

\bar{x}_i : Metabolit ortalama pik alanı

Otomatik ölçeklendirme: Eşitlik 2.2.'de gösterildiği gibi hesaplanabilir. Korelasyonlara bağlı olarak metabolitleri karşılaştırır. Bu ölçeklendirmede tüm metabolitler eşit derecede önem kazanır fakat burada ki dezavantaj ölçüm hataları daha fazla etkin hale gelmesidir.

$$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

s_i : Standart sapma

Aralık ölçeklendirme: Eşitlik 2.3. de gösterildiği gibi hesaplanabilir. Yöntemin amacı metabolitleri biyolojik cevap aralıklarına göre karşılaştırmaktır. Tüm metabolitler eşit derecede önemli hale gelir. Ölçeklendirme biyoloji ile ilgilidir ama ölçüm hatalarının daha abartılı bir hal halmasını sağlar ve aykırı değerlere duyarlılığıdır.

$$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{(x_{i \text{ maks}} - x_{i \text{ min}})} \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

$x_{i \text{ maks}}$: En yüksek metabolit pik alanı

$x_{i \text{ min}}$: En küçük metabolit pik alanı

Pareto ölçeklendirme: Eşitlik 2.4.'de gösterildiği gibi hesaplanabilir. Yöntemde ki büyük değerlerin göreceli önemini azaltır, ancak veri yapısını kısmende olsa sağlam tutar. Bu ölçeklendirme kullanıldığı zaman orjinal ölçümlere otomatik ölçeklendirme den daha yakın

sonuçlar elde edilir. Bu metodun dezavantajı ise büyük kat değişikliklerine duyarlıdır.

$$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}} \quad (\text{Eşitlik 2.4.})$$

2.1.2. Lipidomiks

Her ne kadar metabolomun bir alt kesimi olsa da, lipit türlerinin karmaşıklığı, belirgin kimyasal özellikleri ve önemli biyolojik aktiviteleri, lipidomu önemli araştırmaların odağı haline getirmiştir. Lipidomikler, “lipid metabolizması ve fonksiyonunda yer alan proteinlerin ekspresyonunda lipit moleküler türlerin ve biyolojik rollerinin tam karakterizasyonu” olarak tanımlanmıştır. Lipidomikler, bireysel lipit çalışmasından, global lipit metabolitlerinin sisteme entegre bir bağlamda incelenmesine ve patofizyolojik süreçlerdeki rollerini daha iyi anlaşılmasını sağlarlar. Sistem biyolojisinde yeni bir alan olarak ortaya çıkmış lipidomiks çalışmalar, metabolomiks çalışmalara benzer şekilde hastalık teşhisi ve biyobelirteç keşfi, ilaç geliştirme, gıda ve beslenme çalışmalarında kullanılmaktadır. Lipidomiks yaklaşım, normal, patolojik veya tedaviye özgü olayların benzersiz metabolik özelliklerini ortaya çıkarabilir.

Biyolojik zarların temel bileşenleri olan lipitler, yapısal ve işlevsel olarak çeşitli molekül sınıflarıdır. Biyosentez ve kimyasal yapıya bağlı olarak lipitler hidrofobik veya amfifilik olarak tanımlanmaktadır. Amfifilik lipitler, sulu bir ortamda veziküllerde, membranlarda veya lipozomlarda bulunur. Biyolojik lipitler izopren ve ketoasil gruplarından oluşmaktadır. Lipitler yağ asitleri, gliserolipitler, sfingolipitler, fosfolipitler, sakkarolipitler, sterol lipitler, prenol lipitler ve polipeptitler olmak sekiz kategoriye ayrılabilirler (32). Yağ asitleri ve gliserolipitler nispeten basit bir yapıya sahiptir. Yağ asitleri, en önemli lipit sınıflarından biridir ve tüm lipitlerin temel bileşenidir. Yağ asitleri, 4–24 karbon atomu ve 0-6 çift bağ uzunluğunda doymuş veya doymamış düz karbon zincirlerine sahiptir. Yağ asitleri, çeşitli biyoaktif lipitlerin öncüleridir. Eikosanoidler arasında lökotrienler, prostaglandinler ve enflamatuar süreçlerin gelişiminde önemli rol oynayan tromboksanlar bulunur. Gliserolipitler,

gliserol omurgasının hidroksil gruplarına esterlenmiş yağ asidi içeriğinde farklı olan mono-, di- ve tri-sübstitüe edilmiş gliserollerden oluşur. Çeşitli çalışmalar, değişmiş trigliserit sentezinin ve katabolizmanın birçok hastalığın ortaya çıkmasında ve gelişmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Kolesterol ve kaynaşmış dört halkalı bir çekirdek yapısından oluşan türevleri dahil olmak üzere sterol lipitleri, membran lipitlerinin önemli bileşenleridir. Sterol lipitleri, hücre sinyalinin düzenleyici işlevi ve hücre sel sıvı modülasyonu gibi farklı biyolojik rollere sahiptir (33) . Fosfolipitler olarak da bilinen gliserofosfolipitler (GP), doğada her yerde bulunur ve lipit çift katmanlarının önemli bileşenleridir ve hücre sinyalizasyon ve metabolizması ile ilgilidir. Polar kafa grubunun pozisyonuna bağlı olarak GP, glisetofosfatekinler ve glisetofosfatidik olarak iki farklı sınıflara bölünebilir. asitler, gliserofosfolezler (PG), gliserofosfosinler (PS), fosfoetanolin (PE), fosfomiyoinozitol (PI). Sfingolipitler, 1,3-dihidroksil, 2-amino alkan veya alken (alfadan) bazik bir omurgasından oluşan kompleks bir bileşik ailesinden oluşur. Sfingomyelin (SM) ve sfingosin, sırasıyla 1-hidroksil grubuna ve sfoidoid zincirinin 2-amino grubuna bağlı bir fosforilkolin baş grubundan ve yağ asidinden oluşan iki önemli sfingolipittir.

Lipidomiks çalışmalar da çok farklı biyolojik materyalde (kan, idrar, doku, tükürük, hücre vb.) gerçekleştirilebilir. Genel olarak kloroform veya kloroform-metanol karışımı lipidomiks analizlerde tercih edilmektedir.

Lipidomiks çalışmalarda kullanılan analitik teknikler ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi (veri analizleri) metabolomiks çalışmalarla bire bir aynıdır.

2.1.3. Fluksomiks

Metabolik fenotiplerin karakterizasyonu sadece metabolit seviyelerinin değil, aynı zamanda döngü hızlarının da belirlenmesini gerektirir (34-37). Özellikle, düşük derişimli ve yüksek döngü hızına sahip birçok metabolitin derişiminde herhangi bir derişim olmaksızın döngü hızlarında önemli artış ya da azalmalar olabilmektedir (38, 39). Bu nedenle, metabolomik fenotipi anlamak için metabolomik analizlerin yanı sıra yolak analizlerinin de yapılması gerekmektedir (29, 38, 40, 41). Metabolit düzeylerinin yanı sıra döngü hızlarının hesaplanmasına dayanan bu tip analizlere,

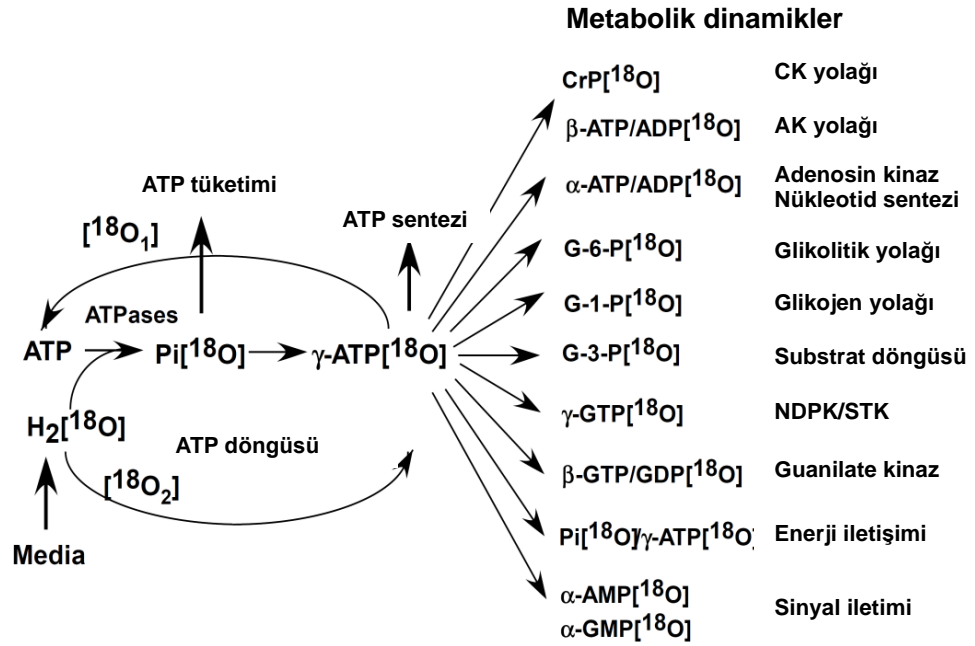
yolak analizi (fluksomik) denmektedir. Fluksomik, omik teknolojileri içinde gelişimini en az tamamlayanıdır (10, 18).

Fluksomik analizlerde kararlı izotoplar (^{13}C , ^{15}N ve ^{18}O) ile metabolit derişimleri ve döngü hızları eş zamanlı olarak analiz edilmektedir. Fluksomik analizlerde farklı yolaklar için farklı kararlı izotoplar kullanılmaktadır. Karbon omurgasını izlemek için ^{13}C izotopu ve azot omurgasını izlemek için ise ^{15}N izotopu oldukça yaygın kullanılmaktadır (42-44). Fakat bu teknikler tek başlarına tüm hücre dinamiklerinin elde edilmesine imkan tanımaz. Özellikle yaşam faaliyetlerinin vazgeçilmezi olup, canlı organizmaların metabolomunda bulunma sıklığı bakımından en önemli parçalardan biri olan inorganik fosfatın yer aldığı hücrenin enerji sistemleri hakkında bilgi veremezler (10, 18, 19, 45, 46).

Fosfat içeren enerji yolaklarının izlenmesi için mutlaka ^{18}O izotopu kullanılmalıdır. Ayrıca ^{13}C ve ^{15}N izotop işaretlemelerine göre ^{18}O ile yapılan işaretleme süresi çok kısadır. İşaretleme dakikalar içinde tamamlanır. Bu da uygulama kolaylığı ve istenilen düzeyde deneylerin tekrarlanmasını sağlar (10).

^{18}O işaretlemenin diğer bir avantajı ise; sadece fosfat işaretlemesinde değil karbon omurgası ve azot omurgasının takip edilmesinde de kullanılabilmesidir. ^{18}O izotopu kullanılarak elde edilen metabolomik ve yolak analizler; genetik hastalıkları, kanser, miyokardiyal iskemi, kalp yetmezliği ve dejeneratif hastalıklar gibi enerji ve metabolik dengesizliklerin sonucu ortaya çıkan hastalıkların mekanizmasının aydınlatılmasında, erken teşhisinde ve tedavi etkinliğinin izlenmesinde kullanılabilir (10, 18, 19).

^{18}O izotoplar özellikle enerji ve sinyal iletiminden sorumlu olan fosfotransfer ağların ve fosforil metabolik dinamiklerin izlenmesi açısından eşsizdir (34, 47-53). ^{18}O doğal ve kararlı bir izotoptur. İşaretlemede kullanılan ^{18}O 'in kaynağı ^{18}O bakımından zenginleştirilmiş sudur (H_2^{18}O). Doku ya da hücreler, H_2^{18}O içeren ortama maruz kaldıklarında, H_2^{18}O hızlı bir şekilde hücrenel su ile dengeye ulaşır ve ilgili enzimatik reaksiyonların oranına bağlı olarak hücrenel fosfatmetabolitler ^{18}O ile işaretlenir (52) (Şekil 2.3.)

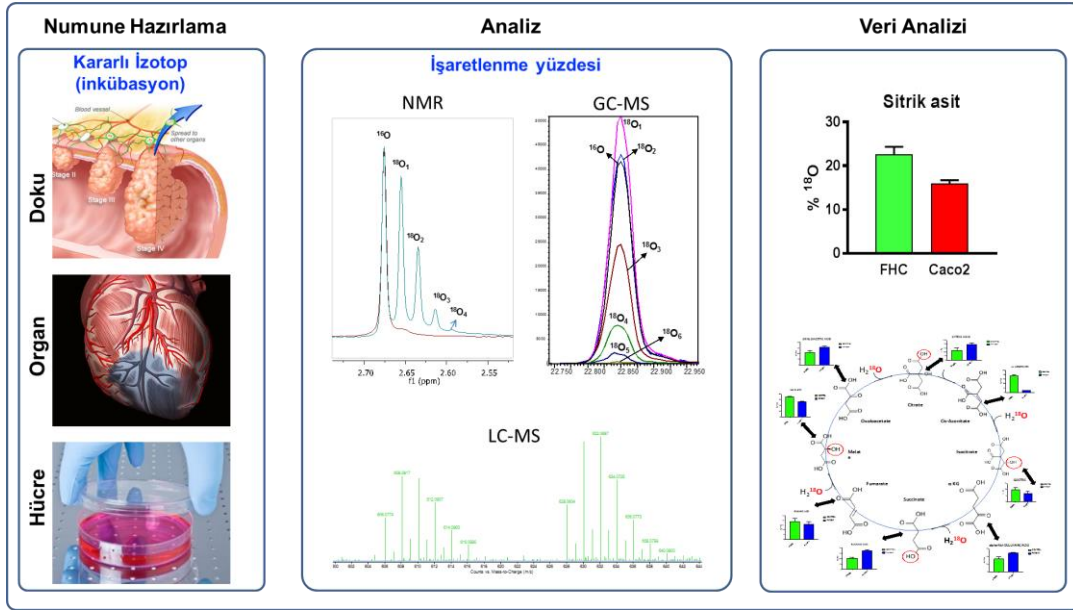


Şekil 2.3. ^{18}O işaretleme mekanizmasının ve işaretlenen metabolitlerin hangi yolak analizlerinde kullanıldığının şematik gösterimi.

^{18}O etiketleme prosedürü ATP'nin hidrolizi sırasında her seferinde H_2^{18}O 'deki ^{18}O 'nun inorganik fosfata dahil olarak inorganik fosfatın işaretlenmesine dayanmaktadır. Daha sonra ^{18}O işaretlenmiş inorganik fosfat diğer fosfat içeren bileşiklere işaretleyerek tüm fosfat içeren yolların işaretlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.3).

Fluksomiks analizler metabolomiks analizler gibi 3 basamaktan oluşmaktadır. Bunlar i) numunelerin hazırlanması (kararlı izotopla işaretleme ve numunelerin toplanması), ii) analizleri ve iii) işaretlenme yüzdelerinin hesaplanması.

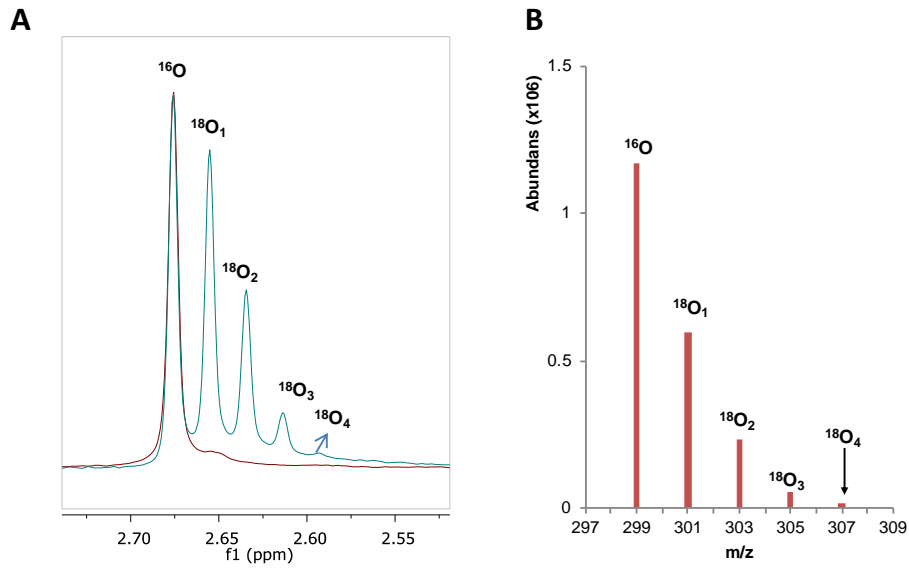
Fluksomik analizler yaşayan organizmalarda gerçekleştirilebilir (Şekil 2.4). Bunun için canlı organizma, doku, ve/veya hücre hattı kararlı izotoplar ile inkübe edilir. İnkübasyon işleminin canlı organizmanın yaşamını sürdüreceği koşullarda olması gerekir. İşaretleme süresinin sonunda metabolomik reaksiyonlar hızlıca durdurulur ve metabolitler uygun bir çözücü ile tüketilebilirler.



Şekil 2.4. Doku, organ ve hücre hatlarının işaretlenmesi.

Fluksomiks analizler için en çok kullanılan yöntemler NMR ve kütle spektroskopisinin kombine edildiği sıvı ve gaz kromatografisidir. Metabolomiks çalışmalarda olduğu gibi her üç yöntem birbirlerine göre farklı üstünlükler göstermektedir.

İşaretlenmiş olan fosfat metabolitlerindeki ^{18}O yüzdesi, ^{31}P NMR ya da kütle spektrofotometresi ile tespit edilebilir. Fosfatın ^{18}O ile birleşmesi ile ^{31}P -NMR spektrumunda izotop kayması veya kütle spektrumunda 2 amu'luk artışla gözlenmektedir (Şekil 2.5). Bu farklılıklardan yararlanarak fosfat ile entegre olmuş ^{18}O yüzdesi belirlenerek ilgili yolların döngü hızları ve devir süreleri hesaplanabilmektedir. ^{31}P -NMR ve kütle spektrometrisi ile bağlantılı olarak, ^{18}O işaretleme yöntemi değişik enerji yollarının (ATP sentezi ve kullanımı, adenilat kinaz temelli fosfotransfer yolları, kreatin kinaz ve glikolitik yollar, glikojen ve hücre için enerji iletimi) takibini sağlar (Şekil 2.3) (34, 35, 48-51, 54-56).



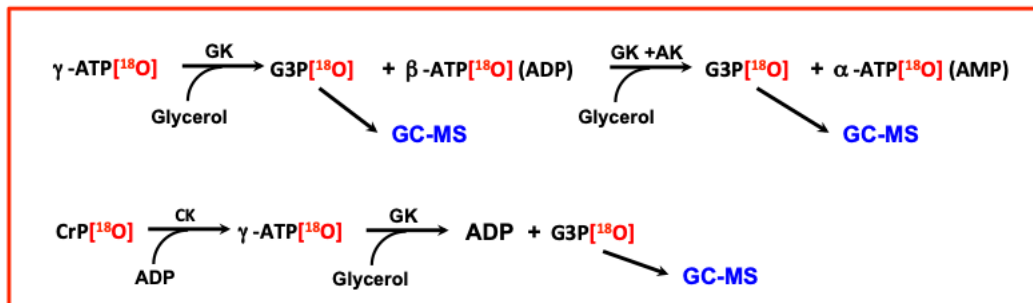
Şekil 2.5. ^{18}O işaretlemenin izlenmesinde kullanılan analitik teknikler A) NMR ve B) kütle dedektörü.

^{18}O 'in fosfat ile birleşmesi sadece enzimatik koşullarda gerçekleşir ve birleşen ^{18}O yüzdesi enzimin aktivitesiyle doğru orantılıdır. Böylece ilgili enzimin döngü hızı ve döngü sayısı hesaplanabilir (34, 54, 57). Teorik olarak, tüm metabolitlerin üçte biri fosfat içermektedir (58). Tüm bu fosfat içeren metabolitler ^{31}P -NMR spektroskopisi ve kütle spektrometresi kullanılarak belirlenebilir. ^{31}P -NMR temelli işaretlemenin en büyük avantajı numuneyi tahrip etmemesi ve numune hazırlama basamağının GC-MS'e göre daha kolay olmasıdır. Fakat analitik hassasiyetinin düşük olmasından dolayı sadece mM düzeyindeki bileşiklerin analizleri yapılabilmektedir. Daha düşük derişimlere inebilmek için daha uzun süreli analizler gerçekleştirilmelidir. Analiz sürelerinin numune başına 24 saate çıkarılması gerekmektedir. Bu da kontrol ve çalışma grubu (n=6 her bir grupta) içeren bir çalışmanın sadece 12 gün cihaz üzerinde analiz edilmesi anlamına gelmektedir. Ayrıca iyi bir fosfor spektrumu alınması için numunelerdeki divalan metallerin uzaklaştırılması gerekir. Bunun için ise numunelerin en az 12 saat boyunca reçine ile muamele ederek divalan iyonların uzaklaştırılması gerekmektedir. Cihazın düşük hassasiyeti, yüksek derişimde numuneler hazırlanarak giderilmeye çalışılabilir. Fakat kısıtlı numune erişimi olduğunda, bu durum uygulanamamaktadır. Örneğin, herhangi bir hücre hattının iyi bir ^{31}P -NMR spektrumu elde etmek için 10 cm'lik petri kutularında çoğaltılan hücrelerden (10^6 hücre/petri) yaklaşık 100 petri kutusunun bir araya getirilmesi gerekmektedir. Tüm bu sebeplerden

dolayı ^{31}P -NMR'ın düşük derişimli numunelerin fosfometabolit analizinde kullanılması pratik değildir.

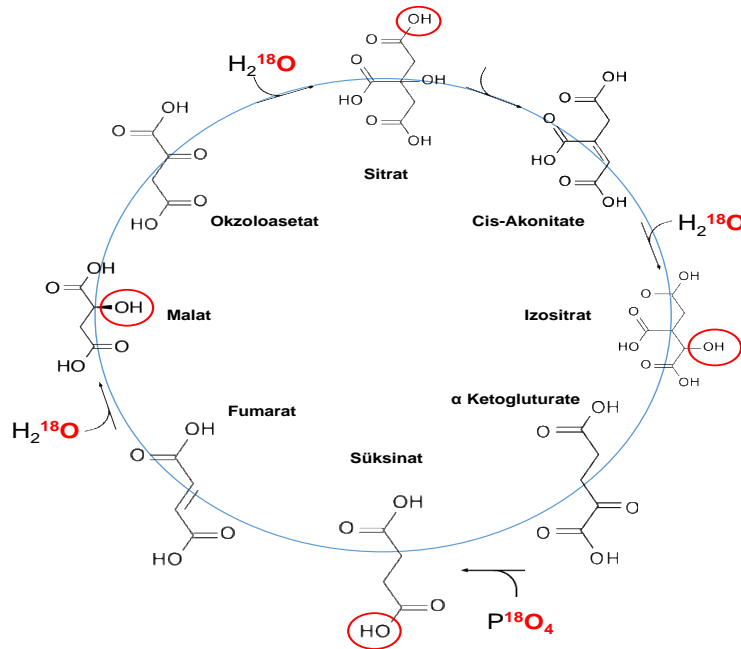
^{31}P -NMR'ın diğer bir önemli özelliği ise, oligofosfatların farklı pozisyonlarında bulunan fosfatları herhangi bir ayırma ihtiyacı duyulmadan analiz edilebilmesidir (18, 45, 46) (Şekil 3). 2D- ^{31}P -NMR ile özellikle ATP'nin farklı bölgelerindeki fosforlar için çok eşsiz bilgiler elde edilmiştir (46). Fakat böyle bir analizi gerçekleştirmek için fosfometabolitler preparatif HPLC ile saflaştırılmalı ve 12 saat boyunca analiz edilerek spektrumu alınmalıdır. Her bir numunedeki yüzlerce fosfometabolit sayısı düşünülürse böyle bir uygulamanın yapılması pratik olarak mümkün değildir.

GC-MS temelli fosfometabolomik analizler özellikle şeker içeren fosfatların analizinde oldukça etkilidir. LC-MS ile glikoz-1-fosfat (G1P) ve glikoz-6-fosfat (G6P) gibi izomerlerin ayrımları gerçekleştirilemezken, GC-MS ile bu tip izomerlerin analizleri yüksek ayırıcılıkta yapılabilmektedir. GC-MS analizlerde termal kararlılığı olmayan bileşikler türevlendirilerek analizleri gerçekleştirilebilir. Fakat türevlendirmeye rağmen bazı fosfometabolitler (ATP, ADP ve gliserilaldehit fosfat gibi) termal olarak kararlı değildirler. Bu durumda bu bileşikleri analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için enzimatik reaksiyonlarla gliserol-3-fosfata (G3P) dönüştürülmesi gerekmektedir (Şekil 2.6). Termal kararlılığı olmayan ve düşük derişimlerdeki fosfatların analizinde GC-MS ve ^{31}P -NMR ile yaşanan bu dezavantajlar, herhangi bir türevlendirmeye ihtiyaç duymamaları ve yüksek hassasiyetlerinden dolayı LC-MS yöntemi kullanılarak giderilebilir.

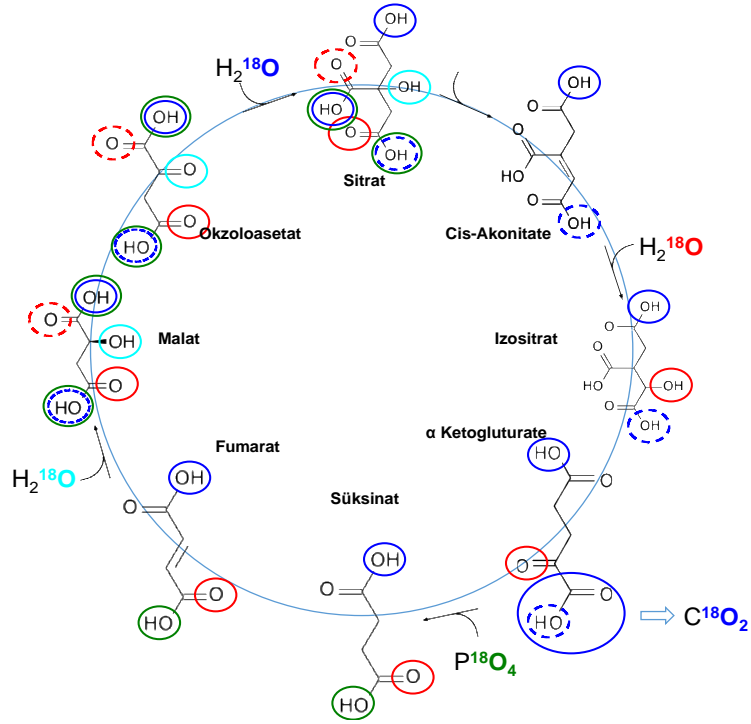


Şekil 2.6. Termal kararlılığı olmayan ATP ve CrP'nin GC-MS ile analizleri.

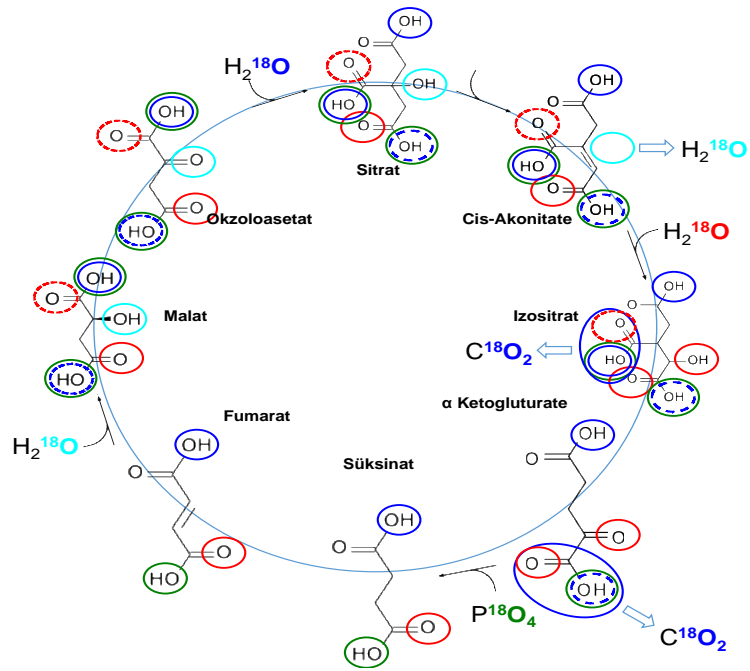
Yukarıda mekanizmasını açıkladığımız ^{18}O işaretleme; ATP'nin ADP'ye dönüşümünde her seferinde bir inorganik fosfatın işaretlenmesine, sonrasında işaretlenen inorganik fosfatın diğer bileşikler ile bir araya gelmesine dayanmaktadır (49, 50, 59). ^{18}O ile zenginleştirmede işaretleme ajanı olarak ^{18}O işaretli su (H_2^{18}O) kullanılmaktadır. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veri tabanına göre suyun rol aldığı yaklaşık olarak 3000 enzimatik reaksiyon bulunmaktadır. Bu durumda sadece fosfometabolitlerin değil suyun yer aldığı ve fosfat olmayan bileşikler de işaretlenebilmektedir. Örneğin Krebs döngüsü metabolitleri ^{18}O ile enzimatik olarak 4 farklı noktadan işaretlenebilmektedirler. ^{18}O içeren su ile *in vivo* koşullara maruz bırakılan hücrelerde enzimatik reaksiyonlar sonucunda, Krebs döngüsündeki metabolitlerin oksijenleri (kırmızı halka içinde gösterilen) ^{18}O izotopuyla işaretlenebilmektedir (Şekil 2.7). Birinci döngü sonucunda Krebs döngüsündeki tüm metabolitler ^{18}O ile işaretlenmektedir (Şekil 2.8). 2. döngü ve sonrasında ise; Krebs döngüsündeki metabolitlerin işaretlenen oksijenlerin pozisyonları döngü sayısından bağımsız olup değişmemektedir (Şekil 2.9). Böylece işaretlenme yüzdeleri döngü sayısı ile ilişkili olmaktadır.



Şekil 2.7. Krebs döngüsündeki metabolitlerin ^{18}O ile işaretlenme başlangıç noktaları.



Şekil 2.8. Krebs döngüsündeki metabolitlerin birincil döngü sonundaki işaretlenen metabolitleri ve işaretlenme yerleri.



Şekil 2.9. Krebs döngüsündeki metabolitlerin ikincil döngü sonundaki işaretlenen metabolitleri ve işaretlenme yerleri.

Metabolitlerin döngü hızlarının hesaplanması

Molekül ile etkileşen oksijen sayısına göre kütle spektrumunda iki birimlik kaymalar oluşturmaktadır. Her bir kayma değerinde metabolitin pik alanı hesaplanır ve bu değerler aşağıdaki formül yardımıyla toplam ^{18}O işaretleme yüzdesi hesaplanır (10).

$$\% \text{ } ^{18}\text{O} \text{ işaretleme} = [\% \text{ } ^{18}\text{O}_1 + 2(\% \text{ } ^{18}\text{O}_2) + 3(\% \text{ } ^{18}\text{O}_3) + \dots + n (\% \text{ } ^{18}\text{O}_n)] / [n (\% \text{ H}_2^{18}\text{O})]$$

n moleküldeki işaretlenen toplam oksijen

$$SA_t = 1 - (2^{-N})$$

Spesifik aktivite (SA_t): Toplam $\% \text{ } ^{18}\text{O}$ işaretleme /saniye

N : döngü sayısı.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetik asit Merck
- Asetonitril (MeCN) Merck
- Fosforik asit Merck
- Hidroklorik asit Merck
- Metanol (MeOH) Lab-Scan
- Sitrik asit J.R. Baker
- Sodyum hidroksit Merck
- Amonyum format Merck
- Metoksiamin hidroklorür Sigma
- N-metil-N-trimetilsililtrifloraasetat Thermo Scientific
+%0.1 Trimetilklorosilan

3.2. Kullanılan Cihazlar

- GC-MS (Shimadzu QP2010 Ultra)
- LC-qTOF-MS (Agilent 6530)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285)
- Milli-Q su cihazı (Barnstead NanoPure Diamond)
- Otomatik mikropipet (Ependorf 10-100 µl ve 100-1000 µl)
- pH metre (Mettler Toledo MA 235)
- Santrifüj (Hettich, EBA 20)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285)
- Terazi (Shimadzu Libror EB-330 H)
- Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex RK 514 BH)
- Vorteks karıştırıcı (Heildoph Reax Top)
- Manifold (Macherey-Nagel)

3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- Cam pipet (1-10 mL'lik, pyreks®)
- Balon jöje (5-1000 mL'lik, pyreks®)
- Beher (Çeşitli hacimlerde)
- Membran filtre (Titan 0.45 µm)
- Şırınga
- GC kolon [DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)]
- LC kolon Merck ZIC pHILIC (150 mm x 2.1 mm i.ç., 5 µm partikül çapı)
InertSustainSwift C18 (150 mm x 3.0 mm i.ç., 3 µm partikül çapı)

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok standart metabolit çözeltileri (1000 µg/mL): Çalışmalarda kullanılan tüm metabolitlerin standartları metanol:su (50:50 h/h) karışımı ile 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bütün stok çözeltiler amber renkli şişelerde +4 °C'de saklanmıştır. 10.00, 1.00 ve 0.10 µg/mL derişimdeki çözeltiler stoklardan seyreltilerek günlük hazırlanmıştır.

%0.1 formik asit içeren su: Derişik formik asit (% 86) çözeltilisinden 1 mL alınarak içinde bir miktar distile su bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye distile su ile.

%0.1 formik asit içeren asetonitril: Derişik formik asit (% 86) çözeltilisinden 1 mL alınarak içinde bir miktar asetonitril bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye asetonitril ile tamamlanmıştır.

%0.1 asetik asit ve %1 1 M amonyum format içeren su: Glasiyal asetik çözeltilisinden 1 mL ve 10 mL 1 M amonyum format tamponundan alınarak içinde bir

miktar su bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye su ile tamamlanmıştır.

%0.1 asetik asit ve %1 1 M amonyum format içeren asetonitril: Glasiyel asetik çözeltisinden 1 mL ve 10 mL 1 M amonyum format tamponu alınarak içinde bir miktar asetonitril bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir litreye asetonitril ile tamamlanmıştır.

%5 asetonitril içeren 20 mM amonyum karbonat tamponu: 1.9 g amonyum karbonat tartılmış ve içinde 50 mL asetonitril ve bir miktar su bulunan bir litrelik balon jöjeye aktarılmış sonrasında bir litreye su ile tamamlanmıştır.

%5 su içeren asetonitril: 50 mL su bir litrelik balon jöjeye aktarılmış ve bir asetonitril ile tamamlanmıştır.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Caco-2 hücre kültürü, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisinde %10 fetal sığır serum, 2mM L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin G, 100 µg/mL streptomisin ve %1 esansiyel olmayan amino asit solüsyonu ile süspansiyon haline getirilerek gerçekleştirilmiştir. FHC hücre kültürü ise, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (1:1) içerisinde %10 fetal sığır serum, 5 µg/mL insulin-transferrin-selenyum, 100 ng/mL hidrokortizon, 10 mM (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansulfonik asit (HEPES), 100 unite/mL penisilin G, 100 µg/mL streptomisin ile süspansiyon haline getirilerek gerçekleştirmiştir. Tüm kültürler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda muhafaza edilmiş ve %100 doluluğa ulaşmış hücre hatlarında hasat işlemi gerçekleştirilmiştir.

%100 doluluğa ulaşmış FHC ve CaCo-2 hücre hatları, inkübatörden çıkarılmış ve bekletilmeden 5 mL izotonik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır. Hücreler üzerine 1 mL metanol:su (9:1, h/h) çözeltisinden eklenmiş ve hafif bir şekilde petri kutusu çalkalandıktan sonra sıvı azot içine konarak hücrelerin dondurulması sağlanmıştır. Sıvı azot içinde bekletilen petri kutularındaki hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla 2 mL'lik endorff tüplere kazınarak alınmıştır. Hücrelerin kazındığı petri kutularına 1 mL daha metanol:su (9:1, h/h) çözeltisi eklenerek işlemler

tekrarlanmış ve elde edilen çözelti ependorf tüpe aktarılmıştır. Ependorf tüpler 15000 rpm'de santrifüjlenerek proteinler çöktürüldükten sonra üst fazlar 2 mL'lik ependorf tüpe transfer edilmiş ve -20 °C'de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

3.5.1. Kemoterapötiklere Dirençli Caco-2 ve FHC Hücre Hatlarının Geliştirilmesi

Dirençli hücre hatlarının geliştirilmesi için Caco-2 ve FHC hücre hatları, 5-FU ve CIS kemoterapötiklerine IC₉₀ değeri ile bir defaya mahsus olmak üzere 24 saat süreyle uyarılmış ve devam eden 6 ay boyunca IC₅₀ değerlerinde maruz bırakılmıştır. Caco-2 hücrelerinde 5-FU ve CIS için IC₅₀ değerleri sırasıyla 276 µg/mL ve 151 µg/mL olarak hesaplanmıştır. FHC hücrelerinde ise 5-FU ve CIS için IC₅₀ değerleri sırasıyla 555 µg/mL ve 312 µg/mL olarak bulunmuştur.

IC₉₀ ve IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

IC₉₀ ve IC₅₀ değerleri 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5- diphenyltetrazolyum bromidefor boyası ile belirlenmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna yaklaşık 4×10^4 - 6×10^4 hücre kendisine ait besi yeri içinde ekilmiş ve hücrelerin %100 doluluğa ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Doluluğa ulaşmış hücreler, farklı derişimlerdeki 5-FU (0-100 µM) ve CIS (0-20 µM) çözeltilerinden 10 µL eklendikten sonra 24 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuk başına 5 mg/mL 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5- diphenyltetrazolyum bromidefor çözeltisinden 10 µL eklenmiş ve oluşan formazan kristalleri 100 µL dimetilsülfoksitte çözülmüştür. Plaka 590 nm'de plaka okuyucuda okunarak sonuçlar kontrol grup değerleri kullanılarak standardize edilmiştir. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5- diphenyltetrazolyum bromidefor deneyi n=3 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kontrol grup değerleri kullanılarak normalize edilmiştir. Hücre ölüm oranın %90 ve %50 olduğu değerler sırası ile IC₉₀ ve IC₅₀ olarak belirlenmiştir.

3.5.2. Hücre Hatlarının ^{18}O ile İşaretlenmesi

% 100 doluluğa ulaşmış hücre hatları, inkübatörden çıkarıldıktan sonra üç defa izotonik NaCl çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanır. Daha sonra içinde %30 H_2^{18}O içeren hücre besiyeri 10 mL eklenerek 37°C 'de tekrar inkübe edilerek hücrelerin işaretlenmesi sağlanır. Çalışmada işaretleme zamanı olarak 1, 2 ve 5 dak denenerek hücre hatları için en uygun süre belirlenmiştir. İşaretleme süresi tamamlananlar inkübatörden çıkartılıp H_2^{18}O içeren besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra, izotonik NaCl çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanıp üzerine 1 mL metanol:su (8:1, h/h) karışım eklenmiştir. Hafif bir şekilde petri kutusu çalkalandıktan sonra sıvı azot içine konarak hücrelerin dondurulması sağlanmıştır. Dondurulmuş hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak alınmıştır. Petri kutusu tekrar 1 mL metanol:su (8:1, h/h) karışımı eklenerek çalkalanmış ve elüatlar birleştirilmiştir. 4°C 'de 15000 rpm'de hücreler çöktürüldükten sonra üst faz 2 mL'lik endorf tüpe transfer edilmiş ve süpernatantlar -20°C 'de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

3.6. Metabolomik Analizler

Metabolomik analizler GC-MS ve LC-qTOF-MS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler

-20°C 'de saklanan numuneler derin dondurucudan çıkarılmış oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kurumuş numuneler 20 μL metoksiamin hidroklorür (piridin içinde, 20 mg/mL) ile etüvde 30°C 'de 90 dak tutularak metoksillendirilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen numuneler üzerine 80 μL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit +trimetil-klorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiş ve etüvde 37°C 'de 30 dak bekletilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen numuneler silillenmiş GC-MS viallerine aktarılmış ve sonrasında DB5-MS kolon kullanılarak GC-MS sistemi ile analizleri Tablo 3.1'de belirtilen optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları *SpectConnect* yazılımı kullanılarak düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur.

Metabolitlere ait pikler alikonma indeksli Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Tablo 3. 1. GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

Kolon	DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	Fırın sıcaklığı artışı 60°C'den (1 dak tutulur) 325°C'ye 10°C /dak artışla (10 dak tutulur)
Analiz süresi	37.5 dak
Enjeksiyon hacmi	1 µL
Taşıyıcı gaz akış hızı	Helyum, 1 mL/dak
MSD geçiş sıcaklığı	290°C
Çözücü gecikme süresi	5.90 dak
Kütle aralığı	50-650 dalton

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisleri Excel (V:16.0.4849.1000, Microsoft, ABD) çalışma dosyasına aktarılmış ve farklı normalizasyon teknikleri kullanılarak normalize edilmiştir. Data verilerindeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimi yarı değeri ile doldurulmuştur. Daha sonra bu veri matrisi SIMCA-P+ (V:13.0.3.0, Umetrics AB, İsveç) programına aktarılarak; PCA ve PLS-DA yöntemleri ile incelenerek grupların ayırılmasında önemli olan metabolitler bulunmuştur.

3.6.2. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizler

-20 °C'den çıkarılan numuneler vakumlu santrifüjde tamamen kuruluğa kadar uçurulmuş ve su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözündürülmüştür. Metabolitlerin analizleri C18 (150 mm x 3 mm, 3 µm) kolon kullanılarak ve hareketli faz olarak % 0.1 formik asit içeren su içeren (Hareketli faz A) ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril (Hareketli faz B) kullanılarak gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2). Analizler negatif ve pozitif iyonizasyon modunda qTOF-MS sistemi kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.3). Analizler gradient elüsyon uygulanarak 30 dak'da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar MSDIAL (V:3.70, RIKEN,

Japonya) yazılımı kullanarak pikler ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilerek veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması için kalite kontrol numunelerinin (havuz edilerek oluşturulan numuneler) farklı çarpışma enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeylerinde uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumları kütüphanelerde taranarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.2. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler gradient elüsyon prgramı.

Zaman (dak)	% Hareketli faz B*
0	10
1	10
10	90
11	90
15	10
25	10

*% 0.1 formik asit içeren asetonitril

Tablo 3.3. LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.

	Pozitif iyonizasyon	Negatif iyonizasyon
Kütle aralığı	50-1700 amu	50-1700 amu
Tarama hızı (spektrum/sn)	2	2
Sprey voltajı(kV)	3500	3500
Skimmer voltajı (V)	65	65
Gaz sıcaklığı (°C)	325	325
Gaz akışı (L/dak)	10	10
Nebulizer (psig)	45	45

3.6.3. Lipidomiks Analizler

Lipidomiks analizler LC-qTOF-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. -20 °C'den çıkarılan numunelerin kloroform fazları vakumlu santrifüjite tamamen kuruluğa kadar uçurulmuş ve 200 µL izopropil alkol:asetonitril (65:35, h/h) karışımı ile tekrar çözüldürülmüştür. Lipit analizleri C18 (150 mm x 3 mm, 3 µm) kolon ve hareketli faz olarak % 0.1 asetik asit içeren 10 mM amonyum asetat (Hareketli faz A) ve % 0.1 asetik asit ve 10 mM amonyum asetat içeren izopropil alkol:asetonitril (30:70, h/h)

(Hareketli faz B) kullanılarak gradient elüsyonda gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4). Hareketli faz akış hızı 0.3 mL/dak ve kolon fırın sıcaklığı 65 °C'ye ayarlanmıştır. Analizler negatif ve pozitif iyonizasyon modunda qTOF-MS sistemi kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.3). Analizler gradient elüsyon uygulanarak 30 dak'da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar MSDIAL yazılımı kullanarak pikler ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilerek veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması için kalite kontrol numunelerinin (havuz edilerek oluşturulan numuneler) farklı çarpışma enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeylerinde uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumların kütüphanelerde taranarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.4. Lipidomiks analizler gradient elüsyon prgramı.

Zaman (dak)	% Hareketli faz B*
0	35
11	90
12	95
14	35

*% 0.1 asetik asit ve 10 mM amonyum asetat içeren izopropil alkol:asetonitril (30:70, h/h)

3.7. Fluksomiks Analizler

Monofosfat içeren metabolitlerin analizleri GC-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir.(tablo 3.5.)GC-MS ile analizler gerçekleştirilmeden önce numuneler MSTFA türevlendirme ajanı kullanılarak Bölüm 3.6.1'de anlatıldığı gibi türevlendirme gerçekleştirilmiştir. Türevlendirilmiş metabolitlerin ¹⁸O işaretleme yüzdelерinin hesaplanması Tablo 3.6-3.8'de verilen m/z değerlerine göre gerçekleştirilmiştir. Seçilen bileşiklerin fragmentlerine ait her bir işaretlenmiş oksijen için kütledeki 2 m/z birimlik artışına denk gelecek olan piklerin alanlarının hesaplanması ile belirlenmiştir. Örneğin G3P için ¹⁶O (ana iyon 357 m/z), ¹⁸O₁, ¹⁸O₂ ve ¹⁸O₃ için sırasıyla 357 (moleküler iyon-¹⁶O), 359 (¹⁸O₁+2), 361 (¹⁸O₂+4) ve 363 (¹⁸O₃+6) m/z değerlerindeki pik alanları hesaplanarak ¹⁸O ile işaretlenme yüzdesi hesaplanmıştır.

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan -20°C 'de saklanan işaretlenmiş numuneler derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra $400\ \mu\text{L}$ 'si vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. GC-MS ile analizler gerçekleştirilmeden önce numuneler Bölüm 3.6.1'de anlatıldığı gibi MSTFA türevlendirme ajanı olarak kullanılarak türevlendirilmiştir. GC-MS cihaz parametreleri Tablo 3.5' de verimiştir. Türevlendirilmiş metabolitlerin ^{18}O işaretleme yüzdelерinin hesaplanması Tablo 3.6 - 3.8'de verilen m/z değerlerine göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.5. ^{18}O izotop analizleri için GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

Cihaz	GC-MS/QP2010 Ultra (Shimadzu)
Kolon	DB5-MS kolon (30 m+10 m draguard; 0.25 mm i.ç. ve 0.25 μm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	Fırın sıcaklığı artışı $60\ ^{\circ}\text{C}$ 'den (1 dak tutulur) $325\ ^{\circ}\text{C}$ 'ye $5\ ^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ (5 dak tutulur)
Analiz süresi	59 dak
Enjeksiyon hacmi	$1\ \mu\text{L}$
Taşıyıcı gaz akış hızı	$1\ \text{mL}/\text{dak}$
MSD geçiş sıcaklığı	$290\ ^{\circ}\text{C}$
Çözücü gecikme süresi	5.90 dak
Kütle aralığı	50-600 dalton

Tablo 3.6. Monofosfat içeren metabolitlerin TMS türevlerinin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri.

	Alıkonma indeksi*	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$	$^{18}\text{O}_4$	$^{18}\text{O}_5$	$^{18}\text{O}_6$	$^{18}\text{O}_7$
3-Fosfogliserat	1485	299	301	303	305				
Fosfoenolpiruvat	1276	369	371	373	375				
Fosfokolamin	1459	299	301	303	305				
Fosfo-L-treonin	1497	299	301	303	305				
Fosfoserin	1517	299	301	303	305				
Gliserol-3-fosfat	1439	357	359	361	363				
Glikoz-6-fosfat	1994	387	389	391	393				
İnorganik fosfat	951	299	301	303	305	307			
Monometilfosfat	850	241	243	245	247				
Pirofosfat	1345	451	453	455	457	459	461	463	465

* Yağ asidi metilesterleri (FAME) kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.7. Krebs döngüsü'nde yer alan metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdesi için kullanılan m/z değerleri.

	Alıkonma indeksi*	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$	$^{18}\text{O}_4$	$^{18}\text{O}_5$	$^{18}\text{O}_6$	$^{18}\text{O}_7$
α-ketoglutarik asit	1250	288	300	302	304	306	308		
Cis-akonitat	1423	375	377	379	381	383	385	387	
Fumarik asit	1025	225	247	249	251	253			
İzositrik asit	1498	465	467	469	471	473	475	477	479
Malik asit	1165	233	235	237	239	241	243		
Okzoloasetik asit	1139	290	292	294	296	298	300		
Sitrik asit	1494	465	467	469	471	473	475	477	479
Süksinik asit	990	247	249	251	253	255			

* Yağ asidi metilesterleri (FAME) kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.8. Diğer fosfat içermeyen metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdesi için kullanılan m/z değerleri.

	Alkonma indeksi*	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$	$^{18}\text{O}_4$
Alanine	778	190	192	194		
Aspartik asit	1195	245	247	249	251	
Fenilalanin	12226	222	224	226		
Gliserol	950	205	207	209	211	
Glutamik asit	1207	276	278	280	282	284
Hipotaurin	1277	241	243	245		
Hippürik asit	1523	206	208	210	212	
Izolösin	853	188	190	192		
Kreatinin	1233	329	331			
Laktik asit	733	219	221	223	225	
Lösin	831	188	190	192		
Metiyonin	1087	221	223	225		
Oleik asit	1892	339	341	343		
Palmitik asit	1720	313	315	317		
Pürivat	722	174	176	178	180	
Serine	932	219	221	223	225	
Stearik asit	1916	341	343	345		
Treonin	971	219	221	223	225	
Üre	924	189	191			
Valin	892	218	220	222		

* Yağ Asidi Metilesterleri (FAME) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7.1. Fosfonükleotitlerin ^{18}O İzotop Analizleri

Fosfonükleotitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri LC-qTOF-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizler % 5 asetonitril içeren 20 mM amonyum karbonat pH 9 (hareketli faz A) ve % 5 su içeren asetonitril (hareketli faz B) hareketli fazları kullanılarak ZIC-pHILIC (150 mm x 2.1 mm, 5 μm) kolonda 0.17 mL/dak hareketli faz akış hızında ve 30 °C kolon fırın sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde

qTOF-MS sistemi negatif iyonizasyon modunda kullanılmıştır (Tablo 3.3). Analizler gradient elüsyon uygulanarak 30 dak'da gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.9). Fosfonükleotitlerin işaretlenme yüzdeleri Mass Hunter yazılımı (V:B.07.00, Agilent, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.9. Fosfonükleotitlerin ^{18}O izotop analizleri gradient elüsyon prgramı.

Zaman (dak)	% Hareketli faz B*
1	95
15	50
25	5
26	5

*% 5 su içeren asetonitril

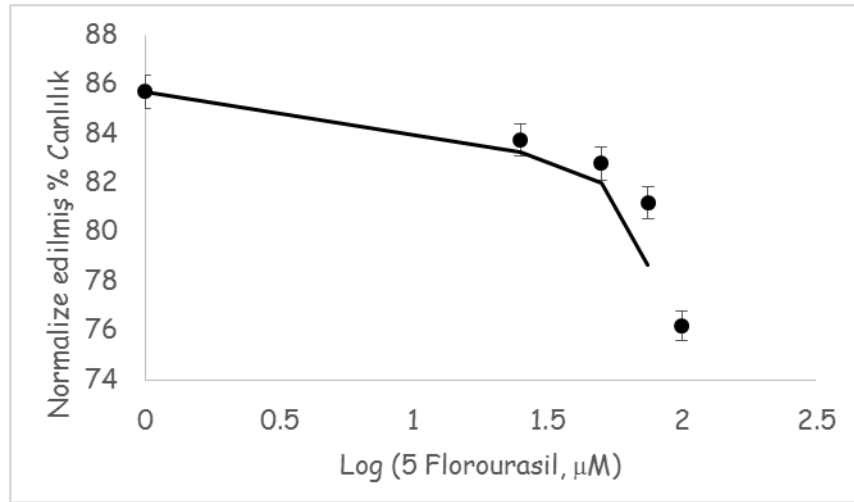
4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

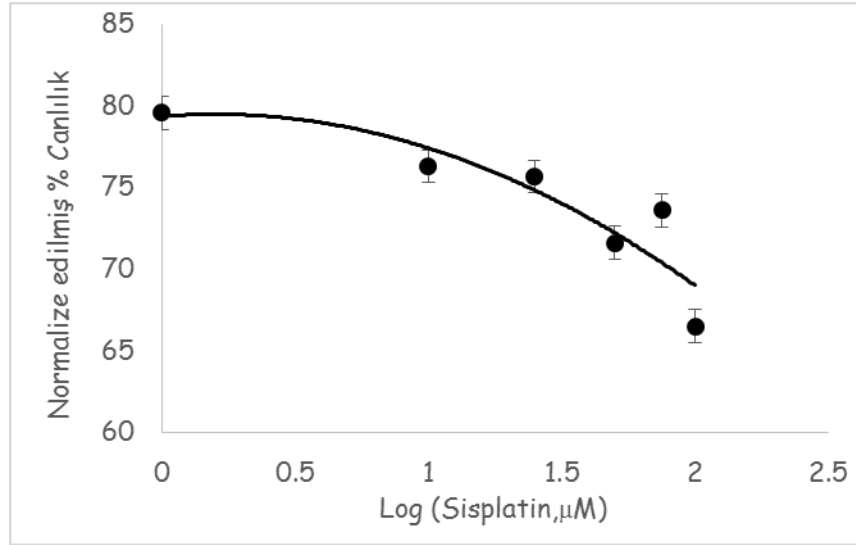
Caco-2 ve FHC hücre kültürü çalışmalarının Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm kültürler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda muhafaza edilmiş ve %100 doluluğa ulaşmış hücre hatlarında hasat işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.2. Kemoterapötiklere Dirençli Caco-2 Hücre Hatlarının Geliştirilmesi:

Çalışmada Caco-2 hücrelerinde direnç geliştirmek üzere kolorektal kanser tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötiklerden 5-FU ve CIS için Caco-2 ve FHC hücre hatlarında direnç geliştirilmiştir. Dirençli hücre hatlarının geliştirilmesi için 5-FU ve CIS kemoterapötiklerinin Caco-2 hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 276 µg/mL ve 151 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1-4.2). IC₅₀ değerleri doğrultusunda Caco-2 hücre hattında direnç geliştirilmesi çalışmaları her iki kemoterapötik için gerçekleştirilmiştir.



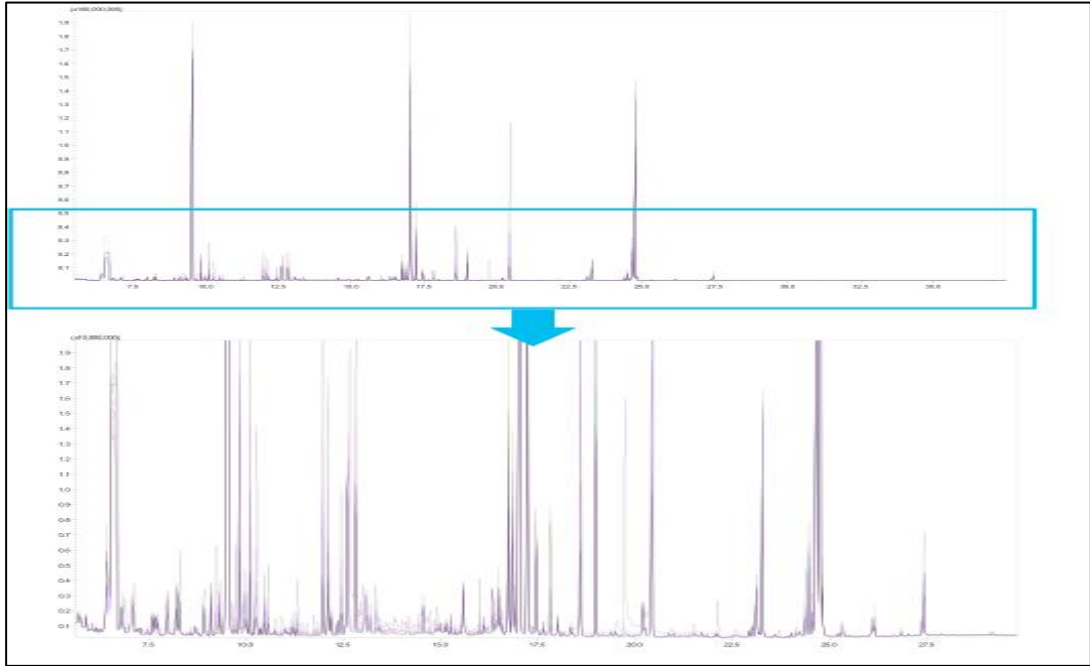
Şekil 4.1. 5-FU'in Caco-2 hücrelerinin % canlılığına etkisi



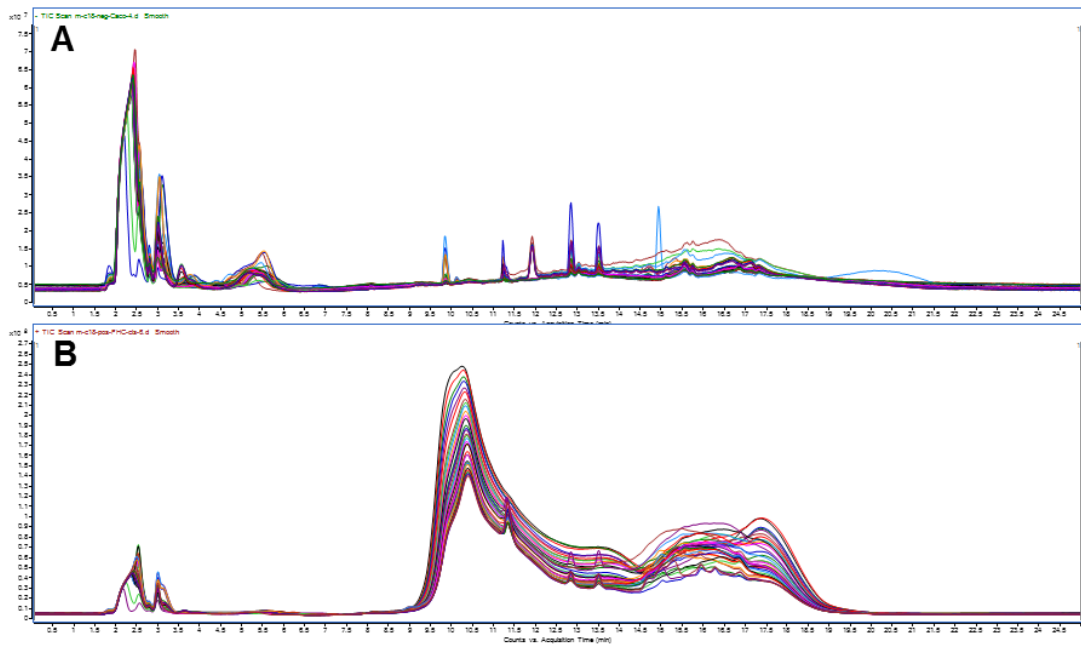
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde CIS'nin Caco-2 hücrelerinin % canlılığına etkisi

4.3. Metabolomik ve Lipidomik Analizler

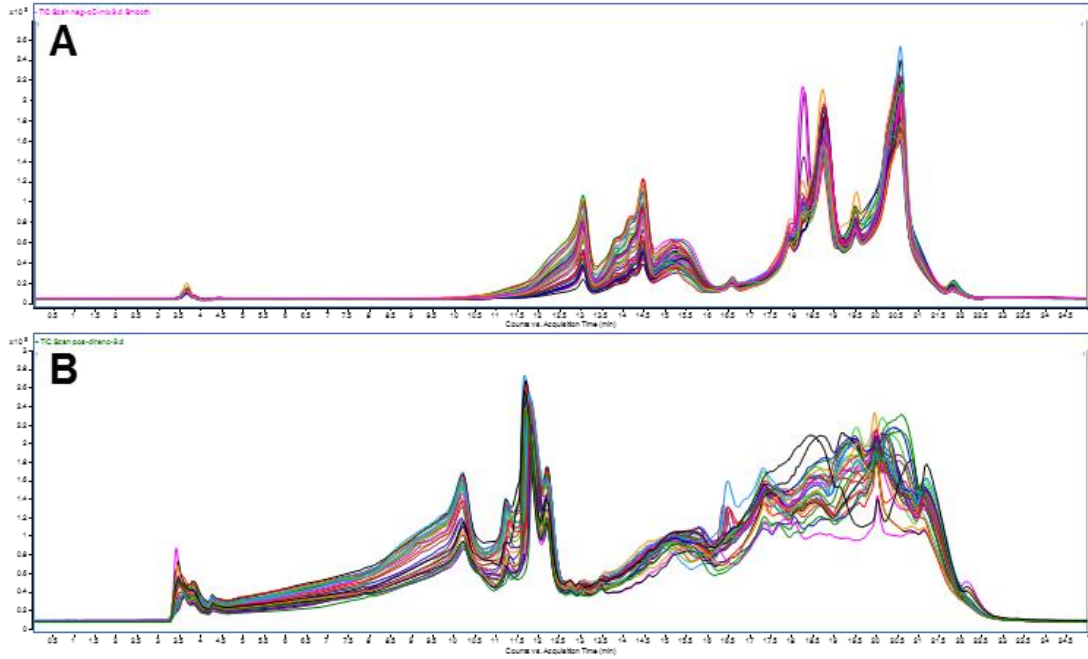
Kolorektal kanseri alanındaki araştırmalarda *in vitro* hücre kültürü modeli olarak kullanılan Caco-2 ve FHC hücre hatlarının ilaç direncine bağlı olarak değişen metabolomik profilleri GC-MS (Bölüm 3.6.1) ve LC-qTOF-MS (Bölüm 3.6.2) yöntemleri ile lipidomiks çalışmalarını ise LC-qTOF-MS (Bölüm 3.6.3) yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla FHC ve Caco-2 hücre hatlarına iki farklı kematöröpötik ajan ile geliştirilen direnç çalışmalarına ait numunelerde altı tekrarlı olarak GC-MS ve LC-qTOF-MS ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ait örnek kromatogramlar Şekil 4.3 ve 4.4 (metabolomiks çalışmalar için) ve Şekil 4.5'de (lipidomiks) verilmiştir.



Şekil 4.3. Caco-2 hücre hattına ait numune GC-MS kromatogramı.



Şekil 4.4. Metabolomik analizleri için elde edilen LC-qTOF-MS kromatogramları A) Negative iyonizasyon modu, B) Pozitif iyonizasyon modu.

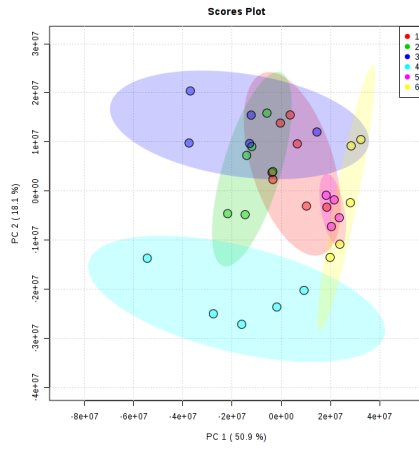


Şekil 4.5. Lipidomiks analizleri için elde edilen LC-qTOF-MS kromatogramları A) Negative iyonizasyon modu, B) Pozitif iyonizasyon modu.

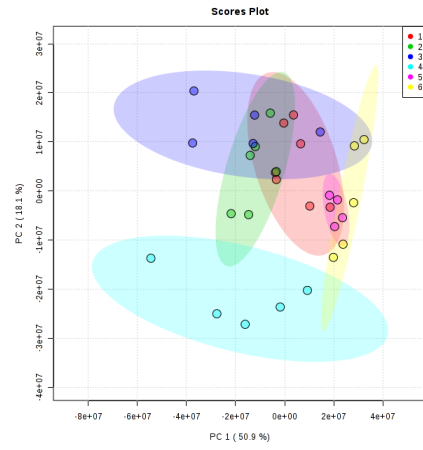
4.4. Veri Analizi

Büyük ölçekli hedeflenmemiş metabolomik analizler de yaşanan en büyük problemlerden biri ise numune hazırlama ve cihazdan gelen varyasyonlardır. Bu varyasyonlar farklı normalizasyon teknikleri kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Tez çalışmamızda normalizasyon etkisi özellikle varyasyonun çok yüksek olduğu GC-MS verilerinde denenerek optimize edilmiştir.

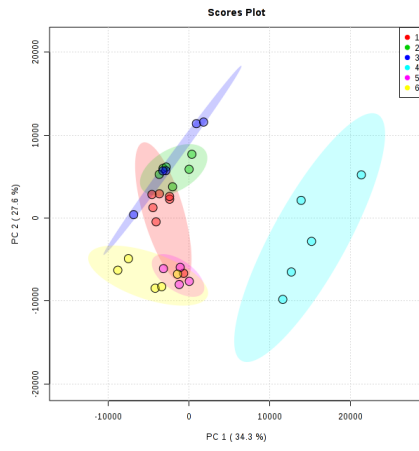
GC-MS analizlerinden elde edilen ham verilere normalizasyon teknikleri denenerek veri üzerindeki varyasyon en aza indirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla normalizasyon teknikleri (ortanca ve TPN) ve ölçeklendirme tekniklerinin (merkezi, otomatik, aralık ve paretro) veri üzerindeki etkileri değerlendirmek için PCA grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.6-4.8). Normalizasyona bağlı olarak elde edilen temel bileşen 1 (PCA₁) ve temel bileşen 2 (PCA₂) değerleri Tablo 4.1-4.3'de verilmiştir.



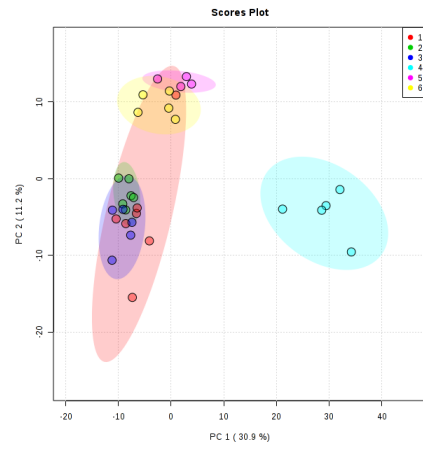
Ham veri



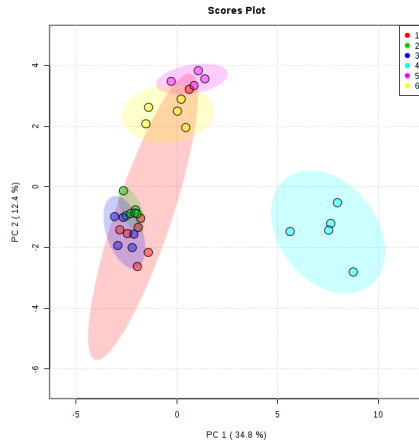
Ölüklendirme: Ortalamayı merkezlendirme



Ölüklendirme: Pareto ölüklendirme

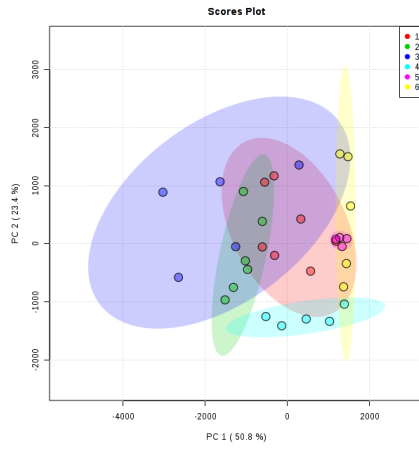


Ölüklendirme: Otomatik ölüklendirme

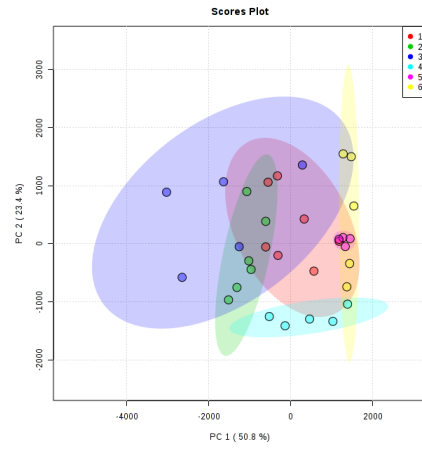


Ölüklendirme: Aralık ölüklendirme

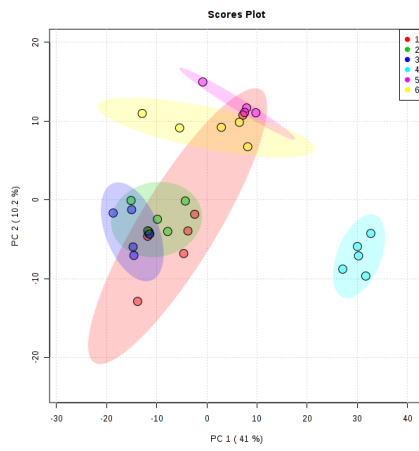
Şekil 4.6. Ham veri üzerine ölüklendirme etkisi.



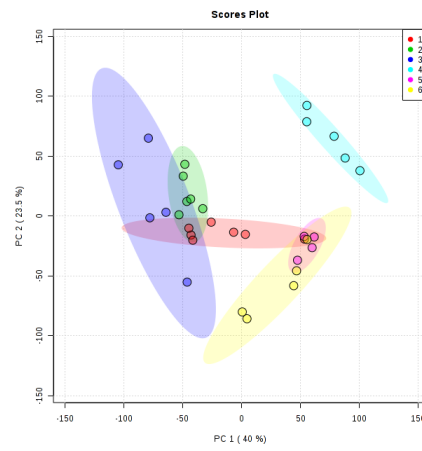
Normalizasyon: Ortanca
Ölçeklendirme: -



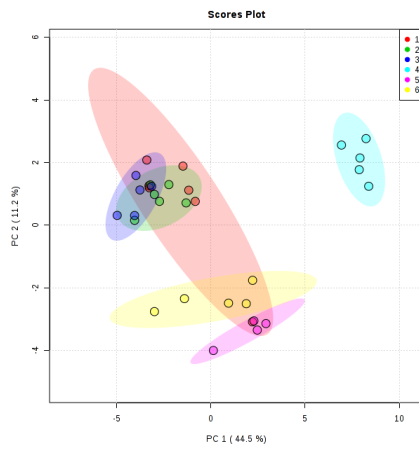
Normalizasyon: Ortanca
Ölçeklendirme: Ortalamayı merkezlendirme



Normalizasyon: Ortanca
Ölçeklendirme: Otomatik ölçeklendirme

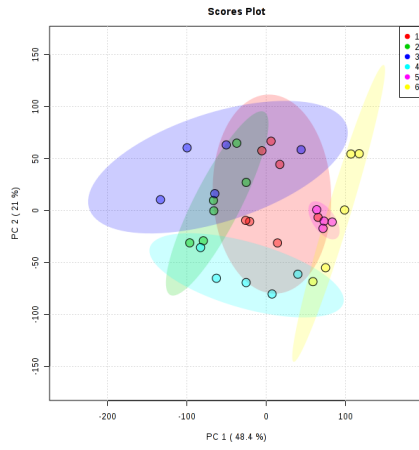


Normalizasyon: Ortanca
Ölçeklendirme: Pareto ölçeklendirme

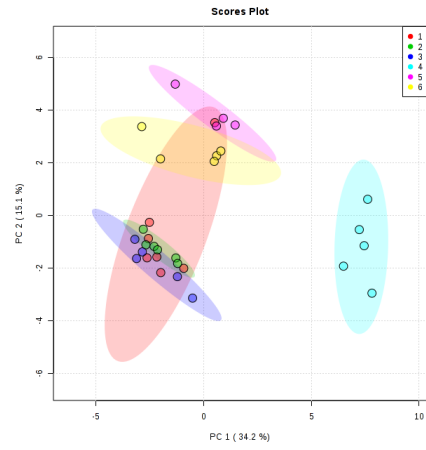


Normalizasyon: Ortanca
Ölçeklendirme: Aralık Ölçeklendirme

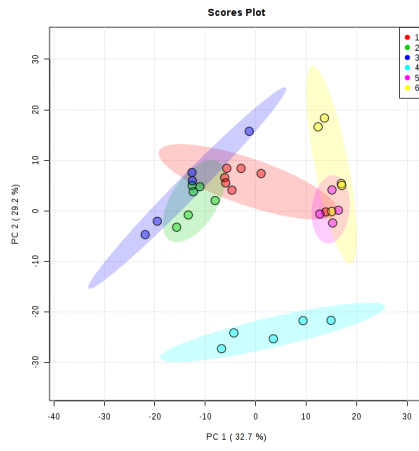
Şekil 4.7. Ortanca normalizasyon tekniği üzerine ölçeklendirme etkisi.



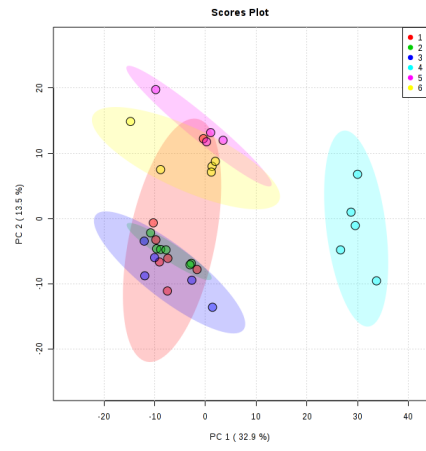
Normalizasyon: TPN
Ölçeklendirme: -



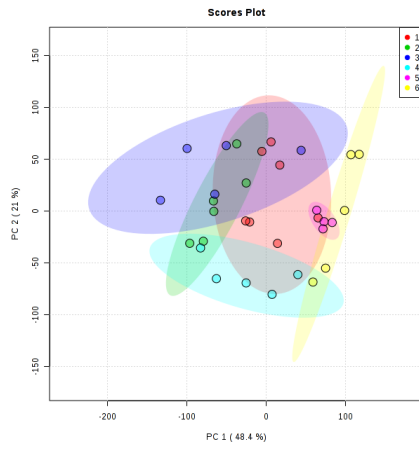
Normalizasyon: TPN
Ölçeklendirme: Aralık ölçeklendirme



Normalizasyon: TPN
Ölçeklendirme: Pareto ölçeklendirme



Normalizasyon: TPN
Ölçeklendirme: Otomatik ölçeklendirme



Normalizasyon: TPN
Ölçeklendirme: Ortalamayı merkezlendirme

Şekil 4.8. TPN tekniği üzerine ölçeklendirme etkisi.

Tablo 4.1. Normalizasyon etkisinin temel bileşen 1'e etkisi.

Ölçeklendirme	Normalizasyon		
	Ham veri	Ortanca	TPN
Ham veri	50.9	50.8	48.4
Ortalamayı merkezleme	50.9	50.8	48.4
Pareto	34.3	40	32.7
Otomatik	30.9	41	32.9
Aralık	34.8	44.5	34.2

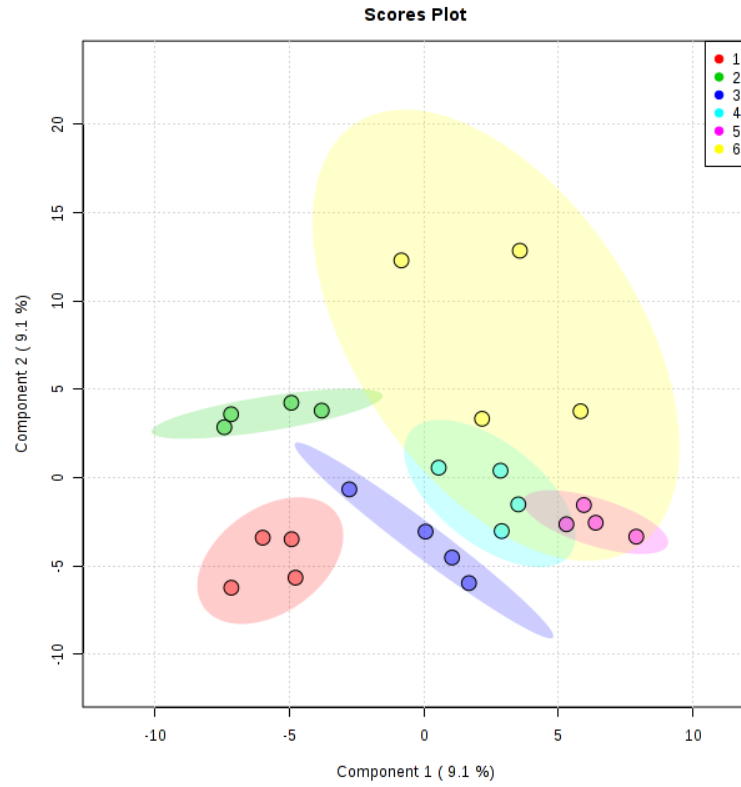
Tablo 4.2. Normalizasyon etkisinin temel bileşen 2'ye etkisi.

Ölçeklendirme	Normalizasyon		
	Ham veri	Ortanca	TPN
Ham veri	18.1	23.4	21
Ortalamayı merkezleme	18.1	23.4	21
Pareto	27.6	23.5	29.2
Otomatik	11.2	10.2	13.5
Aralık	12.4	11.2	15.1

Tablo 4.3. Normalizasyon etkisinin ilk iki temel bileşen üzerine etkisi.

Ölçeklendirme	Normalizasyon		
	Ham veri	Ortanca	TPN
Ham veri	69	74.2	69.4
Ortalamayı merkezleme	69	74.2	69.4
Pareto	61.9	63.5	61.9
Otomatik	42.1	51.2	46.4
Aralık	47.2	55.7	49.3

TPN ve otomatik ölçeklendirme tekniği; elde edilen düşük varyasyon değerlerinden dolayı metabolomik verilerin normalizasyonu için seçilmiştir. Bu normalizasyon basamakları kullanılarak elde edilen veriler metabolomik profillerin incelenmesinde kullanılmıştır (Şekil 4.9). TPN ve otomatik ölçeklendirme tekniğine dayanan normalizasyon basamakları GC-MS ve LC-qTOF-MS analizlerinden elde edilen verilere uygulanmış ve sonuçlar Tablo 4.4-4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Caco-2 ve FHC hücre hatlarına ait GC-MS metabolomik profillerine ait PLS-DA skor grafiği.

Tablo 4.4. GC-MS analizi sonucunda tanımlanan metabolitler ve bağlı derişimleri*.

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
1-hexadecanol	-0.12±0.04	-0.17±0.03	-0.19±0.02	-0.17±0.02	0.81±0.92	-0.16±0.03
1-methyl nicotinamide	-0.68±0.13	-0.20±0.10	0.10±0.13	0.24±0.28	1.56±0.34	-1.03±0.24
2,3-dimethylsuccinic acid	-0.44±0.55	-0.64±0.26	0.01±0.20	1.05±0.41	0.18±0.29	-0.17±0.11
2-amino-1-phenylethanol	0.37±0.28	-0.16±0.18	0.84±0.21	0.04±0.27	0.09±0.56	-1.18±0.23
2-butyne-1,4-diol	0.52±0.67	0.08±0.14	-0.13±0.09	0.13±0.28	-0.43±0.52	-0.17±0.23
2-hydroxybutyric acid	-0.59±0.01	-0.38±0.05	-0.35±0.05	-0.50±0.02	1.89±0.23	-0.06±0.42
2-hydroxypyridine	-0.35±0.50	-0.39±0.15	0.19±0.29	0.48±0.43	-0.42±0.35	0.48±0.38
2-ketoisocaproic acid	-0.20±0.25	-0.50±0.31	0.68±0.30	-0.55±0.18	1.04±0.52	-0.46±0.15
2-keto-L-gulonic acid	-0.21±0.20	0.26±0.34	0.03±0.26	1.14±0.40	-0.97±0.12	-0.24±0.42
2-phosphoglyceric acid	-0.29±0.09	1.03±0.69	0.73±0.28	-0.37±0.08	-0.54±0.00	-0.56±0.00
3-hexenedioic acid	-0.15±0.22	-0.56±0.34	0.14±0.07	0.40±0.11	-0.50±0.10	0.67±0.76
3-indolelactic acid	-0.55±0.04	-0.44±0.05	-0.29±0.05	-0.44±0.03	1.78±0.25	-0.05±0.49
3-methyl-2-oxobutanoic acid	0.70±0.65	0.19±0.06	-0.10±0.09	0.21±0.25	-0.75±0.48	-0.26±0.21
3-phenyllactic acid	-0.57±0.03	-0.41±0.06	-0.48±0.01	-0.37±0.04	1.95±0.20	-0.12±0.38
3-phosphoglyceric acid	-0.63±0.06	-0.35±0.12	-0.42±0.06	-0.08±0.13	1.76±0.53	-0.28±0.06
4-guanidinobutyric acid	-0.90±0.08	-1.04±0.02	0.12±0.15	0.52±0.28	-0.06±0.13	1.35±0.42
4-hydroxy-L-proline	-0.66±0.05	-0.31±0.11	-0.48±0.06	-0.26±0.14	1.51±0.61	0.20±0.18
4-hydroxyphenylacetic acid	-0.60±0.05	-0.72±0.13	-0.52±0.09	0.56±0.20	0.63±0.19	0.65±0.70

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
5-hydroxy-L-tryptophan	-0.98±0.08	0.04±0.53	0.27±0.44	0.81±0.29	0.02±0.23	-0.16±0.27
Alanine	-0.82±0.01	-0.67±0.02	-0.46±0.06	-0.51±0.12	1.51±0.32	0.95±0.23
Allo-inositol	-0.08±0.51	-0.12±0.34	-0.43±0.13	0.05±0.34	1.16±0.38	-0.59±0.09
Alpha ketoglutaric acid	-0.63±0.05	-0.15±0.11	-0.23±0.10	-0.58±0.08	1.78±0.46	-0.20±0.26
Alpha-glucosamine phosphate	-0.73±0.03	-0.62±0.02	-0.66±0.03	0.49±0.18	-0.10±0.18	1.62±0.45
Arachidic acid	0.29±0.39	-0.23±0.23	-0.43±0.23	-0.36±0.15	0.72±0.70	0.00±0.22
Aspartic acid	-0.77±0.02	-0.64±0.03	-0.73±0.01	0.57±0.40	0.34±0.34	1.23±0.34
Benzoic acid	0.14±0.60	0.08±0.28	0.19±0.32	0.60±0.33	-0.68±0.38	-0.32±0.14
Beta-alanine	-0.59±0.02	-0.58±0.01	-0.52±0.02	-0.21±0.07	2.02±0.34	-0.12±0.03
Beta-glycerolphosphate	-0.90±0.03	1.02±0.31	-0.18±0.09	-0.75±0.03	1.28±0.37	-0.48±0.09
Capric acid	0.46±0.67	-0.23±0.20	0.26±0.27	0.39±0.30	-0.77±0.35	-0.12±0.13
Caprylic acid	0.57±0.74	-0.01±0.11	-0.03±0.25	0.46±0.19	-0.76±0.30	-0.23±0.18
Cholesterol	-0.29±0.08	-0.30±0.02	0.46±0.73	-0.39±0.03	0.16±0.21	0.37±0.53
Cis-aconitic acid	-0.66±0.03	-0.59±0.05	-0.57±0.02	-0.15±0.10	2.05±0.26	-0.08±0.05
Citraconic acid	-0.44±0.14	0.50±0.81	-0.55±0.11	0.03±0.15	0.60±0.28	-0.14±0.06
Citric acid	-0.79±0.01	-0.66±0.06	-0.64±0.02	0.10±0.16	1.95±0.23	0.04±0.08
Creatinine	-0.76±0.01	-0.53±0.03	-0.71±0.02	0.02±0.18	1.74±0.40	0.25±0.18
Cytidine	-1.00±0.05	-0.59±0.06	-0.72±0.03	0.13±0.15	1.48±0.38	0.69±0.20
Cytidine-5-monophosphate	-0.82±0.15	-0.67±0.16	-0.75±0.07	0.12±0.12	1.75±0.27	0.36±0.14
Dihydroxyacetone phosphate	0.71±0.46	-0.93±0.12	-0.22±0.24	0.14±0.28	-0.61±0.14	0.91±0.39
Fumaric acid	-0.40±0.00	0.64±0.90	-0.33±0.01	-0.21±0.05	0.36±0.09	-0.06±0.09
Galacturonic acid	-0.53±0.16	-0.81±0.03	-0.81±0.03	0.01±0.17	1.67±0.25	0.48±0.28
Glucoheptonic acid	-0.87±0.01	-0.63±0.04	-0.74±0.02	0.48±0.27	1.66±0.30	0.10±0.16
Gluconic acid	0.35±0.22	1.19±0.29	0.10±0.15	0.56±0.22	-1.14±0.11	-1.06±0.22
Gluconic acid lactone	-0.22±0.19	0.23±0.33	0.03±0.26	1.17±0.44	-0.93±0.14	-0.28±0.39
Glucosaminic acid	-0.04±0.19	0.22±0.12	0.16±0.14	1.54±0.24	-1.34±0.15	-0.54±0.26
Glucose	0.32±0.21	0.64±0.09	0.34±0.13	0.99±0.16	-1.57±0.17	-0.73±0.27
Glucose-6-phosphate	-0.56±0.00	-0.53±0.02	-0.55±0.01	-0.09±0.16	1.78±0.51	-0.05±0.11
Glutamic acid	-0.82±0.01	-0.57±0.05	-0.71±0.02	0.01±0.15	1.59±0.43	0.50±0.23
Glutathione reduced	-0.96±0.03	-0.73±0.09	-0.71±0.07	0.46±0.20	0.44±0.20	1.49±0.34
Glyceraldehyde	-0.74±0.27	0.52±0.46	-0.16±0.54	0.30±0.35	-0.38±0.22	0.45±0.14
Glyceraldehyde 3-phosphate	0.20±0.40	0.40±0.33	0.63±0.17	0.48±0.29	-0.93±0.26	-0.78±0.37
Glyceric acid	-0.33±0.21	0.38±0.30	0.41±0.30	-1.12±0.07	1.37±0.21	-0.70±0.16
Glycerol	0.57±0.75	0.43±0.51	-0.32±0.05	-0.08±0.08	-0.46±0.05	-0.13±0.03
Glycerol 1-phosphate	-0.97±0.03	1.07±0.31	-0.21±0.12	-0.61±0.02	1.24±0.38	-0.52±0.02
Glycine	-1.08±0.21	-0.50±0.05	-0.34±0.19	1.01±0.35	0.68±0.32	0.22±0.40
Glycolic acid	0.45±0.24	-0.05±0.04	1.01±0.22	-1.24±0.06	0.21±0.32	-0.39±0.51
Heptadecanoic acid	-0.09±0.11	-0.30±0.03	-0.39±0.02	-0.20±0.02	1.14±0.83	-0.15±0.03
Homoserine 1	-0.60±0.03	-0.39±0.06	-0.60±0.10	-0.13±0.14	1.74±0.53	-0.02±0.06
Homoserine 2	0.17±0.57	-0.67±0.12	-0.39±0.19	0.35±0.18	0.08±0.54	0.47±0.31
Hypotaurine	-0.59±0.08	-0.28±0.19	-0.55±0.11	0.02±0.24	1.66±0.50	-0.26±0.14

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
Isoleucine 1	0.94±0.18	0.49±0.22	1.16±0.17	-1.09±0.09	-1.02±0.16	-0.48±0.11
Isoleucine 2	0.75±0.31	0.67±0.36	0.97±0.12	-1.08±0.12	-0.69±0.19	-0.62±0.14
Itaconic acid	0.22±0.60	0.08±0.16	0.03±0.14	0.52±0.42	-0.70±0.45	-0.15±0.22
Lactamide	-0.18±0.18	0.24±0.10	-0.11±0.13	-0.93±0.01	1.59±0.39	-0.60±0.35
Lactic acid	0.87±0.38	0.08±0.24	0.09±0.32	-0.97±0.05	0.02±0.30	-0.08±0.53
Lactose	-0.39±0.01	-0.29±0.04	-0.28±0.09	0.36±0.46	0.83±0.74	-0.22±0.04
Lauric acid	0.43±0.65	-0.13±0.19	0.09±0.32	0.53±0.27	-0.81±0.34	-0.12±0.14
Leucine	0.92±0.18	0.52±0.19	1.16±0.16	-1.09±0.09	-1.04±0.18	-0.48±0.11
Lysine	-0.18±0.31	0.89±0.12	-0.52±0.31	1.20±0.19	-0.97±0.19	-0.42±0.28
Lyxose	-0.32±0.20	0.15±0.21	-0.06±0.21	1.61±0.22	-1.23±0.12	-0.15±0.27
Lyxosylamine	-0.49±0.05	-0.54±0.00	-0.51±0.03	-0.22±0.07	2.06±0.32	-0.31±0.02
Malic acid	-0.81±0.01	-0.61±0.05	-0.56±0.03	-0.11±0.19	1.77±0.27	0.32±0.31
Malonic acid	0.96±0.70	0.22±0.14	-0.43±0.17	0.02±0.19	-0.73±0.18	-0.04±0.28
Mannitol	0.76±0.47	-0.09±0.07	-0.68±0.13	-0.75±0.18	1.08±0.18	-0.33±0.43
Mannose	-0.95±0.06	1.04±0.43	0.07±0.32	0.58±0.35	-0.21±0.27	-0.53±0.21
Methionine	-0.04±0.44	-0.06±0.44	-0.50±0.02	-0.41±0.07	1.34±0.43	-0.33±0.05
Methyl oleate	-0.06±0.40	0.20±0.24	0.19±0.26	0.55±0.51	-0.55±0.30	-0.33±0.46
Methyl palmitate	0.00±0.20	0.16±0.33	-0.38±0.20	-0.39±0.13	1.20±0.63	-0.59±0.14
Methylmalonic acid	0.21±0.37	0.66±0.30	0.66±0.21	-1.19±0.38	0.04±0.24	-0.38±0.28
Mimosine	-0.37±0.38	-0.83±0.08	-0.66±0.14	-0.18±0.12	1.62±0.16	0.42±0.29
Mucic acid	-0.47±0.01	-0.42±0.01	-0.47±0.01	-0.38±0.03	2.11±0.28	-0.37±0.01
Myo-inositol	-1.27±0.03	-0.26±0.14	-0.83±0.07	0.90±0.27	1.25±0.14	0.21±0.23
N-acetylglucosamine	-0.09±0.14	-0.47±0.06	0.00±0.09	1.75±0.37	-1.03±0.17	-0.17±0.23
N-acetylglutamic acid	-0.66±0.03	-0.61±0.07	-0.74±0.03	-0.15±0.15	0.58±0.23	1.59±0.43
N-acetylmannosamine	-0.45±0.00	-0.46±0.01	-0.45±0.00	-0.14±0.02	1.53±0.69	-0.03±0.04
N-methylanthranilic acid	0.79±0.68	0.12±0.31	-0.24±0.11	-0.29±0.16	-0.25±0.38	-0.12±0.28
Oleic acid	0.62±0.22	-0.14±0.03	-0.19±0.13	-0.38±0.04	0.49±0.86	-0.41±0.05
Oxalic acid	-0.02±0.50	0.05±0.25	0.46±0.10	0.45±0.19	-1.09±0.51	0.16±0.27
Palmitoleic acid	0.30±0.58	-0.31±0.00	-0.33±0.01	0.49±0.68	0.14±0.27	-0.29±0.02
Pantothenic acid	-0.37±0.25	1.72±0.29	0.01±0.17	-0.22±0.22	-0.33±0.29	-0.81±0.11
Phenylalanine	-0.19±0.45	-0.98±0.06	-0.59±0.12	0.17±0.22	0.92±0.41	0.67±0.29
Phosphocolamine	-0.74±0.06	1.20±0.39	0.16±0.12	-0.51±0.08	0.79±0.41	-0.91±0.00
Phosphoglycolic acid	0.68±0.18	0.89±0.41	0.89±0.17	-0.40±0.07	-1.11±0.07	-0.95±0.05
Phosphoric acid	0.00±0.35	0.48±0.13	-0.15±0.16	0.90±0.34	-1.43±0.22	0.22±0.34
Porphine	-0.50±0.54	-0.35±0.16	-0.14±0.12	0.59±0.40	-0.14±0.46	0.54±0.31
Proline	-0.33±0.06	-0.11±0.14	-0.13±0.08	-0.64±0.01	1.66±0.60	-0.46±0.05
Purine riboside	-0.70±0.01	-0.64±0.02	-0.66±0.00	0.20±0.17	1.60±0.50	0.21±0.17
Putrescine	1.14±0.50	-1.15±0.05	0.15±0.18	0.69±0.15	-0.60±0.17	-0.23±0.20
Pyridoxine	-0.24±0.18	0.22±0.33	0.01±0.25	1.12±0.43	-0.91±0.14	-0.21±0.44
Pyroglutamic acid	-0.62±0.02	-0.73±0.08	-0.81±0.02	0.01±0.18	0.64±0.20	1.52±0.42
Pyrophosphate	-0.68±0.25	0.59±0.54	-0.66±0.24	0.15±0.31	-0.01±0.19	0.60±0.39
Ribitol	-0.72±0.07	-0.46±0.04	-0.60±0.06	-0.05±0.17	1.96±0.29	-0.14±0.15

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
Ribonolactone	-0.46±0.10	-0.92±0.06	-0.83±0.06	0.23±0.07	0.43±0.18	1.54±0.43
Ribose-5-phosphate	-0.86±0.12	-0.15±0.16	-0.55±0.07	-0.16±0.10	1.86±0.37	-0.13±0.15
Ribulose-5-phosphate	-0.36±0.09	-0.52±0.06	-0.51±0.05	-0.18±0.12	1.72±0.57	-0.15±0.10
Saccharic acid	-0.51±0.01	-0.46±0.01	-0.48±0.01	-0.35±0.05	2.12±0.25	-0.32±0.02
Serine	0.67±0.21	-0.76±0.10	-0.10±0.31	1.18±0.29	-0.73±0.46	-0.26±0.13
Spermidine	-0.58±0.12	0.31±0.47	0.61±0.59	0.17±0.25	-0.14±0.22	-0.38±0.34
Squalene	-0.15±0.01	-0.17±0.01	-0.17±0.01	-0.18±0.00	0.83±0.91	-0.16±0.01
Succinic acid	-0.63±0.19	-0.69±0.08	-0.74±0.03	0.44±0.21	1.78±0.17	-0.16±0.24
Sucrose	-0.35±0.05	-0.27±0.05	-0.30±0.04	-0.15±0.03	1.06±0.85	0.01±0.05
Tagatose	-0.19±0.13	-0.12±0.12	-0.14±0.08	1.10±0.48	-0.54±0.24	-0.11±0.61
Tartaric acid	0.68±0.73	-0.17±0.10	-0.35±0.19	0.17±0.29	-0.46±0.30	0.14±0.26
Threitol	-0.77±0.17	-0.42±0.27	-0.37±0.20	-0.13±0.44	1.15±0.38	0.54±0.26
Threonine	-0.94±0.17	-0.62±0.14	-0.35±0.12	0.42±0.25	1.27±0.43	0.22±0.36
Thymine	-0.67±0.05	-1.13±0.16	1.01±0.20	-0.16±0.13	0.80±0.36	0.16±0.43
Trehalose	-0.17±0.00	-0.17±0.00	-0.17±0.00	-0.16±0.00	-0.16±0.01	0.83±0.91
Tryptophan	-0.58±0.26	-0.38±0.22	-0.07±0.23	1.71±0.34	-0.59±0.18	-0.09±0.17
Tyrosine	-0.64±0.41	-0.43±0.19	-0.12±0.15	1.13±0.29	-0.07±0.48	0.12±0.35
Uracil	-0.51±0.32	-0.65±0.11	-0.83±0.07	-0.02±0.07	0.99±0.32	1.01±0.42
Urea	0.05±0.58	0.08±0.52	-0.07±0.13	0.08±0.24	-0.57±0.42	0.43±0.16
Valine	0.78±0.28	0.51±0.20	1.10±0.17	-1.10±0.15	-1.03±0.19	-0.27±0.17
Xylitol	-0.82±0.14	-0.12±0.10	-0.39±0.03	-0.06±0.08	1.87±0.41	-0.49±0.06

*TPN ve otomatik ölçeklemeye göre normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.5. LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilen metabolomiks analizler sonucunda elde edilen metabolitler ve bağlı derişimleri.

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
(2-benzyl-2,4,6-trihydroxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)oxidanesulfonic acid	0.74±0.49	-0.41±0.35	-0.22±0.51	0.06±0.33	-0.28±0.24	-0.05±0.23
(Dodecyloxy)sulfonic acid	0.23±0.22	-0.03±0.14	-0.51±0.05	-0.10±0.14	-0.59±0.03	1.33±0.78
(R)-3-Hydroxy-Octadecanoic acid	1.16±0.46	0.12±0.48	0.23±0.41	-0.16±0.21	-0.52±0.17	-0.43±0.19
(S)-a-Amino-2,5-dihydro-5-oxo-4-isoxazolepropanoic acid N2-glucoside	-0.04±0.41	-0.14±0.28	-0.64±0.12	-0.34±0.15	1.19±0.37	-0.24±0.44
[5-(3,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-2-hydroxyphenyl]oxidanesulfonic acid	0.53±0.61	-0.23±0.14	-0.25±0.26	-0.42±0.17	-0.14±0.37	-0.04±0.17
(2-hydroxy-5-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]phenyl)oxidanesulfonic acid	-0.06±0.20	-0.18±0.20	-0.65±0.03	0.18±0.44	-0.10±0.13	-0.77±0.03
12,13-DHOME	1.04±0.96	-0.29±0.00	-0.29±0.00	-0.19±0.06	-0.06±0.09	0.00±0.10
16-Dehydroprogesterone	0.52±0.53	-0.54±0.31	-0.23±0.39	-0.10±0.24	-0.27±0.22	1.00±0.22

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
1-hexadecyl-glycero-3-phosphate	1.18±0.53	0.13±0.33	-0.18±0.29	-0.32±0.30	-0.84±0.19	-0.08±0.22
1-Piperidinecarboxaldehyde	0.32±0.29	-0.39±0.11	-0.16±0.18	0.62±0.42	-0.58±0.08	-0.43±0.10
2-Arachidonylglycerol	-0.06±0.50	-0.21±0.44	0.37±0.33	0.38±0.42	-0.06±0.33	-0.36±0.36
2-Glyceryl-prostaglandin H2	0.25±0.28	-0.06±0.54	0.11±0.52	-0.20±0.19	-0.18±0.36	0.24±0.50
2-oxo-nonadecanoic acid	1.04±0.39	-0.31±0.23	0.32±0.42	0.23±0.47	-0.30±0.17	-0.41±0.39
2-Thiophenethiol	0.76±0.53	-0.11±0.36	0.11±0.41	-0.47±0.27	-0.05±0.30	-0.14±0.42
3'-(2'',3''-Digalloylglucosyl)- phloroacetophenone	-0.58±0.16	0.49±0.15	0.10±0.09	0.90±0.33	0.02±0.65	-1.08±0.04
3-(2,4-dihydroxy-3,5- dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	1.30±0.61	-0.10±0.27	0.12±0.42	0.02±0.19	-0.78±0.20	-0.27±0.11
3-(4-Hydroxyphenyl)lactate	-0.44±0.05	-0.34±0.03	-0.32±0.04	-0.15±0.04	1.69±0.74	-0.42±0.11
3,4,5-trihydroxy-6-(2,4,6- trihydroxyphenoxy)oxane-2- carboxylic acid	-0.45±0.10	0.06±0.04	-0.25±0.06	-0.21±0.14	0.03±0.17	-0.11±0.16
3-Carbamoyl-2- phenylpropionaldehyde	0.68±0.51	-0.38±0.16	0.05±0.22	-0.30±0.15	0.23±0.38	0.08±0.70
3H-1,2-Dithiole-3-thione	0.06±0.29	0.38±0.46	0.17±0.33	-0.47±0.32	-0.70±0.10	0.34±0.30
3-Hydroxy-2H-pyran-2-one	-0.75±0.06	-0.35±0.09	0.34±0.13	-0.40±0.07	0.05±0.19	-0.64±0.03
5'-Methylthioadenosine	-0.83±0.01	-0.71±0.02	-0.74±0.02	-0.26±0.10	0.57±0.27	1.06±0.56
6-[4-(3-carboxyoxiran-2-yl)-2- methoxyphenoxy]-3,4,5- trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	1.61±0.48	0.37±0.24	0.04±0.31	-0.46±0.17	-0.85±0.13	-0.69±0.09
6-[5-(2-([2-(3,4- dimethoxyphenyl)ethyl]-C- hydroxycarbonimidoyl)eth-1-en- 1-yl)-2-methoxyphenoxy]-3,4,5- trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	-0.74±0.02	-0.40±0.08	-0.47±0.08	0.01±0.24	1.61±0.66	0.10±0.27
7-Hydroxy-3-oxocholanoic acid	1.16±0.76	-0.15±0.15	-0.09±0.14	-0.22±0.14	-0.53±0.08	-0.44±0.11
8-HETrE	1.98±0.40	-0.54±0.10	-0.61±0.10	0.22±0.26	-0.46±0.13	-0.40±0.18
Alpha-CEHC	-0.23±0.30	0.54±0.21	0.78±0.36	-0.70±0.13	-0.52±0.19	0.41±0.69
Cer(d18:0/16:0)	0.15±0.42	-0.46±0.09	0.28±0.42	-0.14±0.22	-0.41±0.18	0.72±0.71
Cer(d18:0/17:0)	0.33±0.20	-0.49±0.16	-0.38±0.17	0.39±0.41	-0.50±0.14	0.51±0.47
Ceriporic acid C	0.95±0.55	0.34±0.47	-0.14±0.35	-0.01±0.35	-0.43±0.18	-0.60±0.07
Cervonyl carnitine	-0.41±0.09	0.05±0.43	0.80±0.84	0.34±0.18	-0.38±0.06	-0.25±0.19
Dehydrochorismic acid	0.52±0.48	-0.52±0.21	-0.28±0.25	-0.52±0.18	-0.21±0.37	0.66±0.36
Dehydrophytosphingosine	-0.68±0.05	-0.62±0.05	-0.27±0.20	-0.15±0.07	0.21±0.13	1.75±0.63
Ethyl aconitate	0.95±0.59	-0.41±0.05	0.15±0.46	-0.57±0.03	-0.56±0.13	0.58±0.42
Ethyl oleate	0.17±0.25	-0.31±0.13	-0.13±0.22	-0.23±0.12	0.07±0.17	-0.33±0.04
Glycerol 1-(9Z-octadecenoate) 2- tetradecanoate 3-phosphate	-0.49±0.34	-0.48±0.30	0.14±0.44	0.26±0.48	0.36±0.34	0.23±0.39
hexadecaspheganine(1+)	1.25±0.70	0.41±0.32	-0.20±0.26	-0.46±0.14	-0.54±0.17	-0.25±0.16
hexadecyl (E)-3-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)prop-2-enoate	0.67±0.43	-0.48±0.08	-0.42±0.12	0.04±0.39	0.07±0.31	0.44±0.69
Histidinyl- Glutamate	-0.61±0.15	-0.29±0.41	0.40±0.68	0.19±0.18	0.00±0.16	0.55±0.51
Isoacitretin	-0.24±0.24	-0.47±0.17	0.74±0.46	-0.44±0.11	0.06±0.33	0.17±0.57
Kaempferol-4'-methyl ether	1.91±0.56	0.01±0.22	-0.44±0.10	-0.16±0.16	-0.49±0.08	-0.27±0.11

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	-0.52±0.07	-0.48±0.08	-0.18±0.35	-0.36±0.06	0.41±0.27	1.39±0.69
Menthol-glucuronide	1.33±0.40	0.32±0.18	0.32±0.25	0.36±0.18	-0.88±0.26	-1.19±0.04
MG(0:0/16:0/0:0)	1.08±0.84	-0.43±0.10	-0.20±0.26	-0.13±0.21	-0.14±0.17	0.08±0.15
N,N-Dimethylglycine	-0.16±0.49	0.65±0.20	-0.36±0.21	0.10±0.25	-0.62±0.21	0.26±0.74
N,N-dimethyl-Safingol	-0.82±0.12	-0.89±0.13	-0.25±0.19	-0.19±0.11	-0.10±0.09	0.97±0.37
N-a-Acetyl-L-arginine	1.26±0.53	0.36±0.29	0.27±0.41	0.14±0.21	-0.68±0.13	-0.44±0.15
N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	-0.67±0.02	-0.56±0.04	-0.53±0.05	1.03±0.63	-0.21±0.22	-0.10±0.15
N-Acetylneuraminic acid	-0.60±0.08	-0.26±0.05	-0.33±0.05	0.98±0.66	0.07±0.49	-0.40±0.13
N-Decanoylglycine	0.87±0.57	0.44±0.47	-0.10±0.30	0.06±0.12	-0.15±0.44	-0.33±0.21
N-Hexadecanoylpyrrolidine	-0.39±0.11	-0.63±0.02	-0.30±0.17	-0.05±0.15	-0.11±0.30	0.99±0.39
Nonadeca-10(Z)-enoic acid	-0.26±0.00	-0.27±0.00	0.25±0.30	0.01±0.26	-0.27±0.01	-0.26±0.01
N-tryptophanyl-35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol	1.90±0.64	-0.45±0.04	-0.36±0.03	-0.18±0.14	-0.28±0.06	-0.38±0.04
N-Undecanoylglycine	0.88±0.49	0.21±0.38	0.13±0.46	0.04±0.12	-0.20±0.49	-0.38±0.25
Nutriacholic acid	1.14±0.63	0.05±0.29	0.51±0.28	-0.27±0.27	-0.78±0.10	-0.54±0.19
O-methoxycatechol-O-sulphate	1.82±0.32	0.06±0.29	0.52±0.26	-0.19±0.10	-0.97±0.01	-0.68±0.11
PA(16:1(9Z)/16:0)	-0.07±0.40	0.42±0.33	-0.57±0.31	0.04±0.35	-0.49±0.23	-0.01±0.50
PA(18:0/14:1(9Z))	0.08±0.45	-0.54±0.15	0.75±0.38	-0.16±0.37	0.23±0.44	0.21±0.48
Penicilloic acid	0.58±0.64	-0.19±0.24	-0.04±0.32	0.07±0.29	0.23±0.40	-0.48±0.45
PI(17:2(9Z,12Z)/0:0)	0.10±0.22	-0.57±0.04	-0.21±0.09	-0.13±0.16	0.53±0.28	0.42±0.92
PI(19:0/18-HETE)	0.79±0.35	-0.57±0.12	-0.22±0.24	-0.19±0.29	-0.43±0.38	1.26±0.44
Sedoheptulose 7-phosphate	0.24±0.49	-0.57±0.07	-0.67±0.02	0.53±0.52	-0.03±0.23	-0.58±0.04
Stearoylcarnitine	0.68±0.81	-0.32±0.13	0.17±0.36	0.05±0.30	-0.28±0.23	0.08±0.19
Taurine	-1.42±0.26	0.77±0.19	-0.42±0.13	0.17±0.44	0.45±0.31	0.26±0.43
Trans-Hexa-dec-2-enoic acid	1.03±0.50	-0.26±0.30	-0.33±0.29	0.01±0.21	0.04±0.49	-0.24±0.29
Trichostatin A	-0.56±0.11	-0.49±0.17	0.05±0.56	-0.13±0.11	0.12±0.23	1.32±0.57
Tridecanoylglycine	0.63±0.81	0.40±0.61	-0.27±0.00	-0.27±0.00	-0.26±0.00	-0.26±0.00
Uridine 5'-monophosphate	-0.10±0.31	0.70±0.55	0.73±0.40	-0.44±0.29	-0.42±0.10	0.11±0.43

*TPN ve otomatik ölçeklemeye göre normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Tablo 4.6. LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilen lipidomiks analizler sonucunda elde edilen metabolitler ve bağlı derişimleri.*

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
(24E)-15alpha-Acetoxy-3alpha-hydroxy-23-oxo-7,9(11),24-lanostatrien-26-oic acid	1.25±0.46	1.27±0.08	0.09±0.24	-0.48±0.13	-0.74±0.13	-0.72±0.11
(2E)-1-[3-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one	0.43±0.14	0.15±0.26	-0.04±0.17	-0.44±0.12	-0.64±0.12	0.71±0.83
(3beta,5alpha,9alpha,14alpha,22E,24R)-3,5,9,14-Tetrahydroxyergosta-7,22-dien-6-one	0.18±0.17	-0.18±0.03	-0.21±0.01	-0.22±0.00	-0.23±0.00	-0.23±0.00
(4E,8E,10E-d18:3)sphingosine	0.99±0.44	0.67±0.66	-0.33±0.11	0.05±0.38	-0.50±0.21	-0.48±0.13
(9Z)-12,13-Dihydroxyoctadec-9-enoic acid	0.74±0.44	2.06±0.06	-0.38±0.04	-0.54±0.05	-0.60±0.02	-0.49±0.05
(9Z,12Z,15Z)-3-hydroxyoctadecatrienoylcarnitine	-0.34±0.19	0.27±0.38	-0.15±0.44	0.00±0.53	0.11±0.41	0.00±0.38
(E)-4-Oxo-2-hexen-1-al	0.93±0.93	-0.32±0.03	-0.19±0.06	-0.10±0.11	-0.17±0.04	-0.14±0.06
(R)-5-Hydroxy-2,4-dimethoxydalbergiquinol	-0.70±0.27	-0.19±0.34	0.51±0.53	0.69±0.35	-0.14±0.17	-0.63±0.30
(Z)-13-Octadecenoic acid	0.35±0.17	-0.75±0.04	0.28±0.54	-0.30±0.23	0.15±0.20	0.15±0.69
(Z)-But-1-ene-1,2,4-tricarboxylate	0.05±0.46	1.20±0.18	1.08±0.28	0.01±0.35	-0.87±0.17	-0.65±0.05
1-(4-methoxyphenyl)-4-methylpenta-1,4-dien-3-one	-0.19±0.27	0.22±0.54	-0.41±0.34	0.29±0.40	0.47±0.35	-0.64±0.27
1-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphate	-0.52±0.11	-0.05±0.23	0.12±0.22	-0.29±0.17	0.12±0.29	0.85±0.78
1-(Malonylamino)cyclopropanecarboxylic acid	0.05±0.47	1.24±0.19	1.03±0.27	0.01±0.35	-0.87±0.18	-0.63±0.06
10-propyl-5,9-tridecadien-1-ol	0.76±0.67	-0.47±0.22	-0.52±0.21	-0.07±0.26	0.69±0.33	-0.36±0.13
10Z-Heptadecenoic acid	-0.32±0.10	0.54±0.89	-0.08±0.34	-0.09±0.19	-0.09±0.26	0.15±0.46
11-Hydroxyeicosatetraenoate glyceryl ester	-0.39±0.32	0.90±0.49	0.66±0.15	0.21±0.38	-0.82±0.29	-0.45±0.28
12-HETE-G	0.33±0.56	0.17±0.27	-0.06±0.25	0.32±0.44	-0.92±0.06	0.12±0.26
13-Hydroxyabscisic acid	-1.27±0.13	0.30±0.34	0.19±0.35	0.56±0.23	0.58±0.22	0.13±0.38
13-Oxo-9,11-tridecadienoic acid	0.71±0.51	1.32±0.23	0.04±0.24	-0.73±0.35	-0.31±0.23	-0.39±0.25
17-phenyl-trinor-PGF2alpha amide	0.61±0.33	0.84±0.55	0.41±0.36	-0.53±0.37	-0.94±0.11	-0.09±0.32
18-Oxocortisol	-0.25±0.46	0.27±0.49	0.12±0.45	0.32±0.39	-0.23±0.44	-0.21±0.18
18-oxo-nonadecanoic acid	1.07±0.25	0.86±0.35	-0.47±0.21	-0.90±0.10	0.27±0.30	0.01±0.48
1-deoxytetradecasphinganine	-0.41±0.19	-0.14±0.05	-0.25±0.10	-0.02±0.32	0.80±0.63	0.33±0.43
1-Methylbutyl butanoate	-0.16±0.06	0.25±0.10	-0.14±0.08	-0.26±0.07	-0.18±0.06	0.92±0.91
1-Octen-3-yl primeveroside	-0.47±0.21	-0.52±0.07	0.44±0.41	-0.31±0.20	-0.05±0.28	1.05±0.61
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)	0.09±0.35	1.26±0.21	0.91±0.26	-0.44±0.27	-0.94±0.11	-0.54±0.21
1-Pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate	0.22±0.50	0.90±0.41	0.61±0.31	-0.14±0.31	-0.88±0.15	-0.39±0.38
2-(1,2-dihydroxypropan-2-yl)-6-(2-methylbut-3-en-2-yl)-2H,3H,7H-furo[3,2-g]chromen-7-one	-0.20±0.21	1.03±0.57	0.04±0.42	-0.14±0.57	-0.14±0.19	-0.01±0.17
2-(acetylamino)-1,5-anhydro-2-deoxy-3-O-b-D-galactopyranosyl-D-arabino-Hex-1-enitol	0.74±0.18	-0.11±0.22	0.17±0.13	-0.43±0.15	-0.61±0.09	-0.38±0.33
2,3-Diaminopropionic acid	-0.87±0.04	-0.65±0.04	-0.34±0.20	0.10±0.49	0.55±0.42	1.19±0.28

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
2,5-Dihydro-2,4,5-trimethyloxazole	0.38±0.54	0.16±0.41	0.77±0.44	-0.38±0.30	-0.52±0.22	-0.16±0.33
24-Oxo-1alpha,23,25-trihydroxyvitamin D3	0.16±0.23	-0.14±0.48	0.45±0.33	0.17±0.36	-0.01±0.36	-0.16±0.60
2-Carboxy-5,7-dimethyl-4-octanolide	-0.06±0.28	0.76±0.26	0.50±0.19	-0.88±0.51	0.12±0.28	0.23±0.45
2-deoxy-20-hydroxyecdysone 22-phosphate	0.26±0.43	0.09±0.35	0.83±0.50	-0.29±0.34	-0.40±0.29	-0.47±0.23
2-Octenedioic acid	-0.42±0.37	-0.28±0.36	0.21±0.46	0.30±0.40	0.73±0.47	-0.38±0.17
2'-O-Methylcajanone	-0.77±0.26	0.33±0.28	-0.21±0.16	0.35±0.47	0.06±0.39	0.41±0.47
2-Oxo-4-methylthiobutanoic acid	-0.72±0.28	-0.67±0.21	-0.45±0.42	0.11±0.25	0.61±0.28	0.67±0.23
3,4-Methylenedioxybenzoic acid	0.62±0.52	0.18±0.08	-0.35±0.07	-0.24±0.13	-0.45±0.06	-0.44±0.08
3-(3-[(3,3-dimethyloxiran-2-yl)methyl]-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid	0.74±0.95	-0.25±0.02	-0.22±0.04	-0.24±0.02	0.03±0.09	0.06±0.09
35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol	-0.38±0.38	0.79±0.35	0.54±0.28	0.76±0.43	-0.52±0.28	-0.75±0.28
3-carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid	0.43±0.80	0.08±0.34	-0.10±0.30	0.20±0.23	0.17±0.24	-0.33±0.16
3-Dehydrospinganine	-0.79±0.05	0.15±0.24	-0.52±0.14	-0.13±0.27	1.35±0.54	0.17±0.36
3-Deoxyvitamin D3	1.60±0.72	-0.14±0.07	-0.22±0.04	-0.44±0.01	-0.30±0.05	-0.40±0.03
3-Hydroxy-6,8-dimethoxy-7(11)-eremophilin-12,8-olide	-0.13±0.43	-0.36±0.25	-0.26±0.35	0.23±0.46	-0.09±0.21	0.56±0.53
3-Hydroxy-9-hexadecenoylcarnitine	0.24±0.32	1.31±0.47	0.56±0.44	0.19±0.25	-0.70±0.11	-0.83±0.04
3-Hydroxydodecanedioic acid	0.88±0.95	-0.15±0.01	-0.15±0.01	-0.17±0.00	-0.16±0.01	-0.16±0.01
3-Hydroxysintaxanthin	-0.89±0.17	0.02±0.37	-0.08±0.23	0.49±0.56	0.34±0.31	0.24±0.44
3-Methyl-4-phenyl-3-buten-2-one	0.40±0.30	0.34±0.31	0.51±0.70	-0.15±0.26	-0.52±0.24	-0.41±0.13
3-Methylhistidine	-0.16±0.05	-0.28±0.03	-0.24±0.10	-0.28±0.08	0.52±0.89	0.56±0.29
3-oxo-heneicosanoic acid	0.05±0.29	-0.11±0.18	-0.13±0.24	-0.33±0.15	0.55±0.79	0.04±0.30
3-Oxohexadecanoic acid	-0.65±0.28	0.27±0.16	-0.01±0.45	0.86±0.39	0.24±0.42	-0.45±0.31
3-oxo-nonadecanoic acid	0.13±0.26	0.40±0.30	-0.56±0.12	-0.62±0.10	0.29±0.30	0.93±0.68
4,5-Dihydroorotic acid	0.25±0.18	1.06±0.44	-0.25±0.16	-0.14±0.42	-0.04±0.40	-0.34±0.38
4-Hydroxybenzoic acid	-0.14±0.45	1.57±0.14	0.98±0.26	-0.26±0.30	-0.85±0.08	-0.65±0.11
5-Acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole	-0.35±0.08	-0.20±0.08	-0.31±0.08	-0.34±0.06	0.67±0.62	0.33±0.65
5-Aminopentanoic acid	0.71±0.40	1.13±0.12	0.40±0.32	-0.85±0.27	-0.43±0.38	-0.50±0.24
5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	-0.39±0.39	0.35±0.26	0.50±0.41	-0.02±0.28	-0.36±0.27	0.33±0.59
5S-HETE di-endoperoxide	-0.38±0.29	1.45±0.58	-0.57±0.18	-0.23±0.21	0.38±0.30	0.24±0.36
6-O-Desmethyl-mycophenolic acid	0.96±0.93	-0.05±0.05	-0.07±0.06	-0.27±0.03	-0.24±0.04	-0.15±0.03
Adenine	-0.72±0.04	-0.44±0.04	-0.23±0.29	-0.53±0.08	0.98±0.65	0.76±0.31
all-trans-7-hydroxyhexadeca-2,4,8,10-tetraenoic acid	0.51±0.44	1.04±0.36	0.41±0.27	-0.33±0.34	-0.57±0.23	-0.49±0.37
alpha-Tocopherol succinate	1.42±0.79	-0.04±0.04	-0.40±0.00	-0.34±0.04	-0.28±0.10	-0.09±0.05
Aminocaproic acid	0.49±0.18	0.24±0.10	-0.12±0.14	-0.62±0.08	0.51±0.84	-0.46±0.10
Arachidonoyl Serinol	-0.41±0.18	0.09±0.33	-0.35±0.44	-0.26±0.47	0.73±0.41	0.20±0.37
Avocadyne 4-acetate	0.86±0.95	-0.12±0.02	-0.18±0.03	-0.16±0.05	-0.14±0.02	-0.08±0.05
C17 Sphinganine	0.22±0.52	0.74±0.55	0.09±0.39	-0.43±0.20	-0.02±0.38	-0.10±0.35
Calcitroic acid	-0.02±0.40	0.89±0.57	0.24±0.33	0.00±0.54	-0.01±0.27	-0.32±0.15
Caproic acid	0.43±0.77	0.25±0.11	0.26±0.07	-0.57±0.40	-0.04±0.20	0.12±0.30

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
Ceramide (d18:1/12:0)	0.49±0.69	-0.23±0.45	-0.23±0.25	-0.01±0.21	0.28±0.36	0.11±0.28
DAG 15:0e	0.25±0.51	0.48±0.24	0.25±0.50	-0.53±0.23	0.06±0.44	-0.25±0.31
DAG 18:0e	0.23±0.26	0.80±0.56	0.32±0.58	-0.34±0.15	-0.45±0.09	-0.32±0.19
DAG 30:4	0.68±0.26	-0.17±0.24	0.53±0.55	-0.67±0.03	-0.46±0.14	-0.26±0.34
DAG 32:8e	0.26±0.45	0.52±0.80	0.15±0.27	0.28±0.33	-0.25±0.21	-0.48±0.20
D-Alanyl-D-alanine	0.20±0.56	-0.56±0.04	-0.07±0.35	-0.23±0.29	-0.20±0.24	0.56±0.54
Dehydroepiandrosterone sulfate	0.76±0.96	-0.25±0.03	-0.17±0.05	-0.23±0.02	-0.06±0.07	0.05±0.07
Dihydro-5-(2-octenyl)-2(3H)-furanone	0.19±0.42	0.99±0.30	0.40±0.31	-0.22±0.38	-0.33±0.32	-0.38±0.34
Dihydro-5-methyl-2(3H)-thiophenone	0.13±0.47	1.20±0.24	0.98±0.31	0.00±0.32	-0.84±0.18	-0.63±0.08
Epsilon-caprolactam	-0.10±0.43	0.32±0.47	0.87±0.47	-0.33±0.33	-0.47±0.24	-0.06±0.36
FA 10:0	-0.53±0.23	1.30±0.28	0.16±0.31	-0.31±0.34	0.10±0.28	0.53±0.37
FA 12:0	-0.35±0.11	1.43±0.72	0.18±0.45	-0.23±0.31	-0.13±0.20	-0.07±0.20
FA 16:0	-0.59±0.18	-0.08±0.34	-0.19±0.45	-0.31±0.40	-0.04±0.44	0.31±0.25
FA 16:4	-0.21±0.43	1.25±0.19	0.57±0.15	-0.09±0.41	-0.13±0.21	-0.78±0.38
FAHFA 22:4/4:0	-0.53±0.27	1.53±0.29	0.32±0.28	-0.15±0.40	-0.14±0.33	-0.37±0.33
Glucosylceramide (d18:1/12:0)	-0.24±0.17	1.47±0.95	0.18±0.20	-0.08±0.11	-0.55±0.03	-0.14±0.15
Glutamylhistidine	-0.82±0.04	-0.20±0.26	-0.16±0.26	0.84±0.54	0.42±0.34	0.03±0.38
Glycocholic acid	-0.57±0.02	-0.41±0.10	-0.12±0.15	0.24±0.25	0.18±0.43	0.41±0.79
Hexacosanedioate(2-)	0.91±0.93	0.00±0.01	-0.12±0.08	-0.21±0.02	-0.24±0.04	-0.14±0.05
Hydroxypropyl-Alanine	0.25±0.44	-0.34±0.18	-0.01±0.19	1.13±0.52	-0.18±0.28	-0.32±0.30
Isovalerylglucuronide	-0.94±0.08	-0.50±0.33	0.04±0.34	0.40±0.43	0.77±0.34	0.10±0.49
L-Isoleucine	-0.42±0.24	0.61±0.26	-0.44±0.30	0.25±0.38	-0.13±0.51	0.39±0.53
LPC 18:0	-0.23±0.09	-0.33±0.00	-0.25±0.08	-0.23±0.06	-0.01±0.19	0.05±0.17
LPC 26:1-SN1	-0.12±0.34	0.01±0.20	-0.73±0.10	0.07±0.48	1.19±0.31	0.21±0.39
LPC 36:4-SN2	-0.44±0.28	-0.40±0.11	-0.22±0.29	0.32±0.37	0.06±0.28	0.97±0.62
LPE 26:6	-1.06±0.11	0.71±0.34	-0.08±0.21	-0.47±0.24	0.41±0.23	0.76±0.60
L-Phenylalanine	-0.20±0.39	0.28±0.14	-0.21±0.31	0.08±0.43	0.75±0.57	-0.31±0.29
LysoPC(16:0)	-1.05±0.12	-0.37±0.32	0.14±0.45	0.62±0.42	0.61±0.32	-0.06±0.37
LysoPC(16:1(9Z))	0.75±0.71	-0.50±0.13	-0.20±0.27	0.04±0.44	0.05±0.24	-0.28±0.16
LysoPC(18:1(11Z))	0.67±0.43	-0.24±0.17	-0.31±0.27	0.07±0.40	-0.55±0.11	-0.18±0.31
MAG 15:0	0.42±0.50	-0.07±0.40	-0.10±0.24	-0.35±0.21	0.38±0.54	0.22±0.40
MAG 18:0	-0.23±0.31	0.99±0.53	0.28±0.43	-0.03±0.39	-0.40±0.41	-0.03±0.24
MAG 20:1	0.13±0.40	-0.36±0.28	0.40±0.67	-0.41±0.17	0.18±0.41	-0.25±0.11
Methyl 2-thiofuroate	0.82±0.37	1.59±0.15	-0.27±0.25	-0.55±0.28	-0.53±0.16	-0.52±0.25
Methylglutaric acid	0.36±0.81	-0.62±0.06	-0.11±0.11	0.13±0.22	0.18±0.34	-0.20±0.22
Methyl-S-Cysteinyglycine	-0.34±0.05	-0.38±0.25	0.76±0.39	-0.36±0.11	0.16±0.37	-0.13±0.26
MG(0:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	-0.57±0.19	0.50±0.27	-0.12±0.31	-0.51±0.31	0.20±0.29	0.05±0.44
MG(18:0/0:0/0:0)	-0.10±0.34	1.27±0.44	0.20±0.44	-0.21±0.33	-0.07±0.33	-0.35±0.34
MG(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0/0:0)	-0.05±0.51	0.61±0.40	0.86±0.49	0.07±0.26	-0.47±0.26	-0.34±0.18
MG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0/0:0)	0.59±0.51	-0.17±0.08	-0.20±0.08	-0.36±0.09	-0.27±0.07	-0.16±0.27
Mycophenolic acid	0.84±0.95	-0.01±0.08	-0.19±0.04	-0.17±0.05	-0.17±0.05	-0.08±0.07

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
Myristic acid	-0.49±0.17	1.60±0.44	0.18±0.27	-0.37±0.31	-0.16±0.31	-0.32±0.39
N-(2-phenoxy-ethyl) arachidonoyl amine	-1.04±0.11	-0.32±0.37	0.08±0.43	0.55±0.41	0.69±0.34	0.01±0.37
N-(octadecanoyl)hexadecaphingosine-1-phosphocholine	-0.61±0.23	1.68±0.71	0.25±0.18	-0.23±0.12	-0.26±0.08	-0.34±0.11
N,N,O-Tridesmethyl-tramadol	-0.31±0.32	-0.50±0.07	-0.03±0.17	-0.17±0.20	0.19±0.63	0.32±0.61
N-Acetyl-b-glucosaminylamine	0.49±0.60	0.29±0.39	-0.59±0.15	0.22±0.40	-0.19±0.31	-0.13±0.40
N-Acetylserotonin	-0.99±0.18	-0.35±0.24	0.03±0.29	0.11±0.37	1.06±0.48	0.14±0.37
Neuromedin B (1-3)	-0.40±0.39	0.78±0.19	0.23±0.34	0.42±0.49	-0.13±0.24	-0.37±0.45
PA 18:0	-0.50±0.04	-0.18±0.07	-0.37±0.04	-0.22±0.08	-0.18±0.17	1.70±0.65
PA 38:6; PA 18:1-20:5; [M-H]-	-0.45±0.00	-0.10±0.25	-0.24±0.19	-0.28±0.16	0.72±0.69	0.32±0.46
PA 40:7; PA 18:1-22:6; [M-H]-	-0.27±0.02	0.37±0.48	-0.27±0.03	-0.19±0.11	0.08±0.31	-0.23±0.07
PA(18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-0.20±0.19	-0.19±0.23	-0.39±0.11	-0.33±0.13	0.72±0.64	0.34±0.50
PA(22:2(13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.43±0.30	-0.73±0.02	-0.51±0.11	-0.54±0.08	0.24±0.36	1.44±0.46
PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.05±0.35	-0.43±0.25	-0.48±0.16	-0.28±0.22	0.83±0.58	0.23±0.44
PA(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	-0.17±0.14	-0.11±0.22	-0.38±0.07	-0.25±0.10	0.40±0.59	0.49±0.64
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:0)	1.34±0.30	-1.05±0.04	-0.20±0.19	-0.06±0.29	0.02±0.40	0.23±0.38
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:0)	0.16±0.62	-0.47±0.05	-0.52±0.14	-0.43±0.18	0.38±0.15	1.17±0.43
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:1(11Z))	1.06±0.24	-0.94±0.01	-0.45±0.26	-0.33±0.32	0.45±0.33	0.43±0.49
Palmitic acid	0.85±0.94	-0.26±0.05	-0.07±0.09	-0.05±0.09	-0.13±0.06	-0.28±0.06
PC 28:0	0.21±0.30	1.74±0.48	0.50±0.32	-0.34±0.36	-0.75±0.08	-0.47±0.06
PC 31:0e	0.02±0.47	0.43±0.39	0.62±0.50	-0.45±0.04	-0.50±0.00	-0.50±0.00
PC 32:2e	-0.55±0.03	1.16±0.56	0.03±0.32	0.61±0.63	-0.17±0.05	-0.46±0.07
PC 34:2	0.58±0.72	0.81±0.32	0.02±0.27	-0.51±0.04	-0.36±0.16	-0.42±0.08
PC 38:5	0.60±0.50	0.71±0.21	0.21±0.17	-0.75±0.04	-0.35±0.42	-0.17±0.41
PC 39:7e	-0.39±0.03	-0.42±0.00	-0.41±0.01	0.41±0.45	0.57±0.80	0.26±0.16
PC 44:9	0.35±0.35	1.14±0.77	-0.27±0.19	0.11±0.36	-0.56±0.00	-0.56±0.00
PE(18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-0.61±0.19	-0.16±0.17	-0.42±0.42	0.47±0.28	0.05±0.49	0.85±0.46
PE(20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	-0.56±0.25	0.13±0.21	0.20±0.33	0.34±0.45	-0.15±0.38	0.16±0.59
PE(20:1(11Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.62±0.47	0.18±0.27	0.58±0.62	-0.48±0.07	-0.50±0.11	-0.52±0.13
PE(22:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.57±0.41	1.24±0.31	-0.62±0.30	-0.08±0.26	-0.13±0.27	-0.14±0.35
PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:0)	0.30±0.21	-0.06±0.16	0.67±0.27	-0.25±0.23	-0.31±0.33	-1.12±0.04
PE-Cer(d16:1(4E)/20:0)	-0.45±0.05	-0.05±0.06	-0.39±0.07	0.27±0.57	0.68±0.63	-0.35±0.25
Pentadecanoic acid	-0.59±0.09	1.41±0.66	0.08±0.28	-0.26±0.25	-0.27±0.23	0.12±0.46
PG 34:0	0.02±0.21	-0.69±0.00	-0.52±0.10	0.57±0.66	-0.29±0.12	1.07±0.38
Phytosphingosine 18:0	-0.80±0.16	0.19±0.36	0.43±0.40	0.91±0.43	0.04±0.36	-0.59±0.18
PI(17:1(9Z)/16:1(9Z))	-0.43±0.01	0.33±0.31	-0.42±0.03	-0.29±0.11	0.32±0.56	0.34±0.43

	Caco-2			FHC		
	Kontrol	CIS	5-FU	Kontrol	CIS	5-FU
PI(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/15:1(9Z))	-0.12±0.22	1.73±0.32	0.61±0.40	-0.40±0.23	-0.71±0.00	-0.71±0.00
Salsoline-1-carboxylate	-0.20±0.48	-0.28±0.27	0.15±0.43	-0.58±0.04	-0.54±0.14	0.64±0.22
SM d33:1	0.95±0.91	-0.21±0.01	-0.21±0.01	-0.22±0.00	-0.21±0.01	-0.22±0.00
SM d34:1	0.91±0.86	0.11±0.13	-0.22±0.08	-0.28±0.08	-0.29±0.15	-0.27±0.12
SM d34:2	-0.88±0.26	-0.22±0.27	-0.44±0.17	0.16±0.23	1.27±0.54	-0.18±0.24
Stearic acid	-0.74±0.18	-0.02±0.66	0.60±0.30	0.66±0.36	-0.14±0.29	-0.57±0.29
Uridine 2',3'-cyclic phosphate	-0.48±0.22	0.17±0.22	-0.39±0.15	-0.09±0.38	0.90±0.52	0.13±0.55

*TPN ve otomatik ölçeklemeye göre normalize edilmiş verilerin ortalama ± standart hata'sı

Caco-2 ve FHC hücre hatlarından elde edilen metabolit değerleri normalizasyon işlemlerinden sonra t-testi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Caco-2 ve FHC hücre hatlarından elde edilen grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait p değerleri.

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
(2-benzyl-2,4,6-trihydroxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)oxidanesulfonic acid	0.113	0.243	0.785	0.453	0.793	0.537	0.325	0.794	0.792
(Dodecyloxy)sulfonic acid	0.382	0.012	0.014	0.011	0.132	0.050	0.267	0.005	0.057
(R)-3-Hydroxy-Octadecanoic acid	0.184	0.200	0.874	0.251	0.408	0.742	0.039	0.277	0.213
(S)-a-Amino-2,5-dihydro-5-oxo-4-isoxazolepropanoic acid N2-glucoside	0.855	0.230	0.169	0.006	0.855	0.048	0.553	0.026	0.445
[5-(3,7-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-2-hydroxyphenyl]oxidanesulfonic acid	0.291	0.304	0.948	0.551	0.182	0.825	0.199	0.845	0.550
(2-hydroxy-5-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]phenyl)oxidanesulfonic acid	0.714	0.024	0.055	0.586	0.077	0.001	0.656	0.776	0.028
12,13-DHOME	0.235	0.235	0.957	0.303	0.154	0.684	0.269	0.052	0.024
16-Dehydroprogesterone	0.146	0.322	0.582	0.635	0.011	0.004	0.351	0.535	0.030
1-hexadecyl-glycero-3-phosphate	0.151	0.065	0.545	0.220	0.569	0.042	0.046	0.045	0.819
1-Piperidinecarboxaldehyde	0.065	0.231	0.338	0.028	0.050	0.334	0.595	0.232	0.245
2-Arachidonylglycerol	0.836	0.529	0.353	0.466	0.244	0.584	0.553	0.807	0.198
2-Glyceryl-prostaglandin H2	0.650	0.831	0.839	0.959	0.469	0.549	0.257	0.874	0.872
2-oxo-nonadecanoic acid	0.021	0.279	0.251	0.347	0.353	0.812	0.255	0.965	0.268
2-Thiophenethiol	0.242	0.395	0.716	0.371	0.563	0.881	0.091	0.910	0.705
3'-(2",3"-Digalloylglucosyl)-phloroacetophenone	0.001	0.006	0.072	0.296	0.000	0.155	0.004	0.539	0.000
3-(2,4-dihydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	0.083	0.171	0.701	0.025	0.266	0.069	0.095	0.097	0.435
3-(4-Hydroxyphenyl)lactate	0.128	0.088	0.703	0.047	0.056	0.028	0.001	0.032	0.419

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
3,4,5-trihydroxy-6-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)oxane-2-carboxylic acid	0.001	0.122	0.002	0.339	0.674	0.595	0.224	0.877	0.497
3-Carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde	0.100	0.327	0.178	0.268	0.639	0.867	0.123	0.211	0.974
3H-1,2-Dithiole-3-thione	0.611	0.823	0.748	0.549	0.124	0.014	0.287	0.065	0.738
3-Hydroxy-2H-pyran-2-one	0.011	0.000	0.003	0.065	0.018	0.008	0.008	0.106	0.000
5'-Methylthioadenosine	0.002	0.006	0.304	0.026	0.060	0.486	0.000	0.002	0.015
6-[4-(3-carboxyoxiran-2-yl)-2-methoxyphenoxy]-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	0.059	0.029	0.459	0.125	0.297	0.364	0.004	0.002	0.066
6-[5-(2-([2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-C-hydroxycarbonimidoyl)eth-1-en-1-yl)-2-methoxyphenoxy]-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	0.005	0.018	0.598	0.062	0.828	0.079	0.016	0.020	0.092
7-Hydroxy-3-oxocholanoic acid	0.155	0.171	0.794	0.115	0.297	0.561	0.135	0.063	0.103
8-HETrE	0.000	0.000	0.669	0.061	0.110	0.823	0.007	0.645	0.390
Alpha-CEHC	0.086	0.078	0.605	0.483	0.180	0.267	0.221	0.007	0.672
Cer(d18:0/16:0)	0.226	0.849	0.149	0.400	0.321	0.192	0.594	0.830	0.637
Cer(d18:0/17:0)	0.016	0.032	0.691	0.088	0.856	0.088	0.907	0.940	0.133
Ceriporic acid C	0.463	0.160	0.475	0.358	0.167	0.447	0.211	0.196	0.263
Cervonyl carnitine	0.358	0.219	0.486	0.007	0.070	0.566	0.007	0.382	0.291
Dehydrochorismic acid	0.097	0.204	0.513	0.499	0.022	0.155	0.091	0.515	0.076
Dehydrophytosphingosine	0.426	0.104	0.160	0.057	0.021	0.054	0.000	0.000	0.020
Ethyl acornitate	0.062	0.348	0.304	0.949	0.030	0.037	0.040	0.326	0.537
Ethyl oleate	0.155	0.427	0.552	0.205	0.473	0.060	0.217	0.133	0.444
Glycerol 1-(9Z-octadecenoate) 2-tetradecanoate 3-phosphate	0.995	0.327	0.311	0.879	0.968	0.826	0.271	0.121	0.890
hexadecaspheinganine(1+)	0.341	0.107	0.205	0.756	0.397	0.301	0.054	0.038	0.878
hexadecyl (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate	0.039	0.051	0.735	0.960	0.654	0.661	0.348	0.149	0.288
Histidinyl-Glutamate	0.523	0.213	0.444	0.478	0.561	0.372	0.009	0.556	0.878
Isoacitrein	0.495	0.111	0.047	0.227	0.362	0.880	0.514	0.228	0.493
Kaempferol-4'-methyl ether	0.016	0.004	0.117	0.119	0.636	0.166	0.008	0.075	0.321
LysoPC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	0.781	0.408	0.455	0.031	0.044	0.253	0.119	0.016	0.093
Menthol-glucuronide	0.060	0.075	0.991	0.005	0.000	0.312	0.067	0.006	0.000
MG(0:0/16:0/0:0)	0.136	0.214	0.490	0.991	0.476	0.405	0.230	0.206	0.423
N,N-Dimethylglycine	0.190	0.739	0.010	0.071	0.858	0.320	0.670	0.002	0.477
N,N-dimethyl-Safingol	0.710	0.047	0.032	0.592	0.022	0.029	0.006	0.001	0.023
N-a-Acetyl-L-arginine	0.201	0.205	0.879	0.012	0.063	0.287	0.102	0.014	0.166
N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate	0.063	0.041	0.651	0.119	0.141	0.702	0.033	0.188	0.031
N-Acetylneuraminic acid	0.009	0.025	0.411	0.338	0.089	0.415	0.054	0.549	0.627
N-Decanoylglycine	0.606	0.196	0.395	0.675	0.167	0.745	0.232	0.418	0.574
N-Hexadecanoylpyrrolidine	0.082	0.709	0.105	0.888	0.044	0.068	0.131	0.142	0.019

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
Nonadeca-10(Z)-enoic acid	0.098	0.157	0.150	0.347	0.361	0.567	0.361	0.880	0.157
N-tryptophanyl-35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol	0.008	0.010	0.152	0.581	0.226	0.171	0.016	0.049	0.652
N-Undecanoylglycine	0.347	0.326	0.897	0.677	0.197	0.768	0.156	0.559	0.396
Nutriacholic acid	0.181	0.423	0.320	0.141	0.467	0.340	0.089	0.034	0.016
O-methoxycatechol-O-sulphate	0.004	0.016	0.305	0.000	0.014	0.048	0.000	0.009	0.003
PA(16:1(9Z)/16:0)	0.414	0.386	0.075	0.281	0.945	0.447	0.858	0.069	0.403
PA(18:0/14:1(9Z))	0.253	0.324	0.016	0.542	0.585	0.979	0.706	0.157	0.445
Penicilloic acid	0.333	0.451	0.741	0.770	0.364	0.301	0.525	0.429	0.478
PI(17:2(9Z,12Z)/0:0)	0.022	0.260	0.010	0.088	0.600	0.922	0.448	0.005	0.547
PI(19:0/18-HETE)	0.007	0.056	0.266	0.658	0.031	0.024	0.079	0.751	0.022
Sedoheptulose 7-phosphate	0.168	0.122	0.223	0.397	0.083	0.055	0.720	0.070	0.103
Stearoylcarnitine	0.293	0.613	0.272	0.435	0.953	0.297	0.525	0.893	0.840
Taurine	0.000	0.009	0.001	0.647	0.902	0.746	0.017	0.437	0.205
Trans-Hexa-dec-2-enoic acid	0.071	0.057	0.877	0.967	0.529	0.664	0.117	0.648	0.843
Trichostatin A	0.742	0.352	0.425	0.399	0.045	0.103	0.030	0.088	0.177
Tridecanoylglycine	0.843	0.335	0.336	0.068	0.027	0.356	0.335	0.341	0.029
Uridine 5'-monophosphate	0.269	0.162	0.968	0.963	0.358	0.299	0.488	0.095	0.357
(24E)-15alpha-Acetoxy-3alpha-hydroxy-23-oxo-7,9(11),24-lanostatrien-26-oic acid	0.976	0.070	0.009	0.233	0.239	0.921	0.008	0.000	0.020
(2E)-1-[3-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-2,4,6-trihydroxyphenyl]-3-phenylprop-2-en-1-one	0.455	0.083	0.624	0.302	0.241	0.172	0.002	0.045	0.441
(3beta,5alpha,9alpha,14alpha,22E,24R)-3,5,9,14-Tetrahydroxyergosta-7,22-dien-6-one	0.163	0.062	0.465	0.407	0.148	0.331	0.056	0.270	0.023
(4E,8E,10E-d18:3)sphingosine	0.746	0.025	0.220	0.271	0.258	0.924	0.169	0.177	0.457
(9Z)-12,13-Dihydroxyoctadec-9-enoic acid	0.062	0.042	0.000	0.363	0.498	0.115	0.024	0.000	0.196
(9Z,12Z,15Z)-3-hydroxyoctadecatrienoylcarnitine	0.258	0.718	0.594	0.884	1.000	0.860	0.595	0.827	0.827
(E)-4-Oxo-2-hexen-1-al	0.354	0.298	0.153	0.593	0.764	0.745	0.342	0.035	0.579
(R)-5-Hydroxy-2,4-dimethoxydalbergiquinol	0.360	0.093	0.418	0.084	0.027	0.222	0.017	0.910	0.118
(Z)-13-Octadecenoic acid	0.002	0.913	0.200	0.199	0.578	0.999	0.063	0.011	0.898
(Z)-But-1-ene-1,2,4-tricarboxylate	0.118	0.111	0.786	0.066	0.115	0.303	0.950	0.000	0.000
1-(4-methoxyphenyl)-4-methylpenta-1,4-dien-3-one	0.582	0.665	0.441	0.752	0.110	0.047	0.384	0.747	0.644
1-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)-sn-glycero-3-phosphate	0.159	0.043	0.685	0.292	0.223	0.441	0.339	0.724	0.427
1-(Malonylamino)cyclopropanecarboxylic acid	0.114	0.128	0.633	0.066	0.129	0.270	0.945	0.000	0.000
10-propyl-5,9-tridecadien-1-ol	0.234	0.130	0.908	0.124	0.392	0.022	0.319	0.052	0.572
10Z-Heptadecenoic acid	0.414	0.545	0.587	0.996	0.674	0.689	0.340	0.566	0.724

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	5FU CIS	CIS
11-Hydroxyeicosatetraenoate glyceryl ester	0.103	0.021	0.694	0.077	0.231	0.422	0.292	0.035	0.010
12-HETE-G	0.849	0.570	0.628	0.028	0.733	0.005	0.988	0.009	0.652
13-Hydroxyabscisic acid	0.006	0.005	0.864	0.953	0.394	0.362	0.000	0.565	0.919
13-Oxo-9,11-tridecadienoic acid	0.439	0.307	0.015	0.379	0.486	0.836	0.061	0.004	0.281
17-phenyl-trinor-PGF2alpha amide	0.770	0.715	0.600	0.349	0.428	0.044	0.060	0.022	0.367
18-Oxocortisol	0.549	0.617	0.855	0.415	0.284	0.972	0.410	0.554	0.550
18-oxo-nonadecanoic acid	0.685	0.001	0.025	0.007	0.125	0.687	0.000	0.324	0.427
1-deoxytetradecasphinganine	0.348	0.518	0.468	0.317	0.564	0.589	0.356	0.310	0.254
1-Methylbutyl butanoate	0.020	0.882	0.033	0.410	0.266	0.300	0.322	0.014	0.317
1-Octen-3-yl primeveroside	0.877	0.103	0.130	0.510	0.083	0.167	0.616	0.266	0.462
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)	0.057	0.115	0.443	0.145	0.781	0.169	0.298	0.000	0.003
1-Pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate	0.438	0.555	0.664	0.080	0.658	0.297	0.582	0.008	0.090
2-(1,2-dihydroxypropan-2-yl)-6-(2-methylbut-3-en-2-yl)-2H,3H,7H-furo[3,2-g]chromen-7-one	0.117	0.643	0.282	0.999	0.852	0.667	0.921	0.130	0.919
2-(acetylamino)-1,5-anhydro-2-deoxy-3-O-b-D-galactopyranosyl-D-arabino-Hex-1-enitol	0.040	0.043	0.386	0.362	0.903	0.553	0.001	0.106	0.185
2,3-Diaminopropionic acid	0.015	0.039	0.302	0.534	0.107	0.277	0.101	0.072	0.002
2,5-Dihydro-2,4,5-trimethyloxazole	0.813	0.617	0.449	0.733	0.667	0.423	0.290	0.245	0.154
24-Oxo-1alpha,23,25-trihydroxyvitamin D3	0.649	0.521	0.424	0.761	0.678	0.848	0.985	0.866	0.431
2-Carboxy-5,7-dimethyl-4-octanolide	0.128	0.165	0.525	0.148	0.166	0.851	0.229	0.215	0.619
2-deoxy-20-hydroxyecdysone 22-phosphate	0.813	0.450	0.376	0.832	0.707	0.867	0.380	0.405	0.058
2-Octenedioic acid	0.835	0.348	0.525	0.538	0.188	0.072	0.255	0.220	0.297
2'-O-Methylcajanone	0.049	0.128	0.187	0.674	0.934	0.608	0.089	0.670	0.276
2-Oxo-4-methylthiobutanoic acid	0.928	0.635	0.724	0.252	0.167	0.896	0.072	0.022	0.060
3,4-Methylenedioxybenzoic acid	0.561	0.125	0.003	0.222	0.280	0.938	0.177	0.001	0.446
3-(3-[(3,3-dimethyloxiran-2-yl)methyl]-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid	0.470	0.382	0.600	0.026	0.012	0.859	0.370	0.063	0.027
35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol	0.109	0.103	0.657	0.046	0.023	0.609	0.099	0.045	0.014
3-carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid	0.770	0.578	0.746	0.936	0.107	0.137	0.805	0.863	0.552
3-Dehydrosphinganine	0.010	0.129	0.081	0.051	0.555	0.131	0.054	0.167	0.133
3-Deoxyvitamin D3	0.119	0.045	0.434	0.033	0.238	0.178	0.028	0.152	0.013
3-Hydroxy-6,8-dimethoxy-7(11)-eremophilin-12,8-olide	0.744	0.841	0.868	0.584	0.682	0.331	0.612	0.526	0.272
3-Hydroxy-9-hexadecenoylcarnitine	0.156	0.600	0.371	0.014	0.004	0.324	0.909	0.006	0.015
3-Hydroxydodecanedioic acid	0.450	0.345	0.888	0.396	0.354	0.923	0.338	0.679	0.442
3-Hydroxysintaxanthin	0.092	0.028	0.857	0.836	0.756	0.869	0.058	0.610	0.577
3-Methyl-4-phenyl-3-buten-2-one	0.905	0.901	0.870	0.354	0.430	0.719	0.233	0.107	0.265

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
3-Methylhistidine	0.170	0.555	0.775	0.437	0.030	0.966	0.289	0.534	0.040
3-oxo-heneicosanoic acid	0.737	0.685	0.963	0.343	0.343	0.593	0.313	0.569	0.712
3-Oxohexadecanoic acid	0.058	0.297	0.665	0.353	0.038	0.249	0.017	0.960	0.478
3-oxo-nonadecanoic acid	0.603	0.053	0.030	0.024	0.068	0.455	0.036	0.845	0.078
4,5-Dihydroorotic acid	0.177	0.087	0.042	0.867	0.758	0.626	0.452	0.178	0.851
4-Acetylzearalenone	0.289	0.015	0.549	0.139	0.017	0.106	0.013	0.849	0.021
4-Hydroxybenzoic acid	0.028	0.075	0.170	0.113	0.292	0.192	0.850	0.000	0.000
5-Acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole	0.307	0.749	0.434	0.173	0.370	0.737	0.961	0.346	0.394
5-Aminopentanoic acid	0.473	0.601	0.154	0.440	0.403	0.896	0.014	0.020	0.067
5-hydroperoxy-7-[3,5-epidioxy-2-(2-octenyl)-cyclopentyl]-6-heptenoic acid	0.255	0.176	0.809	0.445	0.632	0.354	0.500	0.170	0.828
5S-HETE di-endoperoxide	0.043	0.631	0.019	0.162	0.330	0.783	0.716	0.199	0.096
6-O-Desmethyl-mycophenolic acid	0.451	0.337	0.850	0.681	0.041	0.113	0.255	0.026	0.296
Adenine	0.003	0.147	0.598	0.061	0.005	0.780	0.090	0.149	0.061
all-trans-7-hydroxyhexadeca-2,4,8,10-tetraenoic acid	0.481	0.873	0.286	0.604	0.778	0.867	0.200	0.014	0.104
alpha-Tocopherol succinate	0.212	0.061	0.000	0.607	0.007	0.151	0.069	0.142	0.000
Aminocaproic acid	0.375	0.033	0.140	0.253	0.266	0.325	0.000	0.827	0.100
Arachidonoyl Serinol	0.294	0.905	0.551	0.177	0.498	0.400	0.794	0.372	0.406
Avocadyne 4-acetate	0.473	0.343	0.274	0.828	0.336	0.301	0.353	0.639	0.142
C17 Sphinganine	0.596	0.860	0.451	0.401	0.476	0.888	0.306	0.373	0.743
Calcitroic acid	0.306	0.658	0.426	0.987	0.611	0.379	0.973	0.253	0.197
Caproic acid	0.863	0.844	0.905	0.306	0.233	0.683	0.317	0.361	0.678
Ceramide (d18:1/12:0)	0.513	0.387	0.993	0.536	0.756	0.743	0.535	0.484	0.427
DAG 15:0e	0.773	0.996	0.764	0.301	0.532	0.603	0.230	0.543	0.452
DAG 18:0e	0.451	0.902	0.644	0.577	0.939	0.573	0.121	0.086	0.363
DAG 30:4	0.095	0.820	0.408	0.206	0.285	0.620	0.001	0.402	0.292
DAG 32:8e	0.816	0.862	0.716	0.239	0.099	0.480	0.973	0.435	0.116
D-Alanyl-D-alanine	0.348	0.708	0.340	0.950	0.266	0.266	0.546	0.315	0.385
Dehydroepiandrosterone sulfate	0.467	0.400	0.311	0.056	0.004	0.280	0.370	0.098	0.032
Dihydro-5-(2-octenyl)-2(3H)-furanone	0.261	0.726	0.306	0.843	0.778	0.923	0.518	0.042	0.151
Dihydro-5-methyl-2(3H)-thiophenone	0.161	0.197	0.670	0.064	0.112	0.365	0.846	0.001	0.001
Epsilon-caprolactam	0.607	0.191	0.520	0.764	0.628	0.414	0.713	0.240	0.181
FA 10:0	0.003	0.137	0.064	0.411	0.155	0.411	0.646	0.041	0.501
FA 12:0	0.061	0.323	0.251	0.809	0.700	0.847	0.734	0.103	0.663
FA 16:0	0.295	0.470	0.881	0.693	0.260	0.543	0.568	0.959	0.393
FA 16:4	0.048	0.151	0.051	0.932	0.285	0.207	0.861	0.005	0.013
FAHFA 22:4/4:0	0.003	0.072	0.043	0.983	0.708	0.660	0.485	0.017	0.179
Glucosylceramide (d18:1/12:0)	0.158	0.183	0.275	0.004	0.783	0.034	0.499	0.096	0.279
Glutamylhistidine	0.070	0.046	0.938	0.566	0.297	0.508	0.020	0.291	0.702

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
Glycocholic acid	0.220	0.020	0.238	0.915	0.855	0.820	0.015	0.351	0.565
Hexacosanedioate(2-)	0.499	0.343	0.293	0.645	0.284	0.214	0.300	0.003	0.826
Hydroxypropyl-Alanine	0.377	0.630	0.350	0.069	0.051	0.762	0.263	0.725	0.445
Isovalerylglucuronide	0.291	0.026	0.381	0.544	0.692	0.332	0.019	0.065	0.929
L-Isoleucine	0.047	0.962	0.070	0.598	0.851	0.534	0.204	0.357	0.240
LPC 18:0	0.448	0.903	0.449	0.344	0.178	0.831	0.998	0.263	0.172
LPC 26:1-SN1	0.803	0.145	0.024	0.101	0.843	0.102	0.770	0.039	0.061
LPC 36:4-SN2	0.931	0.626	0.665	0.623	0.431	0.251	0.170	0.292	0.144
LPE 26:6	0.002	0.003	0.138	0.036	0.114	0.636	0.064	0.566	0.260
L-Phenylalanine	0.411	0.975	0.307	0.420	0.511	0.166	0.671	0.580	0.842
LysoPC(16:0)	0.126	0.043	0.496	0.978	0.292	0.242	0.006	0.126	0.761
LysoPC(16:1(9Z))	0.242	0.285	0.470	0.993	0.544	0.321	0.462	0.162	0.819
LysoPC(18:1(11Z))	0.178	0.105	0.858	0.199	0.661	0.322	0.371	0.237	0.763
MAG 15:0	0.562	0.409	0.961	0.272	0.271	0.830	0.223	0.609	0.535
MAG 18:0	0.134	0.398	0.425	0.573	0.993	0.500	0.727	0.130	0.577
MAG 20:1	0.449	0.766	0.457	0.242	0.461	0.372	0.272	0.415	0.409
Methyl 2-thiofuroate	0.190	0.051	0.001	0.951	0.956	0.997	0.022	0.000	0.519
Methylglutaric acid	0.404	0.617	0.013	0.912	0.350	0.414	0.807	0.131	0.722
Methyl-S-Cysteinylglycine	0.911	0.028	0.096	0.248	0.481	0.574	0.917	0.381	0.114
MG(0:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	0.030	0.287	0.272	0.160	0.364	0.801	0.891	0.572	0.780
MG(18:0/0:0/0:0)	0.076	0.636	0.204	0.782	0.800	0.601	0.829	0.078	0.393
MG(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0/0:0)	0.450	0.265	0.761	0.213	0.267	0.714	0.858	0.097	0.061
MG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0/0:0)	0.315	0.195	0.827	0.534	0.551	0.721	0.128	0.423	0.908
Mycophenolic acid	0.533	0.346	0.113	0.950	0.335	0.348	0.353	0.190	0.215
Myristic acid	0.005	0.084	0.050	0.678	0.931	0.780	0.758	0.027	0.357
N-(2-phenoxy-ethyl) arachidonoyl amine	0.139	0.045	0.599	0.813	0.393	0.239	0.007	0.142	0.910
N-(octadecanoyl)hexadecaspingosine-1-phosphocholine	0.028	0.023	0.123	0.859	0.530	0.584	0.211	0.042	0.026
N,N,O-Tridesmethyl-tramadol	0.686	0.481	0.090	0.630	0.501	0.898	0.728	0.451	0.629
N-Acetyl-b-glucosaminylamine	0.843	0.146	0.109	0.473	0.589	0.907	0.740	0.447	0.351
N-Acetylserotonin	0.112	0.021	0.455	0.186	0.961	0.199	0.035	0.085	0.838
Neuromedin B (1-3)	0.074	0.290	0.313	0.387	0.305	0.672	0.261	0.050	0.352
PA 18:0	0.009	0.068	0.068	0.831	0.023	0.029	0.021	0.994	0.016
PA 38:6; PA 18:1-20:5; [M-H]-	0.241	0.341	0.717	0.230	0.290	0.672	0.341	0.432	0.328
PA 40:7; PA 18:1-22:6; [M-H]-	0.265	0.981	0.266	0.474	0.766	0.392	0.499	0.685	0.635
PA(18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.974	0.455	0.527	0.172	0.265	0.677	0.617	0.347	0.226
PA(22:2(13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.024	0.024	0.205	0.082	0.003	0.089	0.018	0.085	0.004
PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.407	0.236	0.902	0.134	0.369	0.466	0.482	0.172	0.198

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
PA(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:4 (7Z,10Z,13Z,16Z))	0.848	0.239	0.328	0.337	0.316	0.924	0.653	0.560	0.244
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/1 8:0)	0.000	0.003	0.012	0.892	0.603	0.739	0.013	0.089	0.388
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/2 0:0)	0.482	0.349	0.788	0.010	0.010	0.143	0.418	0.005	0.007
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/2 0:1(11Z))	0.000	0.003	0.208	0.153	0.267	0.969	0.011	0.016	0.181
Palmitic acid	0.412	0.394	0.187	0.523	0.082	0.150	0.403	0.250	0.098
PC 28:0	0.054	0.566	0.110	0.324	0.745	0.030	0.308	0.002	0.022
PC 31:0e	0.603	0.441	0.824	0.341	0.341	0.560	0.384	0.062	0.070
PC 32:2e	0.026	0.132	0.177	0.287	0.155	0.014	0.125	0.068	0.202
PC 34:2	0.829	0.525	0.167	0.421	0.352	0.766	0.199	0.024	0.189
PC 38:5	0.887	0.515	0.177	0.408	0.226	0.780	0.033	0.123	0.444
PC 39:7e	0.397	0.491	0.447	0.875	0.779	0.735	0.135	0.392	0.004
PC 44:9	0.444	0.191	0.154	0.122	0.122	0.560	0.683	0.083	0.201
PE(18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,1 9Z))	0.202	0.711	0.679	0.510	0.527	0.296	0.016	0.768	0.088
PE(20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,1 9Z))	0.133	0.124	0.893	0.465	0.819	0.702	0.139	0.643	0.953
PE(20:1(11Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,1 6Z,19Z))	0.545	0.959	0.669	0.866	0.812	0.937	0.059	0.074	0.146
PE(22:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,1 9Z))	0.337	0.057	0.009	0.900	0.890	0.977	0.249	0.027	0.369
PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/1 8:0)	0.317	0.337	0.112	0.896	0.007	0.049	0.144	0.624	0.000
PE-Cer(d16:1(4E)/20:0)	0.003	0.574	0.019	0.668	0.384	0.193	0.282	0.420	0.888
Pentadecanoic acid	0.028	0.061	0.149	0.968	0.526	0.500	0.275	0.069	0.948
PG 34:0	0.040	0.064	0.254	0.270	0.567	0.011	0.483	0.037	0.004
Phytosphingosine 18:0	0.061	0.025	0.731	0.187	0.015	0.186	0.007	0.820	0.058
PI(17:1(9Z)/16:1(9Z))	0.062	0.690	0.067	0.355	0.227	0.976	0.286	0.988	0.142
PI(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/15 :1(9Z))	0.004	0.175	0.122	0.256	0.256	0.560	0.438	0.000	0.013
Salsoline-1-carboxylate	0.906	0.632	0.524	0.805	0.001	0.002	0.487	0.495	0.383
SM d33:1	0.380	0.273	0.935	0.351	0.236	0.669	0.269	0.859	0.330
SM d34:1	0.521	0.262	0.099	0.986	0.912	0.923	0.237	0.146	0.750
SM d34:2	0.200	0.224	0.594	0.114	0.368	0.049	0.022	0.099	0.452
Stearic acid	0.376	0.005	0.483	0.145	0.036	0.366	0.010	0.884	0.028
Uridine 2',3'-cyclic phosphate	0.130	0.755	0.117	0.191	0.766	0.377	0.444	0.364	0.428
1-hexadecanol	0.299	0.204	0.769	0.355	0.840	0.359	0.349	0.351	0.526
1-methyl nicotinamide	0.025	0.004	0.128	0.020	0.009	0.000	0.021	0.001	0.003
2,3-dimethylsuccinic acid	0.765	0.505	0.099	0.147	0.027	0.329	0.076	0.080	0.510
2-amino-1-phenylethanol	0.177	0.253	0.008	0.932	0.011	0.083	0.457	0.699	0.000
2-butyne-1,4-diol	0.577	0.406	0.277	0.400	0.458	0.682	0.642	0.403	0.884
2-hydroxybutyric acid	0.002	0.002	0.635	0.000	0.364	0.004	0.004	0.000	0.555
2-hydroxypyridine	0.948	0.416	0.139	0.172	0.996	0.145	0.277	0.944	0.586

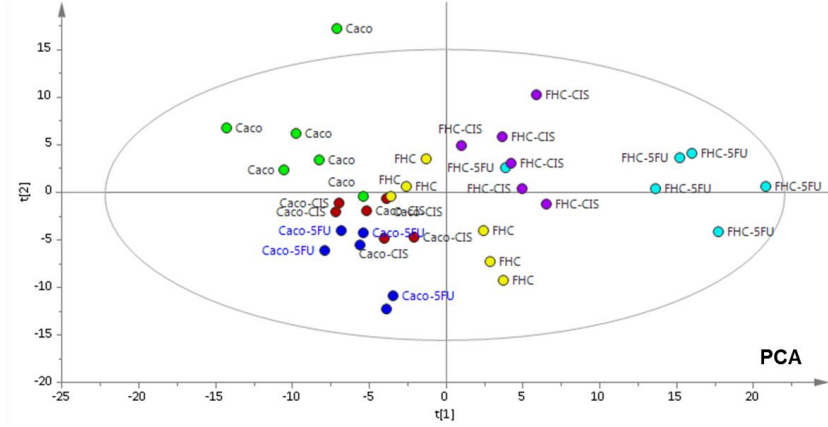
	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
2-ketoisocaproic acid	0.506	0.064	0.031	0.025	0.747	0.030	0.329	0.043	0.011
2-keto-l-gulonic acid	0.304	0.533	0.631	0.001	0.054	0.160	0.021	0.011	0.626
2-phosphoglyceric acid	0.112	0.011	0.717	0.063	0.048	0.000	0.593	0.063	0.002
3-hexenedioic acid	0.379	0.272	0.097	0.000	0.746	0.192	0.068	0.875	0.538
3-indolelactic acid	0.151	0.004	0.100	0.000	0.489	0.013	0.068	0.000	0.667
3-methyl-2-oxobutanoic acid	0.495	0.292	0.037	0.139	0.230	0.413	0.536	0.106	0.547
3-phenyllactic acid	0.059	0.054	0.309	0.000	0.559	0.001	0.004	0.000	0.401
3-phosphoglyceric acid	0.078	0.047	0.609	0.012	0.247	0.006	0.006	0.006	0.146
4-guanidinobutyric acid	0.155	0.000	0.000	0.124	0.165	0.016	0.001	0.000	0.031
4-hydroxy-L-proline	0.023	0.054	0.238	0.027	0.089	0.089	0.030	0.024	0.008
4-hydroxyphenylacetic acid	0.452	0.469	0.264	0.840	0.911	0.973	0.000	0.000	0.158
5-hydroxy-L-tryptophan	0.110	0.029	0.773	0.081	0.051	0.656	0.000	0.967	0.468
Alanine	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.226	0.036	0.000	0.000
Allo-inositol	0.956	0.558	0.455	0.078	0.131	0.002	0.851	0.046	0.367
Alpha ketoglutaric acid	0.004	0.008	0.612	0.001	0.229	0.006	0.660	0.004	0.916
Alpha-glucosamine phosphate	0.031	0.139	0.371	0.061	0.057	0.008	0.000	0.025	0.001
Arachidic acid	0.325	0.176	0.584	0.197	0.248	0.387	0.187	0.266	0.244
Aspartic acid	0.009	0.168	0.038	0.693	0.273	0.118	0.012	0.026	0.000
Benzoic acid	0.939	0.949	0.825	0.042	0.040	0.431	0.549	0.169	0.214
Beta-alanine	0.819	0.034	0.021	0.000	0.361	0.000	0.001	0.000	0.000
Beta-glycerolphosphate	0.000	0.000	0.007	0.001	0.029	0.002	0.009	0.634	0.052
Capric acid	0.388	0.800	0.209	0.043	0.185	0.139	0.930	0.248	0.276
Caprylic acid	0.495	0.501	0.956	0.010	0.036	0.193	0.901	0.057	0.572
Cholesterol	0.885	0.369	0.359	0.038	0.213	0.731	0.273	0.073	0.933
Cis-aconitic acid	0.284	0.046	0.804	0.000	0.596	0.000	0.001	0.000	0.000
Citraconic acid	0.316	0.611	0.266	0.136	0.360	0.041	0.061	0.921	0.013
Citric acid	0.072	0.000	0.825	0.000	0.791	0.000	0.001	0.000	0.000
Creatinine	0.000	0.056	0.001	0.005	0.444	0.012	0.003	0.000	0.001
Cytidine	0.000	0.001	0.114	0.013	0.067	0.125	0.000	0.001	0.000
Cytidine-5-monophosphate	0.544	0.710	0.689	0.001	0.246	0.002	0.001	0.000	0.000
Dihydroxyacetone phosphate	0.011	0.132	0.037	0.051	0.171	0.007	0.354	0.145	0.047
Fumaric acid	0.315	0.000	0.346	0.001	0.215	0.014	0.006	0.781	0.021
Galacturonic acid	0.151	0.159	0.921	0.001	0.219	0.018	0.067	0.000	0.002
Glucoheptonic acid	0.000	0.000	0.027	0.021	0.296	0.002	0.001	0.000	0.001
Gluconic acid	0.061	0.406	0.013	0.000	0.001	0.770	0.566	0.000	0.003
Gluconic acid lactone	0.302	0.496	0.665	0.002	0.047	0.179	0.024	0.014	0.560
Glucosaminic acid	0.318	0.464	0.766	0.000	0.000	0.033	0.001	0.000	0.055
Glucose	0.244	0.956	0.124	0.000	0.001	0.038	0.045	0.000	0.009
Glucose-6-phosphate	0.123	0.108	0.532	0.009	0.855	0.009	0.020	0.002	0.002
Glutamic acid	0.002	0.004	0.051	0.010	0.126	0.069	0.000	0.001	0.001
Glutathione reduced	0.061	0.012	0.854	0.953	0.037	0.034	0.000	0.001	0.000
Glyceraldehyde	0.054	0.394	0.399	0.167	0.717	0.016	0.057	0.135	0.339

	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
Glyceraldehyde 3-phosphate	0.742	0.389	0.572	0.009	0.036	0.775	0.627	0.017	0.010
Glyceric acid	0.106	0.092	0.954	0.000	0.050	0.000	0.008	0.035	0.014
Glycerol	0.891	0.307	0.211	0.005	0.623	0.001	0.452	0.141	0.014
Glycerol 1-phosphate	0.000	0.000	0.005	0.001	0.012	0.002	0.000	0.760	0.040
Glycine	0.038	0.038	0.445	0.533	0.200	0.428	0.001	0.007	0.274
Glycolic acid	0.084	0.145	0.002	0.002	0.165	0.389	0.000	0.485	0.045
Heptadecanoic acid	0.119	0.033	0.026	0.172	0.310	0.187	0.382	0.146	0.000
Homoserine 1	0.018	0.957	0.112	0.011	0.522	0.013	0.014	0.004	0.001
Homoserine 2	0.221	0.422	0.287	0.677	0.767	0.584	0.792	0.249	0.060
Hypotaurine	0.198	0.755	0.292	0.022	0.383	0.007	0.051	0.008	0.156
Isoleucine 1	0.173	0.443	0.050	0.720	0.003	0.030	0.000	0.000	0.000
Isoleucine 2	0.886	0.567	0.495	0.144	0.051	0.779	0.001	0.011	0.000
Itaconic acid	0.843	0.787	0.837	0.101	0.224	0.347	0.717	0.168	0.527
Lactamide	0.085	0.780	0.074	0.000	0.406	0.003	0.003	0.012	0.256
Lactic acid	0.141	0.183	0.990	0.014	0.161	0.887	0.001	0.877	0.808
Lactose	0.040	0.272	0.978	0.631	0.278	0.224	0.168	0.200	0.577
Lauric acid	0.470	0.679	0.603	0.019	0.082	0.122	0.903	0.144	0.587
Leucine	0.199	0.381	0.040	0.810	0.003	0.035	0.000	0.000	0.000
Lysine	0.015	0.508	0.003	0.000	0.001	0.175	0.006	0.000	0.846
Lyxose	0.169	0.423	0.537	0.000	0.001	0.008	0.000	0.000	0.807
Lyxosylamine	0.403	0.710	0.455	0.000	0.334	0.000	0.024	0.000	0.000
Malic acid	0.003	0.000	0.485	0.000	0.306	0.009	0.007	0.000	0.026
Malonic acid	0.371	0.111	0.022	0.025	0.873	0.093	0.268	0.003	0.309
Mannitol	0.136	0.023	0.004	0.000	0.426	0.021	0.021	0.000	0.495
Mannose	0.002	0.018	0.132	0.133	0.031	0.415	0.003	0.049	0.182
Methionine	0.980	0.361	0.386	0.004	0.416	0.006	0.460	0.066	0.024
Methyl oleate	0.619	0.644	0.972	0.119	0.268	0.716	0.411	0.104	0.388
Methyl palmitate	0.709	0.241	0.219	0.047	0.340	0.029	0.164	0.210	0.441
Methylmalonic acid	0.416	0.365	0.996	0.032	0.152	0.325	0.037	0.175	0.023
Mimosine	0.296	0.526	0.332	0.000	0.114	0.008	0.665	0.000	0.012
Mucic acid	0.015	0.644	0.083	0.000	0.852	0.000	0.013	0.000	0.001
Myo-inositol	0.000	0.000	0.008	0.331	0.107	0.006	0.000	0.000	0.003
N-acetylglucosamine	0.042	0.628	0.003	0.000	0.002	0.018	0.002	0.016	0.544
N-acetylglutamic acid	0.513	0.116	0.118	0.034	0.006	0.089	0.011	0.001	0.001
N-acetylmannosamine	0.417	0.438	0.711	0.051	0.035	0.066	0.000	0.025	0.000
N-methylantranilic acid	0.437	0.204	0.344	0.933	0.637	0.803	0.189	0.506	0.726
Oleic acid	0.010	0.015	0.746	0.380	0.672	0.364	0.002	0.520	0.188
Oxalic acid	0.908	0.412	0.195	0.028	0.446	0.078	0.447	0.097	0.362
Palmitoleic acid	0.362	0.345	0.031	0.672	0.316	0.167	0.849	0.155	0.114
Pantothenic acid	0.001	0.282	0.001	0.800	0.055	0.189	0.697	0.001	0.005
Phenylalanine	0.143	0.454	0.024	0.169	0.236	0.663	0.525	0.002	0.005
Phosphocolamine	0.001	0.000	0.044	0.018	0.001	0.004	0.069	0.524	0.000

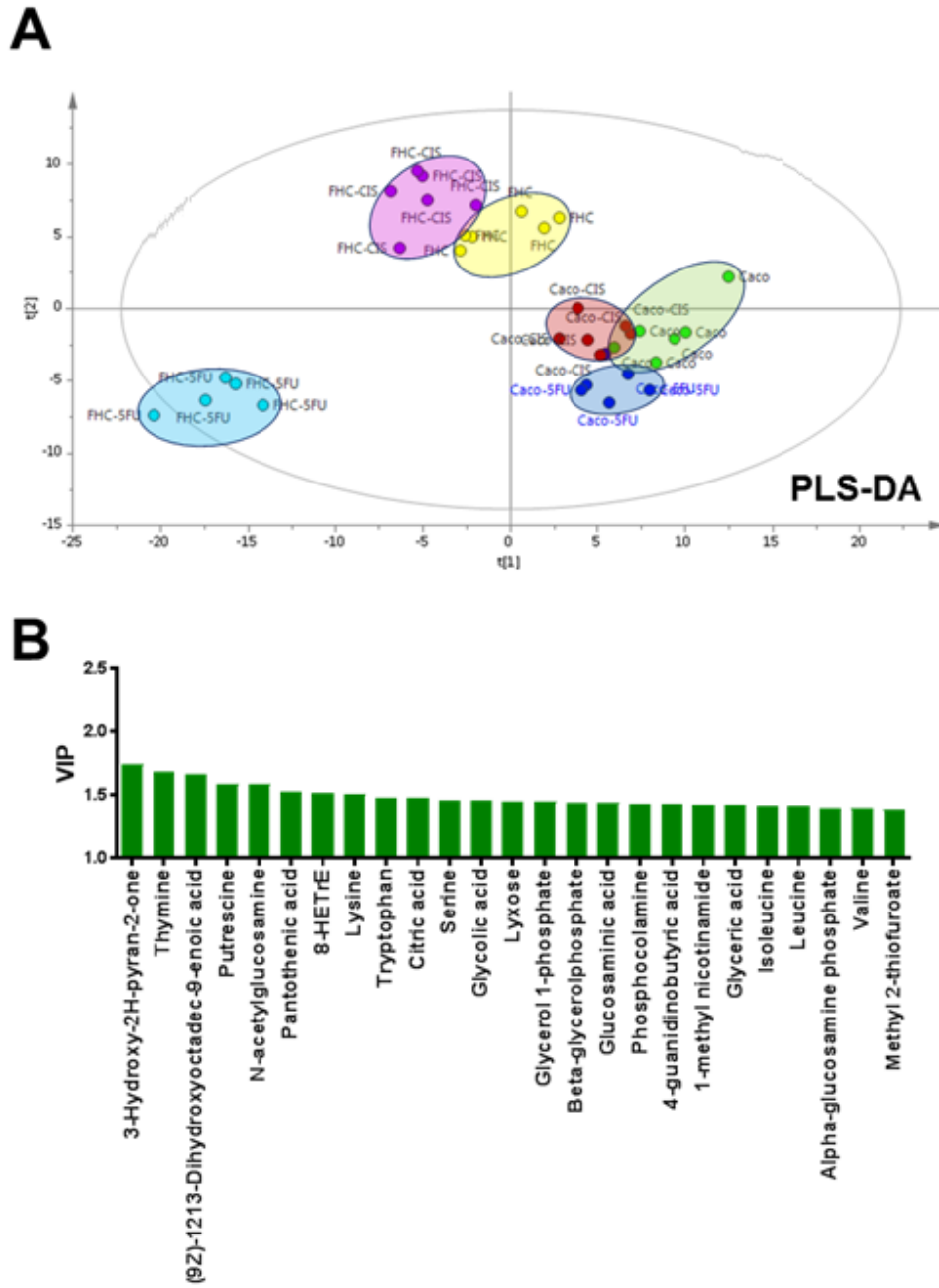
	Caco-2			FHC			Caco-2 / FHC		
	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont. 5FU	Kont. CIS	5FU CIS	Kont.	5FU	CIS
Phosphoglycolic acid	0.674	0.444	0.998	0.000	0.000	0.127	0.001	0.001	0.000
Phosphoric acid	0.269	0.725	0.021	0.000	0.223	0.004	0.121	0.000	0.395
Porphine	0.803	0.557	0.355	0.300	0.934	0.286	0.168	0.715	0.089
Proline	0.209	0.103	0.895	0.006	0.014	0.009	0.002	0.025	0.012
Purine riboside	0.058	0.034	0.391	0.037	0.960	0.038	0.001	0.002	0.001
Putrescine	0.002	0.121	0.000	0.000	0.007	0.226	0.451	0.019	0.213
Pyridoxine	0.286	0.478	0.650	0.002	0.078	0.192	0.025	0.015	0.698
Pyroglutamic acid	0.262	0.000	0.417	0.062	0.013	0.114	0.010	0.000	0.000
Pyrophosphate	0.081	0.958	0.085	0.704	0.421	0.228	0.085	0.366	0.031
Ribitol	0.013	0.268	0.120	0.000	0.705	0.000	0.007	0.000	0.031
Ribonolactone	0.005	0.015	0.388	0.376	0.021	0.057	0.000	0.000	0.001
Ribose-5-phosphate	0.009	0.065	0.070	0.001	0.865	0.001	0.002	0.001	0.041
Ribulose-5-phosphate	0.227	0.235	0.901	0.014	0.845	0.015	0.295	0.005	0.015
Saccharic acid	0.005	0.046	0.177	0.000	0.570	0.000	0.019	0.000	0.000
Serine	0.000	0.092	0.093	0.010	0.002	0.390	0.222	0.966	0.667
Spermidine	0.124	0.101	0.724	0.420	0.260	0.591	0.035	0.446	0.211
Squalene	0.200	0.287	0.706	0.339	0.063	0.347	0.079	0.342	0.582
Succinic acid	0.788	0.601	0.585	0.001	0.115	0.000	0.006	0.000	0.054
Sucrose	0.312	0.526	0.657	0.226	0.035	0.288	0.009	0.185	0.001
Tagatose	0.739	0.793	0.894	0.019	0.188	0.559	0.041	0.177	0.963
Tartaric acid	0.321	0.245	0.467	0.193	0.950	0.192	0.572	0.417	0.194
Threitol	0.340	0.194	0.893	0.070	0.255	0.249	0.247	0.011	0.029
Threonine	0.211	0.028	0.208	0.145	0.687	0.115	0.002	0.003	0.194
Thymine	0.035	0.000	0.000	0.047	0.520	0.326	0.008	0.001	0.134
Trehalose	0.689	0.643	0.827	0.467	0.342	0.344	0.003	0.120	0.339
Tryptophan	0.593	0.203	0.396	0.000	0.001	0.097	0.001	0.521	0.938
Tyrosine	0.677	0.297	0.259	0.081	0.071	0.778	0.009	0.535	0.580
Uracil	0.712	0.384	0.216	0.019	0.053	0.980	0.208	0.001	0.003
Urea	0.969	0.861	0.804	0.247	0.293	0.067	0.966	0.393	0.052
Valine	0.491	0.396	0.068	0.793	0.008	0.024	0.000	0.000	0.000
Xylitol	0.004	0.018	0.050	0.002	0.002	0.000	0.001	0.002	0.188

Caco-2 ve FHC hücreleri için elde edilen metabolomiks (GC-MS ve LC-qTOF-MS) ve lipidomiks veriler birleştirilerek bütünleşik omiks (entegre omiks) verisi elde edilmiş ve bu veri matrisi çok değişkenli veri analizleri ile incelenmiştir. İlk önce bütünleşik omiks verilerine PCA analizleri uygulanmış ve veri setinde herhangi bir sistemik hata veya aykırı bir değer olup olmadığı araştırılmıştır (Şekil 4.10). Aykırı değerler uzaklaştırıldıktan sonra PLS-DA analizleri her iki hücre hattına ait bütünleşik omiks verisinde bir arada ve ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11A-4.13A). PLS-

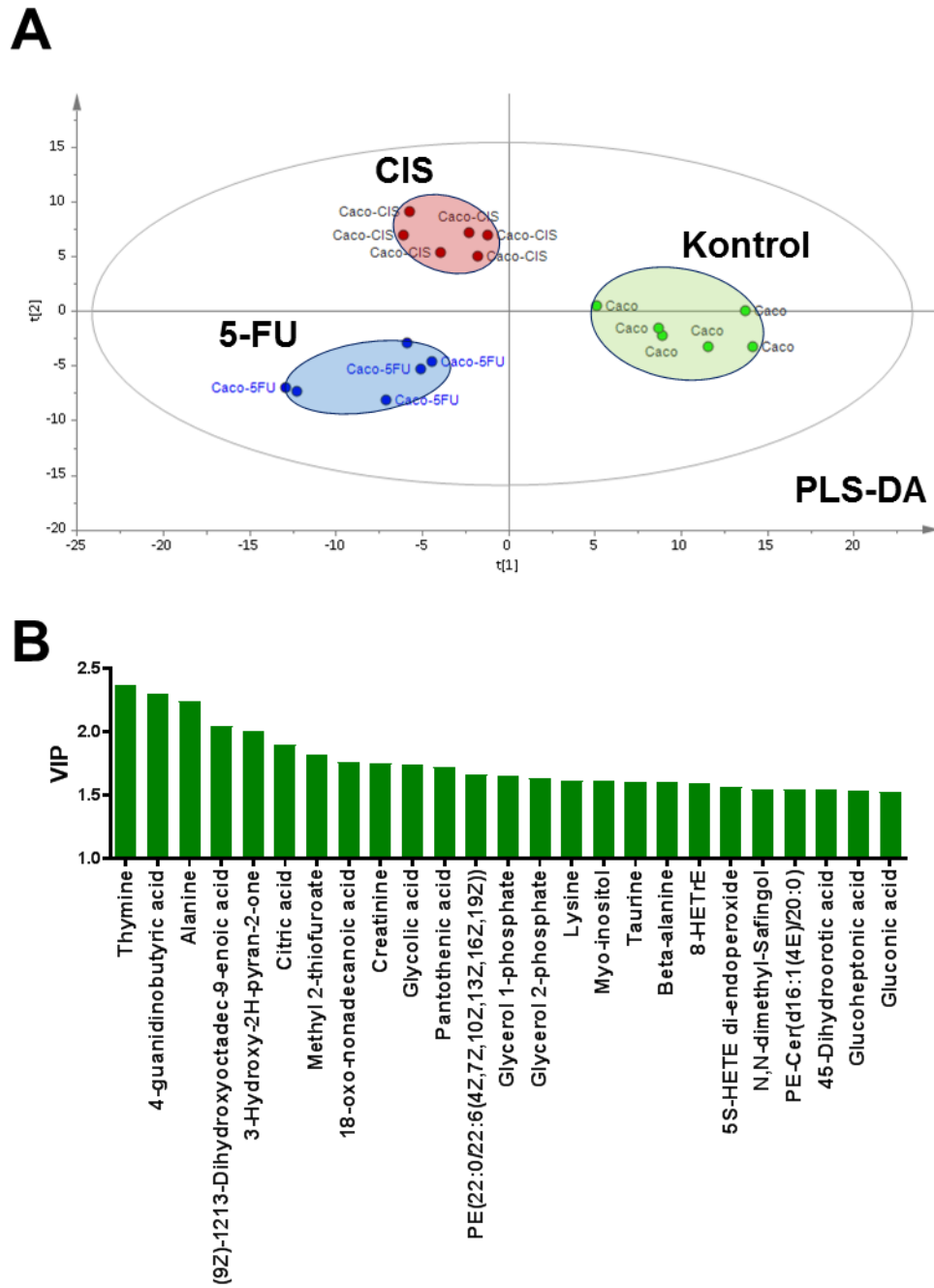
DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.11B- 4.13B). Elde edilen PLS-DA modellerinin güvenilirliği (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerleri ile gösterilmiştir.



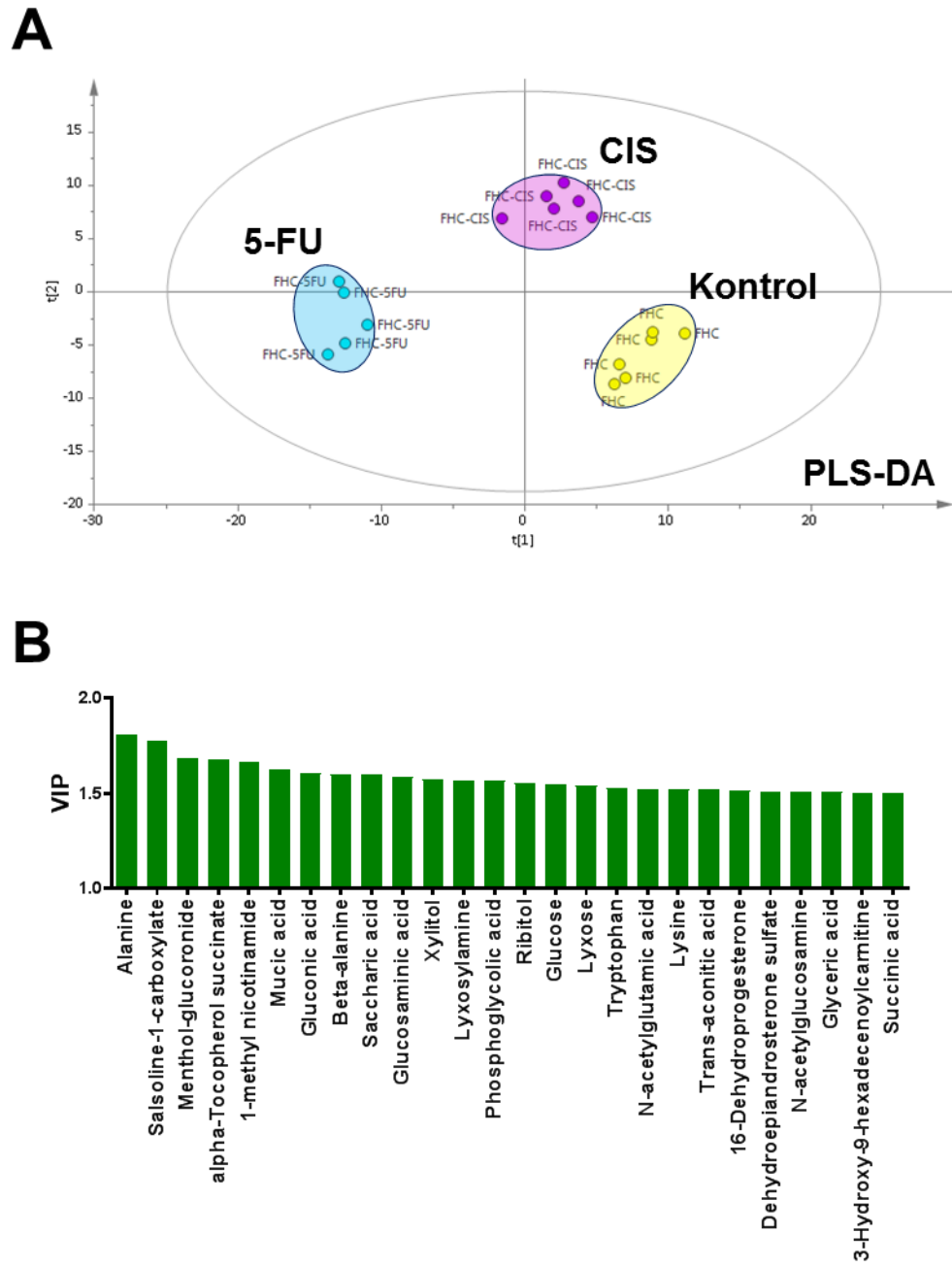
Şekil 4.10. Caco-2 ve FHC hücrelerine ait bütünleşik omik (metabolomik ve lipidomik) verilerine ait PCA skor grafiği.



Şekil 4.11. Caco-2 ve FHC hücrelerinin bütünleşik omik (metabolomik ve lipidomik) verilerine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.96 ve Q^2 :0.73), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.



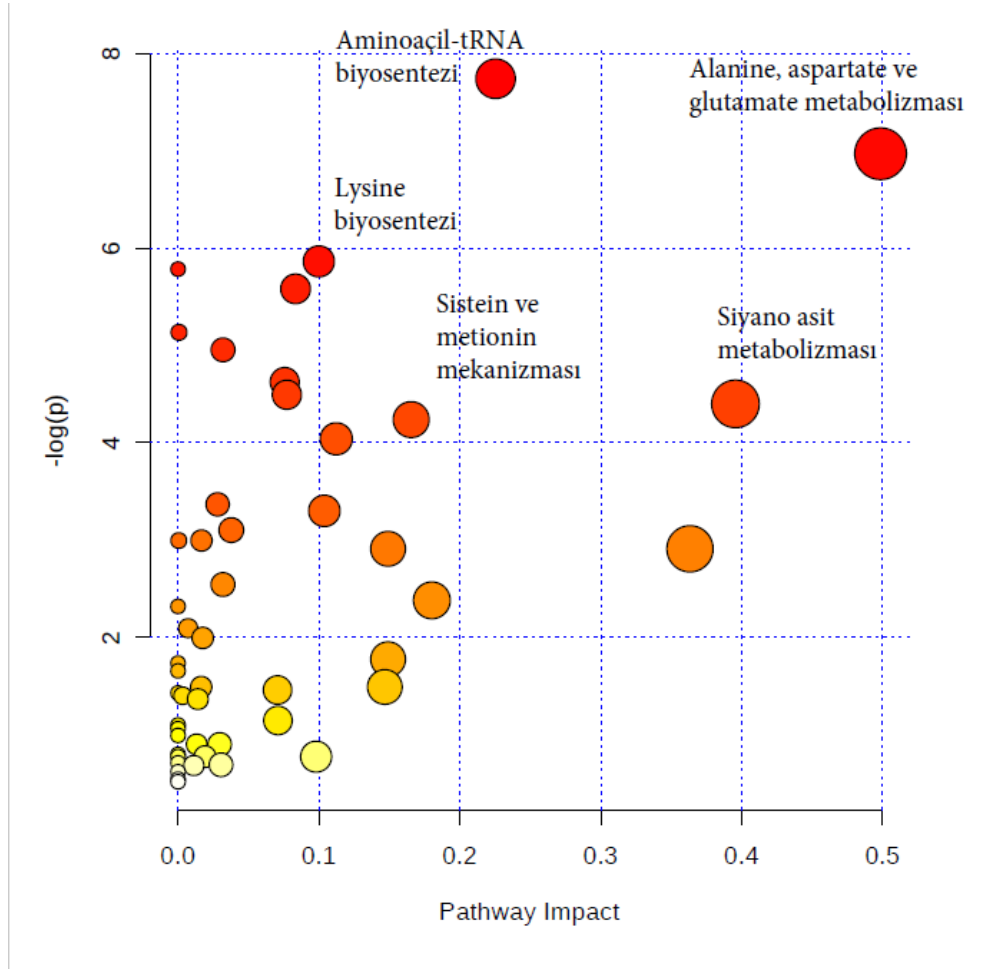
Şekil 4.12. Caco-2 hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen bütünlük omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verisine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.95 ve Q^2 :0.76), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.



Şekil 4.13. FHC hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen bütünleşik omiks (metabolomiks ve lipidomiks) verisine ait çok değişkenli veri analiz. A) PLS-DA skor grafiği (R^2 : 0.99 ve Q^2 :0.87), B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği.

4.5. Yolak Analizleri

Caco-2 ve FHC hücre ile 5-FU ve CIS'e direnç geliştirilen hücre hatları istatistiksel olarak karşılaştırılmış (Tablo 4.7) ve anlamlı değişen metabolitler kullanılarak ($p < 0.05$) yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) gerçekleştirilmiştir. Yolak analizleri sonuçları Şekil 4.14-4.19 ve Tablo 4.8-4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.14. 5-FU direncine bağlı olarak Caco-2'de etkileşen yollar.

Tablo 4.8. 5-FU direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.

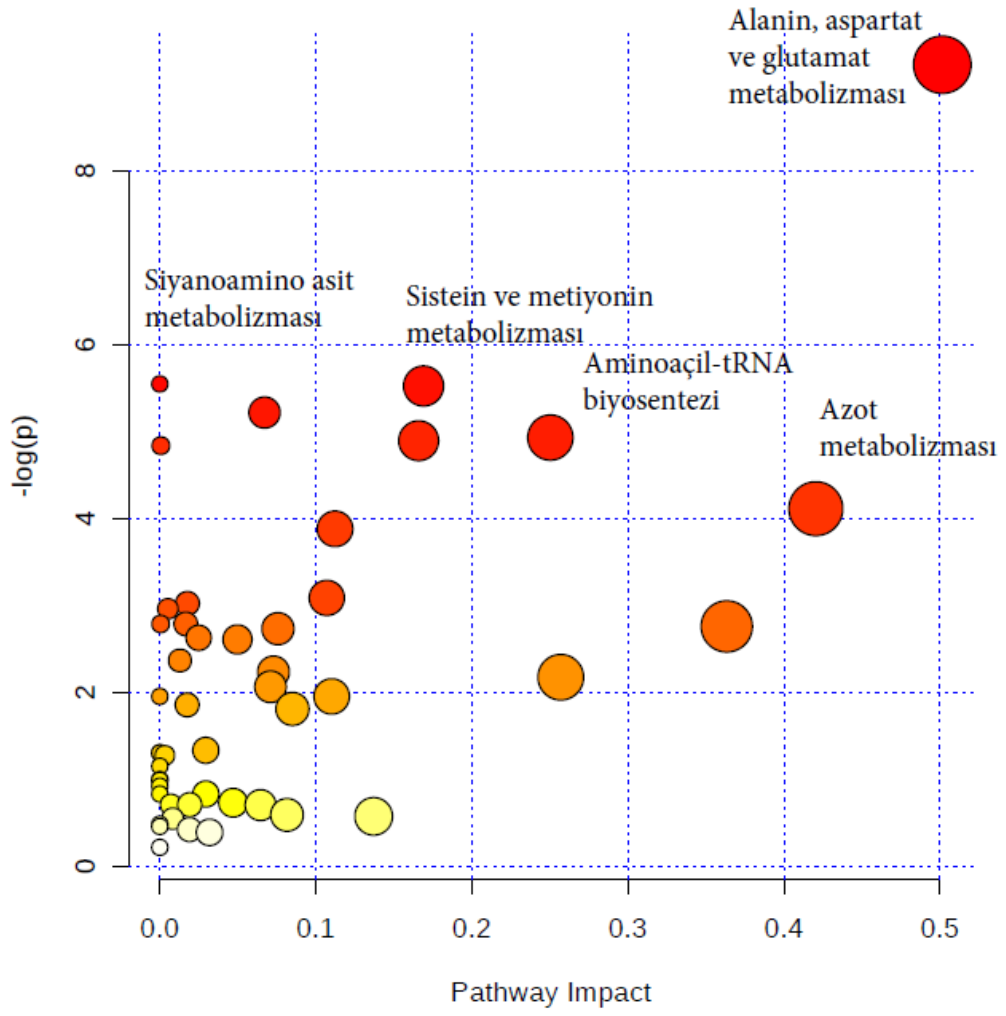
Yolak	Eşleşme Durumu*	p	FDR	Etki
Aminoaçil-tRNA biyosentezi	7/75	0.001	0.016	0.225
Alanine, aspartate ve glutamate metabolizması	4/24	0.001	0.024	0.498
Lysine biyosentezi	4/32	0.001	0.036	0.099
Siyano asit metabolizması	3/16	0.002	0.036	0.000
Sistein ve metionin mekanizması	5/56	0.002	0.036	0.083
Nitrojen metabolizması	4/39	0.003	0.051	0.001
Galaktoz metabolizması	4/41	0.004	0.053	0.031

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

Tablo 4.9. 5-FU direncine bağlı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar.

	Eşleşme Durumu*	Beklenti	p
Malik asit-aspartik asit mekiği	4/10	0.488	0.001
Alanin metabolizması	4/17	0.830	0.008
Amonyak geri dönüşümü	5/32	1.560	0.017
Glikoz-alanin döngüsü	3/13	0.635	0.022
Üre döngüsü	4/29	1.420	0.048
Metiyonin metabolizması	5/43	2.100	0.053

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.



Şekil 4.15. CIS direncine bağlı olarak Caco-2’de etkileşen yollar.

Tablo 4.10. CIS direncine bağılı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.

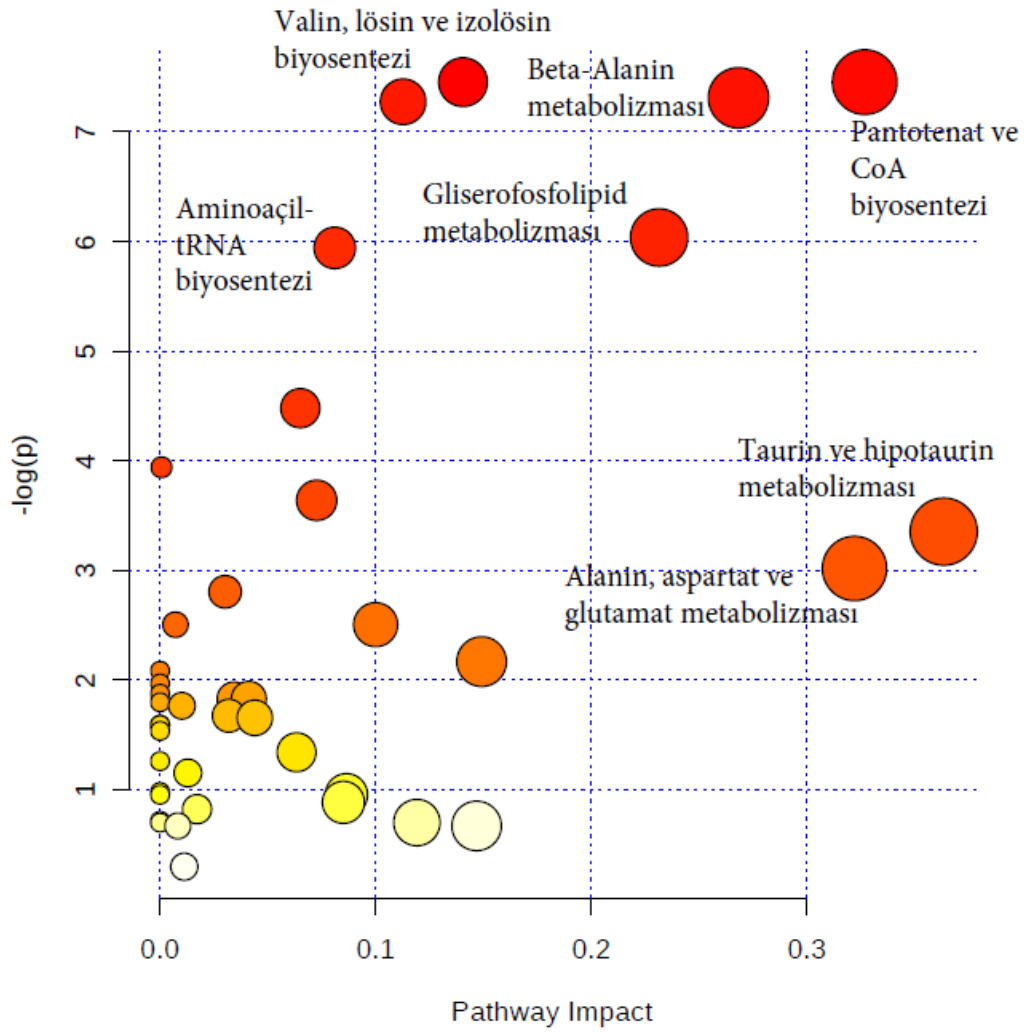
Yolak	Eşleşme durumu*	p	FDR	Etki
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	3/16	0.001	0.009	0.501
Siyanoamino asit metabolizması	2/25	0.004	0.097	0.0
Aminoasıl-tRNA biyosentezi	5/56	0.004	0.097	0.169
Sistein ve metiyonin metabolizması	2/19	0.006	0.097	0.067
Glutasyon metabolizması	3/20	0.008	0.097	0.250
Krebs döngüsü (TCA döngüsü)	4/39	0.008	0.097	0.166
Azot metabolizması	1/12	0.009	0.097	0.001
Glisin, serin ve treonin metabolizması	2/11	0.018	0.175	0.420
D-Glutamin ve D-glutamat metabolizması	1/13	0.021	0.190	0.112
Gliserofosfolipid metabolizması	3/40	0.048	0.341	0.107
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	3/16	0.110	0.009	0.501
Siyanoamino asit metabolizması	2/25	0.004	0.097	0.0

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

Tablo 4.11. CIS direncine bağılı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar.

Yolak	Eşleşme Durumu*	Beklenti	p
Malate-aspartat mekiği	4/10	0.576	0.002
Glutasyon metabolizması	5/21	1.210	0.005
Alanin metabolizması	4/17	0.979	0.014
Üre döngüsü	5/29	1.670	0.022
Amonyak geri dönüşümü	5/32	1.840	0.032
Glikoz-alanin döngüsü	3/13	0.749	0.034
Warburg etkisi	7/58	3.340	0.043
Aspartat metabolizması	5/35	2.020	0.046
Glisin ve serin metabolizması	7/59	3.400	0.047
Glutamat metabolizması	6/49	2.820	0.057

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.



Şekil 4.16. 5-FU ve CIS direncine bağılı olarak Caco-2’de etkileşen yollar.

Tablo 4.12. 5-FU ve CIS direncine bağılı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.

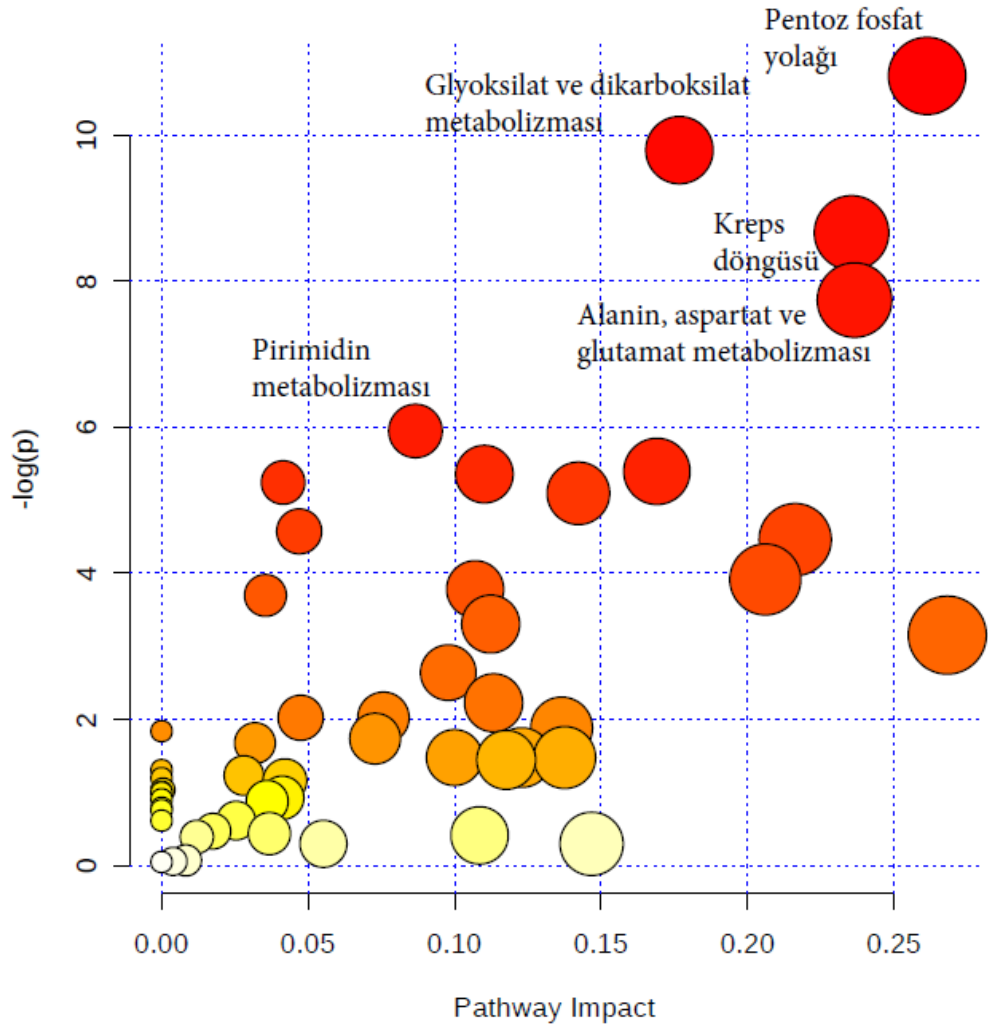
Yolak	Eşleşme durum	p	FDR	Etki
Valin, lösin ve izolösin biyosentezi	4/27	0.001	0.013	0.014
Pantotenat ve CoA biyosentezi	4/27	0.001	0.013	0.327
Beta-Alanin metabolizması	1/7	0.001	0.001	0.268
Aminoaçil-tRNA biyosentezi	2/25	0.001	0.001	0.113
Gliserofosfolipid metabolizması	4/39	0.002	0.003	0.231
Valin, lösin ve izolösin bozulması	1/10	0.003	0.004	0.080
Pirimidin metabolizması	1/15	0.011	0.129	0.065
Azot metabolizması	1/13	0.019	0.194	0.001
Arginin ve prolin metabolizması	4/77	0.026	0.233	0.072
Taurin ve hipotaurin metabolizması	1/10	0.035	0.279	0.363
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	1/12	0.040	0.335	0.322

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

Tablo 4.13. 5-FU ve CIS direncine bağılı olarak Caco-2 hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar.

	Eşleşme durum*	Beklenti	p
Gliserol fosfat mekiği	3/11	0.494	0.011
Triaçilgliserol biyosentezi	2/9	0.404	0.058
Kardiyolipin biyosentezi	2/11	0.494	0.083
Üre döngüsü	3/29	1.300	0.137
Beta-Alanin metabolizması	3/34	1.530	0.193
Aspartat metabolizması	3/35	1.570	0.205
Mitokondrial elektron taşıma zinciri	2/19	0.854	0.209

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.



Şekil 4.17. 5-FU direncine bağlı olarak FHC’de etkileşen yollar.

Tablo 4.14. 5-FU direncine bağı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.

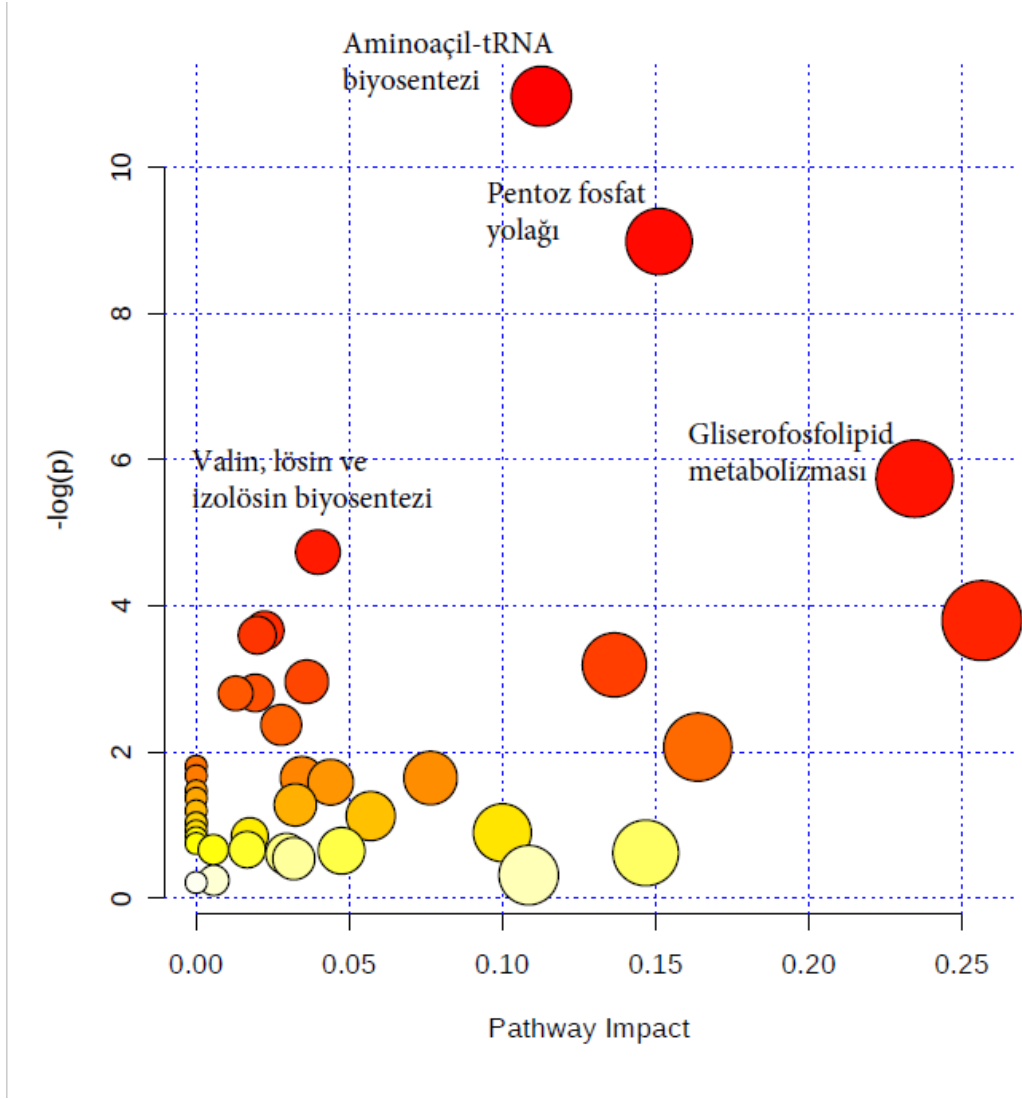
Yolak	Eşleşme Durumu	p	FDR	Etki
Pentoz fosfat yolu	1/4	2.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	0.260
Glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması	4/25	7.10 ⁻⁵	0.003	0.176
Krebs döngüsü	1/4	2.10 ⁻⁴	0.006	0.235
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	5/24	5.10 ⁻⁴	0.011	0.236
Pirimidin metabolizması	7/60	0.002	0.026	0.185
Propanoat metabolizması	1/7	0.003	0.042	0.086
Sfingolipid metabolizması	4/25	0.006	0.056	0.110
Aminoasil-tRNA biyosentezi	7/75	0.006	0.056	0.169
Galaktoz metabolizması	5/41	0.011	0.056	0.041
Glikoliz veya Glukoneogenez	4/31	0.013	0.095	0.040
Gliserolipid metabolizması	1/8	0.024	0.097	0.216

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

Tablo 4.15. 5-FU direncine bağı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yollar.

	Toplam metabolit sayısı*	Beklenti	p
Warburg etkisi	13/58	4.420	0.001
Glukoneogenesis	8/35	2.670	0.003
Glikoz-alanin döngüsü	4/13	0.990	0.013
Malate-aspartat mekiği	3/10	0.762	0.035
Glikoliz	5/25	1.900	0.036
Gliserol fosfat mekiği	3/11	0.838	0.045
Mitokondrial elektron taşıma zinciri	4/19	1.450	0.050

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.



Şekil 4.18. CIS direncine bağı olarak FHC'de etkileşen yolaklar.

Tablo 4.16. CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.

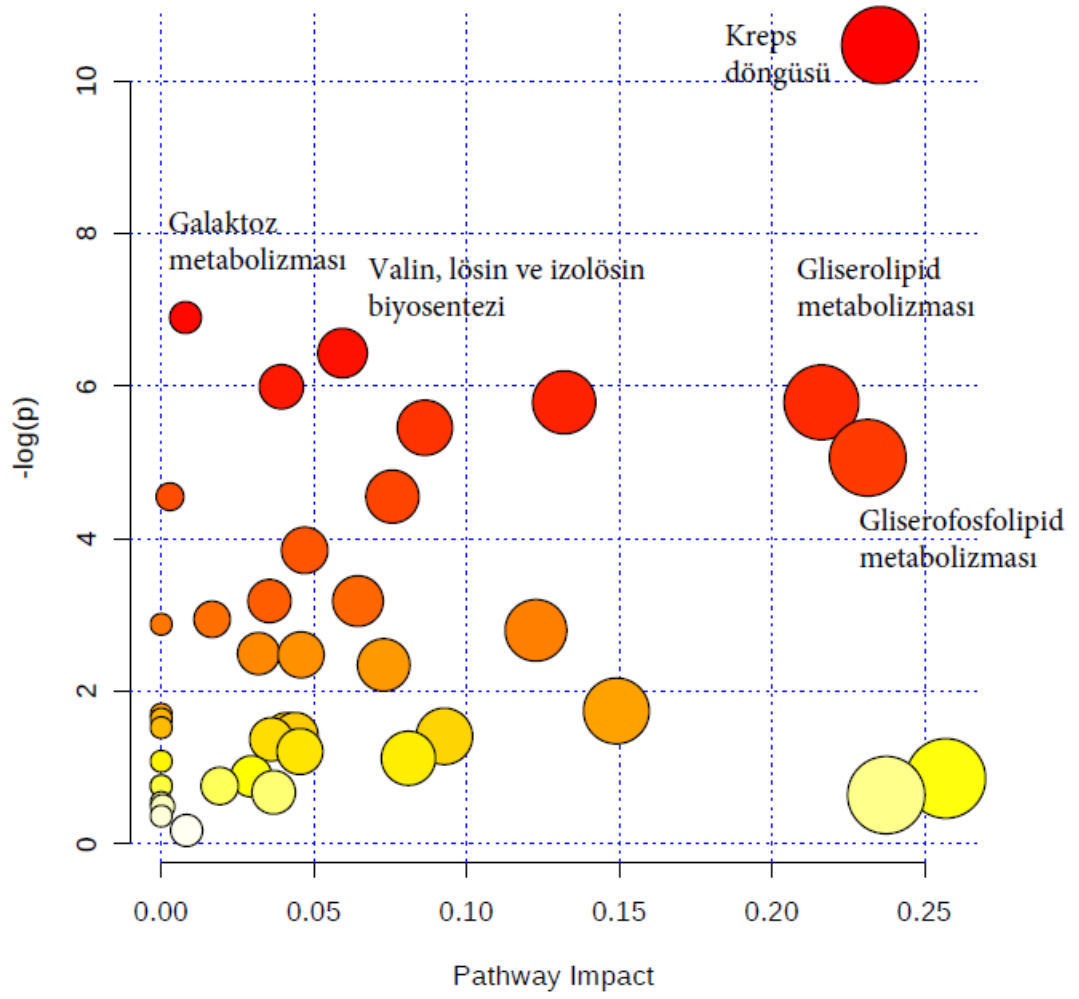
Yolak	Eşleşme Durumu*	p	FDR	Etki
Aminoasıl-tRNA biyosentezi	8/75	3.10 ⁻⁵	0.002	0.112
Pentoz fosfat yolağı	5/32	1.6.10 ⁻⁴	0.006	0.151
Gliserofosfolipid metabolizması	4/39	0.004	0,103	0.234
Valin, lösın ve izolösın biyosentezi	1/9	0.010	0.202	0.04
Glutasyon metabolizması	3/38	0.026	0.375	0.256
Valin, lösın ve izolösın bozulması	3/40	0.030	0.375	0.220
Galaktoz metabolizması	3/41	0.03	0.375	0.020
Glisin, serin ve treonin metabolizması	1/16	0.041	0.400	0.130

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

Tablo 4.17. CIS direncine bağlı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirci yolak analizlerinden elde edilen yollar.

	Toplam metabolit sayısı	Beklenti	p
Glutasyon metabolizması	3/21	0.984	0.071
Gliserol fosfat mekiği	2/11	0.516	0.0904
Fosfatidiletanolamin biyosentezi	2/12	0.562	0.105
Glikoz-alanin döngüsü	2/13	0.609	0.121

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.



Şekil 4.19. 5-FU ve CIS direncine bağlı olarak FHC’de etkileşen yollar.

Tablo 4.18. 5-FU ve CIS direncine bağılı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar.

Yolak	Eşleşme Durumu*	p	FDR	Etki
Krebs döngüsü	1/4	4.2.10 ⁻⁵	0.003	0.235
Galaktoz metabolizması	5/41	0.001	0.116	0.008
Valin, lösin ve izolösin biyosentezi	4/27	0.002	0.171	0.060
Glyoksilat ve dikarboksilat metabolizması	1/10	0.003	0.277	0.040
Pentoz fosfat yolu	1/8	0.004	0.315	0.132
Gliserolipid metabolizması	1/8	0.004	0.315	0.216
Propanoat metabolizması	4/35	0.004	0.427	0.086
Gliserofosfolipid metabolizması	4/39	0.006	0.621	0.231
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	4/45	0.010	0.950	0.003
Glukoneogenez	3/31	0.02	1.000	0.050

*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

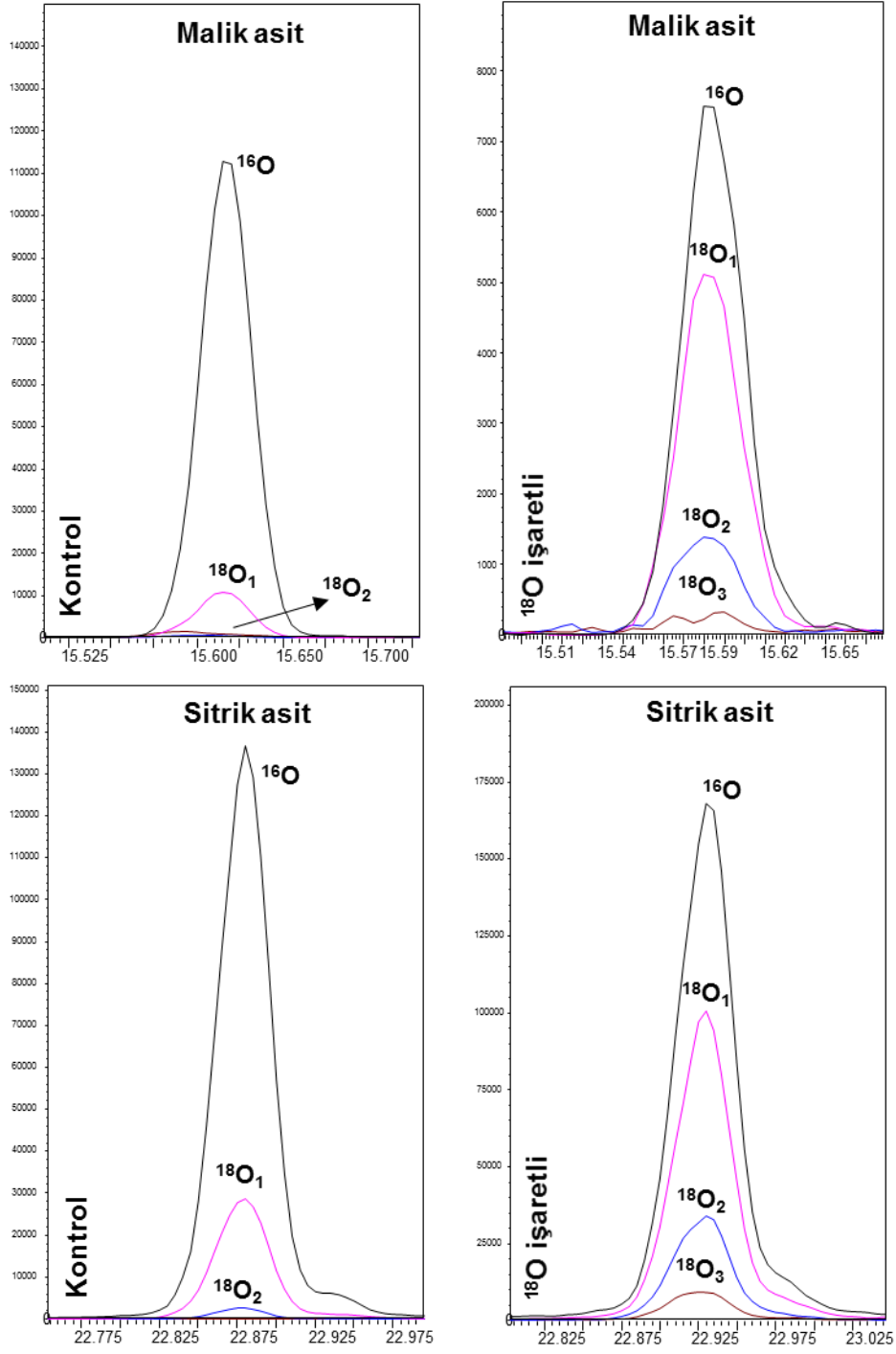
Tablo 4.19. 5-FU ve CIS direncine bağılı olarak FHC hücre hatlarında istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yolak analizlerinden elde edilen yolaklar.

	Eşleşme Durumu*	Beklenti	p
Warburg Etkisi	5/29	3.00	0.001
Gliserolipid Metabolizması	6/25	1.49	0.003
Glukoneogenesis	1/5	2.08	0.003
Glikoliz	1/5	1.49	0,01
Mitokondrial Elektron Taşıma Zinciri	4/19	1.13	0,01
Gliserol Fosfat Mekiği	3/11	0.655	0,02
Krebs döngüsü	5/32	0.655	0,02

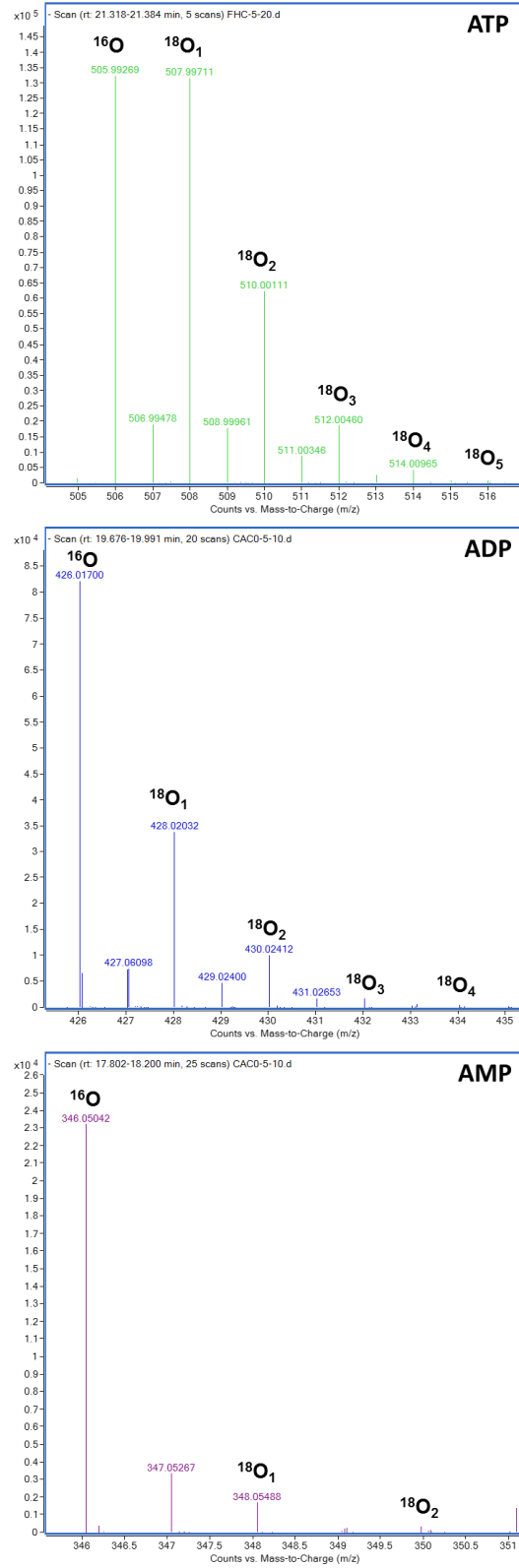
*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı.

4.6. Fluksomiks Analiz

İşaretleme işlemi gerçekleştirilmiş hücre hatlarında metabolitlerin ¹⁸O işaretleme yüzdelerinin belirlenmesi için GC-MS ve LC-qTOF-MS sistemleri ile iki farklı yöntem kullanılmıştır. GC-MS, monofosfat, Krebs döngüsü metabolitleri gibi polar bileşiklerin ayırımındaki yüksek etkinliğinden dolayı bu bileşiklerin analizinde kullanılmıştır (Şekil 4.20). LC-qTOF-MS yöntemi ise özellikle GC-MS'de termal kararlılık göstermeyen fosfonükleotitlerin analizlerinde kullanılmıştır (Şekil 4.21).

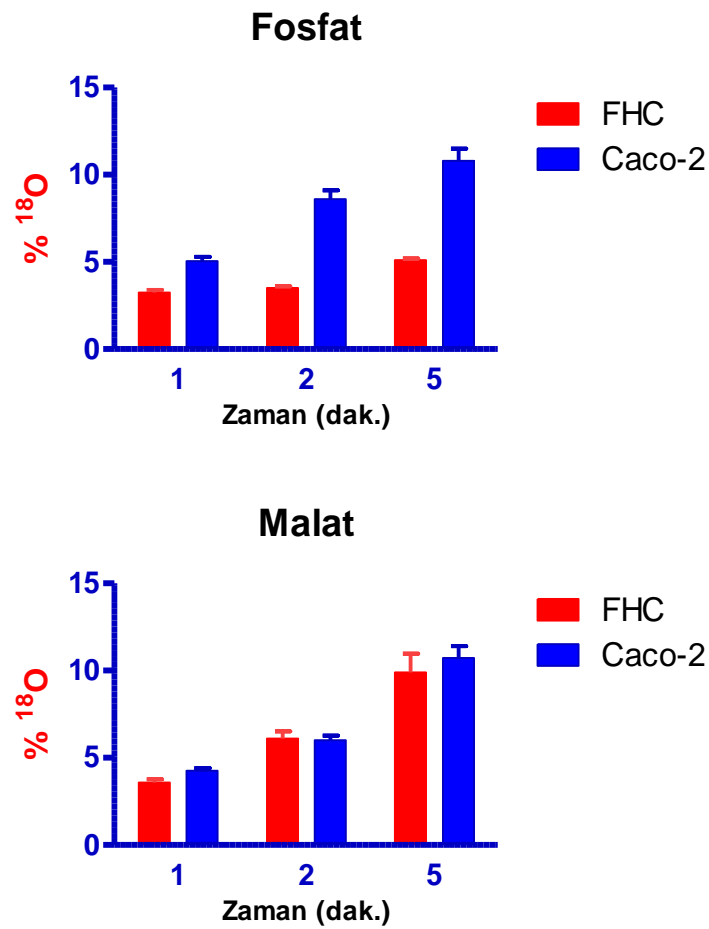


Şekil 4.20. Krebs Döngüsü metabolitlerinin kontrol ve ^{18}O işaretlenmiş hücre hatlarından analizlerine ait örnek GC-MS kromatogramları.

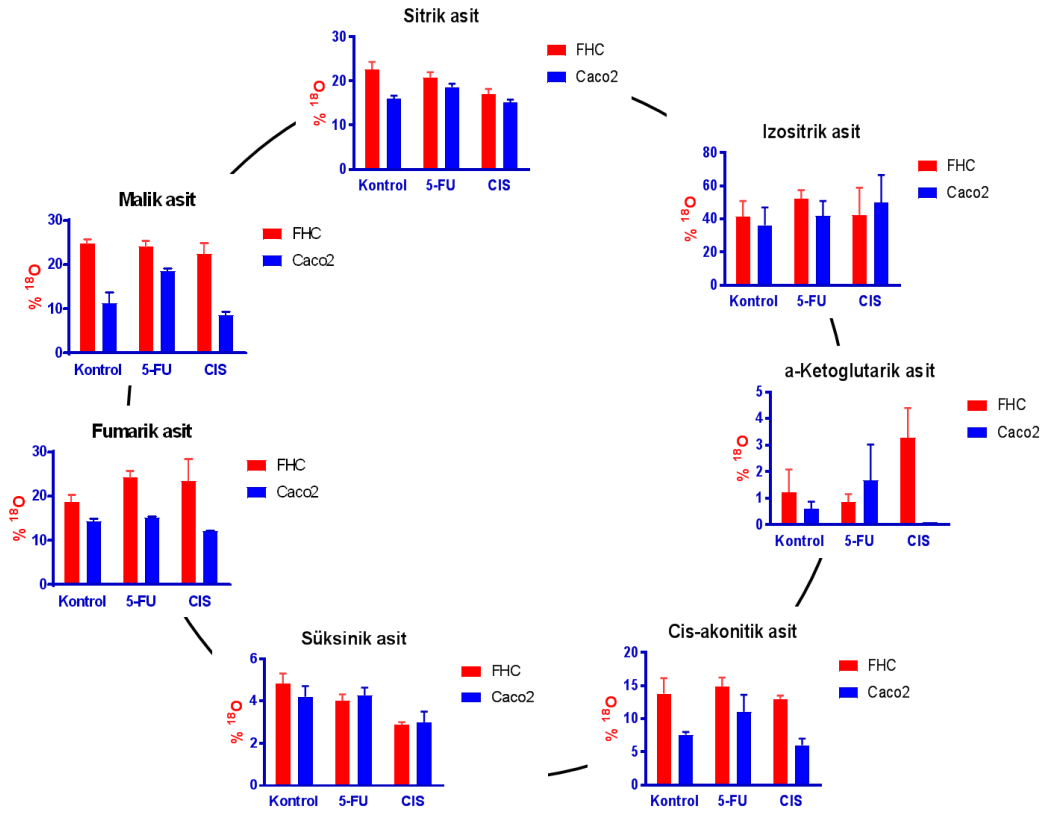


Şekil 4.21. Hücre hatlarında ^{18}O ile işaretlenmiş ATP, ADP ve AMP metabolitlerine ait LC-qTOF-MS spektrumları.

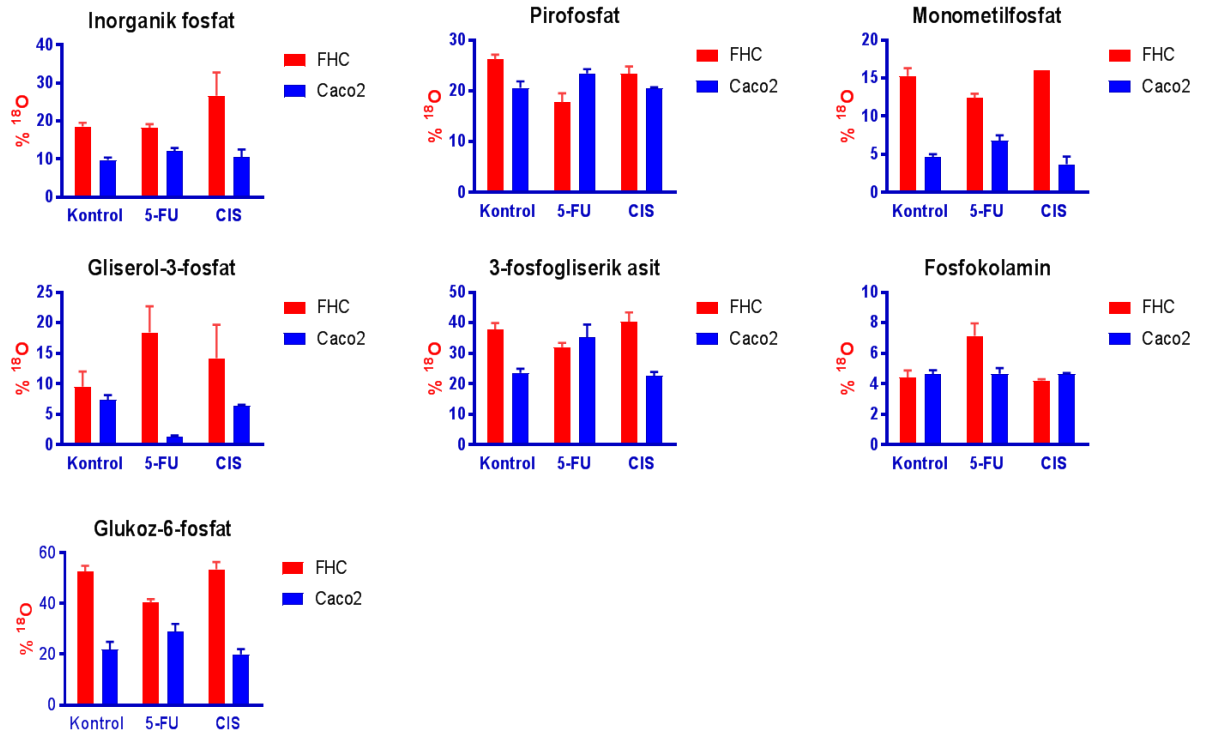
Fluksomiks analizlerde ilk önce işaretleme süresi belirlenmiştir. Bu amaçla % 100 doluluğa ulaşmış hücre hatları %30 $H_2^{18}O$ içeren hücre besiyerinde 1, 2 ve 5 dak boyunca işaretlenmiş ve 5 dak en uygun işaretlenme zamanı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22). Direnç gelişimi süreci sonucunda % 100 doluluğa ulaşmış hücre hatları % 30 $H_2^{18}O$ içeren hücre besiyerinde 5 dakika işaretlendikten sonra fluksomik analizler gerçekleştirilmiştir. Caco-2 ve FHC hücre ile 5-FU ve CIS'e direnç geliştirilen hatların farklı metabolitler için elde edilen ^{18}O ile işaretlenme yüzdeleri Şekil 4.23-4.25'de sunulmuştur.



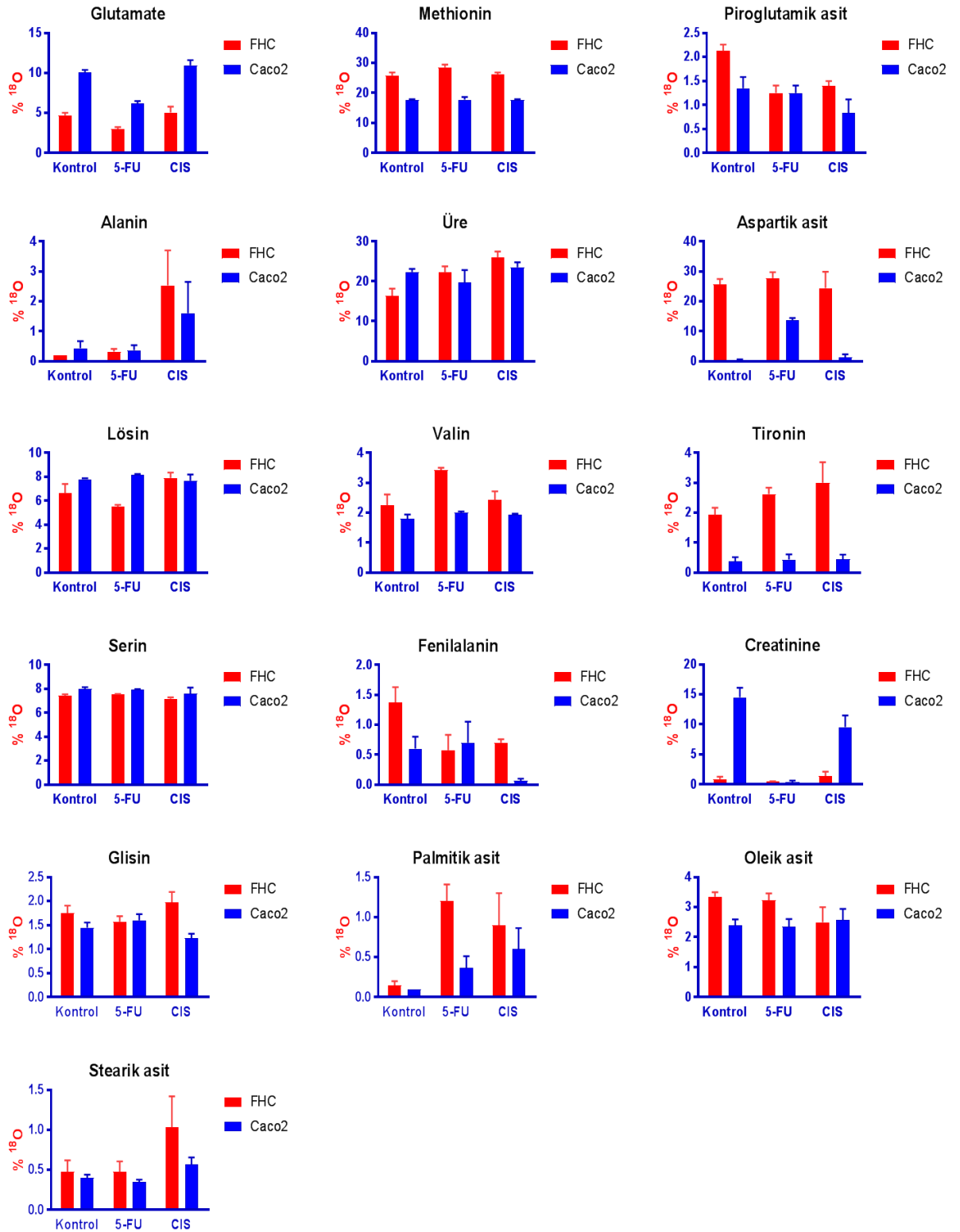
Şekil 4.22. Caco-2 ve FHC hücre hatlarında yapılan analizler sonucunda farklı metabolitler için elde edilen ^{18}O işaretlenme yüzdeleri (1, 2 ve 5 dak)



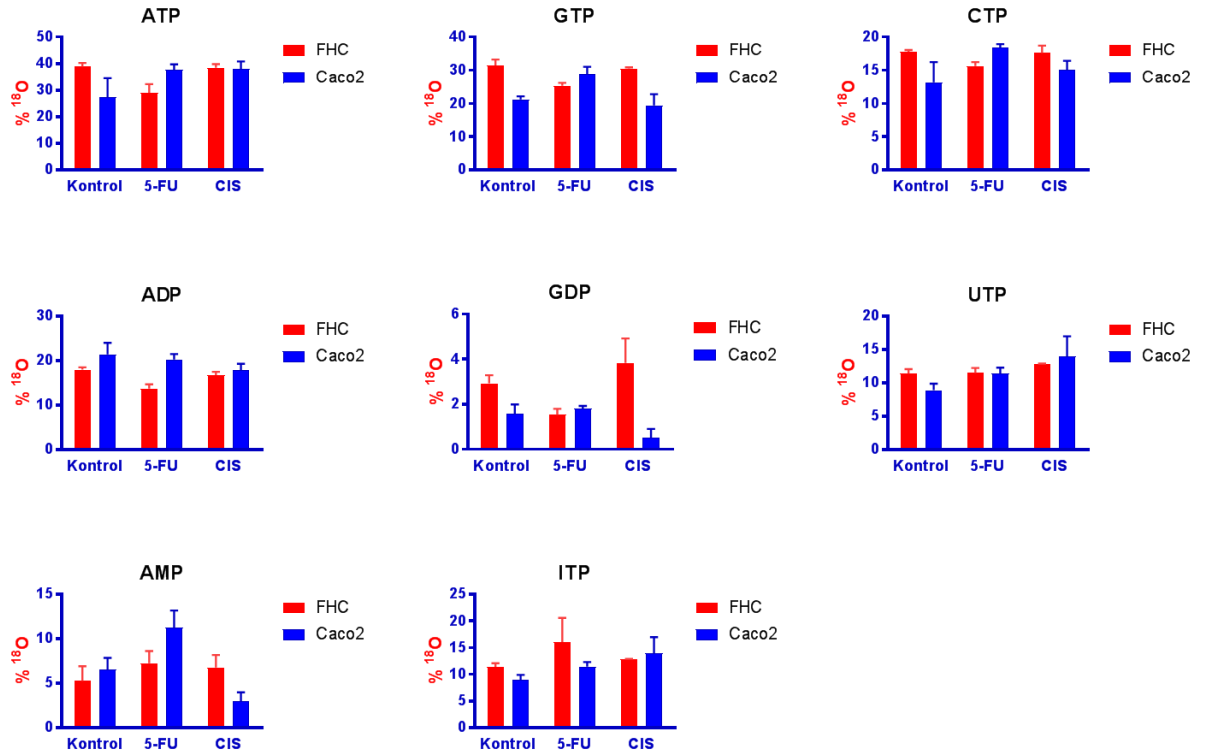
Şekil 4.23. Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan Krebs döngüsü metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri.



Şekil 4.24. Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan fosfat içeren metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri.



Şekil 4.25. Caco-2 ve FHC hücrelerinde yer alan fosfat içermeyen metabolitlerin ^{18}O ile işaretlenme yüzdeleri.



Şekil 4.26. Hücre hatlarında ¹⁸O ile işaretlenmiş fosfonükleotitlerin işaretlenme yüzdeleri.

Tablo 4.20. Caco-2 ve FHC hücrelerinin dirence bağlı olarak değişen döngü hızları.

	Caco-2	Caco 2-5FU	Caco-2-CIS	FHC	FHC-5FU	FHC-CIS
3-fosfoglisirik asit	0.812±0.026	1.021±0.055	0.787±0.006	1.263±0.116	0.96±0.0530	1.241±0.073
a-ketoglutarik asit	0.009±0.004	0.025±0.017	0.019±0.012	0.018±0.011	0.012±0.004	0.057±0.016
Alanin	0.006±0.002	0.005±0.002	0.024±0.011	0.002±0.001	0.004±0.001	0.038±0.012
aspartik asit	0.006±0.002	0.212±0.010	0.693±0.584	0.429±0.031	0.472±0.033	0.408±0.053
Cis-akonitik asit	0.114±0.006	0.171±0.036	0.079±0.009	0.216±0.034	0.232±0.021	0.462±0.143
Fenilalanine	0.004±0.002	0.008±0.004	0.001±0.000	0.020±0.003	0.008±0.003	0.008±0.002
Fosfokalamın	0.068±0.003	0.069±0.005	0.052±0.011	0.065±0.006	0.107±0.011	0.074±0.008
Fumarik aist	0.229±0.008	0.238±0.003	0.379±0.100	0.301±0.025	0.404±0.023	0.392±0.046
G3P	0.111±0.011	0.021±0.001	0.053±0.022	0.146±0.035	0.300±0.066	0.393±0.092
G6P	0.359±0.051	0.496±0.052	0.245±0.056	1.084±0.062	0.748±0.028	1.111±0.043
Glisim	0.021±0.001	0.023±0.002	0.019±0.001	0.025±0.002	0.023±0.001	0.029±0.003
Glutamik asit	0.153±0.004	0.092±0.004	0.141±0.019	0.069±0.004	0.044±0.003	0.073±0.013
İzositrik asit	0.712±0.218	0.836±0.202	1.082±0.248	0.841±0.238	1.085±0.127	0.859±0.212
Kreatinine	0.227±0.023	0.007±0.003	0.523±0.267	0.013±0.005	0.007±0.000	0.021±0.009
Lösin	0.118±0.001	0.123±0.001	0.115±0.007	0.099±0.010	0.082±0.002	0.119±0.006
Malik asit	0.176±0.034	0.295±0.009	0.111±0.018	0.411±0.016	0.399±0.021	0.368±0.023

	Caco-2	Caco 2-5FU	Caco-2-CIS	FHC	FHC-5FU	FHC-CIS
Methinin	0.281±0.004	0.283±0.014	0.281±0.002	0.431±0.018	0.484±0.016	0.435±0.015
Monometilfosfat	0.069±0.005	0.102±0.009	0.055±0.009	0.239±0.015	0.191±0.008	0.251±0.000
Oleik asit	0.035±0.002	0.034±0.003	0.043±0.006	0.049±0.002	0.047±0.003	0.045±0.009
Palmitik asit	0.000±0.000	0.004±0.002	0.006±0.003	0.001±0.001	0.013±0.004	0.043±0.018
Pi	0.190±0.010	0.228±0.012	0.196±0.026	0.343±0.015	0.336±0.015	0.380±0.008
Pirfosfat	0.333±0.020	0.386±0.013	0.244±0.062	0.438±0.016	0.283±0.027	0.384±0.013
Piroglutamik asit	0.019±0.003	0.018±0.002	0.016±0.004	0.031±0.002	0.018±0.002	0.030±0.005
Serin	0.121±0.002	0.119±0.000	0.114±0.007	0.111±0.002	0.113±0.001	0.107±0.001
Sitrik asit	0.252±0.011	0.298±0.012	0.198±0.028	0.371±0.028	0.338±0.018	0.270±0.010
Stearik asit	0.006±0.000	0.005±0.000	0.006±0.002	0.007±0.002	0.006±0.002	0.030±0.014
Süksinik asit	0.062±0.007	0.063±0.005	0.03±0.008	0.072±0.006	0.059±0.004	0.074±0.016
Treonin	0.005±0.002	0.005±0.002	0.004±0.002	0.028±0.003	0.039±0.003	0.044±0.009
Üre	0.365±0.010	0.320±0.048	0.387±0.018	0.258±0.022	0.364±0.020	0.433±0.015
Valin	0.026±0.002	0.029±0.000	0.025±0.003	0.033±0.005	0.051±0.001	0.036±0.004
ADP	0.350±0.042	0.328±0.019	0.228±0.050	0.287±0.008	0.304±0.08	0.464±0.142
ATP	0.481±0.114	0.685±0.041	0.694±0.059	0.712±0.028	0.499±0.056	0.701±0.016
GTP	0.345±0.015	0.492±0.039	0.315±0.051	0.546±0.033	0.422±0.015	0.525±0.004
AMP	0.077±0.022	0.173±0.027	0.034±0.012	0.078±0.022	0.109±0.019	0.101±0.019
CTP	0.207±0.042	0.294±0.008	0.235±0.020	0.283±0.004	0.245±0.009	0.279±0.010
CDP	0.023±0.005	0.027±0.002	0.004±0.003	0.043±0.005	0.022±0.003	0.069±0.015
ITP	0.135±0.013	0.175±0.012	0.332±0.102	0.175±0.009	0.259±0.072	0.198±0.001
UTP	0.135±0.013	0.175±0.012	0.332±0.102	0.175±0.009	0.259±0.072	0.198±0.001

5. TARTIŞMA

Günümüzde omik teknikleri, yüksek işlem hacimli yöntemler olarak hastalıkların teşhisinde, prognozunda ve temel araştırmalarda biyolojik süreçlerin incelenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Bir numunedeki düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tamamının analizini gerçekleştirebilen en yeni omik teknolojisi metabolomiktir. Bu yöntemin sağladığı en büyük avantaj ise belirlenmiş bir zamanda, belirli çevresel koşullar altında hücre/doku fenotipi arasında daha yakından bir bağlantı oluşturmaya olanak vermesidir.

Canlı sistemlerde omik teknolojileri ile elde edilebilen her türlü bilgi aslında başka bir omik verinin yol göstericisi de olabilmektedir. Örneğin; protein seviyeleri bir hücre sisteminin metabolik profilini etkilemekte ve aynı zamanda metabolitlerin derişimleri protein ekspresyonlarını etkilenmesine neden olduğu için proteom ve metabolom profilleri doğrudan birbirleri ile bağlantılıdır. Bu nedenle çeşitli omik verileri (genomik, proteomik, metabolomik, fluksomik, transkriptomik) birleştiren entegre bir yaklaşım, herhangi bir uyarının biyolojik etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması açısından çok güçlü bir araçtır.

Son yıllarda kolorektal kanserin tedavisinde önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, bu kanser türü dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olarak kalmaya devam etmektedir. 5-FU ve CIS, kanser tedavilerinde ve klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerdir. Son yıllarda bu ajanların etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması, kemoterapötik aktiviteyi artıran yeni stratejilerin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı geliştirdikleri ilaç direnci nedeniyle klinik etkileri azalmaktadır. Yürütülen kapsamlı araştırmalara rağmen ilaç direnci, kemoterapötik ilaçların klinik uygulamasında kritik sınırlama olmaya devam etmektedir. Dolayısıyla kemoterapötiklere karşı hücrelerin gösterdiği ilaç direncinin üstesinden gelinebilmesi için daha fazla araştırma yapılmasının kanser terapisinin potansiyelini arttırmada etkili olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklarda çoklu ilaç direnci, farklı ilaç grupları için farklı hücre tiplerinde oldukça ayrıntılı çalışılmış ve konuya ilişkin çok sayıda rapor yayınlanmıştır. Bu

çalışmaların çoğu, çoklu ilaç direncinin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik çalışmalardır; her biri farklı/aynı hedef gen/protein üzerine odaklanmıştır (60-63). Bu doğrultuda henüz ilaç direnci durumunda hücrenin omik verilerinin nasıl etkilendiğini kapsamlı şekilde araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla, kanser hücre hatlarındaki direnç gelişimine bağlı olarak değişen dinamiklerin belirlenmesi için metabolomik ve fluksomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamında hücre hatlarında ayrı ayrı 5-FU ve CIS ile direnç geliştirilmiş; direnç gelişimi sırasında kaynaklarda sıklıkla rapor edildiği gibi Caco-2 hücrelerinin enterositlere fenotipik transdiferansiyasyonunu engellemek amacıyla hücrelerin tam doyumluğa ulaşmasını beklemeden pasajlama yapılmıştır. Direnç gelişimi için hücrelerin ilaç ile uyarımı için süre konusunda kaynaklarda çok farklı uygulamalar/protokoller mevcut olmakla birlikte genellikle IC₅₀ değerinin altındaki derişim ile uyarımda 2-3 aylık bir sürenin yeterli olacağı rapor edilmektedir. Bu amaçla ilk önce kemoterapötik ajanların IC₅₀ değerleri belirlenmiş (Şekil 4.1-4.2) ve hücre hatları 5-FU ve CIS'e maruz bırakılarak direnç gelişimi her iki ilaç için de 6 aylık süreçte gerçekleştirilmiştir.

Kolorektal kanseri alanındaki araştırmalarda *in vitro* hücre kültürü modeli olarak kullanılan Caco-2 ve FHC hücre hatlarının ilaç direncine bağlı olarak değişen metabolomik profilleri GC-MS ve LC-qTOF-MS yöntemleri ve lipidomik çalışmalar ise LC-qTOF-MS ile incelenmiştir. Bu amaçla 6 adet FHC ve Caco-2 hücre hatlarında iki farklı kemoterapötik ajan ile geliştirilen direnç çalışmaları GC-MS ve LC-qTOF-MS ile analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3-4.5). Bu analizler sonucunda GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik çalışmalarda ve LC-qTOF-MS temelli lipidomik çalışmada sırasıyla 122, 68 ve 151 metabolit olmak üzere toplamda 341 adet metabolit tanımlanmıştır (Tablo 4.4 - 4.6).

Biyolojik bir olayın kantitatif bir metabolikte neden olduğu metabolomik değişiklikleri ortaya çıkarmak için, farklı numunelerde bulunan ayrı ayrı metabolitlerin gerçek derişim farklılıklarını incelemek için doğru ve kesin bir ölçüm yapabilen analitik bir araç kullanmak çok önemlidir. Metabolomik analizlerin basamaklarında yer alan basamakların (numune toplama biçimi ve saklanması, numune analizi ve veri analizi) her biri kantitatif sonuçları önemli ölçüde etkileyebilir

ve bu nedenle büyük bir özenle yapılmalıdır. Bunlar arasında, toplam numune miktarı veya metabolitlerin derişimleri, bir numuneden diğesine önemli ölçüde farklı olabilir. Bu nedenle, toplam numune miktarı değişiminin, bireysel metabolitlerin miktar tayini üzerindeki etkisinin azaltılması veya yok edilmesi kritik öneme sahiptir (64). Büyük ölçekli hedeflenmemiş metabolomik analizler de yaşanan bu varyasyonlar farklı normalizasyon teknikleri ile ortadan kaldırılabılır. Çalışmamızda analizlerden kaynaklanan farklılıkları ortadan kaldırmak için farklı normalizasyon teknikleri özellikle varyasyonun çok yüksek olduğu GC-MS verilerinde denenmiştir (Şekil 4.6-4.9). Analiz sonucunda elde edilen veriler temel bileşen bir, iki ve ilk iki temel bileşen için en küçük varyasyon değerleri sırası ile ham verinin otomatik ölçeklendirmesi ve TPN'nin otomatik ölçeklendirme yapıldığında elde edilmiştir (Tablo 4.1-4.3). Varyasyonun en aza indiği ham veri otomatik normalizasyon yerine TPN ve otomatik ölçeklendirme tekniği direnç mekanizmasının araştırılmasında metabolomik verilerinin normalizasyonu için kullanılmıştır. Çünkü ham verinin otomatik ölçeklendirmesine dayalı analizler özellikle hücre kültürü gibi farklı miktarda numune örneklerinin normalizasyonunda etkili olamamaktadır (64). Metabolomik ve lipidomik çalışmalar sonucunda elde edilen veriler TPN ve otomatik ölçeklendirme tekniği ile normalize edilerek Tablo 4.4 - 4.6'da sunulmuştur.

Normalize edilmiş veriler üzerinde çok değişkenli veri analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk önce veri setinde sistematik bir hata veya aykırı bir değer olup olmadığı PCA skor grafiği ile gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Aykırı değerler verilerden uzaklaştırıldıktan sonra gruplar arasındaki farklılaşmayı daha ayrıntılı inceleyebilmek için PLS-DA analizleri her iki hücre hattı için bir arada ve ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11A-4.13A). PLS-DA grafikleri Caco-2 ile FHC hücre hatlarının direnç gelişimine bağlı olarak farklı metabolomik profiller sahip olduklarını göstermiştir. Bu farklılaşmaya neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.11B-13 B).

PLS-DA yöntemi zorlanmış bir analiz yöntemi olduğu için doğruluğunun gösterilmesi gerekmektedir. Bu amaçla PLS-DA modellerinin güvenilirliği hesaplanan (R^2) ve tahmin edebilme (Q^2) değerlerinden yararlanılır. Farklı modeller için elde edilen R^2 ve Q^2 değerleri [R^2 : 0.96 ve Q^2 :0.73 (Caco-2 ve FHC) ve R^2 : 0.95 ve Q^2 :0.76

(Caco-2) ve R^2 : 0.99 ve Q^2 :0.87(FHC)] Şekil 4.11-4.13’de verilmiştir. Elde edilen R^2 ve Q^2 değerlerinin 0.5’den büyük olması yöntemlerin geçerliliğini göstermektedir.

Caco-2 ve FHC hücre ile 5-FU ve CIS’e direnç geliştirilen hücre hatları tek değişkenli veri analiz yöntemleriyle de karşılaştırılmış ve gruplar arasında karşılaştırmalara ait p değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Belirlenen çok sayıda metabolit arasından direnç geliştirilmemiş ve geliştirilmiş grup arasında anlamlı düzeyde farklılık ($p < 0.05$) gösterdiği saptanan metabolitler ile gerçekleştirilen yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) sonucunda dirence bağlı değişen yollar belirlenmiştir (Tablo 4.8-12, Şekil 4.15-19). Değişen yollar incelendiğinde çıkarılacak en temel sonuç aslında metabolit düzeylerindeki farklılık açısından her iki ilaç ile elde edilen değişimlerin benzer olmasıdır. Her iki ajanla da değişim saptanan yollar temelde malat-aspartat mekiği, aminoasit, amonyak metabolizmaları ile glikoz-alanin ve üre döngüleri olup bu yollarda da etkilenen metabolitlerin aynı olması dikkat çekicidir (Tablo 4.9-4.11). Aslında kaynaklarda çoklu ilaç direnci çalışılırken direnç gelişim mekanizmalarının protein ve gen düzeyinde farklı olduğu rapor edilmektedir. Tez çıktıları ile söz konusu veriler birlikte ele alındığında her bir ajanın bireysel olarak direnç geliştirme mekanizması farklı da olsa etkilenen metabolitlerin ve yolların ortak olduğu sonucuna varılabilir. Kaynaklarda Caco-2 hücrelerinin omik temelli çalışmalar ile metabolomik ve proteomik profillerinin belirlendiği en kapsamlı çalışma Gioria ve ark. tarafından 2016’da yayınlanmış ve altın nanopartiküllerin Caco-2 hücreleri üzerindeki toksisitelerini metabolomik ve proteomik teknikler ile değerlendirdiği çalışmadır (65). Bu çalışmada hücre ekstraktlarında altın nanopartiküllerin etkisi ile 35 tane metabolit 61 tane de protein düzeyinin değiştiği rapor edilmiştir. Metabolomik profillemeye için söz konusu çalışmada sadece LC-MS verisi değerlendirilmiştir. Tez kapsamında omik temelli çalışmalar [metabolomiks, (GC-MS ve LC-qTOF-MS), lipidomiks ve fluksomiks] ile kontrol grubunda ve direnç geliştirilen grupların her birinde 341 adet metabolit düzeyinin saptanmış olması nedeniyle çalışma alanında öncül nitelikte bir çalışma olarak değerlendirilmiştir. Gioria ve ark. tarafından rapor edilen çalışmada protein metabolizması, hücre morfolojisi ve transport ile sinyal iletimi yollarındaki düzeyi değişen metabolitlerin altın nanopartiküllerin toksisitesi ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada altın nanopartiküllerin canlı

sistemlerle etkileşime girmesi sonucunda etkilenen biyolojik süreçlerin anlaşılmasına katkıda bulunulmuştur. Lamers ve ark. tarafından rapor edilen bir başka çalışmada ise inulinin Caco-2 hücrelerindeki etkisini değerlendirmek için ¹H-NMR temelli metabolomik analizler gerçekleştirmiştir (66). Bu çalışmada özellikle *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen metabolomik profillemenin *in vivo* koşulları yansıtmaya açısından iyi bir model olduğu ve *in vitro* koşullarda çalışmanın özellikle de maliyet açısından avantajlı olduğu belirtilmiştir. Yukarıda bahsi geçen iki çalışma Caco-2 hücrelerinde günümüze kadar gerçekleştirilmiş en kapsamlı omik temelli çalışmalardır. Tez kapsamında taranan metabolit sayısının söz konusu çalışmaya kıyasla yaklaşık 10 kat fazla olmasına paralel olarak Caco-2 hücrelerinde 5-FU ve CIS'e direnç gelişimiyle ilişkilendirilen yolak sayısı da benzer şekilde daha fazladır. Omik temelli çalışmalarda tespit edilen metabolit sayısı arttıkça ilgilenilen mekanizmaya dahil olan yolakların daha ayrıntılı saptanması beklenen bir durumdur.

Bu tez kapsamında 5-FU ve CIS karşı Caco-2 hücrelerinde direnç gelişmesinin mekanizması omik temelli çalışmalar ile araştırılmış ve direnç gelişimi ile birlikte etkilenen hücresel yolaklar belirlenmiştir. Kaynaklarda her iki kemoterapötik ajana karşı direnç gelişiminde Bcl-2/Bax proteinlerinin rol oynadığı rapor edilmiş ve birçok çalışma bu proteinler çevresinde direnç gelişimi mekanizmasını aydınlatmaya yönelik tasarlanmıştır (67-69). Buna karşın Bonneau ve ark. 2013'de yayınladıkları derleme niteliğindeki bir çalışmada Bcl-2 protein ailesinin rol aldığı non apoptotik yolakları özetlemişler çalışmada Bcl-2'nin hücre siklusunun düzenlemesinden başlayarak immün cevap oluşumu, hücre migrasyonu, erken embriyonik gelişim gibi birçok yolakta görev aldığı bildirilmiştir (70). Bu bilgiler doğrultusunda tez kapsamında direnç gelişimi ile birlikte etkilendiği ortaya konulan çok sayıda hücresel yolağın var olması şaşırtıcı değildir.

Caco-2 hücrelerinin 5-FU ve CIS ile 6 aylık süre ile uyarılmaları sonucunda her iki hücre grubunda da LC-qTOF-MS ve GC-MS ile elde edilen metabolomik profiller incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla özellikle amino asit metabolizmasının, Krebs döngüsünün ara bileşenleri, nükleik asit, karbohidrat ve lipid metabolizmalarının etkilendiği tespit edilmiştir.

İki grubun metabolomik verilerinden yola çıkarak iki grupta da kontrol grubuna kıyasla aynı anlamlılık düzeyinde değişen 4 metabolit olduğu; bunlardan ikisinin amino asit (alanine ve glisin); birinin bir gliserofosfolipid (fosfatidik asit); diğerinin ise bir nükleik asit olduğu (sistidin) belirlenmiştir. Bu 4 metabolitteki değişimin direnç geliştirilen ajandan bağımsız olarak gerçekleştiği; direnç gelişim mekanizması açısından ortak, ayırıcı olmaktan uzak metabolitler olduğu saptanmıştır.

Tek başına kontrole kıyasla 5-FU ile direnç geliştirilen gruba ait profil incelendiğinde; aminoasit metabolizmasında yer alan 10 adet metabolitin anlamlı şekilde değiştiği saptanmıştır. Bunlardan 7'si (serin, alanin, glutamik asit, aspartik asit, lizin, glisin, izolösin) protein yapısında yer alan standart amino asitler, 1'i posttranslasyonel modifikasyon ile standart aminoasit olan prolinden elde edilen ve ekstraselüler matriksin temel bileşeni olan kollajen yapısında yer alan amino asit; hidroksi prolindir diğeri ise protein yapısında yer almayan amino asit; homoserindir. Metabolik profili değiştiği saptanan diğer amino asit ise taurindir.

5-FU ile direnç gelişim sürecinde amino asit metabolizmasında anlamlı düzeyde en çok etkilenen 3 metabolitten ilki miyoinozittir. Miyoinozitol, endojen olarak glukozdan sentezlenir dolayısıyla esansiyel değildir, miyoinozitol de inozitol fosfatlar dahil birkaç ikincil mesajcı için prekürsördür. Ayrıca Miyoinozitol, fosfatidilinozitol (PI) fosfatidilinozitol fosfat (PIP) gibi membran lipidlerinin önemli bileşenidir. 5-FU ile fosfatidilkolin ve fosfatidilkolin düzeylerinin kontrole kıyasla anlamlı artmış tespit edilmiş olması da miyoinozitol düzeyindeki artıştan ileri gelmektedir. Bu şekilde biyolojik membranların yapısında yer alarak miyoinozitolün insüline karşı duyarlılığı arttırdığı da rapor edilmiştir (71). 5-FU ile direnç gelişim sürecinde en çok etkilenen ikinci metabolit ise taurindir. Taurin metiyonin, sistein, homosistein gibi sülfür taşıyan bir amino asittir. Taurin protein yapısında nadiren yer alır, daha ziyade hücre membranını stabilize etmek ve potasyum, sodyum, magnezyum, kalsiyum gibi iyonların membrandan geçişini kolaylaştırmak için biyolojik membranların yapısında yer alır; endojen olarak B6 vitaminin varlığında sistein amino asitinden sentezlenir. 5-FU direnç gelişiminden en çok etkilenen metabolit kreatinindir. Kreatinin hücrede enerji mekiği olarak görev yapan ve anlık

enerji ihtiyacı karşısında hızlı enerji temini sağlayan kreatinin yıkım ürünüdür. Kreatin ise arjinin, glisin ve metiyonin amino asitlerinden sentezlenen bir tripeptittir.

5-FU ile direnç gelişiminde Caco-2 hücrelerinde etkilendiği saptanan diğer metabolik yolak nükleik asit metabolizmasıdır. Nükleik asitlerden sitidin ve adenin düzeylerinin kontrole kıyasla arttığı; timin düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Sitidin bir pirimidin nükleoziti; adenin pürin bazı; timin ise pirimidin bazıdır. Bu bilgi doğrultusunda 5-FU'in etkisi ile hem pirimidin hem de pürin metabolizmasının etkilendiği sonucuna varılmıştır. Nükleik asitlerin yapı taşları olan nükleotidler bir pürin veya pirimidin baz, 5 karbonlu monosakkarit; riboz ve fosfattan oluşur. 5-FU ile direnç gelişiminde riboz 5-fosfatın düzeyi kontrol grubuna kıyasla 5 kattan fazla artış göstermiştir. Bu durum nükleotid yapımının hücrede arttığını; hücrede nükleik asit sentezi yapılacağını işaret etmektedir. Nükleik asitler DNA ve RNA'nın yer aldığı makromolekül ailesidir. DNA yapımı; hücre replikasyonu sırasında uyarılır, RNA yapımı ise protein sentezinin uyarılmasıyla aktive olur, protein sentezinin artması da metabolizmanın anabolizma bileşeninin aktif olduğunu; hücrenin bölünmeye gideceğini işaret eder. Kemoterapötik ajanlara karşı geliştirilen direncin temel göstergesi kontrolsüz hücre çoğalmasının önüne geçilememiş olmasıdır. Nükleik asit ve riboz 5 fosfat metabolizmasındaki bu değişiklikler direnç gelişiminin doğal sonucu olarak kabul edildiğinden elde edilen sonuçlar literatür bilgisi ile uyumludur (68, 69).

5-FU ile direnç gelişim sürecinde Krebs döngüsü ara bileşenlerinden malat ve α -ketoglutarat düzeyinin kontrole kıyasla anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir. Piruvat, malik enzimin katalizlediği bir reaksiyonla malata dönüşmektedir. Bu reaksiyonda ayrıca NADP^+ indirgenerek lipogenez için gerekli NADPH da oluşur. Bu tez kapsamında elde edilen lipidomiks verilerinden biyolojik membranların yapısında yer alan birçok membran lipidinin düzeyinde artış olduğu saptandığından; malik enzim reaksiyonu ile elde edilen NADPH 'ın özellikle membran lipidlerinin biosentezinde kullanılmak üzere üretilmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. Özellikle kanser hücrelerinde glikoliz yolunun aşırı çalışmasına bağlı olarak pirüvat miktarında artış olacağından pirüvatın malik enzim aracılığı ile malata çevrilmiş olacağı düşünülmüştür. α -ketoglutarat düzeyinde izlenen artış ise Krebs döngüsünün

hızındaki artıştan ziyade glutamat, transaminasyon ile α -ketoglutarata dönüştüğünden glutamat düzeyinde izlenen artışla ilişkilendirilmiştir.

CIS ile direnç geliştirilen gruba ait metabolomik profilin aminoasit metabolizmasına ait bölümünde ise sisplatin direnç gelişimi ile etkilendiği tespit edilen 6 metabolit bulunmaktadır. Bunlardan beşi (alanin, glutamik asit, treonin, alanin ve glisin) protein yapısında yer alan standart aminoasit iken diğeri esansiyel amino asit triptofandan endojen olarak sentezlenen ve bir nörotransmitter olan serotoninin prekürsörü; 5-hidroksi L-triptofandır. Kültür ortamında bulunan Caco-2 hücrelerinin serotonin sentezleyip degrade edebildikleri Vieira-Coelho ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışma ile de gösterilmiştir (72).

CIS ile elde edilen metabolomik profilden Krebs döngüsü arabileşenleri incelendiğinde ise döngünün beş ara bileşeninin (sitrik asit, malik asit, fumarik asit, α -ketoglutarat, cis-akonitat) de derişiminin kontrole kıyasla artmış olduğu tespit edilmiştir. Uzun zincirli yağ asitlerinin derişimlerinin azalmış olması da CIS direnç sürecinde lipolizin aktive olduğunu; bu katabolizma ile açığa çıkan asetil KoA birimlerinin de Krebs döngüsüne girerek enerji eldesinde kullanıldığını yansıtmaktadır.

CIS ile direnç gelişiminde Caco-2 hücrelerinde etkilendiği saptanan diğeri metabolik yolak nükleik asit metabolizmasıdır. Nükleik asitlerden timin, sitidin ve 5'-metiltiyoadenozin düzeylerinin kontrole kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Sitidin bir pirimidin nükleoziti; timin pirimidin bazı; 5'-metiltiyoadenozin ise pürin nükleozittir. CIS etkisi ile hem pirimidin hem de pürin metabolizmasının etkilendiği belirlenmiştir. 5'-metiltiyoadenozin; poliamin biyosentez yolunda metil grubu donörü olarak işlev gören S-adenozilmetiyoninden türer. Gen ekspresyonu, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi metabolik yolların düzenlenmesinde rol oynar. Bu bulgu, CIS ile gelişen direnç mekanizmasında proliferasyonun tekrar uyarılması amacıyla 5'-metiltiyoadenozin derişiminin artmış olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

Caco-2 hücreleri üzerinde in vitro koşullarda gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında 5-FU ve CIS ile direnç geliştirilmesi indüklenmiş; gelişen dirençte etkilenen metabolik yollar ya da metabolitler belirlenmiştir. İki kemoterapötik ajan

için farklı metabolomik profiller elde edilmiş olması nedeniyle bu iki ajana karşı geliştirilen direncin mekanizmasının Caco-2 hücreleri için farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 5-FU ile proliferasyonun anabolik yolların aktive olması ile uyarıldığı; bu durumun da en iyi biyolojik membran bileşenlerinin derişimin artışı ile tespit edilebildiği saptanmıştır. Özellikle miyoinozitolün ve taurinin direnç gelişiminin göstergesi olarak kullanılabilceği değerlendirilmesi yapılmıştır. CIS ile gelişen dirençte ise metabolomik profilde elde edilen kaymalar 5-FU ile elde edilen profil ile birebir örtüşmemektedir. CIS ile direnç gelişim sürecinde enerji metabolizmasının da etkilendiği; yağ asitlerinin enerji eldesinde kullanıldığı göz ardı edilmemelidir. 5'-metiltiyoadenozinin proliferasyonu uyarma açısından etkin bir bileşik olması nedeniyle CIS direnç gelişiminin göstergesi olarak 5'-metiltiyoadenozinin kullanılabilceği düşünülmüştür.

Deney protokolünde direnç gelişim aşamalarında kullanılan kanser hücre hattının (Caco-2; insan epitelyal kolorektal adenokarsinom hücreleri) sağlıklı kontrolü niteliğinde kullanılan hücre hattı FHC (insan normal kolon epitel hücreleri) hücreleridir. Deney süresince FHC hücre hattı Caco-2 hücreleri ile aynı muameleye tabi tutulmuştur. Bu hücrelerin deneyde kullanılma amacı sağlıklı hücreler ile kanserli hücrelerin antineoplastik ajanlara karşı verdikleri cevabın metabolomik profillerinin irdelenmesidir. Klinikte kemoterapötik ajan kullanımına bağlı karşılaşılan hücre temelli sorunların; kanserli hücrelerde kemoterapötik ajanlara karşı gelişen direncin ve sağlıklı hücrelerde etken madde kaynaklı toksisiteye bağlı gözlenen sağlıklı hücre kaybının; metabolomik profildeki etkilerinin saptanması da amaçlanmıştır.

5-FU ile muamele açısından Caco-2 ve FHC hücrelerinden elde edilen metabolomik profiller incelendiğinde iki profilin belirli metabolitler açısından çakıştığı; ancak profillerin ayrışması için kullanılabilcek metabolitlerin var olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle Caco-2 hücreleri ile elde edilen profilde en çok etkilenen metabolit profillerinin biyolojik membranların yapısında yer alan lipit türevi metabolitlerin profillerine ait olduğu; buna karşın FHC hücrelerinin uzun süreli 5-FU ile muamelesinde lipit metabolizmasına ait metabolitlerin profillerinin anlamlı düzeyde değişmediği saptanmıştır. FHC hücrelerinde 5-FU'e uzun süreli maruziyet sonucunda Caco-2 hücrelerinden farklı olarak aminoasitlerden beta-alanin, metiyonin,

prolin, N-asetilarjinin, N-asetil glutamik asit, hipotaurin ve triptofanın; Krebs döngüsü arabileşenlerinden ise sitrik asit başta olmak üzere süksinik asit ve fumarik asitin metabolomik profillerinin etkilendiği belirlenmiştir.

Bu veriler doğrultusunda FHC hücrelerinde 5-FU ile gözlenen ilaç toksisitesinde aminoasitlerden en çok beta-alanin, metiyonin ve Krebs döngüsü ara bileşenlerinden sitrik asit ve fumarik asit metabolizmasının etkilendiği; Caco-2 de gözlenen ilaç direncinde ise daha ziyade biyolojik membran lipitlerinin metabolizmasının etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır.

Direnç gelişimine bağlı olarak hücre dinamiklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk önce işaretlenme süresi belirlenmiştir. Farklı zamanlarda gerçekleştirilen işaretleme işlemi sonucunda 5 dakika işaretleme zamanı olarak belirlenmiştir. Böylece daha düşük işaretlenme yüzdesine sahip metabolitler de işaretlenebilmesi izlenilmiştir.

İşaretleme işlemi gerçekleştirilmiş hücre hatlarında metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdelerinin belirlenmesi için GC-MS ve LC-qTOF-MS sistemleri olmak iki farklı yöntem kullanılmıştır. GC-MS, monofosfat gibi polar bileşiklerin ayırımındaki yüksek etkinliğinden dolayı bu bileşiklerin analizinde kullanılmıştır. LC-qTOF-MS yöntemi ise özellikle GC-MS'de termal kararlılık göstermeyen fosfonükleotitlerin analizlerinde kullanılmıştır. İki farklı yöntem kullanılmasının diğer bir önemli nedeni seçiciliktir. Çünkü moleküldeki her bir oksijenin işaretlenmesi ile molekülün m/z değerinde 2 amu'luk artış olmaktadır. Bu durumda bileşiğin işaretsiz halinde bir girişim görülmezken işaretlenmeye bağlı olarak girişimler gözlenebilmektedir. Özellikle yakın kütle ve benzer özellikteki maddelerin birbirlerinden ayrılmasında sorunlar çıkmaktadır.

^{18}O ile zenginleştirmede işaretleme ajanı olarak ^{18}O işaretli su (H_2^{18}O) kullanılmıştır. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veri tabanına göre suyun rol aldığı yaklaşık olarak 3000 enzimatik reaksiyon bulunmaktadır. Bu durumda sadece fosfometabolitlerin değil suyun yer aldığı ve fosfat olmayan bileşiklerin de işaretlenmesi beklenmektedir. GC-MS ile yapılan analizlerde Krebs, amino asit, yağ

ve şeker metabolizmasında yer alan metabolitlerin işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır.

Fluksomiks teknolojisi omik teknolojileri arasında göreceli olarak daha nadiren kullanılan bir tekniktir. Herhangi bir yolaktaki ara ürünün döngü hızı hakkında bilgi veren bir yöntem olması nedeniyle söz konusu yolağın çalışma hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. 5-FU ile direnç geliştirilen Caco-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Krebs döngüsü ara ürünlerinden sitrik asit, alfa ketoglutarat, cis akonitik asit ve malik asit döngü hızlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4. 23). Döngü hızı tayin edilebilen Krebs asit döngüsü bileşenlerinden sitrik asit ve fumarik asit döngü hızlarında ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Döngü hızı tespit edilebilen ara ürünlerden (6 adet) çoğunluğunun (4 adet) işaretlenme yüzdelerinin artmış olması aslında döngünün hızının arttığına işaret etmektedir. Kalan 2 araürün (sitrik asit ve fumarik asit) için döngü hızında değişim saptanamamış olması bu iki ara ürünün hücrel bir çok yolda kullanılıyor olmasından ileri geldiği düşünülmektedir (73). Krebs döngüsünün analizlerde CIS ile elde edilen veriler ve 5-FU ile elde edilen verilerden farklılık göstermiştir. CIS ile direnç gelişimine paralel olarak Krebs döngüsü ara bileşenlerinden α -ketoglutarat dışında hiç birinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p > 0.05$) gözlenmemiştir. Bu doğrultuda, CIS ile oluşturulan direnç ile 5-FU ile oluşturulan direnç mekanizmasının Krebs döngüsü ara bileşenlerinin döngü hızlarına olan etkilerinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Glikolitik ve mitokondriyal metabolizmayı birleştiren G3P mekiği Caco-2 hücre hatlarında dirence bağlı olarak azalmıştır (Tablo 4.20). Bu durum G3P mekiğinin düzgün çalışmadığı ve mitokondri için gerekli süstratın sağlanmadığını göstermektedir (74, 75). G3P işaretlenme yüzdesi dolayısıyla da döngü sayısı 5-FU'de CIS' göre daha anlamlı azalmıştır ve ilk kez direnç gelişimine bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Şekil 4.24 ve 4.28). Bununla birlikte mitokondri için başka bir sağlayıcısı olan glutamik asitin işaretlenmesinde gözlemlenen düşüş mitokondrinin farklı mekiklerle de sağlanmadığını göstermektedir (Şekil 4.25 ve 4.29). Caco-2 hücrelerinde 5FU'ya bağlı olarak G6P döngü hızında bir değişim gözlenmezken CIS ile gözlemlenen dirençte azalma eğilimi göstermiştir. Hücrelerde enerji ihtiyacının

karşılanması için ATPase reaksiyonunun (ADP, Pi ve H +) nihai ürünlerinin çıkarılmasına ve ATP üretim bölgelerine metabolik sinyallerin iletilmesine bağlıdır (76, 77). Spesifik olarak, ATP hidrolizi sırasında ATPase enziminin bulunduğu bölgede üretilen ¹⁸O-işaretli inorganik fosfatların, γ -ATP'ye dahil edilecek ayrı bir ATP üretim alanına ulaşması gerekir. ATP üretiminin aktivasyonundaki gecikme, inorganik fosfatın işaretlenmesine kıyasla γ -ATP'in ¹⁸O işaretlenmenin farklı kinetiği ile sonuçlanacaktır. Böylece, inorganik fosfatın ve γ -ATP'in ¹⁸O işaretlenme kinetiğini takip ederek, hücre içi enerji iletişimi izlenebilir [17,67]. Çalışmamızda dirence bağlı olarak inorganik fosfatın ve γ -ATP'in ¹⁸O işaretlenme oranı değişmemiştir (Şekil 4.30). Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar yaşlanma miyokard biyoenerjitiğinin metabolik stres eğitimi ile iyileşme potansiyelini göstermektedir. Mitokondri mekiklerinde farklılık gözlenmesine rağmen oligofosfonükleotitlerin, inorganik fosfatın ve inorganik/ATP işaretlenme oranlarındaki anlamlı değişiklik gözlenmemesi mitokondri ve enerji metabolizmasının dinamikleri açısından dirence bağlı bir değişim olmadığını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda hücre hatlarında ayrı ayrı 5-FU ve CIS ile direnç geliştirilmiş; direnç gelişimine bağlı olarak hücre fenotipindeki değişiklikler metabolomik ve fluksomik tekniklerle incelenmiştir.

Metabolomik analizler 2 farklı yöntemle (GC-MS ve LC-qTOF-MS) yapılarak en geniş kapsamlı metabolit analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hücrelerin lipid düzeyindeki değişimleri LC-qTOF-MS temelli lipidomiks analizlerle de değerlendirilmiştir. Metabolomik analizler sonucunda elde edilen verilerle gerçekleştirilen çok veri analizinde dirence bağlı olarak metabolomik profillerde değişimler gözlemlenmiştir. Yapılan yolak analizlerinde her iki ajanın benzer yolakları etkilediği gözlemlenmiştir. Her iki ajanla da değişim saptanan yolaklar temelde malat-aspartat mekiği, aminoasit, amonyak metabolizmaları ile glikoz-alanin ve üre döngüleri olup bu yolaklarda da etkilenen metabolitlerin aynı olması dikkat çekicidir.

Fluksomik analizlerde de iki farklı analitik platform kullanılmıştır. GC-MS, monofosfat gibi polar bileşiklerin analizlerinde, LC-qTOF-MS ise fosfonükleotitlerin analizlerinde kullanılmıştır.

İlk kez ^{18}O bağlı işaretleme tekniği kanser hücre hatlarında hücre dinamiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Yine ilk kez Krebs, amino asit, yağ ve şeker metabolizmasında yer alan metabolitlerin ^{18}O işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır. İlaç direncine bağlı olarak krebs döngüsü metabolitlerinde, fosfonükleotilerde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir.

Bu tez kapsamında omik temelli araştırma tekniklerinin mekanizma bazlı çalışmalarda etkilenen yolakların ortaya konulması açısından yüksek potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, değişen ağların, süreçlerin ve yolakların belirlenmesine dayanarak elde edilen bilgilerin, yeni ilaç tasarımında, toksisite ve/veya direnç gelişiminde, tedavi sürecinin takibinde özgül biyobelirteçlerin tanımlanması açısından yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Warburg O. [Origin of cancer cells]. *Oncologia*. 1956;9(2):75-83.
2. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (New York, NY). 1956;124(3215):269-70.
3. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death & disease*. 2013;4:e532.
4. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes & development*. 2012;26(9):877-90.
5. Lee IJ, Hom K, Bai G, Shapiro M. NMR metabolomic analysis of caco-2 cell differentiation. *J Proteome Res*. 2009;8(8):4104-8.
6. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacological reviews*. 2012;64(3):706-21.
7. Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *International journal of cancer*. 2002;98(4):498-504.
8. Hu T, Li Z, Gao CY, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(30):6876-89.
9. Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M, et al. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2002;49(6):445-52.
10. Nemetlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.
11. Nemetlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D 31P NMR for monitoring 18O/16O isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(3):697-706.
12. Nemetlu E, Zhang S, Xu YZ, Terzic A, Zhong L, Dzeja PD, et al. Cardiac Resynchronization Therapy Induces Adaptive Metabolic Transitions in the Metabolomic Profile of Heart Failure. *J Card Fail*. 2015;21(6):460-9.
13. Mangalam A, Poisson L, Nemetlu E, Datta I, Denic A, Dzeja P, et al. Profile of Circulatory Metabolites in a Relapsing-remitting Animal Model of Multiple Sclerosis using Global Metabolomics. *Journal of clinical & cellular immunology*. 2013;4.
14. Zhang S, Nemetlu E, Terzic A, Dzeja P. Regenerative Metabolome and Energetic Signaling Mechanisms Governing Heart Renewal Capacity. *Circ Res*. 2012;111(4).

15. Zhang S, Nemetlu E, Terzic A, Dzeja P. Adenylate Kinase Phosphotransfer and AMP Signaling Regulate Cardiomyocyte Cell Cycle and Heart Regenerative Capacity. *Circulation*. 2012;126(21).
16. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7(2):e32737.
17. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in Mitochondrial Dynamics and Metabolomic Signatures of Evolving Energetic Stress in Mouse Models of Familial Alzheimer's Disease. *PloS one*. 2012;7(2).
18. Nemetlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. O-18-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.
19. Dzeja PP, Hoyer K, Tian R, Zhang S, Nemetlu E, Spindler M, et al. Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. *J Physiol-London*. 2011;589(21):5193-211.
20. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy JG, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*. 2007;2(11):2692-703.
21. Brown M, Dunn WB, Dobson P, Patel Y, Winder CL, Francis-McIntyre S, et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*. 2009;134(7):1322-32.
22. Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of metabolomics to cardiovascular biomarker and pathway discovery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(2):117-23.
23. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*. 2009;37:D603-D10.
24. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: A global biochemical approach to drug response and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2008;48:653-83.
25. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2008;1:45-69.
26. Lanza IR, Zhang SC, Ward LE, Karakelides H, Raftery D, Nair KS. Quantitative Metabolomics by H-1-NMR and LC-MS/MS Confirms Altered Metabolic Pathways in Diabetes. *PloS one*. 2010;5(5):1-10.
27. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical Biology*. 2008;5(1):011001-.
28. Villas-Boas SG, Bruheim P. The potential of metabolomics tools in Bioremediation studies. *Omics-a Journal of Integrative Biology*. 2007;11(3):305-13.

29. Weckwerth W. *Metabolomics: methods and protocols*: Humana Pr Inc; 2007.
30. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(2):443-58.
31. Zehethofer N, Pinto DM. Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis. *Anal Chim Acta*. 2008;627(1):62-70.
32. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S9-14.
33. Traini M, Jessup W. Exploring sterol and lipid biology in the functional genomic era. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(2):341-51.
34. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Juranic N, Macura S, Terzic A. Cellular energetics in the preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by 18O-assisted 31P NMR. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44812-9.
35. Janssen E, Dzeja PP, Oerlemans F, Simonetti AW, Heerschap A, de Haan A, et al. Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *EMBO J*. 2000;19(23):6371-81.
36. Griffin JL, Des Rosiers C. Applications of metabolomics and proteomics to the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy: lessons from downstream of the transcriptome. *Genome Med*. 2009;1(3):1-11.
37. Kelleher JK. Flux estimation using isotopic tracers: common ground for metabolic physiology and metabolic engineering. *Metabolic engineering*. 2001;3(2):100-10.
38. Kruger NJ, Ratcliffe RG. Insights into plant metabolic networks from steady-state metabolic flux analysis. *Biochimie*. 2009;91(6):697-702.
39. Paul Lee WN, Wahjudi PN, Xu J, Go VL. Tracer-based metabolomics: concepts and practices. *Clinical biochemistry*. 2010;43(16-17):1269-77.
40. Cornish-Bowden A, Cardenas ML. From genome to cellular phenotype - a role for metabolic flux analysis? *Nature Biotechnology*. 2000;18(3):267-8.
41. Dzeja PP, Terzic A, Wieringa B. Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;256(1-2):13-27.
42. Fischer E, Zamboni N, Sauer U. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived C-13 constraints. *Analytical Biochemistry*. 2004;325(2):308-16.
43. Noh K, Gronke K, Luo B, Takors R, Oldiges M, Wiechert W. Metabolic flux analysis at ultra short time scale: Isotopically non-stationary C-13 labeling experiments. *Journal of Biotechnology*. 2007;129(2):249-67.
44. Zamboni N. (13)C metabolic flux analysis in complex systems. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;22(1):103-8.

45. Nemetlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D P-31 NMR for monitoring O-18/O-16 isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(3):697-706.
46. Juranic N, Nemetlu E, Zhang S, Dzeja P, Terzic A, Macura S. P-31 NMR correlation maps of O-18/O-16 chemical shift isotopic effects for phosphometabolite labeling studies. *J Biomol Nmr*. 2011;50(3):237-45.
47. Stempel KE, Boyer PD. Refinement in oxygen-18 methodology for the study of phosphorylation mechanisms. *Methods in Enzymology*. 1986;VOL. 126:618-39.
48. Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from 18O labeling of metabolite phosphoryls. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15110-9.
49. Pucar D, Janssen E, Dzeja PP, Juranic N, Macura S, Wieringa B, et al. Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress. *J Biol Chem*. 2000;275(52):41424-9.
50. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, et al. Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by O-18-assisted P-31 NMR and H-1 NMR spectroscopy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;256(1-2):281-9.
51. Pucar D, Bast P, Gumina RJ, Lim L, Drahl C, Juranic N, et al. Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H776-82.
52. Dawis SM, Walseth TF, Deeg MA, Heyman RA, Graeff RM, Goldberg ND. Adenosine triphosphate utilization rates and metabolic pool sizes in intact cells measured by transfer of 18O from water. *Biophys J*. 1989;55(1):79-99.
53. Cohn M, Hu A. Isotopic (18O) shift in 31P nuclear magnetic resonance applied to a study of enzyme-catalyzed phosphate--phosphate exchange and phosphate (oxygen)--water exchange reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(1):200-3.
54. Zeleznikar RJ, Dzeja PP, Goldberg ND. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7311-9.
55. Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Suppression of creatine kinase-catalyzed Phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(22):12847-51.
56. Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium - Increased contribution in heart failure. *Circulation Research*. 1999;84(10):1137-43.
57. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*. 2006;571(Pt 2):253-73.

- 58.** Nobeli I, Ponstingl H, Krissinel EB, Thornton JM. A structure-based anatomy of the E-coli metabolome. *Journal of Molecular Biology*. 2003;334(4):697-719.
- 59.** Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Juranic N, Macura S, Terzic A. Cellular energetics in the preconditioned state - Protective role for phosphotransfer reactions captured by O-18-assisted P-31 NMR. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(48):44812-9.
- 60.** Duarte IF, Ladeirinha AF, Lamego I, Gil AM, Carvalho L, Carreira IM, et al. Potential Markers of Cisplatin Treatment Response Unveiled by NMR Metabolomics of Human Lung Cells. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(11):4242-51.
- 61.** He L, Zhu H, Zhou S, Wu T, Wu H, Yang H, et al. Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018;50(8):101.
- 62.** Zhang L, Song R, Gu D, Zhang X, Yu B, Liu B, et al. The role of GLI1 for 5-Fu resistance in colorectal cancer. *Cell & bioscience*. 2017;7:17-.
- 63.** Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Chen W-S. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2008;13(8):1551-69.
- 64.** Wu Y, Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *J Chromatogr A*. 2016;1430:80-95.
- 65.** Gioria S, Lobo Vicente J, Barboro P, La Spina R, Tomasi G, Urban P, et al. A combined proteomics and metabolomics approach to assess the effects of gold nanoparticles in vitro. *Nanotoxicology*. 2016;10(6):736-48.
- 66.** Lamers R-JA, Wessels EC, van de Sandt JJ, Venema K, Schaafsma G, van der Greef J, et al. A pilot study to investigate effects of inulin on Caco-2 cells through in vitro metabolic fingerprinting. 2003;133(10):3080-4.
- 67.** Meng X, Fu R. miR-206 regulates 5-FU resistance by targeting Bcl-2 in colon cancer cells. *OncoTargets and therapy*. 2018;11:1757-65.
- 68.** Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, et al. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer*. 1998;78(8):986-92.
- 69.** Wu DW, Huang CC, Chang SW, Chen TH, Lee H. Bcl-2 stabilization by paxillin confers 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Cell Death Differ*. 2015;22(5):779-89.
- 70.** Bonneau B, Prudent J, Popgeorgiev N, Gillet G. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(7):1755-65.
- 71.** Unfer V, Facchinetti F, Orru B, Giordani B, Nestler J. Myo-inositol effects in women with PCOS: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocr Connect*. 2017;6(8):647-58.
- 72.** Vieira-Coelho MA, Teixeira VL, Guimaraes JT, Serrao MP, Soares-da-Silva P. Caco-2 cells in culture synthesize and degrade dopamine and 5-

hydroxytryptamine: a comparison with rat jejunal epithelial cells. *Life Sci.* 1999;64(1):69-81.

73. Nemetlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by O-18-assisted P-31 NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics.* 2012;44(7):386-402.

74. Scholz TD, Koppenhafer SL, TenEyck CJ, Schutte BC. Developmental regulation of the alpha-glycerophosphate shuttle in porcine myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(6):1605-13.

75. Nemetlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by ¹⁸O-assisted ³¹P NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics.* 2012.

76. Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep.* 2000;2(3):212-7.

77. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Juranic N, Macura S, Terzic A. Cellular energetics in the preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by 18O-assisted 31P NMR. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(48):44812-9.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda herhangi bir etik kurulu iznine gerek yoktur.

EK 2. Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

Turnitin

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gürkan Özen
 Ödev başlığı: Gürkan Doktora Tez Final
 Gönderi Başlığı: METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇA
 Dosya adı: Dosya boyutu: 4.29 M
 Sayfa sayısı: 130
 Kelime sayısı: 37,481
 Karakter sayısı: 187,895
 Gönderim Tarihi: 19- Haz-2019 05:25PM (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1145241842

T.C.
 HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
 SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇALIŞMALAR İLE KOLON
 KANSERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERE KARŞI DİRENCİNİN
 VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Gürkan ÖZEN

Analitik Kimya Programı
 DOKTORA TEZİ

ANKARA
 2019

METABOLOMİK VE FLUKSOMİK ÇALIŞMALAR İLE KOLON KANSERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERE KARŞI DİRENCİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6 BENZERLİK ENDEKSİ	%5 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%5 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
2	git.embl.de İnternet Kaynağı	%1
3	www.hmdb.ca İnternet Kaynağı	<%1
4	anes.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	phytohub.eu İnternet Kaynağı	<%1
6	adan-embl.ibmcm.umh.es İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
8	bidd2.nus.edu.sg İnternet Kaynağı	<%1

EK 3. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması:

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

$$\text{Standart Hata Hesaplanması: Standart Hata (SH)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\sqrt{\text{Ölçüm sayısı}}}$$

$$\text{Merkezi ortalamaştırma: } \tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$$

\tilde{x}_{ij} : Normalize edilmiş değer

x_{ij} : Metabolit pik alanı

\bar{x}_i : Metabolit ortalama pik alanı

$$\text{Otomatik ölçeklendirme: } \tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i}$$

s_i : Standart sapma

$$\text{Aralık ölçeklendirme: } \tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{(x_{i \text{ maks}} - x_{i \text{ min}})}$$

$x_{i \text{ maks}}$: En yüksek metabolit pik alanı

$x_{i \text{ min}}$: En küçük metabolit pik alanı

$$\text{Paretro ölçeklendirme: } \tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}}$$

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Ankara'da doğdum. İbn-i Sina Lisesini'ni bitirdikten sonra 1999 yılında girdiğim Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi'nden 2004 yılında mezun oldum. 2005 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım ve 2009 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2012 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım ve halen aynı bölümde eğitimime devam etmekteyim. Evliyim ve iki çocuk babasıyım.