

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

**GLİOBLASTOMA MULTİFORME, MENENJİYOM (BİRİNCİL)  
VE METASTAZ (İKİNCİL) BEYİN TÜMÖRLERİNE AİT  
FENOTİPLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILACAK  
BÜTÜNLEŞİK OMİKS ANALİZLER İÇİN ANALİTİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**Uzm. Kim. Cemil Can EYLEM**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2022**



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

**GLİOBLASTOMA MULTİFORME, MENENJİYOM (BİRİNCİL)  
VE METASTAZ (İKİNCİL) BEYİN TÜMÖRLERİNE AİT  
FENOTİPLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILACAK  
BÜTÜNLEŞİK OMİKS ANALİZLER İÇİN ANALİTİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**Uzm. Kim. Cemil Can EYLEM**

**Analitik Kimya Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN**

**ANKARA**

**2022**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GLİOBLASTOMA MULTİFORME, MENENJİYOM (BİRİNCİL) VE**  
**METASTAZ (İKİNCİL) BEYİN TÜMÖRLERİNE AİT FENOTİPLERİN**  
**BELİRLENMESİNDE KULLANILACAK BÜTÜNLEŞİK OMİKS ANALİZLER**  
**İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULANMASI**

**Cemil Can Eylem**

**Danışman: Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman**

Bu tez çalışması 27.06.2022 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Sedef Kır*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Dilek Ak*  
*(Anadolu Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Murat Palabıyık*  
*(Ankara Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. İncilay Süslü*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*
- Üye:** *Prof. Dr. Emirhan Nemutlu*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

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

06 Temmuz 2022

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



## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

04/07/2022

Cemil Can EYLEM

<sup>i</sup>“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 danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya 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 internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

## ETİK BEYAN

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

Uzm. Kim. Cemil Can EYLEM

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında değerli bilgi ve birikimiyle bana destek olup mesleki ve bilimsel birikimiyle bana yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman'a,

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Sedef Kır ve Sayın Prof. Dr. Dilek Ak'a,

Tez sürecim boyunca desteklerini esirgemeyip yardımına koşan Prof. Dr. Emirhan Nemutlu ve Doç. Dr. Ayşegül Doğan'a,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma ve bana destek olan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam için örneklerin toplanmasına imkan sağlayan ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ali İhsan Ökten ve çalışma arkadaşlarıma,

Bursiyer olarak bana destek veren TÜBİTAK (2211-A) ve YÖK'e (100/2000),

Tez çalışmamı destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatımın her anında sevgi ve destekleriyle yanımda olan AİLEME,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

## ÖZET

**Eylem, C. C., Glioblastoma Multiforme, Menenjiyom (Birincil) ve Metastaz (İkincil) Beyin Tümörlerine ait Fenotiplerin Belirlenmesinde Kullanılacak Bütünleşik Omiks Analizler için Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Uygulanması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2022.** Genotip ve fenotip arasındaki doğrudan nedensel ve fonksiyonel bağlantıları göstermek için protein, metabolit ve lipit gibi ara moleküler seviyelerin kapsamlı şekilde incelenmesi çok önemlidir. Kapsamlı metabolomik ve lipidomik analizler için birden çok analitik tekniğe ve analiz koşullarının optimizasyonuna ihtiyaç vardır. Çalışma kapsamında metabolomik analizler eş zamanlı olarak GC-MS ve LC-qTOF-MS ile lipidomik analizler ise LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiş ve kullanılan analitik yöntemler çeşitli deneysel tasarımlar ile optimize edilmiştir. Plazma örnekleri için metanol:su:kloroform (3:1:3, h/h/h), doku örnekleri için ise metanol:su:diklorometan (2:1:3, h/h/h) metabolitlerin, lipitlerin ve hatta proteinlerin tüketilmesi için optimum çözücü karışımları olarak belirlenmiştir. Doku örneklerinin GC-MS temelli metabolomik analizleri için sililleme reaktifinin inkübasyon süresi ve sıcaklığının, metoksiamin derişimi-metanol hacmi etkileşiminin, plazma örnekleri içinse metoksiamin derişimi ile sililleme reaktifinin inkübasyon süresinin ve metanol-metoksiamin hacmi etkileşiminin analiz sonuçlarını etkileyen önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler için uçurulan örneklerin yeniden çözülmesinde kullanılan hareketli faz bileşiminin hem doku hem de plazma örneklerinden yapılan analizlerin sonuçlarını etkilediği tespit edilmiştir. LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin kromatografik koşullarına etki eden parametreler ise Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. Metabolomik ve lipidomik analizler için geliştirilen analitik yöntemler beyin tümörlü hasta grupları ile kontrol grubunu oluşturan bireylerden toplanan doku ve plazma örneklerine uygulanmış ve bu tümörlere ait fenotipler aydınlatılarak sonuçlar klinik açıdan bütüncül olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel tasarım, GC-MS, LC-qTOF-MS, metabolomik, lipidomik

**Destekleyen Kurumlar:** H.Ü. B.A.P. Kapsamlı Araştırma Projesi (TSA-2020-18566)

## ABSTRACT

**Eylem, C. C., Development and Implementation Analytical Methods for Integrated Omics Analyses to be used to Identify Phenotypes of Glioblastoma Multiforme, Meningioma (Primary) and Metastasis (Secondary) Brain Tumors, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2022.** A thorough examination of intermediate molecular levels such as protein, metabolite, and lipid is required to establish direct causal and functional links between genotype and phenotype. Comprehensive metabolomics and lipidomics analysis require the optimization of analysis conditions, as well as the use of multiple analytical techniques. In the thesis, metabolomics analyses were performed with GC-MS and LC-qTOF-MS, and lipidomic analyses were carried out with LC-qTOF-MS. The analytical techniques utilized were optimized with several experimental designs. The optimum solvent combinations for the extraction of metabolites, lipids, and even proteins were determined to be methanol:water:chloroform (3:1:3, v/v/v) for plasma samples and methanol:water:dichloromethane (2:1:3, v/v/v) for tissue samples. For GC-MS based metabolomics analyses performed with tissue samples; incubation time and temperature of silylation reagent, methoxyamine concentration-methanol volume interaction, and for plasma samples; methoxyamine concentration, incubation time of silylation reagent and methanol-methoxyamine volume interaction, were found to be important parameters affecting the analysis results. The mobile phase composition used as reconstitution solution for LC-qTOF-MS based metabolomics analyses was determined to have a significant effect on the analysis results. The Box-Behnken design was used to optimize the parameters affecting the chromatographic conditions of LC-qTOF-MS based metabolomics and lipidomics analyses. The developed analytical methods were applied to tissue and plasma samples of patients and control groups. The phenotypes of the tumors were illuminated by comparing them to the control group, and the results were evaluated in a holistic manner from a clinical point of view.

**Keywords:** Design of Experiment, GC-MS, LC-qTOF-MS, metabolomics, lipidomics  
**Supported by:** H.U. S.R.P. Comprehensive Research Project (TSA-2020-18566)

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xxiii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Kanser ve Beyin Tümörleri	4
2.1.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	5
2.1.2. Beyin Tümörlerinin Derecesi	5
2.1.3. Beyin Tümörlerinin Etiyolojisi	6
2.1.4. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi	7
2.1.5. Beyin Tümörlerinin Patogenezi	8
2.1.6. Beyin Tümörlerinin Tanısı, Tedavisi ve Prognozu	10
2.1.7. Beyin Tümörlerinden Metabolomik ve Lipidomik Analizlere ait Kaynak Özeti	12
2.2. Sistem Biyolojisi	19
2.3. Omiks Teknolojileri	20
2.3.1. Genomik	21
2.3.2. Transkriptomik	22
2.3.3. Proteomik	22
2.3.4. Metabolomik	23
2.3.5. Lipidomik	24
2.4. Bütünleşik Omiks Analizler	25
2.4.1. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin Tarihsel Gelişimi	26
2.4.2. Metabolomik ve Lipidomik İlişkisi	28

2.4.3. Metabolitler ve Metabolit Sınıfları	28
2.4.4. Lipit ve Lipit Sınıfları	29
2.5. Metabolomik ve Lipidomik Analizler	32
2.5.1. Örnek Seçimi ve Toplanması	33
2.5.2. Örneklerin Tüketilmesi	34
2.5.3. Örnek Hazırlama Basamağı	38
2.5.4. Enstrümental Analiz	39
2.5.5. Veri Analizi	68
2.6. Kemometri	71
2.6.1. Deneysel Tasarım Terminolojisi	72
2.6.2. DoE	73
2.6.3. DoE ve OVAT Yaklaşımlarının Karşılaştırılması	76
2.6.4. Tarama tasarımları	77
2.6.5. Optimizasyon tasarımları	78
2.6.6. Tasarım Matrisleri	78
2.6.7. Faktöriyel Tasarımlar	78
2.6.8. D-optimal Tasarım (228-230)	81
2.6.9. Box-Behnken Tasarımı	84
2.6.10. Deneysel Tasarım Modellerinin Değerlendirilmesi (220)	86
2.6.11. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda Deneysel Tasarım	92
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>94</b>
3.1. Kimyasal Maddeler	94
3.2. Cihazlar	95
3.3. Cam ve Sarf Malzemeler	95
3.4. Yazılımlar	96
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	96
3.6. Plazma ve Doku Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	97
3.7. Bütünleşik Omiks Analizler için Doku Örneklerinin Hazırlanması	98
3.7.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Eş Zamanlı Tüketilmesi	98
3.7.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme	99
3.7.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik ve Lipidomik Analizler için Örneklerin Hazırlanması	99

3.8. Bütünleşik Omiks Analizler için Plazma Örneklerinin Hazırlanması	100
3.8.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Eş Zamanlı Tüketilmesi	100
3.8.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme	100
3.8.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik ve Lipidomik Analizler için Örneklerin Hazırlanması	101
3.9. Enstrümental Analizler	101
3.9.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler	101
3.9.2. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizler	102
3.9.3. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizler	103
3.10. Veri Analizi	105
3.11. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin DoE ile Optimizasyonu	107
3.12. Optimizasyon Çalışmaları	108
3.12.1. Doku Örneklerinden DoE ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	108
3.12.2. Plazma Örneklerinden DoE ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	113
3.12.3. Enstrümental Analizler	117
3.12.4. Veri Analizi	118
<b>4. BULGULAR</b>	121
4.1. Doku Örneklerine ait Metabolomik ve Lipidomik Analiz Sonuçları	121
4.1.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Tüketme Basamağının Optimizasyonu	121
4.1.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu	125
4.1.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağının Optimizasyonu	129
4.1.4. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu	132
4.1.5. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu	135
4.1.6. Doku Örneklerine ait Tanımlanan Metabolitler, Lipitler ve İstatistiksel Analiz Sonuçları	138
4.1.7. Doku Örneklerine ait Çok Değişkenli Veri Analizleri	162
4.1.8. Doku Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi	165
4.2. Plazma Örneklerine ait Metabolomik ve Lipidomik Analiz Sonuçları	170



4.2.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Tüketme Basamağının Optimizasyonu	170
4.2.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu	174
4.2.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağının Optimizasyonu	178
4.2.4. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu	181
4.2.5. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu	184
4.2.6. Plazma Örneklerine ait Tanımlanan Metabolitler, Lipitler ve İstatistiksel Analiz Sonuçları	187
4.2.7. Plazma Örneklerine ait Çok Değişkenli Veri Analizleri	202
4.2.8. Plazma Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi	205
4.3. Plazma ve Doku Örneklerine ait Yolak Analizleri	208
<b>5. TARTIŞMA</b>	212
5.1. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin Optimizasyonu	212
5.1.1. Doku Örneklerinden Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	213
5.1.2. Plazma Örneklerinden Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	217
5.1.3. Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	218
5.2. Optimize Yöntemlerin Gerçek Örneklere Uygulanması	224
5.2.1. Doku Örnekleri	227
5.2.2. Plazma Örnekleri	232
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	240
<b>7. KAYNAKLAR</b>	244
<b>8. EKLER</b>	
EK-1: İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK-2: Kodlanmış Matematiksel Model	
EK-3: Tez Çalışmasına ait Etik Kurul İzni	
EK-4: Orjinallik Raporu	
EK-5: Digital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>2-DG</b>	2-Deoksi-D-Glukoz
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>ADK</b>	Anyon Değişim Kromatografisi
<b>AF</b>	Amonyum Format
<b>AKT1</b>	Alfa Serin/Treonin-Protein Kinaz
<b>ALK</b>	Anaplastik Lenfoma Kinaz
<b>APCI</b>	Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonizasyon
<b>APPI</b>	Atmosferik Basınçta Foto İyonizasyon
<b>APS</b>	Ayrıştırılan Pik Sayısı
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>AUC</b>	ROC Eğrisi Altında Kalan Alan
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>BSS</b>	Bağlı Standart Sapma
<b>BSTFA</b>	N,O-Bis (Trimetilsilil) Trifloroasetamid
<b>BT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>CBS</b>	Kaplamalı Bıçak Sprey
<b>CBTRUS</b>	Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kayıtları
<b>CDKN2A</b>	Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
<b>CE</b>	Kolesteril Ester
<b>CE-MS</b>	Kapiler Elektroforez Kütle Spektrometresi
<b>CI</b>	Kimyasal İyonizasyon
<b>CNS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>CTP</b>	Sitidin Trifosfat
<b>dak</b>	Dakika
<b>D (X)</b>	İsteklilik Fonsiyonu
<b>DC</b>	Doğru Akım
<b>DESI</b>	Desorpsiyon Elektrosprey İyonizasyon
<b>DFPS</b>	Difenil Polisiloksan
<b>DG</b>	Diaçilgliserol
<b>DKT</b>	Düzeltilmiş Kareler Toplamı

<b>DM</b>	Dimetil
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DoE</b>	Deneysel Tasarım
<b>EDTA</b>	Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>EI</b>	Elektron İyonizasyon
<b>ESI</b>	Elektrosprey İyonizasyon
<b>eV</b>	Elektron Volt
<b>FA</b>	Formik Asit
<b>fg</b>	Femtogram
<b>FTICR</b>	Fourier Dönüşümü İyon Siklotron Rezonans
<b>GBM</b>	Glioblastoma Multiforme
<b>GC-MS</b>	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
<b>GL</b>	Gliserolipitler
<b>GLOBOCAN</b>	Küresel Kanser Gözlemevi
<b>GP</b>	Gliserofosfolipitler
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrojen
<b>He</b>	Helyum
<b>HETP</b>	Teorik Tabakaya Eşdeğer Yükseklik
<b>HILIC</b>	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
<b>HLB</b>	Hidrofilik-Lipofilik Partikül
<b>HMP</b>	İnsan Metabolom Projesi
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>IARC</b>	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
<b>ICE</b>	In-Line Kartuş Tüketmesi
<b>IDH</b>	Izositrat Dehidrogenaz
<b>IMS</b>	İyon Hareketlilik Spektrometresi
<b>IPA</b>	Izopropil Alkol
<b>IUBMB</b>	Uluslararası Biyokimya Ve Moleküler Biyoloji Birliği
<b>IUPAC</b>	Uluslararası Temel Ve Uygulamalı Kimya Birliği
<b>İAMS</b>	İstatistiksel Olarak Anlamlı Değişim Gösteren Metabolit Sayısı
<b>KRAS</b>	Kirsten Fare Sarkom Virüsü

<b>L</b>	Litre
<b>LDL</b>	Lipoprotein
<b>LDLR</b>	Lipoprotein Reseptörü
<b>LC-MS</b>	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
<b>LC-qTOF-MS</b>	Sıvı Kromatografisi-Dört Kutuplu Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi
<b>LPA</b>	Lizofosfatidik Asit
<b>m/z</b>	Kütle/Yük
<b>mg</b>	Miligram
<b>MALDI</b>	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
<b>MCCV</b>	Monte-Carlo Çapraz Validasyonu
<b>MeOX</b>	Metoksiamin Hidroklorür
<b>MGMT</b>	O <sup>6</sup> -Metilguanin-DNA Metiltransferaz
<b>MKT</b>	Merkezi Kompozit Tasarım
<b>mL</b>	Mililitre
<b>MTBE</b>	Metil Tert Bütül Eter
<b>mTORC1</b>	Rapamisin Kompleksi 1'in Mekanik Hedefi
<b>MRI</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MRS</b>	Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>MS</b>	Kütle Spektrometresi
<b>MSTFA</b>	N-Metil-N-(Trimetilsilil) Trifloroasetamid
<b>MTBSTFA</b>	N-Tert- Butildimetilsilil-N-Metiltrifloroasetamid
<b>N</b>	Teorik Tabaka Sayısı
<b>N<sub>2</sub></b>	Azot
<b>NF2</b>	Nörofibromatozis Tip 2
<b>NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>OPLS-DA</b>	Orthogonal Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi
<b>OVAT</b>	Tek Seferde Tek Faktör
<b>PA</b>	Fosfatidik Asit
<b>Pa</b>	Paskal
<b>PC</b>	Fosfatidilkolin
<b>PCA</b>	Temel Bileşen Analizi

<b>PD-1</b>	Programlı Hücre Ölüm Proteini 1
<b>PD-L1</b>	Programlı Hücre Ölüm Ligandı 1
<b>PDFGR</b>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamin
<b>PET</b>	Pozitron Emisyon Tomografi
<b>pg</b>	Pikogram
<b>PLOT</b>	Gözenekli Katmanlı Açık Kapiler
<b>PLS-DA</b>	Kısmi En Küçük Kareler-Diskriminant Analizi
<b>PR</b>	Prenol Lipitler
<b>PS</b>	Fosfatidilserin
<b>q</b>	Dört Kutuplu Kütle Analizörü
<b>QC</b>	Kalite Kontrol
<b>qTOF</b>	Dört Kutuplu Uçuş Zamanlı
<b>REIMS</b>	Hızlı Buharlaşmalı İyonizasyon Kütle Spektrometresi
<b>RF</b>	Radyo Frekansı
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SCOT</b>	Destek Kaplı Açık Kapiler
<b>SIM</b>	Seçici İyon İzleme
<b>SL</b>	Sakkarolipitler
<b>SM</b>	Sfingomiyelin
<b>SMO</b>	Kıvrılmış Sınıf Alıcısı
<b>SP</b>	Sfingolipitler
<b>SPECT</b>	Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>ST</b>	Sterol Lipitler
<b>SV</b>	Destekli Vektör Makinesi
<b>TBDMCS</b>	Tert-Butildimetilchlorosilan
<b>TBDMS</b>	Tert-Butildimetilsilil
<b>TG</b>	Triaçilgliserol
<b>TMCS</b>	Trimetilchlorosilan
<b>TMS</b>	Trimetilsilil
<b>TPA</b>	Toplam Pik Alanı

<b>TP53</b>	Tümör Proteini 53
<b>TRAF7</b>	TNF Reseptörü İlişkili Faktör 7
<b>UHPSFC</b>	Ultra Yüksek Performanslı Süper Kritik Akışkan Kromatografisi
<b>WCOT</b>	Çeperi Kaplı Açık Kapiler
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>amol</b>	Attomol
<b>x</b>	Faktör
<b>y</b>	Cevap
<b><math>\mu</math>A</b>	Mikroamper
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	Mikrometre
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Sistem biyolojisi alanında kullanılan omiks teknolojileri.	20
2.2. Lipit sınıfları.	30
2.3. Metabolit ve lipit sınıflarının analiz edildiği enstrümental teknikler.	41
2.4. GC şematik gösterimi.	43
2.5. Taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafiği.	44
2.6. GC'deki enjeksiyon modlarının şematik gösterimi.	46
2.7. GC kolon çeşitleri.	48
2.8. MS analizlerinden elde edilen kromatogram ve kütle spektrumu.	52
2.9. GC-MS'nin şematik gösterimi.	52
2.10. EI şematik gösterimi.	55
2.11. Dört kutuplu analizörün çalışma prensibinin şematik gösterimi.	57
2.12. LC şematik gösterimi.	58
2.13. Yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleri.	64
2.14. ESI'nın şematik gösterimi.	66
2.15. TOF-MS'nin şematik gösterimi.	68
2.16. DoE yaklaşımları için genel bir gösterim olan süreç modeli.	75
2.17. DoE metodolojisine ait uygun deneyler yürütmek için genel şema.	76
2.18. OVAT ve DoE yöntemlerinin karşılaştırılması.	77
2.19. Tam faktöriyel tasarımlar.	79
2.20. İki seviyeli ( $2^{k-1}$ ) üç faktörlü kısmi faktöriyel tasarıma ( $2^{3-1}=4$ ) ait şematik gösterimi.	81
2.21. A) Simetrik $3^2$ tam faktöriyel tasarım, B) asimetrik $3^2$ tam faktöriyel tasarım, C) asimetrik tasarımdaki aday model noktaları, D) 8 deneyden oluşan D-optimal tasarım için seçilmiş model noktaları.	82
2.22. Üç faktör için temsili optimizasyon tasarımları.	85
2.23. Temsili iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım matrisi.	87
2.24. Cevap değişkeni, tasarım matrisi ve katsayılar arasındaki ilişkiye ait şematik gösterim.	87
2.25. Deneysel tasarım seçim rehberi.	92
3.1. Doku örnekleri için optimize edilmiş deneysel koşullar.	104
3.2. Plazma örnekleri için optimize edilmiş deneysel koşullar.	105
3.3. DoE ile yapılan optimizasyon çalışmalarına ait şematik gösterim.	108

- 4.1. Doku örnekleri için D-optimal karışım tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü.. 124
- 4.2. Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için en yüksek isteklilik değerine sahip optimum çözücü karışımını gösteren rampa grafikleri. 124
- 4.3. Diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin doku örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkilerinin incelenmesi. 125
- 4.4. Doku örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. 127
- 4.5. Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 128
- 4.6. Doku örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 129
- 4.7. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. 131
- 4.8. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 132
- 4.9. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 132
- 4.10. Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 135
- 4.11. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 135
- 4.12. Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 138
- 4.13. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 138
- 4.14. Doku örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipit sayıları. 139
- 4.15. Doku örneklerinden metabolomik analizlere ait örnek kromatogramlar. 140



- 4.16.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS (pozitif ve negatif iyonizasyon) ile yapılan lipidomik analizlere ait örnek kromatogramlar. 147
- 4.17.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiği. 162
- 4.18.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri. 163
- 4.19.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (GBM ve kontrol grubu). 164
- 4.20.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (menenjiyom ve kontrol grubu). 164
- 4.21.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (metastaz ve kontrol grubu). 165
- 4.22.** Doku örneklerinden GBM hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 167
- 4.23.** Doku örneklerinden menenjiyom hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 168
- 4.24.** Doku örneklerinden akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 169
- 4.25.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 173
- 4.26.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için en yüksek isteklilik değerine sahip optimum çözücü karışımını gösteren rampa grafiği 173
- 4.27.** Diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin plazma örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkilerinin incelenmesi. 174
- 4.28.** Plazma örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. 176
- 4.29.** Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 177
- 4.30.** Plazma örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiği. 178
- 4.31.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. 180

- 4.32. Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 181
- 4.33. Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 181
- 4.34. Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 184
- 4.35. Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 184
- 4.36. Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. 187
- 4.37. Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı. 187
- 4.38. Plazma örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipit sayıları. 188
- 4.39. Plazma örneklerinden metabolomik analizlere ait örnek kromatogramlar. 189
- 4.40. Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS (pozitif ve negatif iyonizasyon) ile yapılan lipidomik analizlere ait örnek kromatogramlar 196
- 4.41. Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait PCA skor grafiğı. 202
- 4.42. Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilere ait çok değişkenli veri analizleri.. 203
- 4.43. Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (GBM ve kontrol grubunun karşılaştırması). 204
- 4.44. Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (menenjiyom ve kontrol grubunun karşılaştırması). 204
- 4.45. Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (metastaz ve kontrol grubunun karşılaştırması). 205
- 4.46. Plazma örneklerinden GBM hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 206
- 4.47. Plazma örneklerinden menenjiyom hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 207

- 4.48.** Plazma örneklerinden akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. 208
- 4.49.** Kontrol grubuna karşı GBM hastalarına ait yolak analizi etki grafiği. 209
- 4.50.** Kontrol grubuna karşı menenjiyom hastalarına ait yolak analizi etki grafiği. 210
- 4.51.** Kontrol grubuna karşı akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalara ait yolak analizi etki grafiği. 211

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. GBM, menenjiyom ve akciğer beyin metastazı beyin tümörlerinin biyolojik materyallerden metabolomik ve lipidomik analizleri.	15
2.2. Taşıyıcı gazların avantaj ve dezavantajları.	45
2.3. GC dedektörlerine ait seçicilik ve gözlenebilme sınırı değerleri.	50
2.4. API iyonizasyon tekniklerinin özellikleri.	65
2.5. 2 faktör ( $2^2$ ), 3 faktör ( $2^3$ ) ve 4 faktör ( $2^4$ ) için iki seviyeli tam faktöriyel tasarım tablosu.	80
2.6. Üç faktör için D-optimal karışım tasarımı.	84
2.7. Üç faktör için Box-Behnken tasarımı	85
2.8. Örnek faktörler ve seviye değerleri.	88
2.9. Örnek regresyon katsayıları ve tahmini cevap değerleri.	88
2.10. Tasarımdaki faktörlere ait kodlanmış seviye değerleri.	89
2.11. Kodlanmış seviye değerlerine göre Tablo 2.9.'daki katsayılarla ait yeni değerler.	90
2.12. Metabolomik ve lipidomik çalışmaların örnek hazırlama ve yöntem geliştirme basamaklarına ait DoE uygulamaları	93
3.1. Optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.	102
3.2. Metabolomik analizler için gradient elüsyon koşulları.	102
3.3. Optimize edilmiş LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.	103
3.4. Lipidomik analizler için gradient elüsyon koşulları.	103
4.1. Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	122
4.2. Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için oluşturulan D-optimal karışım tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	123
4.3. Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	126
4.4. Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	128
4.5. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	130
4.6. Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistiklerine ait sonuçlar.	131

<b>4.7.</b> Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	133
<b>4.8.</b> Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	134
<b>4.9.</b> Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	136
<b>4.10.</b> Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	137
<b>4.11.</b> Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.	141
<b>4.12.</b> Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.	148
<b>4.13.</b> Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	171
<b>4.14.</b> Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	172
<b>4.15.</b> Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	175
<b>4.16.</b> Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	177
<b>4.17.</b> Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	179
<b>4.18.</b> Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistiklerine ait sonuçlar.	180
<b>4.19.</b> Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	182
<b>4.20.</b> Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	183
<b>4.21.</b> Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.	185
<b>4.22.</b> Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.	186
<b>4.23.</b> Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.	190
<b>4.24.</b> Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.	197

- 4.25.** GBM hastalarında istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipitlerin yer aldığı yolaklar. 209
- 4.26.** Menenjiyom hastalarında istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipitlerin yer aldığı yolaklar. 210
- 4.27.** Akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalarda istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipitlerin yer aldığı yolaklar. 211

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Intrakraniyal tümör olarak bilinen beyin tümörü, hücrelerin kontrol edilemez şekilde çoğaldığı, anormal bir doku kütesidir. Beyin tümörleri beyin dokusundan kaynaklanan benzersiz biyolojisi, prognozu ve tedavisi olan bir grup neoplazmi temsil eder (1). Beyin tümörleri yaş, cinsiyet, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte popülasyonlar arasında da farklılık göstermektedir (2). Beyin tümörleri genel olarak iyi veya kötü huylu olarak tanımlanır.

Günümüzde 150'den fazla farklı beyin tümörü belgelenmiş olup birincil (primer) ve ikincil (metastatik) olmak üzere iki ana grubu ayrılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kayıtları (CBTRUS)'na göre menenjiyom en sık görülen beyin tümürüdür ve birincil beyin tümörlerinin %39'unu oluşturur. Glioblastoma multiforme (GBM) ise bir yıldan daha uzun bir ortalama sağ kalım oranı ile korkunç bir prognoza sahiptir ve kötü huylu birincil beyin tümörlerinin %49,1'ini oluşturur. Metastatik beyin tümörlerinin ise tam insidansı bilinmemekle birlikte birincil beyin tümörlerinden 10 kat daha yaygın olduğu tahmin edilmektedir (3, 4). Beyin tümörlerinin patogenezi çok karmaşık olup oluşumlarında ve gelişimlerinde çok sayıda gen ve proteinin rol aldığı bilinsede mekanizmaları hala net değildir. Bunun en temel nedeni sadece genomik veya proteomik analizlerden elde edilen veri seti ile sınırlı sayıda bilgi elde edilmesidir. Sadece bu bilgiler ile hastalıkların oluşumlarına ve gelişimlerine ait biyolojik mekanizmalar yeteri kadar açıklanamamaktadır.

Günümüzde karmaşık biyolojik sistemlerin hesaplamalı ve matematiksel modellenmesine olanak tanıyan sistem biyolojisi ile hedeflenmemiş genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve lipidomik gibi karmaşık analizler gerçekleştirerek canlı organizmalar hakkında kapsamlı bilgiler ve hastalıklarla ilişkili genler ve moleküler belirteçler elde etmek mümkün hale gelmiştir (5-8). Sistem biyolojisi kapsamında genlerden metabolitlere doğru var olan aşağı akışta yer alan her bir katman biyolojik süreçlerle ilgili ayrı ayrı farklı bilgiler barındırmakta ve bu katmanlar içerisinde metabolomun ve lipidomun fenotipi en iyi yansıttığı savunulmaktadır (9). Bu noktada bütünleşik omiks analizlerin (metabolomik ve lipidomik) kullanılarak beyin tümörlerine ait fenotiplerin karakterize edilmesi ile beyin tümörlerinin erken teşhisine yönelik yeni aday biyobelirteçler belirlenebilir, bireysel tedavi stratejileri geliştirilebilir ve bunların etkinliğini değerlendirilebilir.

Fenotipleme ve tümör biyobelirteçleri üzerine yapılan araştırmalarda minimal invaziv toplanması ve kolay erişilebilirliği nedeniyle sıklıkla kan plazması tercih edilmektedir. Ancak doğrudan tümör dokusundan yapılan çalışmalara ait sonuçların tümörleri nesnel olarak sınıflandırmada, hastalığın sonucunu tahmin etmede ve optimal tedaviye karar vermede anahtar rol oynadığı savunulmaktadır (6). Bu nedenle omiks çalışmaların hem plazma hem de doku örnekleri ile gerçekleştirilmesi kapsamlı biyolojik verilere ulaşılması açısından önem arz etmektedir.

Doku ve plazma gibi karmaşık biyolojik örneklerde çok çeşitli miktarlarda, stabilitelerde ve fizikokimyasal özelliklerde biyomoleküller yer alır (10). Bu biyomoleküllerin hedeflenmemiş bütünüşik omiks analizleri için farklı tüketme protokolleri ile aynı örneğin tekrar tekrar toplanması gereklidir. Ancak hedeflenmemiş bütünüşik omiks analizlerde paralel örnek işleme için gereken artan çaba, zaman ve maliyetin yanı sıra etik kısıtlamalar nedeniyle de çoklu tüketme protokolleri için gereken örnek hacimleri veya miktarları mevcut olmayabilmektedir (11, 12).

Son yıllarda gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi-dört kutuplu uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (HR-LC-qTOF-MS) gibi gelişmiş teknoloji ürünü analitik platformlar karmaşık biyolojik matrislerden hedeflenmemiş omiks çalışmaların gerçekleştirilmesi için eşsiz araçlar haline gelmiştir. GC-MS ve LC-qTOF-MS gibi farklı analitik platformların kullanılması ile aynı örnek üzerinde birden fazla ölçüm yapılabilmekte ve böylelikle deneysel varyasyon asgari düzeyde tutulup veri doğruluğu ve karşılaştırılabilirliği arttırılabilmektedir (13, 14).

Hedeflenmemiş omiks çalışmalarda istenen hedefe yönelik analiz sonuçlarını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilecek birçok faktör bulunmaktadır. Bu nedenle hedeflenmemiş omiks çalışmalarda geliştirilen analitik stratejiler oldukça önem arz etmektedir. Bu noktada kemometrik yaklaşımlardan biri olan deneysel tasarım stratejileri hedeflenmemiş omiks çalışmaların sonuçlarını etkileyen çok sayıda faktörün etkisinin eş zamanlı olarak daha az sayıda deney ile gözlemlenmesine ve deneysel süreçlere ait bilinmeyen etkilerin minimum zaman ve maliyet ile ortaya çıkarılıp daha verimli analizler gerçekleştirilerek daha kapsamlı sonuçlar elde edilmesine olanak tanıyan eşsiz yaklaşımlardır (15-17). Ne yazık ki deneysel tasarım



yaklaşımlarının sağlık bilimlerinde ve özellikle kompleks analizlerin gerçekleştirildiği omiks çalışmalarda kullanımı günümüzde oldukça sınırlıdır (18).

Bu bilgiler ışığında tez kapsamında bütünleşik omiks analizler (metabolomik ve lipidomik) ile GBM, menenjiyom ve metastatik beyin tümörlerine ait fenotiplerin aydınlatılması amaçlanmıştır. Böylelikle tedaviyi bireyselleştirerek sonucu öngörecektir daha kesin bir beyin tümörü sınıflandırması yapılabilmesine ve nöroşirürji biyopsisine veya daha pahalı tekniklere ihtiyaç duyulmadan GBM, menenjiyom ve metastatik (akciğer) beyin tümörlerinin doğru ve erken teşhis edilmesine katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Ayrıca elde edilen bulgular ile GBM, menenjiyom ve metastatik (akciğer) beyin tümörlerine ait yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine ve erken tanıya yönelik yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır. Çalışmanın ardışık hedefi GC-MS ve LC-qTOF-MS gibi gelişmiş teknoloji ürünü iki farklı enstrümental tekniğin kullanılması ile analiz edilen biyomoleküllerin kapsamının artırılmasıdır. Bunun için öncelikle kemometrik deneysel tasarım yaklaşımları ile hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizler için tek bir örnekten metabolitlerin ve lipitlerin sağlam ve etkili bir şekilde geri kazanılmasına izin veren çok yönlü ve yüksek verimli tüketme yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Ayrıca GC-MS ve LC-qTOF-MS ile yapılan hedeflenmemiş omiks çalışmalarının örnek hazırlama ve analiz yöntemlerine etki eden birçok faktörün yine deneysel tasarım stratejileri ile optimize edilerek kapsamlı veriler elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda tez çalışmasının ikinci odak noktası deneysel tasarım stratejilerinin uygulanması ile geliştirilen analitik yöntemlerin ve iş akışının sonraki yapılacak omiks çalışmalarının performansının ve tanımlanan moleküllerin kapsamının artırılmasına yol gösterici olmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser ve Beyin Tümörleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2018 verilerine göre kanser en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir (19). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından üretilen ve dünyada 185 ülkede 36 kanser tipine ilişkin GLOBOCAN kanser insidansı ve mortalite tahminlerine göre 2020 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir (20). Global kanser vakalarının 2020 yılına göre %47'lik bir artışla 2040 yılında 28,4 milyona ulaşması beklenmektedir. Farklı kanser türleri arasında beyin tümörü agresif doğası, heterojenitesi ve düşük hayatta kalma oranı nedeniyle hem çocuklarda hem de yetişkinlerde en ölümcül ve yaygın olan kanser türlerinden biridir (21).

İntrakraniyal tümör olarak bilinen beyin tümörü vücudun farklı bölümlerinde oluşan diğer tümörler gibi hücre anormalliklerinden kaynaklanan ve anormal hücrelerin kontrol edilemez şekilde çoğalması sonucu oluşan kitlelerdir. Beyin tümörleri genel olarak iyi huylu veya kötü huylu olarak tanımlanır. İyi huylu beyin tümörleri yavaş büyüyen hücrelerden oluşur. İyi huylu tümörler mikroskop altında neredeyse normal bir görünüme sahiptir. İyi huylu bir tümör özellikle beynin pons veya medulla gibi kritik bir bölgesinde bulunuyorsa, çok büyükse veya kafa içi basıncında artışa neden olup beyin ödemi ile sonuçlanıyorsa yaşamı tehdit edebilir. Kötü huylu beyin tümörleri ise hızlı büyüyen hücrelerden oluşur, invaziv ve yaşamı tehdit edicidir. Mikroskop altında bakıldığında kötü huylu tümörlerin görüntüsü anormaldir (22, 23).

Beyin tümörleri genel olarak birincil veya ikincil olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Birincil beyin tümörleri beyinde veya merkezi spinal kanalda başlar. Genellikle lenfatik kanallar bulunmaması nedeniyle vücudun diğer bölgelerine yayılma eğilimi göstermeyip çok nadir metastaz yaparlar. Metastazları genellikle beyin omurilik sıvısı veya serebral kan dolaşımı aracılığıyla spinal kordadır (24, 25). İkincil beyin tümörleri ise kolon, akciğer, pankreas, cilt, böbrek gibi vücudun herhangi bir yerinde başlayıp arteriyel dolaşım aracılığıyla beyne yayılım gösterirler. Tüm metastatik beyin tümörleri tanımları gereği kötü huyludur ve "beyin kanseri" olarak adlandırılırlar. Metastatik beyin tümörleri kanser hastalarının yaklaşık %15'inde

sistemik kanserin hematojen yayılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar (24, 25). Metastatik beyin tümörleri birincil beyin tümörlerine göre çok daha sık görülmekle birlikte bunlar içerisinde en yaygın olanı akciğer kanserinin beyne metastazıdır.

### **2.1.1. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması**

WHO beyin tümörlerinin ilk sınıflandırılmasını 1979 (26) yılında yapmış ve bilimsel gelişmelere bağlı olarak 1993 (27), 2000 (28) ve 2007 (29) yıllarında güncelleyerek yenilemiştir. 2007 yılına kadar beyin tümörlerinin sınıflandırması hücre kökeni ve histogeneze dayalı olarak yapılmıştır. 2014 yılında Uluslararası Nöropatoloji Derneği'nin Hollanda'nın Haarlem kentinde düzenlediği toplantıda moleküler bulguların beyin tümörü tanılarında nasıl kullanılabilceğine dair kılavuzlar oluşturulmuş ve WHO'nun 2007 yılındaki sınıflandırmasının büyük çapta revizyonu için zemin hazırlamıştır (30). Bu revizyonun ardından 2016 yılında WHO teşhis doğruluğunun artırılmasının yanısıra prognoz ve tedaviye verilen yanıtın iyileştirilmesi amacıyla genotipik ve fenotipik faktörlerin eş zamanlı kullanılmasına yönelik moleküler parametrelerin dahil edildiği yeni bir sınıflandırma modeli bildirerek tamamen mikroskopiye dayalı yüzyıllık tanı ilkesini bozmuştur. Bir diğer deyişle WHO 2016 yılında ilk kez beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında histopatolojik özellikler ile beraber moleküler parametreleri de kullanarak moleküler tıp temelli bir ayırımı gitmiştir (31). Son olarak ise WHO ek moleküler belirteçlerden ve DNA metilom profillemesi gibi yeni teşhis tekniklerinden elde edilen bilgiler ile 2016 yılında yaptığı sınıflandırmayı tekrar güncellemiş ve 2021 yılında yeni bir beyin tümörü sınıflandırması bildirmiştir. (32).

### **2.1.2. Beyin Tümörlerinin Derecesi**

Tümörler teşhis edildikten sonra genellikle WHO'nun sınıflandırma sistemine göre adlandırılırlar. Tümör derecesi bir tümörün malignite veya saldırganlık düzeyini sınıflandırmanın bir yoludur. Tümör derecesinin bilinmesi uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve sonuçların öngörülmesi açısından oldukça önemlidir.

Beyin tümörleri içerdikleri hücrelerin anormalliklerine göre WHO tarafından 4 dereceye ayrılmıştır. Derece 1 tümörler en az kötü huylu olandır ve genellikle uzun süreli sağkalım gözlenir. Bu tümörler yavaş büyür ve mikroskopla bakıldığında

neredeşey normal bir görünümüne sahiptir. Derece 2 tümörler nispeten yavaş büyür ve mikroskop altında biraz anormal bir görünümüne sahiptir. Bazıları yakındaki normal dokuya yayılım gösterip tekrarlayabilir. Derece 3 tümörler kötü huyludur. Mikroskop altında görünimleri normal hücrelerden oldukça farklıdır. Yakındaki normal beyin dokusuna yayılım gösterme olasılığı yüksektir. Derece 4 tümörler en kötü huylu olanlardır. Hızla çoğalırlar ve mikroskop altında anormal bir görünümüne sahiptirler. Bu tümörler hızla büyümelerini sürdürebilmeleri için yeni kan damarları oluştururlar. Ayrıca merkezlerinde ölü hücre alanları vardır. Glioblastoma (GBM) derece 4 tümörün en yaygın örneğidir.

### 2.1.3. Beyin Tümörlerinin Etiyolojisi

Genellikle beyin tümörleri için risk faktörleri karakteristik özelliklere sahip olan veya olmayan katılımcılardaki beyin tümörü riskini (kohort çalışmaları) veya beyin tümörü olan veya olmayan katılımcıların geçmişlerini (vaka kontrol çalışmaları) karşılaştıran analitik epidemiyolojik çalışmalar yürütülerek keşfedilmektedir. Beyin tümörleri için risk faktörlerini (genetik ve çevresel) araştıran çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen etiyojilerine ilişkin bilgiler halen sınırlıdır (33).

Beyin tümörü gelişen çoğu kişide aile öyküsü yoktur. Birkaç kalıtsal genetik sendrom, birincil beyin tümörü gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. NF1 (nörofibromatoz tip 1) geni ile ilişkilendirilen ve Von Recklinghausen hastalığı olarak da bilinen genetik bozukluk beyin veya omurilik tümörleriyle bağlantılı en yaygın sendromdur. Ayrıca nörofibromatozis tip 2 (NF2), tüberskleroz (TSC1 ve TSC2), nevoid bazal hücreli karsinom sendromu, Turcot sendromu (APC), Li-Fraumeni sendromu (TP53) ve Von-Hippel-Lindau (VHL) sendromu dahil olmak üzere çeşitli kalıtsal sendromların beyin tümörü gelişimine genetik yatkınlık oluşturduğu bildirilmiştir (34). Bu bilinen kalıtsal genetik sendromlara ek olarak beyin tümörü riskini artıran başka kalıtsal mutasyonlar da mevcut olabilmektedir.

Beyin tümürlü hastaların çoğunda tanımlanabilir bir çevresel risk faktörü saptanamamakla birlikte en iyi bilinen çevresel risk faktörü orta ve yüksek seviyede iyonize radyasyona maruz kalınmasıdır (35). Günümüzde radyasyona bağlı beyin tümörlerinin çoğu diğer kanserleri tedavi etmek için kafaya verilen radyasyondan kaynaklanmaktadır. Öte yandan spesifik kimyasallar veya diğer çevresel toksinlerin

beyin tümörlerine yol açtığı ile ilgili kesin bir bilgi mevcut değildir (1). Ayrıca cep telefonu kullanımı da dahil radyofrekanslı elektromanyetik alanlar ile beyin tümörü riski arasındaki ilişkiye dair yapılan çalışmaların çoğu bu ilişki için herhangi bir kanıt sağlayamamıştır. Radyofrekans ve elektromanyetik alanların karsinojenik olabileceğine dair IARC tarafından bildiri (36) yayınlanmış olmasına rağmen günümüzde bu konu halen tartışmalıdır. On yıl veya daha uzun süre cep telefonu kullanımı ile ilişkili olarak beyin tümörü oluşum riskinde kesin olmamakla birlikte çok hafif bir artış olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, alkol kullanımı, kafa travması, enfeksiyonlar (virüsler, toksoplazma gondi), n-nitroso bileşikler, mesleki maruziyet (vinil klorür ve plastik ile çalışanlar) beyin tümörüne neden olan diğer önemli çevresel faktörlerdir (1, 34).

Birincil beyin tümörlerinin %5'den azı genetik yatkınlık sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle beyin tümörü oluşum paterni predispozan bir kalıtsal hastalıktan ziyade çevresel nedenleri düşündürmektedir. Bu nedenle beyin tümörlerine ait fenotiplerin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

#### **2.1.4. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi**

CBTRUS'a göre GBM ve menenjiyom en sık görülen birincil beyin tümörü tipleridir (4). 2014-2018 kayıtlarına göre menenjiyom 100.000'de 9,12 vaka oranı ve 66 yaş ortalaması ile tüm birincil beyin tümörlerinin %39'unu ve kötü huylu olmayan tümörlerin %54,5'ini oluşturur. GBM ise 100.000'de 3,23 vaka oranı ve 65 yaş ortalaması ile tüm primer beyin tümörlerinin %14,3'ünü ve malign primer beyin tümörlerinin %49,1'ini oluşturur.

Menenjiyomların 60 yaşından büyük yetişkinlerde teşhis edilmeleri daha olasıdır ve görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre yaklaşık iki kat daha fazladır. GBM ise erkeklerde daha sık görülmekle birlikte genellikle 45-70 yaş arası erişkinlerde meydana gelir. GBM tanısı konulan hastalar tanıdan sonra 12-18 ay süren ortalama sağkalım ile korkunç bir prognoza sahiptir.

Beyin metastazları ise ikincil beyin tümörlerinin çoğunluğunu oluşturmakla birlikte insidansının birincil beyin tümörlerinden 10 kat daha yaygın olduğu tahmin edilmektedir (3). Metastatik beyin tümörlerinin tam insidansı bilinmemekle birlikte

yılda 200.000-400.000 insan arasında olduğu tahmin edilmektedir (37, 38). Strong ve ark. (1)'nin belirttiğine göre CBTRUS tarafından toplanan verilerin metastatik beyin tümörlerinin en sık akciğer (%39-56), meme (%13-30), deri (%6-11), kolorektal (%3-8), böbrek (%2-6) veya bilinmeyen (%2-14) primer malignitelerden kaynaklandığını bildirmiştir. Tipik olarak akciğer kanseri teşhisi konulduktan birkaç ay sonra (ortalama 4 ay) beyin metastazı ortaya çıkar. Birincil tümör bölgesi bulunmadan metastatik beyin tümörü tanısı konulan hastaların üçte ikisinde akciğer kanseri gelişir. Bununla birlikte beyin metastazı keşfedildiği anda akciğer kanserinin de teşhis edilmesi nadir değildir (39).

T.C. Sağlık Bakanlığı İstatistiklerine göre Türkiye’de beyin ve diğer merkezi sinir sistemi kanserlerinin oranının 100.000 kişide erkeklerde 5,7, kadınlarda ise 4,2 olduğu bildirilmiştir.

### **2.1.5. Beyin Tümörlerinin Patogenezi**

Yetişkinlerde en sık görülen beyin neoplazmı olan GBM ölü tümör hücrelerinin varlığı ile tanımlanan, hızla büyüyen, oldukça kötü huylu (derece 4) bir tümördür. Tümör ağırlıklı olarak anormal astrositik hücrelerden oluşur. Ancak aynı zamanda farklı hücre tiplerinin (kan damarları dahil) ve ölü hücre alanlarının (nekroz) bir karışımını da içerir. GBM infiltratif ve beynin yakın bölgelerine saldırır. Bazen korpus kallozum yoluyla beynin karşı tarafına da yayılabilmektedir. Beynin dışına yayılması ise son derece nadirdir.

Glioblastomalar<sup>1</sup> genellikle ya izositrat dehidrogenaz (IDH)-vahşi tip ya da IDH-mutant olarak teşhis edilir (31). IDH-vahşi tip glioblastomalar daha yaygındır, daha agresif olma eğilimindedir ve IDH-mutant glioblastomalardan daha kötü prognoza sahiptir. IDH mutant glioblastomalar tüm glioblastomaların yaklaşık %10’unu oluşturur. O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) promotörü glioblastoma tanısında önemli bir belirteçtir ve tüm hücrelerdeki genlerin stabilitesi için önemlidir. Metillendiğinde inaktive olur. DNA fazlasıyla hasar görüp hücreler öldüğü için bu kanser hücrelerini belirli kemoterapi ilaçlarına karşı daha duyarlı hale

---

<sup>1</sup> WHO sınıflandırma sistemine göre GBM artık glioblastoma olarak adlandırılmaktadır.

getirir. Bu nedenle MGMT kemoterapi ile ilgili tedavi kararlarına rehberlik etmektedir (40).

GBM vakalarında IDH 1 - IDH 2 ve tümör proteini 53 (TP53) mutasyonları (41), MDM2 (42) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gen ekspresyonları (43), MGMT promotör metilasyonu seviyeleri (41), kromozom 10 heterozigotluk kaybı (LOH q10) (44) ve sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A ve 2B (CDKN2A ve CDKN2B) (45) mutasyonları bireyin prognozunu belirlemeye yardımcı olmada ve tedaviye yanıtı tahmin etmede moleküler amaçlı kullanılan en önemli belirteçlerdir.

Menenjiyomlar tüm birincil beyin tümörlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan, beyni ve omuriliği kaplayan doku tabakasından kaynaklanan çoğu iyi huylu ve yavaş büyüyen tümörlerdir (46). Menenjiyomların genel derecesini tanımlamak için iyi huylu (derece 1), atipik veya anaplastik (derece 2 ve 3) terimleri kullanılır. Derece 2 tümörler menenjiyomların %10-15'ini oluşturur. Derece 3 menenjiyomlar oldukça nadir (%1-3) olmalarına rağmen oldukça agresif olabilir. Hızla büyür ve beyin ve omuriliğe yayılması muhtemeldir. Tümör genellikle ameliyatla tamamen çıkarılmadığı için prognozu derece 1 menenjiyomdan daha kötüdür. Menenjiyomların büyük çoğunluğu (binde birden az) nadiren metastaz yapar (1).

Menenjiyomlar çoğunlukla içe doğru büyür ve beyin veya omurilik üzerinde baskıya neden olmakla birlikte bazen kafatasına doğru da büyüyerek kalınlaşmaya neden olabilir. Farklı beyin veya omurilik hücrelerinden oluşabilir. Genellikle herhangi bir semptom göstermeden yavaş büyüdüğü için her zaman acil tedavi gerektirmezler ve zamanla izlenebilirler (1). Vakalarda en sık gözlemlenen genetik değişiklik tümör büyümesinin baskılanmasında rol oynayan kromozom 22'nin kaybıdır. NF-2 geninde mutasyon bulunan hastaların yaklaşık %50'sinde menenjiyom görülür (47). Ayrıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGFR), EGFR, DAL1, SMO (kıvrılmış sınıf alıcısı), AKT1 (alfa serin/treonin-protein kinaz), TRAF7 (TNF reseptörü ilişkili faktör 7) ve mTORC1 (rapamisin kompleksi 1'in mekanik hedefi) menenjiyomlarla ilişkilendirilen önemli moleküler belirteçlerdir (48-51). Bazı menenjiyom türlerinin progesteron, androjen ve daha az yaygın olarak östrojen gibi seks hormonları ile etkileşime giren reseptörlere sahip olduğu bildirilmiştir (52).

Metastatik beyin tümörleri genellikle asıl tümör lokasyonunda veya birincil bölgede bulunan aynı tip kanser hücrelerinden oluşan merkezi sinir sisteminin (CNS)

en yaygın maligniteleridir. Beyin metastazı tek bir tümör veya çoklu tümörler olarak ortaya çıkabilir. Tipik olarak metastatik beyin tümörleri hematojen olarak veya bitişik dokunun doğrudan istilası yoluyla göç eden birincil tümör hücrelerinden kaynaklanır. Prognoz sadece bir beyin metastazı olan, kafa içi basıncında artış olmayan, birincil kanserin doğru bir şekilde tanımlandığı kontrolsüz sistemik hastalığı olmayan kişiler için olumludur (53).

Bunların içinde yönetilmesi çok zor olan akciğer kanseri tüm beyin metastazlarının yaklaşık %50'sinden sorumludur. EGFR, KRAS (Kirsten fare sarkom virüsü), ALK (anaplastik lenfoma kinaz), TP53 mutasyonları ile programlı hücre ölüm proteini 1 (PD-1) ve programlı hücre ölüm ligand 1 (PD-L1) akciğer kanseri beyin metastazı ile ilişkilendirilen önemli belirteçlerdir (54).

#### **2.1.6. Beyin Tümörlerinin Tanısı, Tedavisi ve Prognozu**

Beyin tümörlerinin tanı ve takibi için en sık kullanılan görüntüleme yöntemleri bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntülemedir (MRI). Beynin anatomik ve yapısal durumu hakkında standart MRI ile bilgi elde etmek mümkün iken difüzyon, fonksiyonel, perfüzyon ve manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) gibi ileri MR spektroskopisi yöntemleriyle tümörün metabolik-biyokimyasal yapısı, yaygınlığı ve türü hakkında da bilgi elde edilebilmektedir. Ek olarak pozitron emisyon tomografi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) taramaları henüz beyin tümörlerinin tanısı için rutin olarak tercih edilmese de tümör derecesini tahmin ederek BT veya MRI'dan elde edilen bilginin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Bazen bir beyin tümörünü kesin olarak teşhis etmenin tek yolu ise biyopsidir. Beyin cerrahı biyopsi yapar ve patolog tümörün iyi huylu mu yoksa kötü huylu mu olduğunu belirleyerek kesin tanı koyar ve WHO sınıflandırma sistemine göre derecelendirir. Biyopsi sonuçlarına göre benzer görünen ancak farklı davranan tümörler aynı histolojik sınıflandırma grubunda yer alabilmektedir. Bazen tümörün tanı konulamayan kısımları veya daha az kötü huylu kısımları örneklenir ve bu durum tümör derecesinin belirlenmesinde yanılgıya sebep olur. Ayrıca biyopsi sırasında %6-12 aralığında kanama ve beyin şişmesi gibi komplikasyonlar geliştiği ve morbidite ile mortalite oranlarının sırasıyla %6-12 ve %0-1.7 aralığında değiştiği bildirilmiştir (55, 56).



Beyin tümörü tedavisinde cerrahi operasyonların yanı sıra kemoterapi, stereotaktik radyocerrahi, radyoterapi ve semptomatik tedaviler de uygulanmaktadır. Sunulan temel tedavi yöntemleri hastanın klinik durumuna, tümörün tipine, boyutuna ve ayrıca lezyonların sayısı, derinliği ve kütesine bağlı olarak tek başına ya da kombine olarak kullanılabilir. Bu nedenle tedavinin her hasta için kişiselleştirilmesi ve hastanın tıbbi durumu ile vücudun herhangi bir yerindeki kanserin kapsamının göz önünde bulundurulması önem arz etmektedir (57).

Beyin tümörlerinin patogenezi çok karmaşıktır. İnsan Genomu Projesi'nin yayınlanması ve genotipleme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte bilim adamları artık insan vücudunda bulunan bir milyon üzerinde genetik varyantı tanımlayabilmekte ve şu soruyu sorabilmektedir: *“Bu kalıtsal genetik varyantlardan herhangi biri beyin tümörü riski ile ilişkili mi?”*

Gelişen teknoloji ve analiz yöntemleri ile birlikte bazı tümörlerin yalnızca temel tümör tipini veya WHO derecesini bilmekten daha bilgilendirici olan ek özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir. Bu özellikler bir hücre reseptöründeki değişikliklerin, spesifik bir protein ürününün, bir mutasyonun veya başka bir moleküler/genetik değişikliğin sonucu olabilmektedir. Bu özellikler tümörün görünümü, doğal öyküsü, tedaviye verilen yanıt, klinik deneylerin mevcudiyeti, semptomlar ve sonuçlara ilişkin tarihsel anlayışı geliştirmektedir. Bu özelliklerin bireysel hastalar için “gerçek zamanlı” tedavi kararlarına uygulanmasına kişiselleştirilmiş tıp adı verilmektedir.

Son yıllarda yüksek teknoloji ürünü enstrümental cihazların gelişimi ile ortaya çıkan moleküler veriler beyin tümörlerinin patogenezinde genomik ve epigenetik faktörlerin önemini göstermektedir. Ancak beyin tümörlerinin oluşumlarında ve gelişimlerinde çok sayıda gen ve protein rol aldığı bilirse de mekanizmaları hala net değildir. Günümüzde beyin tümörlerinin davranışlarını, patogenezlerinde rol oynayan mekanizmaları, hastaların prognozlarını ve tedaviye verecekleri yanıtı belirlemede bireysel ve kişiselleştirilmiş tıbbın temelini oluşturan teşhis ile tedavide potansiyel kullanımlarının yanı sıra tedavilerin etkinliğini izlemek için araştırılmaya devam edilen biyobelirteç çalışmalarından yararlanılmaktadır (58). Tümör kaynaklı biyobelirteçler kanda veya beyin omurilik sıvısında biriken nükleik asitleri, proteinleri ve tümör kaynaklı hücre dışı vezikülleri içerir ve şu anda mevcut olan biyobelirteçlerin

önemli sınırlamaları vardır (58, 59). Bu nedenle tümör davranışını ve nüks riskini tahmin etmedeki önemli belirsizliğin üstesinden gelmek ve tanıda kullanılacak yeni biyobelirteçlerin keşfi için fenotipi en iyi yansıtan metabolomik ve lipidomik profillerin ayrıntılı şekilde ortaya çıkarılması önem arz etmektedir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışması kapsamında araştırılan ve yaklaşık bir yıl ortalama sağkalım oranı ile kötü huylu primer beyin tümörlerinin %49,1'ini oluşturan GBM, en sık görülen ve birincil beyin tümörlerinin %39'unu ve kötü huylu olmayan tümörlerin %54,5'ini oluşturan menenjiyom ile en sık görülen ikincil beyin tümörü sınıfında yer alan akciğer metastazına ait fenotiplerin ve farklılaşan yolların sistem biyolojisi yaklaşımı bütünlük omiks analizler (metabolomik ve lipidomik) ile belirlenmesi klinik alanda kişisel tedavi stratejilerinin daha ileri boyutlara taşınabilmesi, tanı ve teşhiste daha kesin sonuçlara ulaşılabilmesi ve prognoza potansiyel olarak yardımcı olunabilmesi açısından oldukça önemlidir.

### **2.1.7. Beyin Tümörlerinden Metabolomik ve Lipidomik Analizlere ait Kaynak Özeti**

Literatürde beyin tümörlerinin doku ve plazmadan analizlerinde çeşitli tüketme ve aletli analiz yöntemlerinin kullanıldığı görülmüştür. Buna bağlı olarak, kromatografik sistemler ile yapılan çalışmalarda kullanılan tüketme çözücülerinden, kolonlara (C8, C18, HILIC) kadar var olan çeşitli faktörlerin etkisi nedeniyle birbirinden farklı sayıda ve türde metabolitler ve lipitler tanımlanmıştır. Örnek hazırlama basamağında metabolitlerin tüketilmesi için genelde metanol veya farklı oranlarda metanol:su karışımının kullanıldığı görülmüştür. Lipitlerin tüketilmesi içinse diklorometan, kloroform ve metil tert-butil eter (MTBE) gibi polaritesi düşük olan organik çözücüler kullanılmıştır. Analizlerin ise sıklıkla farklı analizörlere (q, qTOF-MS, TOF-MS, Orbitrap) sahip GC-MS ve LC-MS cihazları ile gerçekleştirildiği görülmüştür. Ayrıca sınırlı olsa da literatürde bir boyutlu-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (<sup>1</sup>H-NMR), kapiler elektroforez kütle spektrometresi (CE-MS), iyon hareketlilik spektroskopisi (IMS) ve Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonans kütle spektrometresi (FTICR) analizörü ile yapılan çalışmaların da mevcut olduğu görülmüştür (Tablo 2.1.).

GBM'nin moleküler patogenezi için Wang ve ark. (60)'nin yaptığı çalışmada 99 hastanın doku örnekleri bütünleşik omiks analizler (genomik, proteomik ve metabolomik) ile incelenmiştir. Metabolomik analizler için örnekler su:kloroform:metanol (3:8:4, h/h/h) ile tüketilmiş ve analizler GC-MS ile LC-Orbitrap-MS ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda toplamda 582 tane molekül tanımlanmıştır.

Heiland ve ark. (61)'nin GBM'deki metabolik-transkripsiyonel değişiklikleri haritalamak için doku örneklerinden metabolomik ve transkriptomik analizler ile yaptıkları bütünleşik omiks çalışmada oligodendrositik farklılaşma, hücre döngüsü işlevleri, bağışıklık tepkisi ve hipoksinin GBM hastalarında önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Çalışmada metabolomik analizler kütle spektroskopisine göre oldukça düşük hassasiyete sahip olan <sup>1</sup>H-NMR ile gerçekleştirilmiş ve bu nedenle sınırlı sayıda (31 tane) metabolit tanımlanmıştır.

Literatürdeki bir başka bütünleşik omiks (metabolomik-proteomik) çalışma akciğer kanseri beyin metastazının tedavisinde kullanılan platin bazlı kemoterapinin etkinliğini araştırmaya yöneliktir (62). Çalışma hücre kültürü ve serum örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GC-MS ile gerçekleştirilen metabolomik analizler sonucunda akciğer beyin metastazı ile önemli oranda değişen 10 metabolit tanımlanmıştır.

Wibom ve ark. (63)'nin GBM'deki metabolik paternleri ve radyoterapi sırasındaki değişiklikleri izlemek amacıyla yaptıkları metabolomik çalışmada tümör ve tümöre bitişik beyin bölgesinden toplanan örnekler GC-TOF-MS ile analiz edilmiştir. Toplamda tespit edilen 151 tane molekülden 67 tanesini tanımlanmıştır.

Gilard ve ark. (64)'nin GBM oluşumunun nedenlerini araştırmak amacıyla yaptıkları bir diğer metabolomik çalışmada ise doku örneklerinden 28, plazma örneklerinden 148 olmak üzere toplamda 176 tane metabolit ve lipit tanımlanmıştır.

Beyin tümörlerinden lipitlerin analizi için katı-faz mikro tüketme ile analitik yöntem geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmada Derece I-IV glioma (n=18) ve derece I-II menenjiyom (n=18) hastalarından alınan doku örnekleri LC-Orbitrap-MS ile analiz edilmiştir. Doku örnekleri katı-faz mikro tüketme yöntemi ile doğrudan tüketilmiş ve MS/MS modunda toplam 111 adet lipit tanımlanmıştır (65).

Bir diğerk çalışmada Wang ve ark. (66) beyin tümörlerinin tanısını iyileştirmek amacıyla yeni aday biyobelirteçler belirlemeye yönelik beyin metastazı olan akciğerk hastaları (n=34) dahil olmak üzere olmak üzere farklı beyin tümörü tanılarına sahip 163 hastadan alınan BOS sıvısı örneklerinden LC-qTOF-MS ile metabolomik çalışma gerçekleştirmiştir. Optimizasyon çalışmasında asetonitril ve asetonitril:metanol (1:1, h/h) karışımına göre metanolün BOS sıvısından metabolitleri daha yüksek verimde tükettiği bildirilmiştir. Analizler sonucunda 508 tane pik ayrıştırılmış ve bu piklerden 27 tanesi farklı beyin tümör tiplerini ayırt etmek için tanısal biyobelirteç olarak önerilmiştir.

Beyin tümörlerinin agresif doğası gereği plazma, doku, serum gibi çeşitli biyolojik örneklerden yapılmışok sayıda omiks çalışma olmasına rağmen, bu çalışmaların örnek hazırlama basamağından enstrümental analizlerine kadar yüksek verimli, sağlam ve güvenilir yöntemler geliştirmek için harcananaba halenok sınırlıdır. Bu bağlamda kullanılan omiks teknolojisine bağlı olarak yöntemlerin optimize edilmesi kuşkusuz ki analiz edilen metabolitlerin sayısını ve kapsamını arttırarak örnek hazırlama ve enstrümental cihazlardan elde edilen performansın maksimum seviyeyeıkarılmasını sağlayacaktır.

GBM, menenjiyom ve akciğerk beyin metastazı beyin tümörleri ile yapılan bütünleşik omiks, metabolomik ve lipidomik çalışmalar Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.1.** GBM, menenjiyom ve akciğer beyin metastazı beyin tümörlerinin biyolojik materyallerden metabolomik ve lipidomik analizleri.

Tümör Tipi ve Matriks	Örnek Hazırlama	Enstrümental Yöntem	AMS/TMS/İAMS	Hedef ve Amaç	Kay.
GBM Doku (n=37)	Bipolar forseps ile termal etki	REIMS-qTOF-MS	-/42/13	Doku örneklerinden gerçek zamanlı lipit profillerinin teşhis amacıyla aydınlatılması	(67)
GBM Doku <sup>a</sup> (Hücre* - eksozom**)	Metanol	LC-qTOF-MS (C8)	*932- **947/-/2	Biyobelirteç keşfi için GBM kök hücrelerinden üretilen eksozomlardan lipit profillerinin aydınlatılması	(68)
Birincil Tümörler <sup>f</sup> Plazma	Metanol	<sup>1</sup> H-NMR	26/19/5	Tümör derecesine göre bazal kan plazma metabolitlerindeki değişikliklerin incelenmesi	(69)
Glioma <sup>c</sup> (Derece II-IV) Doku	Metanol:MTBE	<sup>1</sup> H-NMR	66/66/58	IDH1 mutasyonu tarafından modüle edilen doku metabolitlerinin prognostik amaçlı araştırılması	(70)
Glioma <sup>d</sup> (Derece II-IV) Doku* ve Serum**	Kloroform:Metanol:Su (1:3:1, v/v) Metanol:Su (9:1, v/v)	GC-TOF-MS (DB5-MS)	*197/63/12 **230/87/13	Derece II-IV gliomaların teşhisi ve sınıflandırılması için yeni aday biyobelirteçlerin metabolomik analizlerle araştırılması	(71)
GBM Doku (n=34)	Metanol	LC-MS/MS (-) GC-MS (-)	-/597/59	Ameliyat sonrası donma süresinin gecikmesinin beyin tümörü metabolitleri üzerine etkisinin araştırılması	(72)
GBM Plazma (n=159)	-	LC-MS/MS (-)	224/157/3	Genel sağkalım ile ilişkili risk oranlarının belirlenmesi prognostik amaçlı metabolomik profillerinin çıkarılması	(73)

**Tablo 2.1. (Devam)** GBM, menenjiyom ve akciğer beyin metastazı beyin tümörlerinin biyolojik materyallerden metabolomik ve lipidomik analizleri.

Tümör Tipi ve Matriks	Örnek Hazırlama	Enstrümental Yöntem	AMS/TMS/İAMS	Hedef ve Amaç	Kay.
Glioma <sup>e</sup> (Derece I-IV) Doku	-	CE-MS	-/247/20	Glioma derecesine göre yeni aday biyobelirteçlerin metabolomik analizlerle araştırılması	(74)
Glioma (Derece I-IV) Plazma (n=87)	-	LC-MS/MS (-)	224/157/29	Glioma derecelerine ait tümör fenotiplerini farklılaştıran metabolitlerin araştırılması	(75)
GBM Doku (n=27)	-	ICE-MS	32/25/-	GBM tümör dokularının oluşumunda rol alan lipitlerin ve yolakların araştırılması	(76)
Malign Glioma <sup>f</sup> BOS	Metanol (%80)	LC-MS/MS (HILIC)	-/124/39	Malign gliomalı hastaların erken teşhisi için BOS sıvısından metabolomik profillerinin araştırılması	(77)
Malign Glioma <sup>k</sup> Serum	Metanol:Su (9:1, v/v)	GC-TOF-MS (DB5-MS)	159/67/28	Prognozun iyileştirilmesi için radyo terapi öncesi ve sonrası GBM hastalarında metabolit değişimlerinin araştırılması	(78)
Glioma (Derece II-IV) Doku (n=59)	DKM:Metanol (3:1, h/h) Metanol:Su (1:1, h/h)	LC-qTOF-MS (C18)	-/-/15	Glioma derecesine göre farklılaşan metabolitlerin araştırılması ve yeni aday biyobelirteçlerin belirlenmesi	(79)
Menenjiyom <sup>n</sup> (Derece I-II) Doku	Kloroform:Metanol (2:1, v/v)	<sup>1</sup> H-NMR	-/22/4	Yeni tedavi stratejileri için derece I-II menenjiyomların metabolomik profillerinin araştırılması	(80)
Glioma, Menenjiyom (Derece I-IV, Derece I-II) Doku (n=36)	Katı faz mikro tüketme (C18)	LC-Orbitrap-MS (HILIC)	-/111/-	Beyin tümörlerinden lipidomik analizler için örnek hazırlama basamağının optimizasyonu	(65)

**Tablo 2.1. (Devam)** GBM, menenjiyom ve akciğer beyin metastazı beyin tümörlerinin biyolojik materyallerden metabolomik ve lipidomik analizleri.

<b>Tümör Tipi ve Matriks</b>	<b>Örnek Hazırlama</b>	<b>Enstrümental Yöntem</b>	<b>AMS/TMS/İAMS</b>	<b>Hedef ve Amaç</b>	<b>Kay.</b>
Menenjiyom (Derece I-II) Doku (n= -)	-	LC-MS (-)	-/-/-	Derece I III menenjiyomların tanılarının iyileştirilmesi amacıyla farklılaşan metabolitlerin bulunması	(81)
Glioma <sup>h</sup> , Menenjiyom <sup>h</sup> Diğerleri <sup>h</sup> Doku	-	DESI-MS	-/-/19	Tanıyı iyileştirmek amacıyla tümör tiplerine göre farklılaşan metabolit ve lipitlerin araştırılması	(82)
Glioma, Menenjiyom Doku	Mikro-tüketme (HLB)	CBS-Orbitrap-MS	-/-/4	Beyin tümörlerinin hızlı ve erken tanısına yönelik analitik yöntem geliştirme	(83)
Beyin metastazı <sup>i</sup> (akciğer) ve Diğerleri <sup>i</sup> BOS	Metanol	LC-qTOF-MS (C18)	508/-/27	Beyin tümörlerinin tanısını iyileştirmek amacıyla yeni aday biyobelirteçlerin belirlenmesi	(66)
Beyin metastazı <sup>i</sup> Doku	Asetonitril:IPA:Su (3:3:2, h/h/h)	GC-TOF-MS %95 DM/%5 DFPS	-/141/17	Gamma Knife radyocerrahisin sonra radyasyon nekrozunun tümörden ayırt edilmesine yönelik metabolomik profillerin araştırılması	(84)
Akciğer Beyin Metastazı Hücre Kültürü* (n=108) Serum** (n=5-6)	*Metanol:Su (4:1, h/h) **Metanol	GC-MS (DB5-MS)	-/-/10	Akciğer beyin metastazının tedavisinde kullanılan platin bazlı kemoterapinin etkinliğinin bütünleşik omik analizlerle değerlendirilmesi	(62)
Beyin Metastazı Doku	Kit (AbsoluteIDQ p180 Kit)		-	Beyin metastazları türlerine ait yeni biyobelirteçlerin bütünleşik omiks analizlerle belirlenmesi	(85)

**Tablo 2.1. (Devam)** GBM, menenjiyom ve akciğer beyin metastazı beyin tümörlerinin biyolojik materyallerden metabolomik ve lipidomik analizleri.

Tümör Tipi ve Matriks	Örnek Hazırlama	Enstrümental Yöntem	AMS/TMS/İAMS	Hedef ve Amaç	Kay.
GBM Doku (n=99)	Su:Kloroform:Metanol (3:8:4, h/h/h)	GC-MS (HP5-MS) LC-Orbitrap-MS (C18)	-/582/-	GBM'in moleküler patogenezi bütünlük omiks analizlerle aydınlatılması	(60)
GBM Doku (n=33)	Metanol:Su	<sup>1</sup> H-NMR	-/-/31	GBM'deki metabolik-transkripsiyonel değişikliklerin bütünlük omiks analizlerle haritalanması	(61)
GBM Doku (n=11)	Metanol:Su (8:1, h/h)	GC-TOF-MS (DB5-MS)	151/67/-	GBM'deki metabolik paternleri ve radyoterapi sırasındaki değişikliklerin metabolomik analizlerle incelenmesi	(63)
GBM Plazma* Doku**	*Kloroform:Metanol:Su (2:1:~0.5, h/h/h) **Metanol:Su (1:1, h/h)	*LC-IMS-MS (C18) **MALDI- FTICR- MS	-/-/148 -/-/28	GBM'in altında yatan mekanizmanın metabolomik analizlerle araştırılması	(64)

<sup>a</sup> *in-vitro* türetilen glioblastoma kanseri kök hücrelerden sağlanan hücreler ve eksozomlar; <sup>b</sup> GBM (n=28), menenjiyom (n=11), oligodendroglioma (n=10), astrositoma (n=5) ve spesifik olmayan glial tümörler (n=6); <sup>c</sup> astrocytoma (n=24), oligodendroglioma (n=17), GBM (n=32); <sup>d</sup> astrocytoma (n=4, 4), oligodendroglioma (n=20, 25), GBM (n=57, 67); <sup>e</sup> derece 2 (n=11), derece 3 (n=10), derece IV (GBM, n=7); <sup>f</sup> GBM (n=6), anaplastik oligoastrocitom (n=2) ve anaplastik astrocitom (n=2); <sup>g</sup> GBM (n=10), astrocitom (n=1); <sup>h</sup> Derece I (n=23), Derece II (n=10), <sup>i</sup> gri madde (n=23), beyaz madde (n=14), glioma derece II-IV (n=12), menenjiyom (n=13), hipofiz tümörü (n=14), astrocit (n=2); <sup>j</sup> tümör dışı beyin hastalıkları (n=36), MSS birincil lenfoma (n=59), MSS ikincil lenfoma (n=11), Akciğerden beyin metastazı (n=34), metastaz yapmayan akciğer kanseri (n=23), <sup>k</sup> deri metastazı (n=3), meme metastazı (n=2), akciğer metastazı (n=5); <sup>l</sup> deri metastazı (n=14), meme metastazı (n=26), akciğer metastazı (n=37), diğerleri. APS: Ayrıştırılan pik sayısı, BOS: Beyin omurilik sıvısı, CBS: Kaplamalı bıçak sprey, DESI: Desorpsiyon elektrosprey iyonizasyon, DFPS: Difenil polisiloksan, DM: Dimetil, FTICR: Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonans kütle spektrometresi, HLB: Hidrofilik-lipofilik partikül, ICE: In-line kartuş tüketmesi, İAMS: İstatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolit sayısı, IM: iyon hareketlilik spektrometresi, REIMS: Hızlı buharlaşmalı iyonizasyon kütle spektrometresi, TMS: Tanımlanan metabolit sayısı



## 2.2. Sistem Biyolojisi

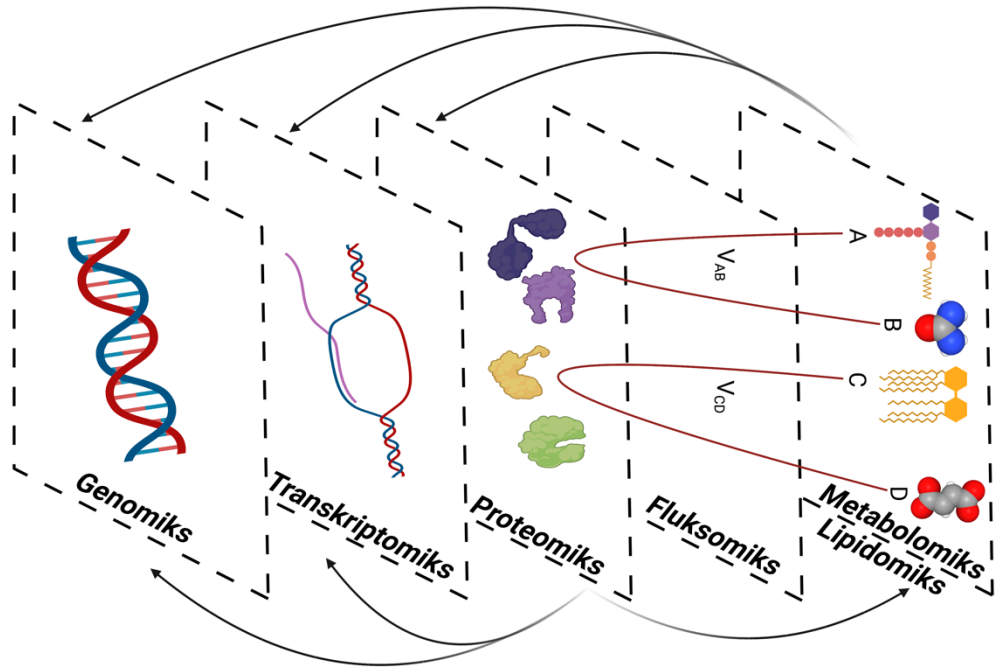
Sistem biyolojisi klasik biyolojideki “moleküler indirgemeci” yaklaşımın aksine biyolojik sistemlerdeki tüm bileşenlerin karmaşık etkileşimlerine, organizma doku ve hücre düzeyinde odaklanan ve bunların tümleşik şekilde sistem seviyesinde incelenmesine amaçlayan çok disiplinli bir bilim dalıdır (86). Bir diğer deyişle sistem biyolojisi canlı organizmaların bütünü oluşturduğu ağların onların parçalarının toplamından daha fazlası olduğu anlayışından yola çıkan, biyolojik sistemlerin karmaşıklığını deşifre etmeye yönelik bütünsel bir yaklaşımdır. Canlı sistemlerin zaman içinde ve farklı koşullar altında nasıl değiştiğini tahmin etmek, sağlık ve çevre sorunlarına çözümler geliştirmek için biyologlar, kimyagerler, bilgisayar bilimcileri, mühendislerin, matematikçiler, fizikçiler, doktorlar gibi birçok farklı disiplinden bilim insanlarını bir araya getiren disiplinler arası bir alandır. Sistem biyolojisi canlı organizmalarda bulunan moleküllerden, hücrelere ve organlara kadar birçok farklı bileşenin rollerini belirlemeyi ve bu bileşenlerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiklerine açıklamayı hedefleyerek, yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesini, hastalıkların benzersiz genetik veya moleküler profillere göre sınıflandırılmasını ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımların sunulmasını sağlar.

Canlı organizmalar biyolojik düzeyde, çok sayıda ve ölçekte entegre olan ve iletişim kuran ağlardan oluşur. Bu noktada biyolojik bir sistemin karmaşıklığını incelerken bu sistemin sadece bir parçasını anlamak yeterli değildir. Bu nedenle sistem biyolojisi biyolojik olarak hipotezler formüle etmek ve dinamik biyolojik değişikliklere uzamsal ve zamansal içgörüler sağlamak için bu ağların anlaşılmasına odaklanır.

Canlı organizmaların yapı taşlarının ve bu organizmalarda meydana gelen olayların kısım kısım değil de tüm parçalar bir araya getirildiğinde canlı organizmaya ait daha büyük ve daha kapsamlı resmin elde edilebileceğine dair fikirler 1930’lu yıllarda ortaya çıkmış olmakla birlikte İnsan Genom Projesi’nden (1990–2003) elde edilen bulgular ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak moleküler biyoloji çalışmalarının hız kazanması 2000’li yıllarda gerçekleşmiştir.

İnsan Genom Projesi (87) tarafından katalize edilen büyük genomik devrim sonucunda insan genomundaki bütün yapısal ve işlevsel fonksiyonları kodlayan genler

tanımlanıp, çeşitli hastalıkların genler aracılığıyla meydana geldiği anlaşılmış olsa da genomik çalışmaların tüm sistem içindeki rolleri büyük oranda anlamsız kalmış ve bu durum bilim insanlarını farklı arayışlara itmiştir (88, 89). Bu nedenle moleküler biyoloji alanında yapılan sonraki çalışmalar sistem biyolojisi düzeyinde bütünlük olarak ele alınmış ve canlı sistemler hakkında fikir edinmek amacıyla matematiksel modellere dökülmüştür (90). Günümüzde sistem biyolojisi kapsamında transkriptomik, proteomik, fluksomik, metabolomik, lipidomik gibi disiplinlerden elde edilen moleküler bilgi sayesinde canlı organizmalara ait bütüncül resmi görmek mümkündür (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1.** Sistem biyolojisi alanında kullanılan omiks teknolojileri. (A, B, C ve D metabolitler ile lipitler) (91).

### 2.3. Omiks Teknolojileri

Omiks teknolojileri hastalıkların erken teşhisini kolaylaştırmak, mekanizmasını aydınlatmak, kişiye özel tedavi stratejileri geliştirmek ve bu stratejilerin etkinliğini ölçmek için genler, transkriptler, proteinler, metabolitler, lipitler gibi biyolojik bir sistemde var olan çeşitli bileşenler arasındaki etkileşimlerin ortaya çıkarılmasına odaklanır (92). Her bir omiks teknolojisi hastalıklara özgü farklılıkların aydınlatılmasına ve sistem biyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunur.

Bir arada olan ve etkileşen genler, transkriptler, proteinler, metabolitler ve lipitler bir hücrenin/organizmanın fenotipi ve fonksiyonu tanımlar. Bu bağlamda omiks teknolojileri biyobelirteç keşfi, hücrenel metabolizma ve kanser gibi karmaşık hastalıkların erken teşhisi ve tedavisi için altta yatan mekanizmaların ve yolların aydınlatılmasında yeni yollar açmıştır (93). Günümüzde omiks teknolojileri başta kanser olmak üzere birçok hastalığın araştırılmasında, ilaç keşiflerinde ve dirençlerinin araştırılmasında ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Kanser araştırmalarında omiks teknolojilerinin uygulamaları gen, transkript, protein, metabolit ve lipit profillerinin aydınlatılarak hücrenel boyutta kanser gelişimin ve evrelerinin ortaya çıkarılmasına olanak sağlayan çok boyutlu analitik yaklaşımlar sağlar (94).

### **2.3.1. Genomik**

Genomik organizmaların genetik veya epigenetik dizi bilgilerinin tamamını veya bir kısmını inceleyen ve bu diziler ile sonraki biyolojik ürünlerin yapısını ve işlevini anlamaya çalışan, bir başka deyişle bir organizmanın genomunun sistematik olarak incelenmesini hedefleyen bir alt disiplindir. Genom bir hücrenin veya organizmanın toplam DNA'sı olup, insan genomu 3,2 milyar baz ve tahminen 30.000-40.000 protein kodlayan gen içerir (95).

Diğer omiks teknolojilerinin gelişiminde lokomotif olan genomik yapısal ve fonksiyonel olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Yapısal genomik genom haritalaması ve DNA dizi analizi (sekanslama) yöntemleri aracılığıyla organizmanın genetik bilgilerinin açıklanmasını yani genom yapılarının karakterize edilmesine aracılık eder. Yapısal genomik ile organizmaya ait genetik bilgiler ortaya çıkarılsa da genlerin fonksiyonlarına ait bilgi elde edilmez. Fonksiyonel genomik ile genlerin ekspresyon paternlerine biçim, miktar ve zaman açısından ışık tutularak organizma açısından önemlerinin anlaşılması sağlanır.

Genomik analizlerle yeni onkojenler keşfedilmekte, tümör büyümesi ve terapötik yanıtın anlaşılmasına katkı sağlanmaktadır. Bu noktada genomik kanser başta olmak üzere birçok hastalık için yeni ve etkili terapötik stratejiler ile klinik olarak kanıta dayalı yaklaşımlar geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

### 2.3.2. Transkriptomik

İnsan Genom Projesinin tamamlanması ile protein kodlayan gen oranının azlığı ve az sayıdaki genin hastalıklarla ilişkilendirilmesine bağlı olarak bilim insanları genomdaki kodlanmayan bölgelerin araştırılmasına ve RNA dizileme çalışmalarına yönelmiştir. Transkriptomik, mikrodizi analizi gibi yüksek verimli yöntemler kullanılarak belirli koşullar altında veya belirli bir hücrede genom tarafından üretilen tüm RNA transkriptlerinin toplamı olan transkriptomu inceleyen bir alt disiplindir. Transkriptom translasyon adı verilen bir süreçte protein sentezi için şablondur ve herhangi bir anda aktif olarak ifade edilen genleri yansıtır. Transkriptom genomun aksine çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösterebilir. Transkriptom dizileme ve biyoinformatik analizler ile hücre düzeyindeki dinamik işleyiş eş zamanlı olarak incelenebilir. Transkriptomik analizlerden elde edilen bilgi genomik analizleri tamamlayıcı niteliktedir. Birçok kanser vakasında mRNA'lar düzensiz haldedir ve onkogeneze süreçleri içinde rol aldıkları bilinmektedir. Bu bağlamda transkriptomik analizler tümör oluşum mekanizmalarının aydınlatılması açısından tanısal role sahiptir (96).

### 2.3.3. Proteomik

Proteinler canlı organizmalarda birçok işleve sahip biyolojik yolların önemli bileşenleri ve hayati molekülleridir. Proteom bir hücrede, dokuda veya organizmada herhangi bir aşamada proteinlerin ekspresyonu, yapısı, işlevleri, etkileşimleri ve modifikasyonları dahil olmak üzere tüm proteinlerin kümesi olarak tanımlanır. Proteomik nihai olarak proteinlerin işlevsel ilişkisini anlamak amacıyla, protein yolları ve ağları aracılığıyla hücre ve organizma içindeki bilgi akışını karakterize etmeyi amaçlar. Proteom hem genlerin hem de çevrenin dinamik bir yansımasıdır ve hastalıklara verilen yanıtlara bağlı olarak etkilenme olasılığının yüksek olması nedeniyle proteinler biyobelirteç keşifleri için umut vaat edicidir. Genom canlı organizmalarda değişmeden kalırken proteom modifikasyonlara uğrar ve değişkendir. Genomdan farklı olarak proteomun dinamik bir yapıya sahip olması, proteinlerin diğer hücresel bileşenlerle etkileşim halinde olması ve hücresel faaliyetlerin yürütülmesinde ki rolleri nedeniyle proteomik sistem biyoloji çalışmalarında ayrı bir öneme sahiptir

(97). Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile peptitleri ve proteinleri buharlaştırmak için matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonunun (MALDI) tanıtılmasının ardından proteomu incelemek için kütle spektrometrisine dayalı yöntemler hızla ortaya çıkmıştır.

Proteinler DNA replikasyonu, metabolik reaksiyonların katalize etmek gibi birçok biyolojik süreçte rol alır. Proteinlerin düzeyleri ve aktiviteleri hücrede meydana gelen süreçlere veya dış etkenlere bağlı olarak niteliksel veya niceliksel olarak değişim gösterir ve buna bağlı olarak proteomik ile dinamik haldeki biyolojik sistemlerin anlık görüntüsü elde edilir. Bu nedenle proteomik, hastalıkların erken teşhisi, prognozu ve gelişimlerinin izlenmesi açısından önemlidir. Ayrıca hedef moleküller açısından ilaç geliştirmede de hayati bir role sahiptir. Proteomik ökaryotik hücrelerde farklı bölgelerde çeşitli yollarla ortaya çıkan translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle karmaşık olup, protein-protein etkileşimlerinin araştırılmasını, kanser patogenizinin daha iyi anlaşılmasını ve kanser tanısında kullanılacak yeni biyobelirteçleri keşfetme fırsatını sunar (98).

#### **2.3.4. Metabolomik**

Genomik, transkriptomik ve proteomik sistem biyolojisinin ana hatlarını oluşturan alt disiplinler olsa da bu katmanların arasındaki bilgi akışını dolduran ve biyolojik sistemlerin yapı ve işleyişiyle ilgili resmin tamamını anlamamızı sağlayan alt disiplin metabolomiktir. Metabolomik düşük moleküler ağırlıklı organik ve inorganik (<1.500 Da) metabolitlerin bütünsel araştırmasına odaklanan sistem biyolojisinin temel alt disiplinidir (8). Metabolitler biyolojik sistemlerde önemli rollere sahiptir. Birçok biyolojik bileşenin (proteinler, RNA, DNA ve hücre duvarları) yapı taşlarıdır, metabolizmada aracılardır, yaşam için birçok gereksinimi sağlarlar (örneğin enerji salınımı için ATP) ve düzenleme ile sinyalizasyonda aktif rol oynarlar. Çevresel bozulmalara verilen birincil ve hızlı tepkiler genel olarak metabolit odaklıdır ve bunları transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerdeki değişiklikler izler. Metabolitlerin düzeyleri biyolojik sistemlerin çevresel değişikliklere verdikleri yanıtlara bağlı olarak fenotipleri tanımlar ve biyolojik süreçlerle ilgili tamamlayıcı ve bütüncü bilgi sağlar. Metabolitler gen ve protein ekspresyonunun aşağı akışındaki

son ürünleri temsil eder ve bu nedenle metabolomik fenotip ile en yakın ilişkili olan alt disiplindir (99, 100).

Metabolomik mitokondriyal fonksiyon (TCA döngüsü, yağ asidi oksidasyonu), lipit biyosentezi ve metabolizması, glukoz ve glutamin metabolizması ve nükleotid biyosentezi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan çok sayıda metabolit sınıfının eşzamanlı analizine izin verir. Patofizyolojik süreçleri tanımlamak, biyobelirteçleri keşfetmek, ilaç toksisitesi ve etkinliğinin anlaşılmasını sağlamak, çevre ve genotip etkileşimini ortaya çıkarmak (nutrigenomik gibi) gibi çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir. Ayrıca son yıllarda yeni bir araştırma alanı olarak ortaya çıkan metabolit düzeylerinin yanı sıra döngü hızlarının hesaplanmasına dayanan fluksomik analizler ile metabolomik verilerin kapsamı arttırılabilmektedir (101, 102).

Metabolomik hasta ve kontrol gruplarına ait karşılaştırmalı metabolik profillerin çıkarılması, moleküler düzeyde hastalık mekanizmalarını anlamak için güçlü bir strateji sağlar. Transkriptomik ve proteomik gibi diğer yüksek verimli yaklaşımlar tarafından tanımlanamayacak yeni biyobelirteçlerin yanı sıra hastalık patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunabilecek molekülleri tanımlama potansiyeline sahiptir. Bu nedenle metabolomik, özellikle kanser oluşumunda viral enfeksiyon, patogenez ve antiviral stratejilere verilen fizyolojik yanıtta yer alan yeni ve öngörülemeyen yolları belirleme potansiyeline sahiptir (103).

Metabolomik çalışmaların temel hedefi biyolojik bir sistemin metabolit profilini aydınlatmak iken, ardışık hedefi hastalık başlangıcı ve sigara kullanımı gibi canlı organizmaların bünyesinde meydana gelen bir farklılığa verdiği yanıt olarak metabolit profilindeki değişimleri incelemektir. Bu bağlamda metabolomik, hastalıkların erken teşhisinde, kişisel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde, tedaviye verilen yanıtın incelenmesinde ve yeni biyobelirteçlerin keşfinde son yıllarda sıklıkla uygulanan umut verici araçlar haline gelmiştir.

### **2.3.5. Lipidomik**

Lipidomik lipit metabolizmasını geniş ölçekte incelemek ve canlı organizmalardaki spesifik değişikliklerin altında yatan biyokimyasal mekanizmaları aydınlatmayı hedefleyen sistem biyolojisinin önemli alt disiplindir. Lipitlerin hücresel

rollerinin yanı sıra hastalık oluşum ve gelişim mekanizmalarındaki rollerinin incelenmesine olanak veren lipidomik son on yılda hızla gelişme göstermiştir (104).

Hücre ve organellerin zarları biyolojik işlevleriyle yakından bağlantılı benzersiz lipit bileşimlerine sahiptir. Ökaryotik hücrelerin lipidomları hücre zarı dinamiklerini yapısal ve kimyasal olarak düzenleyen, enerji depolayan ve biyoaktif metabolitlerin öncüleri olarak hizmet eden yüzlerce lipit türünü içerir (105). Lipitler hücrenel bariyerler, membran matrisleri, sinyalizasyon ve enerji depoları dahil olmak üzere hücrenel fonksiyonlarda birçok önemli rol oynar. Hücrenel lipitler oldukça dinamiktir yani fizyolojik, patolojik ve çevresel koşullarla sürekli değişim gösterirler. (104). Ayrıca hücrenel lipitler oldukça karmaşık olup  $\mu\text{mol}$  ile  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein arasında farklı derişim aralıklarına sahiptirler.

Membranların biyofiziksel özellikleri açıl zincirlerindeki çift bağların sayısı, konumu ve geometrisi gibi bireysel lipit türleri arasında görünüşte küçük ama yapısal olarak oldukça önemli farklılıklardan etkilenir. Bu özellikler zar gelişimini ve fisyon olaylarını yönlendirerek protein işlevlerini düzenler (106). Membranlardaki lipit türleri tek tek moleküller olarak değil toplu olarak hareket eder ve bu nedenle biyolojik işlevlerini anlamak için nicel ve kapsamlı olarak analiz edilmeleri önem arz etmektedir.

Lipidomikın kanser başta olmak üzere hayati öneme sahip diğer birçok hastalıkla ilişkilendirilmesini takiben son yıllarda bilimsel araştırmaların ön saflarında yer aldığı görülmektedir. Hastalıkların patolojileriyle bağlantılı spesifik lipit yollarının mekanistik olarak anlaşılması ve biyobelirteçlerin tanımlaması hastalıkların tedavisinde yeni terapötiklerin geliştirilmesinin temelini oluşturabilir (107).

#### **2.4. Bütünleşik Omiks Analizler**

Omiks araştırmaların en yaygın amacı incelenen biyolojik sistem hakkında daha kapsamlı veriler elde etmektir (108). Geleneksel olarak omiks tabanlı biyomoleküler araştırmalar tek bir gen, protein, metabolit veya yolak üzerine yoğunlaşmıştır. Oysaki birçok hastalık karmaşık ve çok faktörlü olduğundan çoklu moleküler seviyeler arasındaki çapraz etkileşim, her bir omiks tabakayı bağımsız olarak araştıran bu "moleküler indirgemeci" paradigma kullanılarak başarılı bir şekilde

incelenemez (109). Bu nedenle sistem biyolojisinde genotip ve fenotip arasındaki doğrudan nedensel ve fonksiyonel bağlantıları göstermek için protein, metabolit ve lipid gibi ara moleküler seviyelerin gözlemlenmesi kritik öneme sahiptir (110). Bu nedenle son yıllarda proteomik, metabolomik ve lipidomik sistem biyolojisi çalışmalarında genotip ile bağlantı kurmak için temel taşlar haline gelmiştir (111). Sonuç olarak bütünleşik omiks bu üç metodolojiden toplanan bilgileri kullanıp genotip-fenotip ilişkisini entegre etmeye dayalı kapsamlı bir açıklama sağlayarak karmaşık biyolojik sistemler hakkındaki anlayışımızı geliştirip biyolojik yollar ile ilgili eksiksiz ve bilgilendirici bir görünümünün elde edilebileceğini göstermiştir (112).

Tüm metabolitlerin ve lipidlerin kapsamlı profilini sağlayan metabolom ve lipidom proteomun aşağı akışında yer alır (100). Bu noktada hücrenel süreçlerle yakın ilişkileri nedeniyle metabolomik ve lipidomik fenotip-genotip boşluğunu köprüleyen bir unsur olarak kabul edilir (113). Beyin tümörlerinin patogenezi anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar sıklıkla genomik, transkriptomik ve proteomik analizlere odaklanmıştır. Bu nedenle çalışma kapsamında bu açığı kapatmaya yönelik olarak metabolomik ve lipidomik (bütünleşik omiks) analizler ile GBM, menenjiyom ve metastatik (akciğer) beyin tümörlerinin fenotiplerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

#### **2.4.1. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin Tarihsel Gelişimi**

Modern metabolomik analizlerin başlangıcı 1940'ların sonlarında Roger Williams ve ark. (114)'nin her bireyin biyolojik sınırlarına yansıyan bir "metabolik profile" sahip olabileceğini öne sürmesiyle başlamıştır. 1971'de Horning ve ark. (115) tarafından insan idrar ve dokusunda bulunan bileşiklerin GC-MS ile analiz edilebileceğini gösterdikleri çalışmada ise "*metabolik profil*" terimi ilk kez kullanılmıştır. Metabolomik analizlerdeki asıl atılım 2005 yılında İnsan Metabolom Projesi (HMP) ile gerçekleşmiştir. Bu projenin ana hedefleri 1  $\mu\text{M}$ 'dan daha yüksek derişimde bulunan metabolitleri tanımlayarak ilaç metabolizması ve toksikolojisinin değerlendirilmesi, insan metabolomu ve insan genomu arasında bir bağlantı oluşturulması, hastalıkların tanımlanması, prognozu, tedaviye verilen yanıtın iyileştirilmesi ve verileri tüm araştırmacılara ücretsiz olarak sunmak için elektronik bir



veritabanı (Human Metabolome Database-HMDB) oluşturulmasıydı. İnsan Metabolom Projesi'nin 2007 yılında tamamlanarak HMDB'in ilk sürümünün yayınlanması, diğer veri tabanlarının tanıtılması/gelişimi (METLIN, KEGG vb.), çok değişkenli istatistiksel analizlerle birlikte yüksek çözünürlüklü ve duyarlı kütle spektrometresi (MS) ve NMR cihazlarının geliştirilmesi sonucunda metabolomik analizler son on beş yılda sistem biyolojisinde hızla büyüyen bir alan haline geldi (116-118). Metabolit derişimi ve yapısı, ilişkili enzimler veya taşıyıcılar, fizyolojik ve hastalıkla ilgili özellikler ve ilgili kimyasal reaksiyonlar ile metabolik yollar hakkında bilgi içeren HMDB'nin 2022 yılında yayınlanan son sürümünde 217.920 metabolit yer almaktadır (119).

Lipit biyokimyası üzerine yapılan erken çalışmaların çoğu bir lipit türüne, sınıfına veya bir enzim aracılı yolağa odaklanmıştır. Lipit homeostazı, sinyal iletimi ve davranışı üzerine bu öncü çalışmalar lipidomik analizin gücünü göstermiştir. En önemlisi bu çalışmalar zar yapılarında ve hastalık esnasında biyolojik tepkilere aracılık eden işlevlerdeki değişiklikleri tanımlamanın faydasına ilişkin ilk görüşü sağlamıştır (120). Bir hücre, organ veya biyolojik sistemdeki kimyasal olarak farklı lipit türlerinin tamamını ifade eden "*lipidom*" terimi ilk olarak 2001 yılında hakemli bir yayında ortaya çıkmıştır (121). Sonrasında ise 2002 yılında Rildfors ve ark. (122)'leri "*fonksiyonel lipidomik*" terimini "*membran lipidlerinin oynadığı rolün incelenmesi*" olarak tanımlamıştır. 2003 yılında ise Han ve Gross (123) bir hücrenin lipidomundaki lipitlerin miktarını belirlemek, hücresel organizasyonlarını tanımlamak, lipit-lipit ve lipit-protein etkileşim ve dinamiklerini belirlemek ve hücresel bozunmalardan sonra lipit bileşenlerinde meydana gelen değişiklikleri tanımlamak için gerekli enstrümental teknikleri açıklayarak lipidomik disiplinindeki araştırmanın kapsamını özetlemiştir. Bu araştırma lipidomik çalışmaları lipit yapılarının analizi için analitik kimyanın araçlarına, teknolojilerine ve ilkelerine, çok sayıda farklı moleküler türe, hücre fonksiyonlarına ve hücresel bozulmalar sırasında lipitlerin dinamik değişikliklerini toplu olarak tanımlayan etkileşimlere dayanan yeni bir alan olarak tanımlamıştır. Günümüzde lipidomik hücresel lipit sinyali, metabolizma ve homeostazdaki değişikliklerin tanımlanması ve nicelenmesi yoluyla lipitlere bağlı hastalık süreçlerinin altında yatan biyokimyasal mekanizmaların tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından finanse edilen LIPID MAPS konsorsiyumu lipidomik analizlerin birçok alanda gelişimini kolaylaştırmak için kurulmuştur. Bu konsorsiyumun amacı lipitlerin sistematik sınıflandırmasını, karakterize edilmesini, hücre içindeki derişimlerinin ölçülmesini ve veri tabanı geliştirilmesini içermektedir. Bu hareket 2005 ve sonrasında birçok bilgilendirici derleme makalesinin yayınlanması ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak tanıtılan yüksek çözünürlüklü ve duyarlı MS cihazlarının gelişimi ile birlikte lipidomik çalışmaların büyümesini ve gelişimini büyük ölçüde hızlandırmıştır (120).

#### **2.4.2. Metabolomik ve Lipidomik İlişkisi**

Lipitler hücresel metabolik ürünler olduklarından lipidomik genel olarak “metabolomik” alanının geniş şemsiyesi altına girer. Aslında, çoğu metabolomik çalışma bazı lipit sınıflarının analizini kapsar veya lipit analizini belirli bir dereceye kadar gerçekleştirir (123). Bununla birlikte diğer suda çözünür hücresel metabolitlerin çoğunun aksine lipitlerin eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri lipidomik analizleri genel metabolomik analizlerden farklı bir disiplin haline getirir. Çoğu lipit sınıfının her biri yüzlerce, binlerce veya on binlerce bireysel lipit türü içerebilir. Kimyasal bakış açısından ne tek tek lipit türleri ne de bütün bir lipit sınıfı metabolik ağ içerisindeki farklılaşmayla ilgili bilgi sağlayamaz. Bu nedenle lipit metabolizmasının anlaşılması için lipidomik analizlerin metabolomik analizlerden ayrı olarak değerlendirilmesi elzemdir.

#### **2.4.3. Metabolitler ve Metabolit Sınıfları**

Metabolitler metabolizmanın işleyişi sırasında üretilen ve çeşitli enzimler tarafından katalize edilen ara ürünlerdir. Metabolitlerin yakıt, yapı, sinyal iletimi, katalitik aktivite, savunma ve diğer organizmalarla etkileşimler gibi çok çeşitli işlevleri vardır. Bir başka deyişle metabolitler canlı organizmaların biyolojik süreçlerinde rol alan çok sayıdaki yolağın temel bileşeni veya bu metabolik yolağın aktiviteleriyle oluşan önemli biyomoleküllerdir. Organizmalarda pek çok metabolit düşük derişimlerde yüksek akış ve döngü halinde bulunur. Birçok organizma hidrofilik karbonhidratlar, uçucu alkoller, ketonlar, amino asitler ve organik asitler gibi farklı fizikokimyasal çeşitliliğe sahip çok sayıda metabolit barındırır. İnsan vücudunda

üretile metabolitler başta olmak üzere bitki, ilaç gibi diğer metabolitler hakkındaki tüm bilgilere HMDB veri tabanı üzerinden ücretsiz olarak erişilebilir.

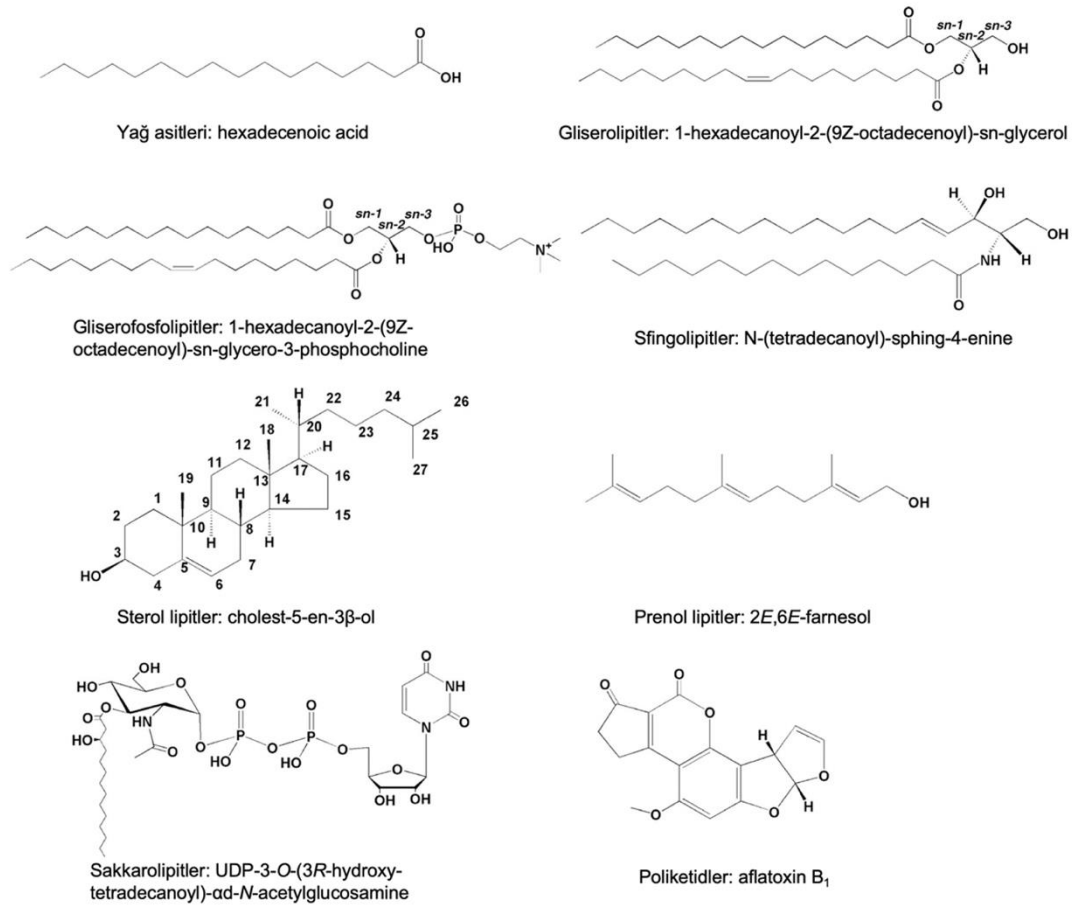
Metabolomik çalışmalarda araştırmacıların ana odağı canlı organizmaların işlevi ve dinamiği ile ilgili tüm biyomolekülleri tanımlamak, bunları karakterize etmek ve seviyelerini belirlemektir. Metabolitlerin seviyeleri biyolojik süreçlerle ilgili bütünlüyci bilgiler sağlar ve değişikliklere verilen cevap olarak biyolojik sistemlerini fenotiplerini tanımlar. Özellikle kanser çalışmaları, yeni metabolik biyobelirteçlerin tanımlanması ve doğuştan gelen metabolizma hatalarının teşhisi için önemli çabalar sarf edilmektedir. Şu anda glikoz, kolesterol, kreatinin, yağ asitleri vb. gibi çeşitli metabolitler klinikte rutin olarak ölçülmektedir. Bunun için gereken altyapının çoğu dünya çapında birçok hastane laboratuvarlarında mevcut halde bulunmaktadır (124).

Polarite, asitlik ve uçuculuk gibi farklı fizikokimyasal özelliğe sahip çok sayıda metabolit olması nedeniyle geniş bir yelpazede metabolitleri eş zamanlı analiz etmek zordur. Bu nedenle, metabolomik çalışmalarda örneklerin toplanması ve saklanması, biyolojik matrislerden metabolitlerin tüketilmesine yönelik yaklaşımlara ve enstrümental yöntemlere kadar her bir deneysel basamağın dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir.

#### **2.4.4. Lipit ve Lipit Sınıfları**

Lipitler genel olarak hidrofobik veya amfifilik küçük moleküller olarak tanımlanır. Bir lipit genellikle suda çözünmeyen ve polar olmayan organik çözücülerde çözünen herhangi bir molekül olarak kabul edilir. Bazı lipitlerin amfipatik doğası sulu ortamda veziküller, çok katmanlı/tek katmanlı lipozomlar veya zarlar gibi yapılar oluşturmalarına izin verir. Esas olarak lipitler hidrokarbon zincirlerinden oluşan heterojen bir bileşik grubudur ve farklı yaşam süreçleri için elzem ve enerji açısından zengin organik moleküllerdir. Biyolojik lipitler genellikle, yağ asitleri, eikosanoidler, monogliseritler, digliseritler, trigliseritler, fosfolipitler, sfingolipitler, steroller, terpenler, prenoller ve yağda çözünen vitaminleri (A, D, E vitaminleri gibi) içeren ve doğal olarak oluşan benzersiz yapılara sahip geniş bir molekül grubunu ifade eder. Lipitlerin işlevleri arasında enerji depolamak, sinyal iletimi ve hücre zarlarının yapısal bileşenleri olarak davranmak yer alır (125).

Lipit sistematik isimleri için genel olarak kabul edilen kılavuzlar Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ve Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca LIPID MAPS konsorsiyumu lipitler için kapsamlı bir sınıflandırma, isimlendirme ve kimyasal temsil sistemi geliştirmiştir (126). Biyolojik lipitler tamamen veya kısmen ketoaçil ve izopren grupları olmak üzere iki farklı biyokimyasal alt birimden meydana gelir (127). LIPID MAPS lipitleri her biri kendi alt sınıflandırma hiyerarşisine sahip sekiz lipit sınıfına bölmüştür. Bu sınıflar yağ asitleri (FA), gliserolipitler (GL), gliserofosfolipitler (GP), sfingolipitler (SP), sterol lipitler (ST), prenil lipitler (PR), sakkarolipitler (SL) ve poliketidler (PK)'dir (Şekil 2.2). Yağ asitleri biyolojik lipit sınıflarının en önemlisidir ve daha karmaşık lipitlerin yapı taşlarını oluştururlar (126).



Şekil 2.2. Lipit sınıfları (126).

Genel olarak lipitlerin karbon zincirleri 4 ile 24 karbon uzunluğunda doymuş veya doymamış olabilir ve oksijen, halojen, nitrojen ve kükürt içeren fonksiyonel gruplara bağlanabilir. Yağ asidinin çift bağ içeriğine bağlı olarak molekülün konfigürasyonu önemli ölçüde etkilenir ve cis veya trans geometrik izomerleşme olasılığı vardır. Araşidonik asit ve prostaglandinleri, lökotrienleri ve tromboksanları içeren eikosanoidler biyolojik olarak en önemli yağ asitleridir.

Gliserolipitler mono-, di- ve tri-sübstitüe gliserollerden oluşur. Gliserolün üç hidroksil grubunun her biri tipik olarak farklı yağ asitleri tarafından esterleştirilir. Gliserolipitler tüm hücrelerin önemli yapısal ve fonksiyonel bileşenleri olduklarından tüm canlı organizmalarda ortaktır ancak düzeyleri farklıdır. Enerji depolanması veya hücre sel sinyal iletiminde önemli araçlar olarak hizmet eden gliserolipitlerin birçok hastalığın oluşumunda rol aldığı gösterilmiştir.

Genellikle fosfolipitler olarak adlandırılan gliserofosfolipitler doğada hücrelerin lipit çift tabakasının anahtar bileşenleridir. Ayrıca metabolizma ve hücre sinyalizasyonunda görev alırlar. Nöral doku (beyin dahil) nispeten yüksek miktarlarda gliserofosfolipit içerir ve bunların bileşimindeki değişiklikler çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Biyolojik zarlarda bulunan önemli gliserofosfolipitler fosfatidilkolin (PC, GPCho veya lesitin olarak da bilinir), fosfatidiletanolamin (PE veya GPEtn) ve fosfatidilserindir (PS veya GPSer). Hücre zarlarının birincil bileşeni ve hücre içi ve hücreler arası proteinler için bağlanma bölgeleri olarak hizmet ederler.

Sfingolipitler 16 ila 26 karbon atomuna sahip doymuş veya doymamış karbon zincirlerine sahiptir. Seramidler (N-asil-sfingoid bazlar) amide bağlı bir yağ asidine sahip sfingoidlipitlerin ana alt sınıfıdır. Seramidler bazen son karbonunda bir hidroksil grubu olan 30 karbonlu bir yağ asidine sahiptir.

Kolesterol ve türevleri gibi sterollerde gliserofosfolipitler ve sfingomyelinlerle birlikte membran lipitlerinin önemli bileşenleridir. Kolesterolün oksitlenmiş türevleri olan ve karaciğerde sentezlenen safra asitleri ve bunların konjugatları önemli sterollerdir. Steroller hormonlar ve sinyal molekülleri olarak farklı biyolojik rollere sahiptir. C18 steroidleri östrojen ailesini içerirken C19 steroidleri testosteron ve androsteron gibi androjenleri içerir. Karotenoidler antioksidanlar ve A vitamininin öncüleri olarak işlev gören önemli basit izoprenoidlerdir. Sakkarolipitler yağ

asitlerinin doğrudan bir şeker omurgasına bağlı olduğu ve çift katmanlı membranlarla uyumlu yapılar oluşturduğu bileşiklerdir. Poliketidler çeşitli organizmalardan izole edilen çok çeşitli biyoaktiviteler sergileyen ve yapısal olarak çeşitli biyoaktif moleküllerdir (126-129).

Metabolomik analizlerde olduğu gibi lipidomik analizlerde de çeşitli fizokimyasal özelliklere sahip lipit sınıflarının mevcudiyeti nedeniyle tüm olası lipit sınıflarının analizini gerçekleştirmek mümkün olmayıp, çeşitli deneysel varyasyon kaynaklarına bağlı olarak deneysel süreçlerin titiz bir şekilde değerlendirilip gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

## 2.5. Metabolomik ve Lipidomik Analizler

Metabolomik ve lipidomik analizler temelde hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizler olmak üzere iki ayrı kategoriye ayrılır. Hedeflenmiş analizler ilgilenilen moleküler gruptaki sınırlı sayıda moleküle ait nicel verilerin elde edilerek ilgili biyokimyasal yolaktaki değişimlerin hedefe yönelik bir bakış açısıyla değerlendirilmesine odaklanır. Hedeflenmiş analizler iç standartların kullanılması ile nicel veya yarı nicel şekilde gerçekleştirilir. Hedeflenmiş çalışmalarda analizi hedeflenen metabolitlerin veya lipitlerin standartları ve optimize analitik yöntemler kullanılarak analizler gerçekleştirilir.

Hedeflenmemiş analizlerde bilinmeyenler dahil örnekteki tüm ölçülebilir moleküllerin kapsamlı analizi istenir. Hedeflenmemiş metabolomik veya lipidomik analizlerin ana hedefi örnekteki metabolom ve lipidom profilini kapsamlı şekilde aydınlatmaktır. Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerin kapsamlı doğası nedeniyle elde edilen geniş veri setlerinin analizi için çok değişkenli analiz gibi gelişmiş kemometrik tekniklere ihtiyaç vardır. Hedeflenmemiş çalışmalarda kullanılan tüketme yöntemleri, örnek hazırlama basamağı, kromatografik ayırma etki eden kolon ve hareketli fazlar gibi birçok faktör metabolitlerin ve lipitlerin geniş ve kapsamlı analizleri için önemli olup optimize edilmelidir.

Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde örnek toplama, tüketme ve örnek hazırlama basamakları ile kromatografik analizlerde kullanılan sabit ve hareketli fazlar temelde aynıdır (130). Hedeflenmiş çalışmalar çoğunlukla doğruluğa, hedeflenmemiş çalışmalar ise genelde tekrarlanabilirliğe

odaklanır. Hedeflenmemiş çalışmalarda analizler tarama (*SCAN*) modunda, hedeflenmiş çalışmalarda ise seçici iyon izleme (*SIM*) modunda gerçekleştirilir. Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizler örnek seçimi ve toplanması, tüketme, örnek hazırlama, enstrümental analiz ve veri analizi olmak üzere beş aşamada gerçekleştirilir.

### 2.5.1. Örnek Seçimi ve Toplanması

Metabolomik ve lipidomik çalışmalarda anlamlı analiz sonuçları elde etmek için örneklem büyüklüğü ve örneklem seçimi çok önemlidir. Karmaşık biyolojik sistemlerden gelen varyasyonları ortadan kaldırmak için genelde hücre kültürü çalışmaları için 3-6, hayvan deneyleri için 10-20, insan çalışmaları için 10-30 örnek kullanılır.

Kan plazması kolay erişilebilirliği nedeniyle metabolik ve lipidomik fenotipleme için en yaygın kullanılan biyoakışkanlardan biridir (131, 132). Tümör dokusunun ise tümörle doğrudan temas halinde olması nedeniyle kan örneğinden daha yüksek seviyelerde potansiyel biyobelirteçler içerdiği düşünülmektedir (133). Bu nedenle tümör dokusundan saptanan biyobelirteçler tümörleri nesnel olarak sınıflandırmada, hastalığın sonucunu tahmin etmede ve optimal tedaviye karar vermede potansiyel yol göstericidirler ve son yıllarda fenotipleme çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bunların dışında insan kaynaklı hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde hücre kültürü, idrar, gaita ve tükürük gibi örnekler ile de çalışılmaktadır.

Örneklerin toplanması ve saklanması hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalardaki en yüksek varyasyon kaynaklarından biridir. Bu nedenle çalışma süresince örnekler aynı şartlar altında toplanmalı ve saklanmalıdır. Metabolitlerin ve lipitlerin kararlılığı sıcaklıktan etkilendiği için örneklerin saklandığı koşullar ayrıca önemlidir. Plazma ve idrar örneklerindeki metabolitlerin -80 °C'de 30 ay, -20 °C'den düşük sıcaklıklarda bir hafta, oda sıcaklığında ise sadece birkaç saat kararlı kaldığı bildirilmiştir (134). Bu nedenle moleküler seviyelerdeki değişiklikleri en aza indirmek için örneklerin mümkün olduğunca soğukta saklanması gerekmektedir.

Plazma örnekleri ile yapılan çalışmalarda kan örnekleri aynı tip pıhtılaştırıcı (EDTA, lityum heparin vb.) tüp içerisine alınmalı ve hemen ardından santrüfuj edilip plazma örneği kandan ayrılarak -80 °C’de saklanmalıdır. Aksi takdirde uzun süre oda sıcaklığında bekleyen kan örnekleri veya plazmalardaki metabolitlerin ve lipitlerin seviyelerinde kaçınılmaz olarak değişim meydana gelecektir. Doku örnekleri plazma örneklerinden farklı olarak cerrahi müdahalenin hemen ardından kriyojenik tüplere alınarak sıvı azot içerisinde daldırılmalı ve metabolizma anında söndürülmelidir. Aksi halde örnekteki metabolitlerin ve lipitlerin düzeylerinde yine değişim meydana gelecektir. Sıvı azot ile metabolizması anında söndürülen doku örnekleri -80 °C’de saklanmalıdır.

### 2.5.2. Örneklerin Tüketilmesi

Örnek hazırlama basamağı matriks etkisini azaltarak hassasiyeti arttırmak için hedeflenmemiş lipidomik ve metabolomik analizlerde en temel ve en önemli basamak olup analitik yöntem ve analiz edilecek metabolit veya lipit türüne göre değişim göstermektedir. Örnek hazırlama basamağı aynı anda çok sayıda örneği çalışmak ve tüketme adımı sırasında metabolitlerin ve lipitlerin stabilitesine bağlı olarak olası herhangi bir bozulmayı önlemek ve yüksek verimli analizler gerçekleştirmek için basit, hızlı, sağlam ve tekrarlanabilir olmalıdır. Bu nedenle analiz sonuçlarının kalitesi ve doğruluğu örnek hazırlama basamağından doğrudan etkilenmektedir.

Örnek hazırlama basamağı tüketme ve enstrümental cihazın gerekliliklerine bağlı olarak temelde iki basamak halinde gerçekleştirilir. Plazma örnekleri ile yapılan çalışmalarda ilk adım proteinlerin çöktürülmesi iken doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda ise metabolitlerin tüketilmesinden önce veya eş zamanlı olarak örneğin homojenizasyonudur (135).

Doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda metabolomik ve lipidomik profilin değişmemesi için öncelikli olarak metabolizma uygun bir şekilde söndürülmeli ve tüketme işlemi gerçekleşinceye kadar örnekler dondurulmalıdır. Çoğu durumda metabolizmanın uygun şekilde söndürülememesi oksidatif strese neden olmaktadır. Ayrıca doku örneklerinin ultrasonikasyon vb. ile homojenizasyonu sıvı nitrojen veya kuru buz varlığında yapılmalıdır.



Plazma ve doku metabolomu ile lipidomu çeşitli miktarlarda, stabilitelerde ve fizikokimyasal özelliklerde çok çeşitli metabolit ve lipit grupları içerir (136). Bu nedenle tek bir çözücü ile karmaşık bir biyolojik örnekten tüm metabolitlerin veya lipitlerin tüketilmesi mümkün değildir (137, 138). Tüketme basamağında çalışmanın hedefi doğrultusunda, analitik yöntem ve ilgili moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çözücü seçimi yapılır. Analizler sonucunda elde edilen metabolik veya lipidomik profil kullanılan çözücü veya çözücülerin polaritesine göre değişir. Ayrıca tüketme geri kazanımı kullanılan çözücülerin fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra çözücü-örnek oranından da etkilenir. Bu nedenle çözücüler hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmanın amacına uygun olarak seçilmeli ve eğer mümkünse ön deneyler ile çözücülerin tüketme verimlilikleri değerlendirilmelidir.

### **Metabolitlerin Tüketilmesi**

Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde genel olarak sıvı-sıvı tüketme tercih edilmektedir. Genel olarak metanol, aseton, asetonitril veya bu çözücülerin sulu karışımları metabolizmayı durdurmak, proteinleri çöktürmek ve kapsamlı metabolomik profiller elde etmek için kullanılmaktadır (9, 139, 140). Metanol hem polar hem de polar olmayan metabolitleri aynı anda çözme kabiliyetine sahip olması nedeniyle diğer çözücülerden daha fazla kullanılmaktadır. Asetonitril plazma örneklerinden proteinlerin çöktürülmesinde metanole göre daha verimlidir. Plazma örneklerinden proteinler plazma ile aynı hacimde asetonitril veya plazma hacminin en az iki katı hacimde metanol eklenerek çöktürülebilir. Ayrıca örneğe doğrudan soğuk çözücü veya perklorik asit, formik asit (FA) gibi kimyasalların eklenmesi ile de metabolizma hızlı ve etkili bir şekilde durdurulup proteinler çöktürülebilir (141). Perklorik asitin kütle spektrometresi ile uyumlu olmaması ve pH değişimine bağlı olarak bazı metabolitleri kimyasal bozunmaya uğratması nedeniyle hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda kullanımı tercih edilmemektedir (142, 143). Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda katı faz tüketme alternatif bir tüketme yöntemi olsada kullanılan adsorbana bağlı olarak belirli bir metabolit grubunun analizine izin verdiği kullanımı kısıtlıdır. Örnek hazırlama basamağında proteinleri

çöktürerek metabolitlerin ve lipitlerin analizine imkan veren bir diğer yöntem ise ultrafiltrasyondur. Ancak ultrafiltrasyon maliyetli bir tüketme yöntemidir.

### **Lipitlerin Tüketilmesi**

Metabolomik çalışmalara benzer şekilde lipidomik çalışmalarda da güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için sadece örneklerin toplanması ve saklanması değil aynı zamanda örnek hazırlama basamakları ve süreçlerine ekstra özen gösterilmelidir.

Genel olarak lipidomik çalışmalar hızlı, tekrarlanabilir ve farklı polaritelere sahip çok çeşitli lipit sınıflarını tüketebilen ve analizlerin gerçekleştirileceği enstrümantal tekniklerle uyumlu örnek hazırlama yöntemleri gerektirir (144). Biyolojik örneklerden tüketilen lipit kapsamını arttırmak için sıvı-sıvı tüketme, organik çözücü ile proteinlerin çöktürülmesi ve katı faz tüketme dahil olmak üzere çeşitli tüketme yöntemleri kullanılmaktadır (145). Lipidomik analizlerde de sıvı-sıvı tüketme yöntemi diğer yöntemlerden daha sık kullanılmaktadır. Lipidomik tüketme protokolleri kromatografik ayırım ve kütle spektrometrisi analizine potansiyel olarak girişim yapabilecek biyolojik matris kaynaklı diğer bileşenlerin (proteinler, şekerler, inorganik tuzlar gibi) numeneden uzaklaştırılması için lipitlerin hidrofobik yapısından yararlanır (146). Günümüzde Folch (147) ve Bligh (148) tarafından geliştirilen kloroform, metanol ve suyun kullanıldığı üç fazlı tüketme tekniği lipitlerin analizinde halen altın standart yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Ayrıca lipitlerin tüketilmesinde kloroform yerine diklorometan, metil tert-bütül eter (MTBE), bütanol ve hegzan gibi farklı polariteye sahip çözücülerde kullanılmaktadır (149).

- **Bligh ve Dyer yöntemi:** Az miktarda biyolojik örnek (<50 mg doku) kloroform:metanol:su (1:1:0,9, h/h/h) ile tüketilir. Faz ayırımından sonra lipitleri içeren kloroform alt fazı ile analizler gerçekleştirilir. Kloroformun toksik olması, viskozitesine bağlı olarak pipetleme zorluğu veya pipetleme sırasında suda çözücünün safsızlıkların kloroform fazı ile taşınması bu yöntemin dezavantajlarıdır.

- **Folch yöntemi:** Az miktarda biyolojik örnek (~0,1 g doku) kloroform:metanol (2:1, h/h) karışımı ile tüketilir ve tüketme çözücüsü su veya %0,9 sodyum klorür (0,2 hacim) ile yıkanır. Bligh ve Dyer yöntemine benzer dezavantajlara sahiptir.

- **Matyash yöntemi:** Biyolojik örnek MTBE:metanol:su (5:1,5:1,25, h/h/h) ile tüketilir. Faz ayırımından sonra MTBE üst fazda yer alır ve bu nedenle yüksek verim, tekrarlanabilirlik ve pipetleme kolaylığına sahiptir. MTBE'in önemli miktarda sulu bileşen içermesi nedeniyle suda çözünür kirletici maddeleri taşıyabilmesi ise dezavantajdır (150).

### **Bütünleşik Omiks Analizler İçin Eş Zamanlı Tüketme**

Bütünleşik omiks analizlerde metabolom ve lipidomun kapsamlı analizi için farklı tüketme protokolleri ve aynı örneğin birden fazla alikotu gerekir. Bu nedenle çoklu ve paralel örnek hazırlama yöntemleri için artan çaba, zaman ve maliyetin yanı sıra genelde klinik olarak az miktarda biyolojik örnek toplanabilmesi veya etik kısıtlamalar nedeniyle gereken örnek hacimlerinin çoğu zaman çoklu tüketmeler için mevcut olmaması, bilim insanlarını aynı örnekten lipidom, metabolom ve proteomun eş zamanlı analizine izin veren çok fazlı tüketme protokollerinin geliştirilmesine yöneltmiştir. Moleküler sınıflara göre tüketme koşullarının farklılık göstermesi nedeniyle yüksek verimli, kapsamlı ve farklı türde moleküllerin (DNA'lar, RNA'lar, proteinler, metabolitler, lipitler gibi) aynı örnekten analizine imkan veren tüketme yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik artan ilgi sonucunda elde edilen biyolojik veri kapsamının arttırıldığı bildirilmiştir (126). Ayrıca tez kapsamındaki gibi bütünleşik omiks analizlerle GC-MS ve LC-MS gibi farklı analitik platformlar kullanarak aynı örnek üzerinde birden fazla analiz yapılması deneysel varyansı en aza indirirken, veri doğruluğu ile karşılaştırılabilirliğini ve analiz edilen moleküler tür sayısı ile kapsamını da arttıracaktır. Bu strateji omik araştırmalarının en yaygın amacını yani tanımlanan biyomolekül sayısı ve türünün arttırılması gerekliliğini doğrudan karşılamaktadır. Bu nedenlerle bütünleşik omiks analizler için aynı örnekten farklı moleküler grupların analizine imkan veren hızlı, sağlam, tekrarlanabilir, yüksek verimli ve basit örnek hazırlama protokollerinin geliştirilmesi hedeflenmemiş çalışmalardan elde edilen bilginin genişletilmesi açısından önem arz etmektedir.

### 2.5.3. Örnek Hazırlama Basamağı

#### GC-MS Analizleri için Örnek Hazırlama Basamağı

GC-MS ile hedeflenmemiş analizlerde tüketme işleminin ardından örnekler genel olarak türevlendirilir. GC-MS ile yapılan analizlerde uygun şartlar altında tüketilen metabolitler veya lipitler uçucu olmadığı sürece örnek kaynağına bakılmaksızın türevlendirilmelidir. Moleküllerin yüksek sıcaklıklarda bozunmasını önlemek ve karboksilik asit, keton ve alkol gibi polar fonksiyonel grupları içeren metabolitlerin uçuculuğunu artırmak için türevlendirme yapılır. Türevlendirme uçuculuğu, termal kararlılığı, hassasiyeti ve dedektör yanıtını iyileştirir. Metoksiaminasyon ve ardından sililasyon GC-MS’de yaygın uygulanan iki aşamalı türevlendirme (151). Uygun çözücü/çözücüler ile tüketilen örnekler türevlendirme basamağından önce bir vakumlu santrifüj veya liyofilizatör ile kuruluğa kadar uçurulur.

GC-MS ile analiz edilen örneklerin türevlendirilmesinde sıklıkla üç tip türevlendirme ajanı kullanılır. Bunlar N,O-Bis (trimetilsilil) trifloroasetamid (BSTFA), N-Metil-N-(trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA) ve N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifloroasetamittir (MTBSTFA). Bu üç reaktif alkoller, karboksilik asitler, karbonhidratlar, amitler, aminler, asit anhidritler ve sülfonamidler gibi fonksiyonel grupları içeren metabolitlerin sililasyonu sağlar. BSTFA ve MSTFA metabolitlerin aynı trimetilsilil (TMS) türevlerini üretirken, MTBSTFA tert-butildimetilsilil (TBDMS) türevlerini oluşturur. TBDMS türevleri TMS türevlerine kıyasla daha yüksek sinyal üretmelerine ve hidrolize karşı daha kararlı olmalarına rağmen metabolitlerin veya lipitlerin tanımlamasındaki zorluklar nedeniyle çok tercih edilmezler (152). Bu nedenle genel olarak türevlendirme ajanı olarak MSTFA kullanılır. MSTFA ile sıklıkla kullanılan trimetilklorosilan (TMCS) veya tert-butildimetilklorosilan (TBDMCS) türevlendirme reaksiyonunu katalize eder. Türevlendirme dedektör sinyalini ve ayırma gücünü artırır ancak birden fazla türevlendirme ürünü oluşturarak çoklu pik oluşumuna neden olabilir (153). Sililasyon basamağından sonra çoklu piklerin ortaya çıkmasının nedenlerinden biri metabolitlerdeki çoklu türevlerin oluşumundan sorumlu enol gruplarının varlığıdır. Bu

nedenle genellikle metoksiaminasyon (piridin içinde metoksiamin hidroklorür ile) metabolitlerdeki çoklu türevlerin oluşumunu önlemek için kullanılır.

GC-MS analizlerindeki bu ek adımlar ana varyasyon kaynaklarından biridir ve çalışmanın tekrarlanabilirliğini etkiler. Örneğe yeterli türevlendirme ajanı (50-80 µL) eklenerek ve türevlendirme işleminin tamamlanması için uygun koşullar sağlanarak varyasyonlar en aza indirilebilir. Metoksiaminasyon reaksiyonunun tamamlanma derecesi metoksiamin hidroklorür hacmi, derişimi ve inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile ilişkilidir. Daha yüksek bir inkübasyon sıcaklığı ve süresi metoksiaminasyon işleminin tamamlanmasını sağlasa da termal olarak kararsız metabolitler bozunabilir (154). Sililasyonda ise metabolomik analizin sonucunu etkileyen kritik faktörler türevlendirme reaktifinin hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresidir. Literatürde metoksiaminasyon ve sililasyon reaksiyonları için genel olarak rapor edilen inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri 30-70 °C ve 30-120 dak iken metoksiaminasyon ve sililasyon reaktiflerinin hacimleri ise sırasıyla 20-40 µL (piridin içinde 10-30 mg/mL) ve 60-80 µL'dir (155-159).

### **LC-MS Analizleri için Örnek Hazırlama Basamağı**

LC-MS ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik veya lipidomik çalışmalarda genel olarak türevlendirme gibi bir ek adıma ihtiyaç duyulmaz. Bu nedenle LC-MS analizleri için örnek hazırlama basamağı GC-MS analizlerine göre çok daha basit ve tekrarlanabilirdir ve ayrıca daha kısa sürede daha az maliyetle gerçekleştirilir. LC-MS ile analizden önce uygun şartlarda tüketilen metabolitler veya lipitler vakumlu santrifüjde veya liyofilizatörde kuruluğa kadar uçurulur. Uçurulan örneklerin yeniden çözündürülmesinde genelde kromatografik analizde tercih edilen hareketli faz karışımı (1:1, h/h) kullanılır. Çözünme kinetiği açısından vorteks süresi, örneklerin yeniden çözündürülmesinde kullanılan çözücü bileşimi ve hareketli faza eklenen FA oranı (%) LC-MS ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde örnek hazırlama basamağını etkileyebilecek önemli faktörlerdir (160, 161).

#### **2.5.4. Enstrümental Analiz**

Hücrel metabolizmanın yeterli şekilde kapsanması için tek bir örnekten moleküler bileşenlerin sağlam ve etkili bir şekilde geri kazanılmasına izin veren çok

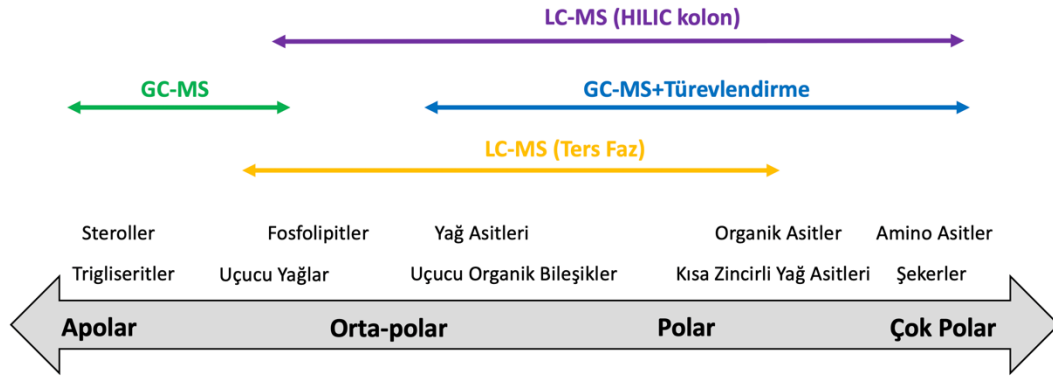
yönlü bir tüketme işleminin yanı sıra çeşitli kimyasal sınıfların analizine izin veren kombine analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kullanılan enstrümental cihazlar karmaşık biyolojik örneklerden yüzlerce veya binlerce molekülü aynı anda analiz etmeli ve bu moleküllerdeki farklılıkların izlenmesine imkan vermelidir (162, 163). Günümüzdeki mevcut analitik platformların hiçbiri örnekte var olan fizikokimyasal çeşitliliğe sahip çok sayıda kimyasal sınıfın (hidrofilik karbonhidratlar, uçucu alkoller ve ketonlar, amino ve amino olmayan organik asitler ve hidrofobik lipitler gibi) analizini tam olarak gerçekleştirme becerisine sahip değildir (8, 12, 164). Bu nedenle, hücreSEL metabolomu veya lipidomu tam olarak olmasa da kapsamlı şekilde analiz etmek için farklı enstrümental cihazların eş zamanlı olarak kullanılması gereklidir (165, 166).

Metabolomik veya lipidomik çalışmalarda yüksek çözünürlüklü gelişmiş spektroskopik teknikler ile analizler gerçekleştirilir. NMR spektroskopisi (167), GC-MS ve LC-MS metabolomik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen enstrümental tekniklerdir (165, 168, 169). Bu enstrümental tekniklerin belirli alanlarda birbirlerine göre üstünlükleri vardır. Kütle spektrometresine kıyasla NMR yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir. Analizler esnasında örnek zarar görmez ve metabolitler ile lipitlerin tanımlanması nispeten daha kolaydır. Ancak NMR cihazlarının düşük çözünürlüğü ve duyarlılığı nedeniyle örnekteki mM düzeyindeki metabolitler ve lipitlerin tayin edilmeleri zordur (170). NMR'nin en büyük dezavantajı ise karmaşık biyolojik örneklerde tanımlanan metabolit sayısının (20-50 metabolit) sınırlı olmasıdır. GC-MS ile yapılan hedeflenmemiş analizlerde tanımlanabilen toplam molekül sayısı (metabolitler ve lipitler) yüz civarında iken LC-MS'de bu sayı bine yakındır. Metabolomik analizlerde kullanılan bir diğer enstrümental cihaz ise CE-MS'dir. CE-MS'nin ayırma etkinliği GC-MS ve LC-MS'ye göre daha yüksek olup tekrarlanabilirliği ise daha düşüktür (171). Bu nedenle CE-MS'in metabolomik analizlerde kullanımı çok sınırlıdır. Ayrıca hücrelerin kültürlenebildiği, manipüle edilebildiği ve parçalanabildiği yüksek verimli ve kontrollü platformlar olan mikroakışkanlar metabolomik ve lipidomik çalışmalar için gelecek vadetmektedir (172).

Günümüzde GC-MS ve LC-MS iyi kromatografik ayırım ve yüksek detektör hassasiyeti ile metabolomik ve lipidomik analizde en sık tercih edilen enstrümental

tekniklerdir (12). Biyolojik örneklerdeki binlerce metabolit ve lipit farklı kromatografik davranış göstermelerine bağlı olarak bu enstrümental teknikler ile kromatografik olarak ayrılıp analiz edilebilmektedir (173). İyi bir kromatografik ayırım duyarlılıkta azalma olmadan MS ile analiz edilecek metabolit sayısını artırır. Aksi takdirde matris etkisinden kaynaklanıyorsa iyon baskılanması nedeniyle duyarlılıkta düşüş meydana gelir.

Örnekteki moleküller ile kromatografik sistem arasındaki etkileşimler moleküllerin fizikokimyasal özelliklerine ve sabit faz tipine bağlı olarak değişir. Bu etkileşimlere bağlı olarak moleküllerin elüsyon sırası belirlenir. Genel olarak uçucu organik bileşiklerin, bazı lipit sınıflarının ve türevlendirilebilen moleküllerin analizi GC-MS ile gerçekleştirilirken kısmen polar veya orta polar bileşikler ile birçok lipit sınıfının analizi LC-MS ile gerçekleştirilir (Şekil 2.3.). GC-MS ve LC-MS’de analiz edilen moleküllerin türü ve sayısı birbirinden farklıdır. Bu nedenle hedeflenmemiş çalışmalarda hem GC-MS hem de LC-MS’in kullanılması analiz edilen moleküller türlerinin kapsamını artırır (12).



Şekil 2.3. Metabolit ve lipit sınıflarının analiz edildiği enstrümental teknikler (102).

Tez çalışması kapsamında hedeflenmemiş metabolomik analizler iki analitik tekniğin eşzamanlı kullanımı (GC-MS ve LC-qTOF-MS) ile hedeflenmemiş lipidomik analizler ise LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiş ve bu enstrümental cihazlara ait genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

### GC-MS (174-178)

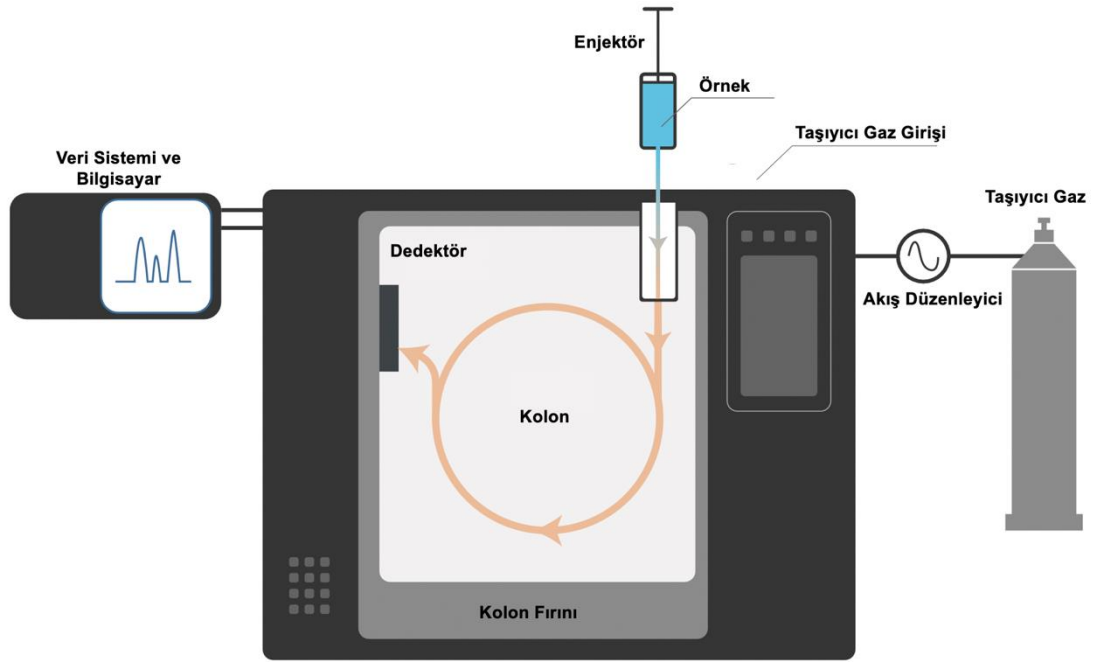
GC-MS örnekteki moleküler türlerin gaz fazında ayırımı için GC ile bu moleküllerin tanımlanmasında kullanılan MS'nin bir araya getirildiği güçlü bir kombine analitik tekniktir. GC katı, sıvı veya gaz halindeki örneklere uygulanabilen termal kararlılığa, yüksek uçuculuğa ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküllerin kılcal bir kolon yardımıyla ayrıldığı etkili bir kromatografik teknik olarak da tanımlanmaktadır. GC'de moleküller helyum, azot, argon gibi bir taşıyıcı gaz yardımıyla kolon boyunca taşınarak sabit fazda adsorbiyon (gaz-katı) veya dağılma (gaz-sıvı) esasına göre ayrılır ve kaynama noktaları ile polaritelerine bağlı olarak kolondan farklı zamanlarda elüe olurlar.

Kılcal GC kolonundan elüe olan moleküller kütle spektrometresinde vakum altında iyonize hale getirilir. Parçalama ürünleri (fragmentler) genelde dört kutuplu kütle analizörü yardımıyla kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ayrılır. GC-MS'de veri toplama geniş bir  $m/z$  oranı aralığında tarama (*SCAN*) modunda veya daha önce belirlenmiş moleküle ait tanımlayıcı kütlelere ait veri toplamak için seçici iyon izleme (*SIM*) modunda gerçekleştirilebilir. GC-MS ile analizi gerçekleştirilen karmaşık bir örneğe ait elde edilen kromatogramda çok sayıda pik yer alır ve moleküllerin tanımlanması için her pike ait benzersiz kütle spektrumları üretilir. Kromatogramlardaki her bir pike karşılık gelen moleküle ait alan değeri onun miktarı ile orantılıdır. Moleküller ticari olarak temin edilebilen kapsamlı kütle spektrum kütüphaneleri ile tanımlanır.

### GC Cihazı

GC cihazı birçok bileşenden oluşur ve sistemdeki her bileşenin rolü iyi bir ayırım ve analiz için kritik öneme sahiptir. GC taşıyıcı gaz, akış düzenleyici, enjektör, sıcaklık programlanmasının yapıldığı kolon fırını, ayırımın gerçekleştiği kolon, moleküllerin sinyalinin algılayan dedektör ve verilerin kromatograma dönüştürülmesini sağlayan veri sistemi ile bilgisayardan oluşmaktadır (Şekil 2.4.).





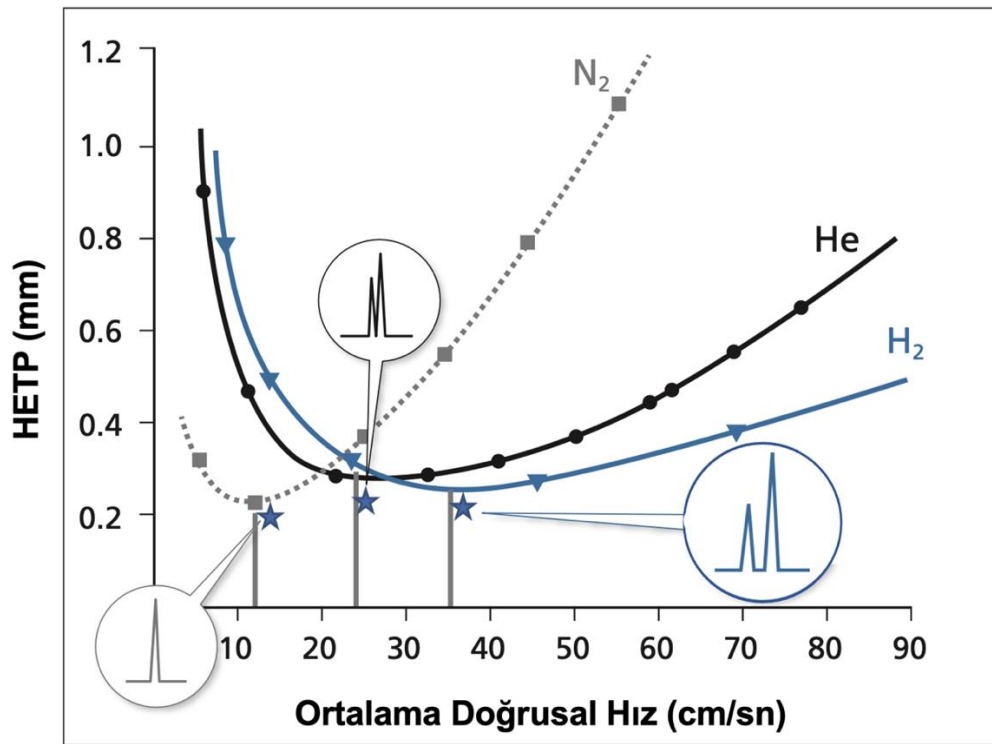
Şekil 2.4. GC şematik gösterimi (179).

### Taşıyıcı Gaz

Moleküller inert taşıyıcı gaz yardımıyla kolon boyunca taşınıp detektöre ulaştırılır. İyi bir kromatografik ayırım ve tekrarlanabilir kromatogramlar elde etmek için taşıyıcı gazın saflığı ve akışın düzenli olması çok önemlidir. GC'ye yüksek saflıkta ve sabit akışta gaz sağlamak için akış düzenleyiciler (gaz kontrol ünitesi) kullanılır. Prensipte taşıyıcı gazın inert olması yani ayırım ve dedeksiyona müdahale etmemesi gerekir. Yüksek saflıkta helyum (He), hidrojen (H<sub>2</sub>) ve azot (N<sub>2</sub>) yaygın olarak kullanılan taşıyıcı gazlardır. Bu gazların farklı özellikleri ve karakteristikleri vardır. Taşıyıcı gaz seçimi örneğe, detektöre ve analiz türüne bağlı olarak yapılır. Bu noktada ayırıcılık, etkinlik (ayırma verimliliği), maliyet ve dedektör ile uyum gibi çeşitli faktörler dikkate alınarak taşıyıcı gaz seçimi yapılmalıdır.

Bir kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir. N değeri ne kadar büyükse kromatografik ayırım o kadar verimli olur. Ayırma verimliliği teorik tabakaya eşdeğer yükseklik (HETP) adı verilen bir başka parametre ile de değerlendirilir. HETP değeri ne kadar düşük olursa ayırma verimliliği o kadar yüksek olur. GC'de taşıyıcı gazın ortalama doğrusal hızı ayırma verimini etkiler. Taşıyıcı gazlar için HETP ve doğrusal hız arasındaki ilişki van Deemter grafiği (Şekil 2.5.) ile gösterilir (175). Bu grafiğe

göre  $N_2$  gazı ile en düşük HETP değerine çok düşük bir doğrusal hızda (12 cm/sn) ulaşılır.  $N_2$ , He ve  $H_2$  gazlarına göre çok daha dar ortalama doğrusal hız aralığına sahiptir. Bu nedenle  $N_2$  çok uzun çalışma süreleri gerektirir ve yaygın kullanılmaz.  $H_2$  gazı ise geniş ortalama doğrusal hız aralığına sahip olup ayırma verimliliği en yüksek gazdır. Ancak patlayıcı olması nedeniyle tercih edilmez. He gazı ise  $H_2$  gazına benzer şekilde geniş ortalama doğrusal hız aralığına sahiptir ve aralarında verimlilik açısından çok büyük bir fark yoktur. Bu nedenlerle GC'de taşıyıcı gaz olarak sıklıkla He gazı tercih edilir. Taşıyıcı gazlara ait avantaj ve dezavantajlar Tablo 2.2.'de sunulmuştur.



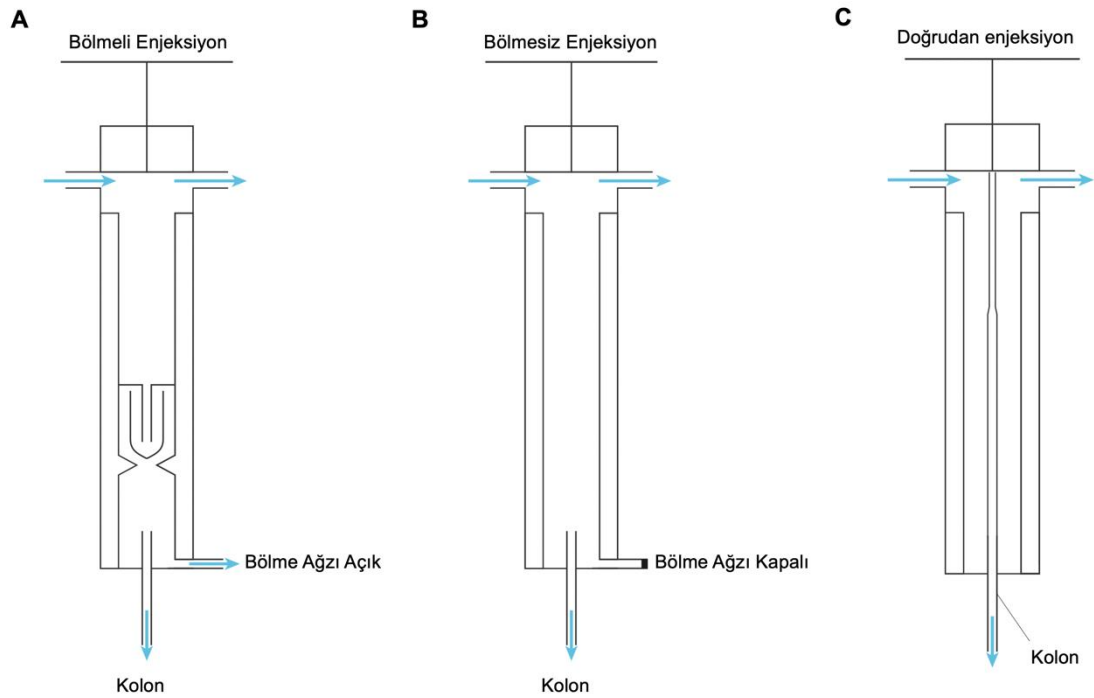
Şekil 2.5. Taşıyıcı gazlara ait Van Deemter grafiği (179).

**Tablo 2.2.** Taşıyıcı gazların avantaj ve dezavantajları.

Taşıyıcı Gaz	Avantajları	Dezavantajları
H <sub>2</sub>	Yüksek difüzyon hızı Yüksek doğrusal hız İyi ayırım verimliliği Kısa analiz süresi	Yanıcı Tamamen inert değil
He	Yanıcı değildir Yüksek ayırıcılık sağlar	Pahalı Kolay ulaşılmaz
N <sub>2</sub>	Ucuz ve kolay ulaşılabılır	Düşük ayırıcılık Uzun analiz ve çalışma süresi

### Enjeksiyon Türleri

Örnek enjeksiyonu GC'deki en önemli basamaklardan biridir. Örneğin enjektör aracılığıyla tek seferde kolona verilmesi gerekir. Aksi takdirde yavaş enjeksiyon veya büyük örnek hacmi kuyruklanmaya ve zayıf ayırıcılığa neden olur. Örneği anında buharlaştırmak için genellikle enjeksiyon portuna ve cam inserte yüksek sıcaklık (150-250 °C) uygulanır. Çok yüksek sıcaklıklarda örnek bozulabilir veya istenmeyen pik oluşumu meydana gelebilir. GC analizi için genelde birkaç µL örnek yeterlidir. Giriş bloğundaki septum özellikle plazma gibi yüksek derişime sahip örneklerle yapılan metabolomik analizlerde düzenli zaman aralıklarında değiştirilmelidir. Enjeksiyon modları bölmeli (*split*), bölmesiz (*splitless*) ve doğrudan kolona olmak üzere üç çeşittir (Şekil 2.6.).



**Şekil 2.6.** GC'deki enjeksiyon modlarının şematik gösterimi (179). A) Bölmeli enjeksiyon, B) Bölmesiz enjeksiyon, C) Doğrudan enjeksiyon.

Bölmeli enjeksiyon yüksek derişime sahip analitleri içeren örneklere uygulanır ve örneğin sadece küçük bir kısmının kolona enjeksiyonuna izin verir. Kolonun aşırı yüklenmesini ve pik genişlemesini engellemek için kullanılır. Kolonun aşırı yüklenmesi ve buna bağlı olarak gelişen pik genişlemesi teorik tabaka sayısı ve pik simetrisi gibi kromatografik parametreleri etkiler. Bu durum özellikle hedeflenmemiş analizlerde kromatogramların ayrıştırılmasında sorunlarla karşılaşılmasına neden olabilir. Kolona enjekte edilen madde miktarı bölme oranına bağlıdır. Bölmeli enjeksiyonda örnek hacmi genelde 1-5  $\mu\text{L}$  olup, 1:10 ile 1:100 aralığında bölme oranı tercih edilir (180, 181). Küçük iç çapa sahip kolonlar için yüksek bölme oranları kullanılmalıdır.

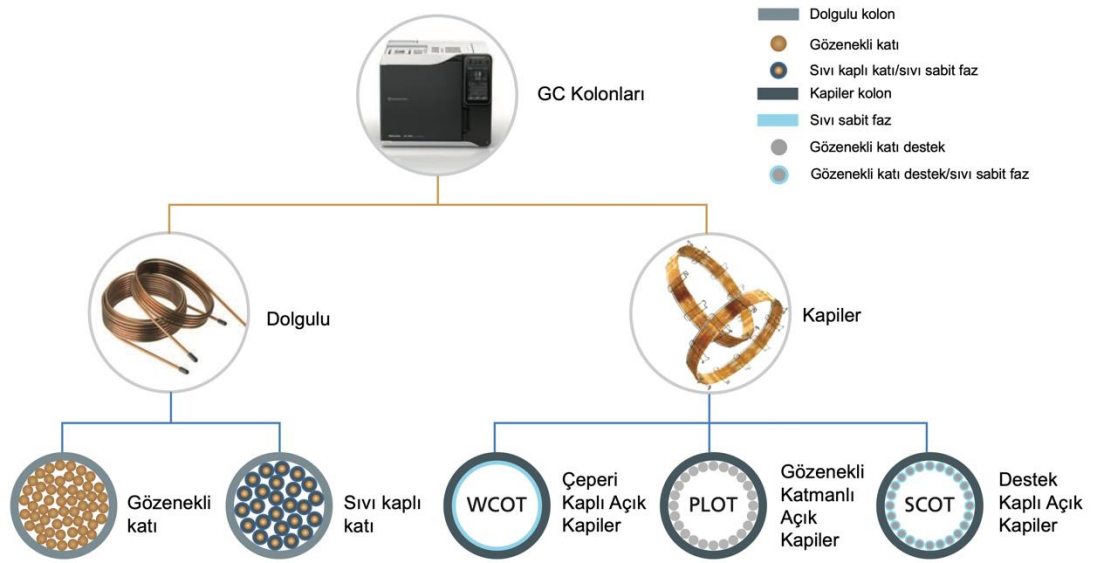
Bölmesiz enjeksiyon plazma veya doku örneklerinin aksine hücre kültürü gibi metabolit veya lipit miktarı nispeten düşük olan örnekler için tercih edilir ve genelde analiz edilen metabolit sayısını arttırmak için kullanılır. Bölmesiz enjeksiyonda örnek hacmi genelde 1  $\mu\text{L}$ 'dir ve belirlenen örnek hacminin tamamı GC kolonuna gönderilir (182). Bölmesiz enjeksiyon kullanımında kolonun aşırı yüklenmediğinden ve pik genişlemesinin olmadığından emin olunmalıdır.

Doğrudan enjeksiyon termal olarak kararsız ve düşük uçuculuğa sahip analitler için kullanılır. Doğrudan enjeksiyonda sıcak enjeksiyon bloğu ile temas önlenir ve ayırım doğrudan kolonda gerçekleşir.

### **GC Kolonları**

GC’de ayırım esas olarak kolonlar ve sıcaklık kontrolü yapılabilen kolon fırını kullanılarak sağlanır. Uygulanacak maksimum sıcaklık kolon türüne ve üretici firmanın talimatları göre belirlenir. Kolon uzunluğundaki artış etkinliği ve seçiciliği artırır. Karmaşık biyolojik örnekler için genelde daha uzun kolonlar tercih edilirken karmaşık olmayan örnekler için daha kısa kolonlar kullanılabilir. GC’de kolon uzunluğu arttıkça analiz süresi uzar. Buna bağlı olarak harcanan zaman ile maliyette artış ve günlük analiz edilen örnek sayısında düşüş meydana gelir. Bu nedenle hedeflenmemiş analizlerde kısa analiz sürelerinde yüksek ayırım gücü elde etmek için kolonun optimum uzunlukta olması istenir. Ticari olarak 5 m ile 150 m arasında değişen kolonlar temin edilebilir. Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde sıklıkla 30 m uzunluğuna sahip kolonlar kullanılır.

Dolgulu kolonlar (gaz-katı ve gaz-sıvı) GC’de kullanılan ilk kolonlardandır. Ancak dolgulu kolonların sınırlı uygulamaları ve düşük ayırma gücü nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Günümüzde GC analizlerinde daha etkili ayırma sağlayan açık kapiler kolonlar tercih edilmektedir. Kapiler kolonlar iç çap olarak daha küçüktür ve poliimid kaplı ergitilmiş silikadan yapılmaktadır. Bu kolonlar ile kısa analiz sürelerinde yüksek ayırma gücü elde edilir ve daha az örnek hacmiyle çalışılabilir. Kapiler kolonlar sıvı sabit fazın yapısı ve yerleşimindeki farklılıklara bağlı olarak çeperi kaplı açık kapiler (WCOT), destek kaplı açık kapiler (SCOT) ve gözenekli katmanlı açık kapiler (PLOT) olmak üzere temelde üç çeşittir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. GC kolon çeşitleri (179).

- ⇒ **WCOT kolonlar:** Sıvı sabit faz kapilerin iç duvarına düzgün bir şekilde uygulanır ve kimyasal olarak bağlanır. Bu ince sıvı tabaka kromatografik ayırım sırasında örnek ile etkileşime girer.
- ⇒ **SCOT kolonlar:** Kolon duvarı küçük partiküller halinde destek materyali ile kaplanmıştır. Ayırımın gerçekleştiği sıvı faz destek materyaline bağlanmıştır.
- ⇒ **PLOT kolonlar:** Sabit faz katıdır ve gaz-katı kromatografi uygulamalarında tercih edilmektedir.

Genel olarak GC’de kromatografik ayırım kolon boyutları (uzunluk, iç çap), sabit faz bileşimi ve kalınlığından etkilenir. Bu nedenle çalışmanın amacına uygun kolon seçilmelidir. Sabit faz film kalınlığı alıkonma süresi ve ayırıcılık ile ilişkilidir. Film kalınlığı arttıkça alıkonma süresi artar. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmesini önlemek için film kalınlığı azaldıkça örnek enjeksiyon hacminin de azaltılması gerekir. Yüksek ve orta moleküler ağırlığa sahip moleküllerin ayırımında ince film kalınlığına, yüksek derişimdeki örneklerin ve düşük moleküler ağırlığa sahip moleküllerin ayırımında ise yüksek film kalınlığına sahip kolonların kullanımı tercih edilir. Ticari olarak 0,1-10  $\mu\text{m}$  arasında değişen film kalınlıklarına sahip kolonlar temin edilebilir. Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde genelde 0,1 ile 0, 25  $\mu\text{m}$  arasında değişen film kalınlığına sahip kolonlar kullanılır.

Kolon seçimindeki bir diğer önemli parametre ise kolon iç çapıdır. Kolon iç çapı, örnek hacmi ve optimum akış hızı arttıkça kolonun ayırma verimi düşmektedir. Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde genelde 0,15 ile 0,35 mm iç çapa sahip kolonlar tercih edilir. Karmaşık örneklerin analizi bu kolonlar ile ortalama analiz sürelerinde yüksek verimlilik ve geniş bir derişim aralığında gerçekleştirilir.

Sabit faz seçici bir analizin anahtarıdır ve sabit faz seçimindeki en önemli kriter polaritedir. Sabit fazlar polar, yarı polar ve apolar olmak üzere basitçe üçe ayrılabilir. GC-MS temelli metabolomik analizlerin çoğunluğunda %5 difenil-%95 dimetilpolisiloksan (DB-5 MS) sabit fazı kullanılır. Genel olarak hedeflenmemiş metabolomik analizlerde kullanılan kolonların uzunluğu 30 m, film kalınlığı 0,25 µm ve iç çapı 0,25 mm'dir.

### **Fırın Sıcaklık Programı**

Karmaşık biyolojik örnekler çeşitli kaynama noktalarına sahip moleküller içerir. Bu moleküllerin yüksek ayırıcılıkta kromatografik ayrımları için fırın sıcaklık programı oldukça önemlidir. Kolon fırını sıcaklığının artırılması sonucu gazların sıvı içindeki çözünürlüğünde azalma ve moleküllerin alıkonma sürelerinde ise artış meydana gelir. Analizler örnekteki düşük kaynama noktalı bileşenleri ayırmak için düşük sıcaklıkta başlatılır ve analiz esnasında yüksek kaynama noktalı bileşenleri ayırmak için sıcaklık yükseltilir. GC-MS fırın sıcaklık programındaki tipik sıcaklık artış hızı 3-10 °C/dak'dır. Fırın sıcaklık programlaması örneklerin özelliklerine göre belirlenir ve çıkılacak maksimum sıcaklığa dikkat edilmelidir. Çünkü kolon üreticisinin belirlediği maksimum çalışma sıcaklığını aşmak kolon kanamasına neden olur. Kolon kanaması destek materyali üzerine tutturulmuş sıvı sabit fazın taşıyıcı gaz tarafından süreklenmesidir. Kolon kanaması sonucunda sabit fazın miktarı değişir ve analizlerden tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemez. Kolon kanamasının devamı halinde kolon zaman içerisinde kullanılamaz hale gelir.

### **Dedektörler**

Dedektörler bir karışımdaki analitlerin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılır. Ölçüm sonuçları sinyallere dönüştürülür ve bir kromatogram elde etmek için alıkonma zamanına karşı iki boyutlu grafik oluşturulur. Pik alanı ve/veya pik

yüksekliği örnekte bulunan molekül miktarına karşılık gelirken alıkonma zamanı molekülün kimliğini belirlemede kullanılır. Termal iletkenlik, alev iyonizasyon, elektron yakalama, termiyonik, alev fotometrik ve MS gibi çeşitli GC dedektörleri mevcuttur. İdeal bir GC dedektörü; yeterli duyarlılık, yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik, geniş ve doğrusal çalışma aralığı, kullanım kolaylığı, yüksek kararlılık gibi çeşitli özelliklere sahip olmalıdır. Ancak tüm bu ideal özellikleri tek bir dedektörde bulmak zordur. Bu nedenle dedektör seçimi çalışmaya uygun olarak yapılmalıdır. Sık kullanılan GC dedektörlerine ait seçicilik ve gözlenebilme sınırı değerleri Tablo 2.3'te sunulmuştur.

**Tablo 2.3.** GC dedektörlerine ait seçicilik ve gözlenebilme sınırı değerleri.

Dedektör	Seçicilik	Gözlenebilme Sınırı
Alev İyonlaşma	Hidrokarbonlar, kükürt	0,2 pg/s
Elektron Yakalama	Halojenler gibi elektrofilik bileşikler	5 fg/s
Kütle	İyonize türler	0,25-100 pg
Termal İletkenlik	Evrensel (seçici değil)	500 pg/mL
Termiyonik	Azot ve fosfor bileşikleri	0,1 pg/s (N)

MS, metabolomik çalışmalarda kullanılan en verimli, tekrarlanabilir, güvenilir, seçici ve sağlam olan dedektördür. Tez çalışması kapsamında MS kullanıldığından bu dedektör detaylı olarak incelenmiştir.

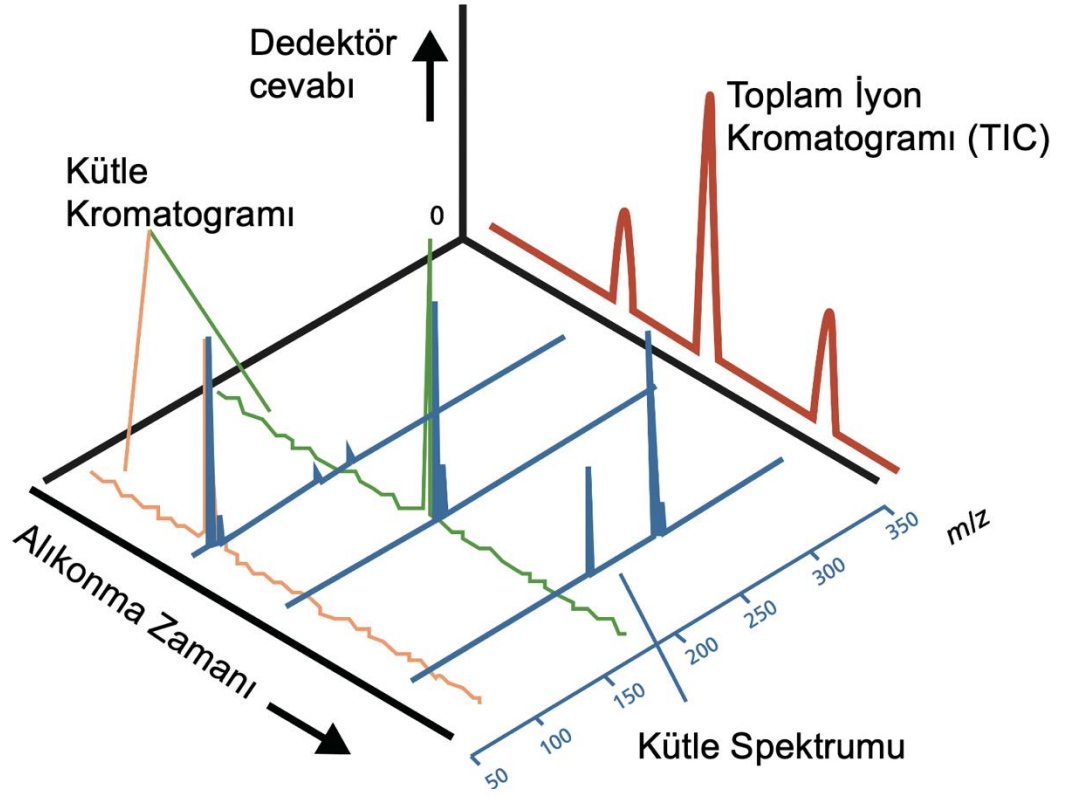
## MS

MS örnekteki molekülleri gaz halinde yüklü ve hareketli bileşenlerine dönüştürüp bunları kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ayıran, teşhis ve tayin amaçlı kullanılan güçlü bir analitik araçtır. Çok sayıda bileşenin eş zamanlı olarak yüksek hassasiyet ile analiz edilmesi kolaylığını sağlar. Düşük gözlenebilme sınırları ve uygulama çeşitliliği ile günümüzde çevre, adli tıp, ilaç ve kimya endüstrileri gibi birçok alanda oldukça popülerdir. Ayrıca MS metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kullanılan en verimli, tekrarlanabilir, güvenilir, seçici ve sağlam olan analitik araçtır. Bir metabolitin veya lipitin kütlesini tekrarlanabilir olarak yüksek hassasiyetle belirlemek bu moleküllerin tayinlerinde kullanılabilecek en faydalı verilerden biridir.



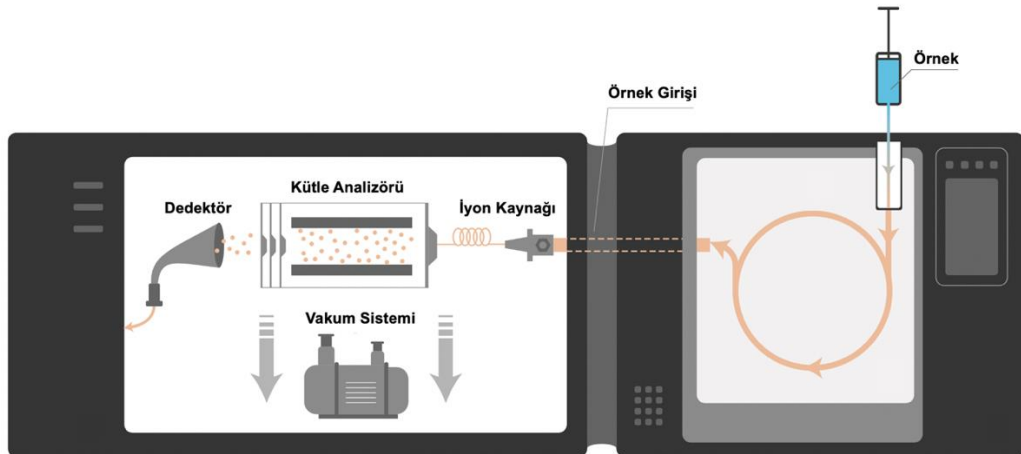
GC'nin MS ile kombine hali özellikle metabolomik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun nedeni tekrarlanabilir moleküler parçalanma ürünleri sağlayan elektron iyonizasyon (EI) adı verilen sert iyonizasyon tekniği ile uyumlu olması kaynaklıdır. EI iyonizasyonu molekülleri tamamen parçalayarak ve moleküle özgü fragmentler oluşturarak GC-MS'yi metabolitlerin veya lipidlerin tanımlanması için benzersiz bir araç haline getirir. Bu benzersiz fragmentler metabolitlerin ve lipidlerin tanımlanması için kullanılır. GC-MS'nin bir diğer avantajı ise metabolitlerin veya lipidlerin tanımlanmasında kullanılan ticari veya *in-house* olarak adlandırılan dahili kütüphanelerin çok gelişmiş olmasıdır. Analizler sonucunda elde edilen kütle spektrumları molekülleri tanımlamak için kütüphanede var olan bir referans spektrum ile kolaylıkla karşılaştırılabilir. Bu kütüphaneler metabolomik analizlerde GC-MS'yi LC-MS'ye göre daha avantajlı hale getirmektedir. GC-MS'nin LC-MS'ye göre en büyük dezavantajı ise molekülleri uçucu ve termal olarak kararlı hale getirmek için kullanılan zaman alıcı ve maliyetli olan türevlendirme basamağına olan ihtiyaçtır.

Temel olarak çözelti halindeki örnekte var olan moleküller iyonizasyon basamağının ardından gaz fazına iyonlaşırlar. Oluşan her bir iyonun kendine özgü bir kütlesi ve yükü vardır. İyon halindeki bu yüklü moleküller manyetik veya elektriksel alandan geçerken  $m/z$  oranlarına göre ayrılırlar. Bileşikler analizörden gelen  $m/z$  değerlerinin 51 etektörden gelen cevap (intensite) verilerine karşı çizilen bir dizi kütle spektrumu ile tanınırlar (Şekil 2.8.). Kütle spektrumundaki  $m/z$  değerleri x ekseninde, iyon yoğunlukları ise y ekseninde yer alır. Toplam iyon kromatogramı (TIC) aynı taramada tüm kütle spektral pik noktalarının yoğunluklarının toplanmasıyla oluşturulan kromatogramdır.



Şekil 2.8. MS analizlerinden elde edilen kromatogram ve kütle spektrumu (179).

MS, GC veya LC bölümü ile bağlantının sağlandığı bir örnek girişi, vakum sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör olmak üzere beş kısımdan oluşur (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. GC-MS'nin şematik gösterimi (179).

### **Örnek Girişi (Arayüz)**

Örnek giriş sistemleri kromatografi cihazı ve MS' i birbirine bağlayan bir köprü görevi görür. MS' nin yüksek vakum ihtiyacını karşılamak için vakum pompalama sistemleri ile birlikte basıncın düşürülmesinde ve sabit tutulmasında rol oynarlar. Bir ısıtıcı ile GC kısmında ayrılan moleküllerin gaz fazında kalmasını ve sadece uçucu bileşiklerin MS'e girmesini sağlamak için arayüz sıcaklığı yüksek tutulur.

Çeşitli örnek giriş sistemlerine sahip olan kütle spektrometrelerinde mümkün olan en az vakum kaybı ile iyon kaynağına örnek verilmesi arzu edilir. Hem GC hem de MS yüksek sıcaklık ve gaz halindeki bileşikleri içermesi bakımından oldukça benzerdir. En önemli fark basınç gereksinimidir. GC atmosferik basınçta çalışırken MS için düşük basınç ve yüksek vakum ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  Pa) gerekir. Basınç probleminin üstesinden gelmek ve GC ile MS arasındaki bağlantıyı sağlamak için vakum pompalama sistemleri oldukça önemli rol oynar.

### **Vakum Sistemi**

MS' de iyonların serbest uçuşunu sağlamak için vakum pompalama sistemi vazgeçilmezdir. Tek bir vakum pompası veya bir diferansiyel vakum pompalama sistemi ile vakum sağlanır. Tek vakum pompalı sistemlerde yüksek vakum elde etmek için gereken iş yükü tamamen tek bir pompa üzerindedir. GC' de taşıyıcı gaz akış hızının beş kat artması durumunda aynı vakumu elde etmek için pompa kapasitesi ve hızının da benzer şekilde beş kat artması gerekir.

Diferansiyel vakum pompalama sistemi birkaç aşamada yüksek vakum elde edilmesini sağlar. Basıncıdaki büyük farklılıkların giderilmesi için yaygın olarak kullanılır. Bu aşamalı vakum sistemiyle MS birkaç vakum bölmesi yardımıyla kademeli olarak ihtiyaç duyduğu yüksek vakuma ulaştırılır. Bu sistem pompaların iş yükünü azaltır ve GC ile daha yüksek akış hızlarında çalışma olanağı sağlar. Diferansiyel vakum pompalama sistemine sahip bir GC-MS cihazında genelde iki pompa kullanılır. Turbomoleküler pompa (TMP) taşıyıcı gazı GC' den uzaklaştıran ana pompadır. Açma ve kapama süresi çok kısa ve verimli olmakla birlikte bakımı kolaydır. TMP döner pompa (rotary pump) adı verilen ikinci bir pompa ile desteklenir.

MS'nin düşük vakumda kalması helyum, hava gibi iyon yoluna müdahale edebilecek ve analizi etkileyebilecek taşıyıcı ve kirletici gazların mevcudiyetine neden olur. İyon kaynağında oluşturulan hedef iyonlar dedektöre giderken bu gazlarla çarpışabilir. Bu istenmeyen çarpışmalar hedef iyonların kaybına, düşük hassasiyet ve tekrarlanabilirliği düşük kütle spektrumlarına neden olur.

Bir iyonun çarpışma olmadan serbest uçuşunun ortalama mesafesi ortalama serbest yol olarak tanımlanır. Yüksek hassasiyet ve güvenilir veri elde etmek için, yeterince uzun ortalama serbest yol arzu edilir. Bu nedenle iyonların dağılmasını ve oluşabilecek yan tepkimeleri en az indirerek kütle spektrometresinin en iyi performansla çalışmasını sağlamak için  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  Pa basınç uygulanır. Bunun için vakum sistemleri oldukça önemlidir ve yüksek vakum varlığında iyonlar detektöre minimum kayıpla ulaşır.

### **İyon Kaynağı**

GC-MS'de iyon kaynağı gaz halindeki molekülleri elektron bombardımanı veya bir reaktif gazla çarpışma/reaksiyon sonucu yüklü iyonlara dönüştürür. Analizi gerçekleştirilecek moleküllerin doğasına göre iyon kaynağı seçilmelidir. EI ve kimyasal iyonizasyon (CI) GC-MS'de kullanılan ana iyonizasyon teknikleridir. Çalışma kapsamında EI kullanıldığı için bu iyonizasyon tekniği ayrıntılı olarak incelenmiştir.

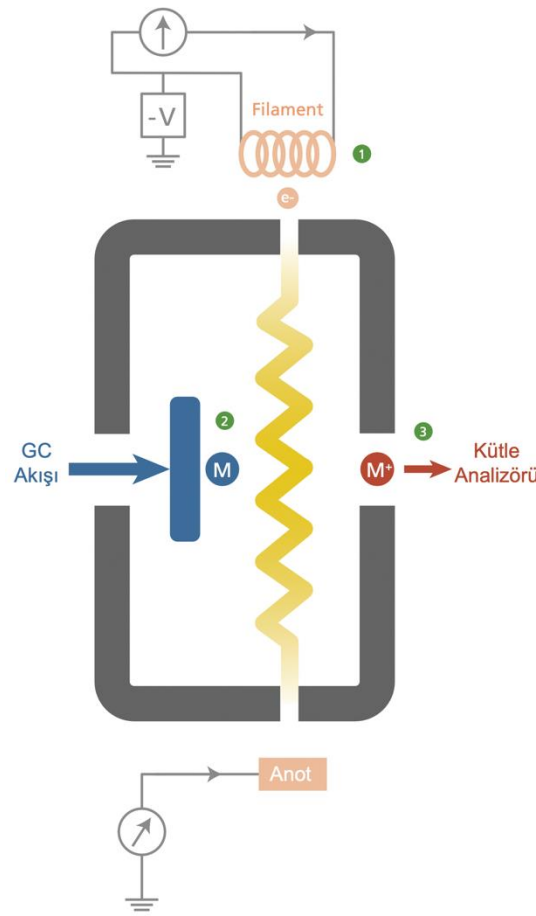
### **Elektron İyonizasyon**

EI GC-MS için tipik bir iyon kaynağıdır. Elektronlar iyonları oluşturmak için gaz halindeki moleküllerle çarpışır. Elektronlar ısıtılmış bir filamentten üretilir ve yüksek voltaj ile iyon kaynağı odasına doğru hızlandırılır. GC'de ayrılan gaz halindeki moleküller EI odasında bu elektronlarla (70 eV'lik elektron demeti) çarpışır.

Bileşikler elektron demeti tarafından iyonize edilir ve parçalanır. Çarpışmanın ardından molekülden bir elektron kopması sonucunda moleküler iyon olarak adlandırılan pozitif yüklü iyon ( $M^+$ ) oluşur ( $M_{(g)} + e^- \rightarrow M^+_{(g)} + 2e^-$ ). Bu pozitif yüklü iyon radikal katyondur ve bu iyonun m/z oranı analitin moleküler kütlelerini yansıtır. Moleküler iyon nadiren gözlenir ve fazla enerji nedeniyle meta-kararlı moleküler iyon ( $M^{+*}$ ) üretilebilir. Bu  $M^{+*}$  iyonundaki kararsızlık ve fazla enerji daha küçük m/z

iyonlarına yani parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olur. Parçalanmanın oldukça yaygın olması ve moleküler iyonun nadiren gözlenmesine bağlı olarak EI yaygın olarak sert iyonizasyon olarak adlandırılır ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir.

EI için açık tip bir iyon kaynağı odası kullanılır ve basitçe Şekil 2.10.'da gösterildiği gibi bir filament, bir anot ve odadan oluşur. İyon kaynağındaki vakum esas olarak  $10^{-2}$  Pa'dan daha az olan taşıyıcı gaz tarafından belirlenir. Esasen iyon kaynağı basıncı, elektron enerjisi, sıcaklık ve iyon kaynağı odasının tasarımı gibi faktörler, EI'nın verimliliğini ve tekrarlanabilirliğini arttırmak için önemlidir.



**Şekil 2.10.** EI şematik gösterimi (179).

İyonizasyon voltajı yayılan elektronların enerjisini temsil eder. Bu değer ayarlanabilir olmakla birlikte iyon yoğunluğu genellikle 70 eV civarında en yoğundur. Bu nedenle genelde 70 eV'de sabit tutulur. Kullanılan enerji azaldığında (<70 eV) parçalanma derecesi ve parça iyonlarının sinyal yoğunluğu azalır.

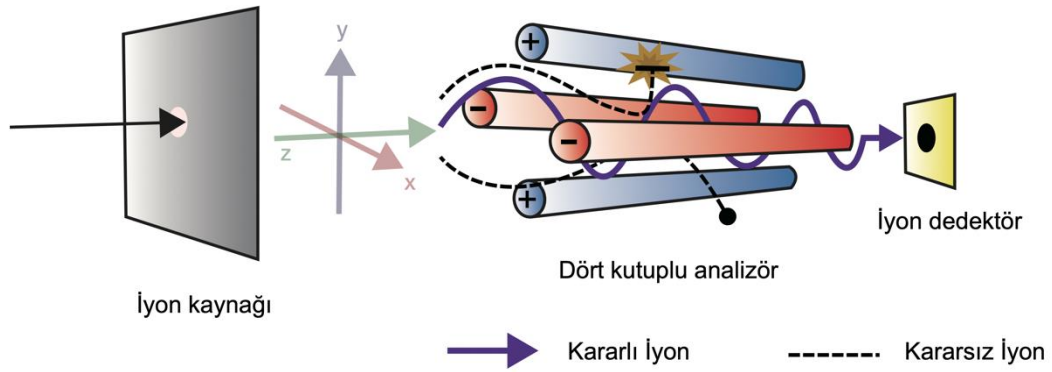
## **Kütle Analizörü**

İyonlar iyon kaynağından kütle analizörüne elektrik alan ile yönlendirilir. MS sisteminin en can alıcı parçası olan kütle analizörü iyonları  $m/z$  oranlarına bağlı olarak ayırır. MS sistemleri genelde kütle analizör tipine bağlı olarak ayırt edilir ve adlandırılır. Kütle analizörünün performansı kütle aralığı, tarama hızı, kütle doğruluğu ve rezolüsyon gibi çeşitli parametrelerle ölçülür. İdeal bir analizör küçük kütle farklılıklarını yüksek hassasiyetle algılar. Kütle analizörünün ölçebileceği  $m/z$ , kütle aralığı; kütle aralığında ölçüm yapılan hız, tarama hızı; kütle analizöründen dedektöre ulaşan iyonların sayısı, iyon iletimi; gözlenen  $m/z$  ile teorik  $m/z$  arasındaki fark, kütle doğruluğu; kütleleri ayırım gücü ( $m/\Delta m$ ), kütle ayırıcılığı olarak ifade edilir. Kütle doğruluğu ppm veya Da ile ifade edilir. Yüksek çözünürlüğe sahip olmayan bir analizör kütleleri yüksek doğrulukla saptayamaz. Ayırıcılık arttıkça kütleler arasındaki küçük farklar ayırt edilebilir ve bu nedenle kütle doğruluğu çoğunlukla analizörün stabilitesine ve rezolüsyona bağlıdır (183, 184). Kütle spektrometresi ile ölçülen kütle moleküldeki her bir atomun ortalama atomik kütlesi kullanılarak hesaplanan ortalama kütle veya moleküldeki elementlerin doğadaki bağıl boluğu en yüksek olan izotopları ile hesaplanan monoizotopik kütle ile karşılaştırılır. Manyetik sektörlü, dört kutuplu (kuadropol, q), uçuş zamanlı (TOF), orbitrap, iyon tuzaklı, FTICR en sık kullanılan kütle analizörleridir. Tez çalışmasının GC-MS ile gerçekleştirilen kısmında dört kutuplu analizör kullanıldığından bu analizör detaylandırılmıştır.

## **Dört Kutuplu Analizör**

GC-MS'de yaygın olarak kullanılan kütle analizörü dört kutuplu analizördür. Yüksek hassasiyeti, düşük maliyeti, hızlı tarama ve kolay bakımı nedeniyle ideal bir analizördür. Dört kutuplu analizör vakumlu ortamda eşit uzaklıkta konumlandırılmış dört paralel silindirik metal çubuktan oluşur. Bu çubuklar, hiperboloidal bir iç yüzeye sahip elektrotlardır. Başlangıçta iyon kaynağından üretilen iyonlar sürekli olarak akış halindedir ve zayıf bir voltajla z-ekseni boyunca (Şekil 2.11.) hızlandırılır. Bu iyonlar küçük bir delikten geçerek kuadropole girerler. Aynı polaritedeki karşıt çubuklarla zıt polaritedeki komşu çubuklara doğru akım (DC) ve radyofrekansı (RF) veya yüksek frekanslı alternatif akım uygulanır. Çubuklara uygulanan voltajlara bağlı olarak kütle

analizörü içinde hızla değişen bir elektrik alan üretilir. Bu elektrik alandan geçen iyonlar x ve y eksenleri boyunca salınım yaparlar. İyonların hareketi elektrik alan kuvvetine bağlıdır ve RF'nin değiştirilmesiyle belirli bir m/z aralığındaki iyonlar kararlı bir salınım hareketi yaparak dört kutuplu analizörden geçerler. Aksine hedeflenmemiş (diğer m/z değerleri) iyonlar ise kararsız hale gelerek çubuklara çarpar ve detektöre ulaşamaz. Dört kutuplu kütle analizörü bunu yaparken yalnızca seçilen m/z iyonlarının kütle analizöründen geçtiği bir kütle filtresi gibi davranır. DC ve RF voltajları değiştirildiğinde m/z aralığı taranır ve iyonlar dedektöre iletilir.



**Şekil 2.11.** Dört kutuplu analizörün çalışma prensibinin şematik gösterimi (185).

### Dedektör

Kütle analizörünün ardından iyonlar genelde elektron çoğaltıcı detektöre aktarılır. Dedektördeki iyon akımı sinyale dönüştürülerek bilgisayara iletilir.

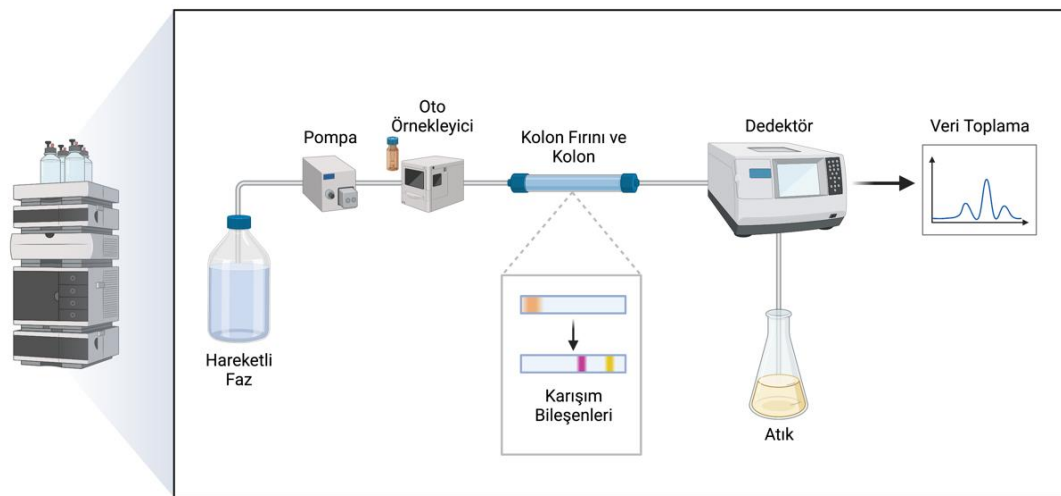
### LC-MS (177, 186-189)

LC, yaşam bilimleri ve kimya alanlarında kullanılan temel bir ayırım tekniğidir. Uçucu olmayan ve termal olarak kararsız moleküller için uygun olmayan GC'nin aksine LC küçük moleküllü ilaç metabolitlerinden peptitlere ve proteinlere kadar çok geniş bir molekül yelpazesini ayırma yeteneğine sahiptir. Özellikle son yıllarda metabolomik, lipidomik ve proteomik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Sıvı kromatografide ayırım sıvı haldeki örnek içerisinde bulunan moleküllerin kolondaki sabit faz ile farklı derecelerde etkileşime girmesi ve hareketli faz yardımıyla kolon boyunca farklı hızlarla taşınması ile gerçekleşir.

GC-MS bölümünde bahsedildiği gibi kütle spektrometresi üç boyutlu veriler üreterek bir örneğin moleküler ağırlığı, yapısı, kimliği, miktarı ve saflığı hakkında eşsiz bilgiler sağlayabilen veriler üretir. Bu bağlamda LC-MS sıvı kromatografisinin ayırım gücünü kütle spektrometresinin algılama kabiliyeti ile birleştiren bir analitik araçtır. Bu teknik ile hem alıkonma zamanlarına göre hem de m/z değerlerine göre ayırımı gerçekleştirilen moleküller hem nitel hem de nicel olarak analiz edilir. LC'nin MS ile kombinasyonu sonucu yüksek seçicilikte güvenilir analizler yapmak mümkündür. Kullanılan kolon tipine (C18, HILIC vb.) bağlı olarak çok çeşitli moleküler sınıfların analizi LC-MS ile gerçekleştirilebilmektedir.

### LC Cihazı

Teknolojik gelişmelere bağlı olarak LC daha verimli, daha hızlı, hassasiyeti ve ayırım gücü yüksek olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) gibi daha küçük kolon taneciği boyutlarına ve daha yüksek basınca sahip teknolojik cihazlara dönüşmüştür. LC tutarlı, sağlam ve yüksek verimli analizler için oldukça önemli olan sabit ve hareketli faz, pompa, enjektör ve oto örnekleyci, kolon fırını, dedektör ve verilerin kromatograma dönüştürülmesini sağlayan veri sistemi ile bilgisayardan oluşur (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. LC şematik gösterimi (91).



### Sabit Faz

Örnek hazırlama basamağının ardından GC'ye benzer şekilde LC'de de analizin doğruluğunu ve verimliliğini doğrudan etkileyen ikinci en önemli parametre kromatografik ayırımıdır. Ticari olarak temin edilen çeşitli sabit fazlar (C8, C18, HILIC vb.) ile moleküllerin ayırımı sağlanabilir. Kolon uzunluğu, tanecik boyutu, hareketli faz ve lineer hız kolon verimini belirlerken kolon iç çapı, sabit fazın film kalınlığı ve kolon sıcaklığı alıkonma zamanını belirler. Etkin bir kromatografik ayırım için uygun kolon ve sabit faz seçimi oldukça önemlidir. Kolon uzunluğunun arttırılması ile daha iyi bir kromatografik ayırım sağlansada analiz süresi ve maliyette istenmeyen artışlara neden olur. Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda genel olarak tercih edilen kolon uzunluğu 100-150 mm, tanecik boyutu ise 1,5 ile 3 µm aralığındadır. Öte yandan günümüzde LC-MS ile yapılan analizlerde 1-1,9 mm iç çapa ve 30-75 mm uzunluğa sahip mikro kolonların kullanımı da artmaktadır (190, 191). Mikro kolonlar ile kısa analiz sürelerinde etkili ayırım yapmak mümkündür. Kolon tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu yüksek basınçlara gereksinim duyulur. UHPLC bu gerekliliği karşılayarak daha verimli analizlerin gerçekleştirilmesini sağlar. Buna karşılık UHPLC sistemlerinde kullanılan küçük tanecik boyutuna sahip kolonların ömrü ise kısadır. Bu nedenle hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kolon boyutu mevcut cihaza (LC ve MS sistemi) ve örnek matrisine bağlı olarak seçilmelidir.

Yüksek kolon verimliliği için kolon özelliklerine göre optimum hareketli faz akış hızı belirlenmelidir. Kolon çapı büyük kolonlar ile yapılan çalışmalarda yeterli akış hızının sağlanamaması nedeniyle pik genişlemesine bağlı hassasiyet kaybı meydana gelir. Ayrıca MS sistemlerinde yüksek akış hızı iyon baskılamaya veya düşük iyonizasyon verimliliğine sebep olabilmektedir. Bu nedenle gerekli durumlarda bir akış bölücü ile akış uygun bir hıza ayarlanır (184).

GC bölümünde belirtildiği gibi biyolojik örneklerdeki farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere (polar-apolar, asidik-bazik, vb.) sahip çeşitli metabolitlerin ve lipidlerin analizi tek bir sabit faz ile gerçekleştirilemez. Bu nedenle kapsamlı bir metabolomik ve lipidomik analiz için farklı sabit fazlar kullanılmalıdır (162, 192). C18

sabit fazı metabolomik ve lipidomik çalışmalarda en sık tercih edilen sabit fazdır. LC'de kullanılan diğere sabit fazlar ise HILIC, amin ve C8'dir.

Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda güvenilir, sağlam, tekrarlanabilir ve çok çeşitli moleküler yapıların analizine izin veren iyi anlaşılmiş bir ayırma mekanizmasına sahip olan ters faz-sıvı kromatografinin (RP-LC) kullanımı oldukça yaygındır. Metabolomik çalışmalarda kullanılan biyolojik örneklerin bir kısmının sulu içeriğine bağlı olarak C18 kolonlarda tutunmayan polar moleküller mevcuttur. Polar moleküller kullanılan sabit fazın hareketli fazdan daha polar olduğu normal faz-sıvı kromatografisi (NP-LC) ile ayrılabilir. NP-LC'de kullanılan sabit fazlar siyano, amino gibi polar grupları içerir. Ancak tekrarlanabilirliklerinin zayıf olması ve ayırma verimlerinin düşük olması nedeniyle NP-LC'nin metabolomik çalışmalarda kullanımı yaygın değildir. Ayrıca NP-LC'de kullanılan hegzan gibi çözücüler MS ile uyumsuzdur. Bu nedenle metabolomik çalışmalarda polar metabolitlerin ayırımı HILIC sabit fazı ile gerçekleştirilir (193). HILIC kolonlar şekerler, amino asitler, vitaminler, karboksilik asitler ve nükleotidler gibi polar bileşiklerin ayrılmasında oldukça etkilidir (194). HILIC sabit fazı polar metabolitlerin tutunmasına ve lipofilik metabolitlerin ise hareketli faz ile sürüklenmesine izin verir (195). Ayrıca bazı lipit sınıflarının analizi için HILIC sabit fazı ile yapılmış lipidomik çalışmalarda mevcuttur (196, 197). Genelde polar bileşikleri ayırmak için tercih edilen sıvı kromatografisi yöntemi olan hidrofilik etkileşim kromatografisinde (HILIC) hareketli faz olarak kullanılan sulu fazda polar metabolitler yüksek oranda çözünür. Ayrıca HILIC'te kullanılan hareketli fazlar MS ile uyumludur. HILIC sabit fazının polar metabolitler üzerindeki ayırım verimliliği C18 sabit fazından daha fazladır. Ancak GC-MS'teki kadar güçlü değildir. Bu nedenlerden dolayı LC ile yapılan çalışmalarda polar olmayan metabolitlerin ve apolar lipitlerin ayrılması için C18 sabit fazı halen en çok tercih edilen sabit fazdır. Polar metabolitlerin analizinde ise çoğunlukla GC-MS tercih edilmektedir. Bu nedenle hedeflenmemiş metabolomik analizlerde hem GC-MS hem de LC-MS kullanımı sonucu tanımlanan moleküllerin kapsamında artış meydana gelmesi beklenmektedir.

## Hareketli Faz

LC'de kullanılan hareketli faz özellikleri (pH, organik çözücü, iyonik güç vb.) pik kapasitesi, çözünürlük, alıkonma zamanı, pik şekilleri ve hassasiyet gibi birçok önemli parametreyi doğrudan etkiler (198). Bu nedenle, hareketli faz seçimi moleküllerin kolonda tutulması için oldukça önemli bir parametredir. LC'de hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizler için kullanılan hareketli fazlar genelde su/sulu çözelti ve bir organik çözücünden (metanol, etanol, asetonitril vb.) oluşur.

Hareketli fazın pH'sı özellikle asidik ve bazik metabolitlerin alıkonma davranışını etkileyen önemli bir faktördür. Bu etki moleküllerin iyonize ve iyonize olmayan kısımlarının farklı kromatografik davranış göstermesi nedeniyle. Ayrıca metabolomik ve lipidomik çalışmalarda farklı fizikokimyasal özelliklere sahip binlerce metabolit ve lipitin eş zamanlı analizi için uygun bir pH seçmek zordur. pH'ye bağlı olarak moleküllere ait piklerin bir kısmı çok keskin ve simetrik, bir kısmı ise kuyruklu ve yayvan olacaktır.

Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda tampon çözeltilerin kullanılması ile pH sabit tutularak analizlerin tekrarlanabilirliği artırılabilir. MS sistemindeki metabolitlerin iyonlaşma derecesi pH'den etkilenir. İyonizasyon verimini arttırmak için pozitif iyonizasyon modunda asidik tamponlar (FA, asetik asit gibi) negatif iyonizasyon modunda bazik tamponlar (amonyum format (AF), amonyum asetat) kullanılır (199, 200).

Genel olarak sıvı kromatografi ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kütle dedektörü ile uyumlu olması nedeniyle hareketli faza FA ilave edilir. Ayrıca FA'nın yüksek iyonizasyon verimliliği nedeniyle yöntemlerin kesinliğini arttırdığı bilinmektedir (201). Genel olarak metabolomik ve lipidomik çalışmalarda hem sulu hem de organik hareketli fazlara %0,1 oranında FA ilave edilir. Hareketli fazdaki FA yüzdesi hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmaların analiz sonuçlarını etkileyebilmektedir ve bu nedenle optimizasyonu önemlidir (202).

Özellikle lipidomik çalışmalarda ayırım gücünü arttırmak için sulu hareketli faz olarak amonyum asetat, AF gibi uçucu tamponlar ile organik hareketli faz olarak izopropil alkol (IPA) ve asetonitril kullanılır (145). Hedeflenmemiş metabolomik veya

lipidomik çalışmalarda moleküller arasındaki ayırım gücünü arttırmak ve iyon baskılanmasını önlemek için analizler gradiyent elüsyon ile gerçekleştirilir. Gradiyent programında kolondan hiçbir zaman %100 sulu veya organik hareketli faz geçirilmemesine özen gösterilmelidir. Aksi takdirde kolonun değişen yüzey özelliklerine bağlı olarak tekrarlanabilirliği düşük alıkonma zamanları elde edilir.

### **Pompa**

LC'de pompa hareketli faz akış hızını sağlamak için kullanılır. LC sistemlerinde pompalar yüksek basınç altında tutarlı ve tekrarlanabilir bir şekilde çalışabilmelidir. Pompanın düzensiz çalışmasına bağlı olarak akış hızında meydana gelen ufak değişiklikler analiz sonuçlarını büyük ölçüde etkiler.

Pompa hareketli faz sisteme verilmeden önce çözücülerini ya sabit oranda (izokratik) ya da değişen oranlarda (gradiyent) karıştırır. Çoğu pompa sistemi çözünmeyen gazları uzaklaştırmak için bir gaz giderme ünitesi (degasser) içerir. Gaz giderme ünitesi gürültünün veya dalgalanmaların azaltılmasına yardımcı olur.

50-300 mm uzunluğunda ve 4,6 mm iç çapa sahip standart HPLC kolonlarıyla kullanım için 400 bar'a kadar basınçlarda akış sağlayabilen pompalar genellikle yeterlidir. 2 µm'den düşük parçacık ve 2,1 mm'den düşük iç çaplara sahip kolonların kullanıldığı modern UHPLC cihazları 1000 bar veya daha yüksek basınç sağlayabilen pompalar gerektirir. Analitik LC uygulamaları için tipik akış hızları 100 µL/dk ile 10 mL/dk arasındadır. Ancak LC-MS ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde akış hızının 0,5 mL/dak'yı aşması istenmez. Aksi halde iyonlaşma etkinliğinde azalma MS sisteminde ise kirlilik gözlenir.

### **Kolon Fırını**

Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde analiz koşulları kolon sıcaklığına bağlı olarak değişim göstermektedir. Kolon sıcaklığı analiz verimliliği açısından oldukça önemli bir parametre olup optimize edilmesi gerekmektedir. Gün içerisinde laboratuvarlardaki ortam sıcaklığı değişim gösterir. Kolon fırını kullanılmadığı takdirde sıcaklık değişimine bağlı olarak alıkonma faktöründe değişim meydana gelir. Tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için kolonun yer aldığı kolon fırınının sıcaklığının mutlaka sabit tutulması gerekir. Özellikle hedeflenmemiş

lipidomik analizlerde yüksek kolon sıcaklığı ile çalışmanın analiz verimliliğini arttırdığı bildirilmiştir (145).

### **Enjektör ve Oto-Örnekleyici**

Örnek kromatografik sisteme enjektör aracılığıyla verilir. LC ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda enjeksiyon hacimleri genelde 1-20 µL aralığındadır. Kolona fazla madde yüklenmemesi, pik genişlemesi ve iyonizasyon verimliliğinde düşüş olmaması için enjeksiyon hacmine dikkat edilmelidir.

Günümüzde manuel enjektörler yerini kullanıcı dostu, doğru ve hassas enjeksiyon yapabilen otomatik enjektörlere bırakmıştır. Ayrıca analizlerde iyi bir tekrarlanabilirlik elde etmek için enjeksiyon hassasiyeti çok önemlidir. Modern UHPLC cihazlarında genellikle %0,15'ten daha az bağıl standart sapma (BSS) ile enjeksiyon hassasiyeti elde edilir. Günümüzde +4 °C'de çalışabilen oto örnekleyicilerle örnekler kararlılıklarını kaybetmeden analiz edilebilmektedir. Ayrıca örnek enjeksiyon portuna taşınmadan önce iğnenin yüzeylerini temizlemek için çoğu modern cihazda iğne yıkama istasyonu yer alır. Kontaminasyon ve aşırı yüklemeyen (*carryover*) kaçınmak için iğnenin düzenli aralıklarla yıkanması gerekir.

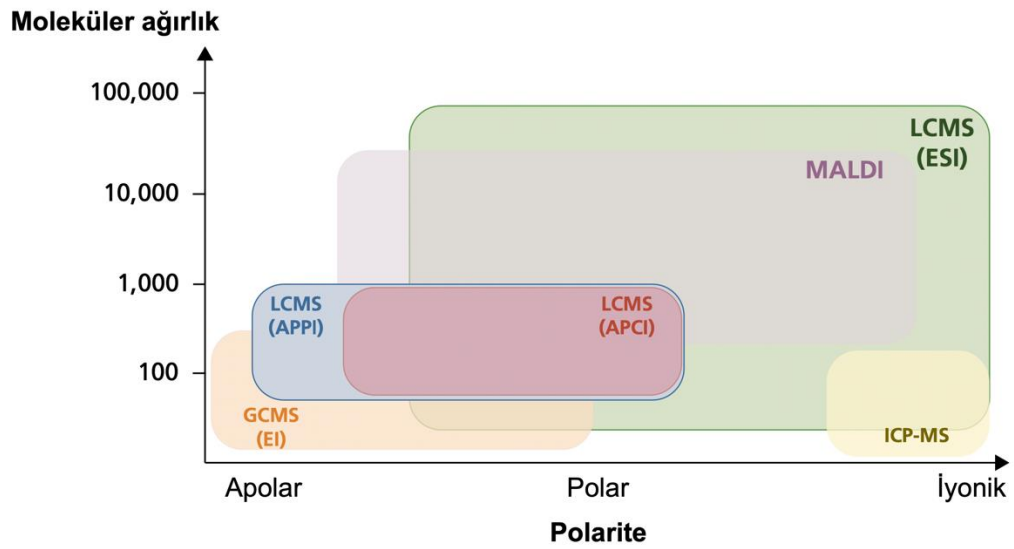
### **Kütle Spektroskopisi**

GC bölümünde MS'nin birçok bölümden bahsedilmiştir. Bu nedenle bu bölümde LC-MS cihazlarında GC-MS'den farklı olarak kullanılan iyon kaynakları (API) ve analizörler (TOF, qTOF) detaylandırılmıştır. (

### **İyon Kaynakları**

İyonizasyon için LC-MS ve GC-MS tipik olarak çok farklı mekanizmalar kullanır. Son on beş yılda LC-MS cihazlarındaki ilerlemenin ana kaynağı analit moleküllerini iyonize eden ve oluşan iyonları hareketli fazdan ayıran iyon kaynaklarıdır. Atmosferik basınçlı iyonizasyon (API) tekniklerinin tanıtılması, LC-MS ile başarılı bir şekilde analiz edilebilen bileşiklerin sayısını büyük ölçüde arttırmıştır. API'da analit molekülleri önce atmosfer basıncında iyonize edilir ve

mekanik ve elektrostatik olarak nötr moleküllerden ayrılır. LC-MS’de genelde kullanılan API teknikleri elektro sprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınçta foto-iyonizasyondur (APPI). ESI geniş bir ölçekte polar ve orta polar bileşiklerin analizi için uygun olmakla birlikte çok sayıda iyon üretme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.13.). APCI ise daha az polar bileşiklerin analizinde tercih edilmekle birlikte genelde ESI’yı tamamlayıcı niteliktedir (203).



**Şekil 2.13.** Yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleri.

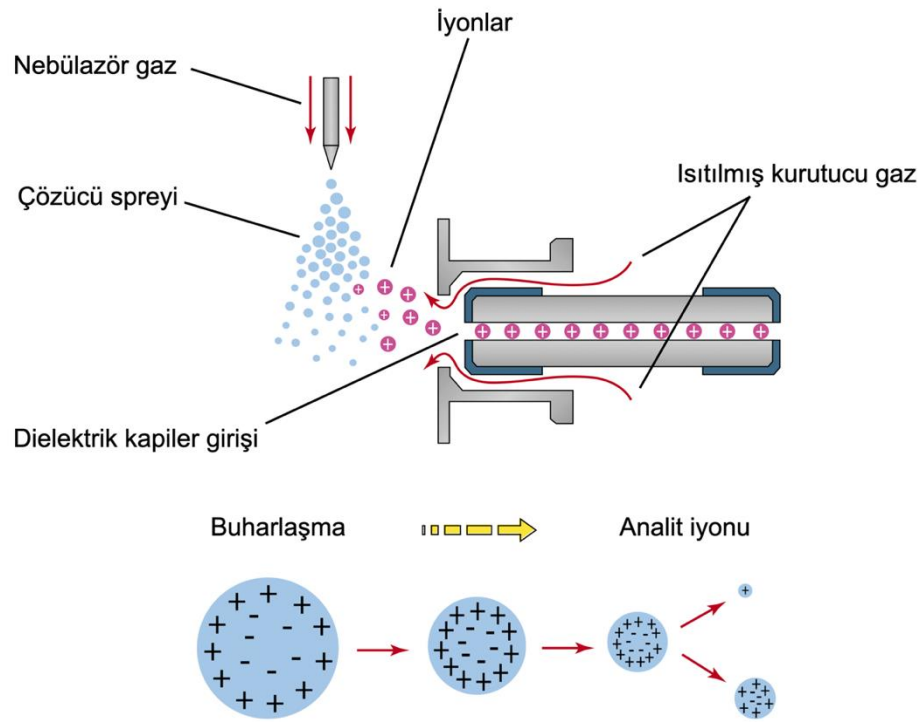
İyonizasyon esnasında  $H^+$  iyonu kaybıyla anyonlar,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  gibi bir iyon katılımıyla ise kationlar oluşur. Analizlerin hem pozitif (+) hem de negatif (-) iyonizasyon modlarında gerçekleştirilmesi sonucu analiz edilen metabolitlerin ve lipidlerin sayısı arttırılabilir. API tekniklerinin iyonizasyon sürecinin ve analit özelliklerinin özeti Tablo 2.4.’te verilmiştir. Bu çalışma kapsamında ESI kullanıldığından daha detaylı olarak incelenmiştir.

**Tablo 2.4.** API iyonizasyon tekniklerinin özellikleri.

API Teknikleri	ESI	APCI	APPI
<b>İyonlaşma süreci</b>	Çözücüdeki iyonların gaz fazına geçişi	Korona deşarjı ile gaz fazında	UV ışınlaması ile gaz fazında
<b>Oluşan iyon türleri</b>	Tek ve çok yüklü		Tek yüklü
<b>Analitin uçuculuğu</b>	Uçucu değil	Bir dereceye kadar gerekli	
<b>Analitin stabilitesi</b>	Termal olarak kararlı olması gerekmez	Termal olarak kararlı olmalıdır	

### Elektrosprey iyonizasyon (ESI)

Günümüzde LC-MS ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda en sık kullanılan iyonizasyon tekniği ESI'dır. Atmosferik basınç altında çalışan oldukça hassas ve yumuşak iyonizasyon tekniğidir. Uçucu polar bir çözücüde çözünmüş olan örnek çözeltisi paslanmaz çelikten yapılmış kapiler iğne aracılığıyla sisleştirilmiş halde kaynak odacığına püskürtülür (Şekil 2.14.). Bu esnada kapiler iğneye yaklaşık  $\pm 3-5$  kV'lık yüksek bir elektrik potansiyeli uygulanarak yüklü damlacıkların oluşması (nebulizasyon) sağlanır. Elektriksel alan yüklü damlacıkları kapiler ucun çıkışında Sir Ingram Taylor tarafından keşfedilen ve Taylor konisi olarak bilinen bir koni oluşturmak için zorlar. Bu esnada elüe edilen çözücü kapiler iğnenin uç kısmından çıkarken nebulizasyona yardımcı olarak sağlanan azot gazı ile buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılır. Yüklü damlacıkların boyutu çözücünün buharlaşmasıyla sürekli olarak küçülür. Buda yüzey yük yoğunluğunun artmasına ve damlacık yarıçapının azalmasına yol açar. Damlacıklar küçüldükçe benzer yüklere sahip iyonların birbirlerini itmesi sonucu elektrostatik (kulombik) kuvvetlerin kohezyon kuvvetlerini aştığı bir noktaya gelinir. Bu noktada çözücü yüklü taneciklerden tamamen uzaklaşır ve kulombik patlama olarak bilinen süreçte analit iyonları gaz fazına desorbe edilerek oluşan gaz fazı iyonları kütle analizörüne gönderilir (204).



Şekil 2. 14. ESI'nın şematik gösterimi (185).

### Kütle Analizörleri

Özellikle son yıllarda LC ile yapılan hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda metabolit ve lipit kimliklerini doğru şekilde tanımlamak için sıklıkla dört kutuplu-uçuş zamanlı (qTOF) ve orbitrap gibi yüksek çözünürlüklü analizörler tercih edilmektedir (205, 206). Bu cihazlardan elde edilen MS/MS spektrumları ile kütleler ve parçalanma ürünleri yüksek çözünürlükle belirlenir. Çalışma kapsamında qTOF analizörü kullanıldığı için detaylı olarak incelenmiştir.

### TOF Kütle Analizörü

TOF analizörü uçuş tüpü adı verilen yüksek vakum odasının içinde hızlandırıcı, reflektör ve detektörden oluşmaktadır. Bir TOF kütle analiz cihazında tüm iyonlara aynı anda tek tip bir elektromanyetik kuvvet uygulanır ve bu iyonlar uçuş tüpünde hızlandırılır. Daha hafif iyonlar daha hızlı hareket eder ve dedektöre önce ulaşır (Şekil 2.15.). İyonların  $m/z$  oranları dedektöre varış zamanlarına göre belirlenir. TOF



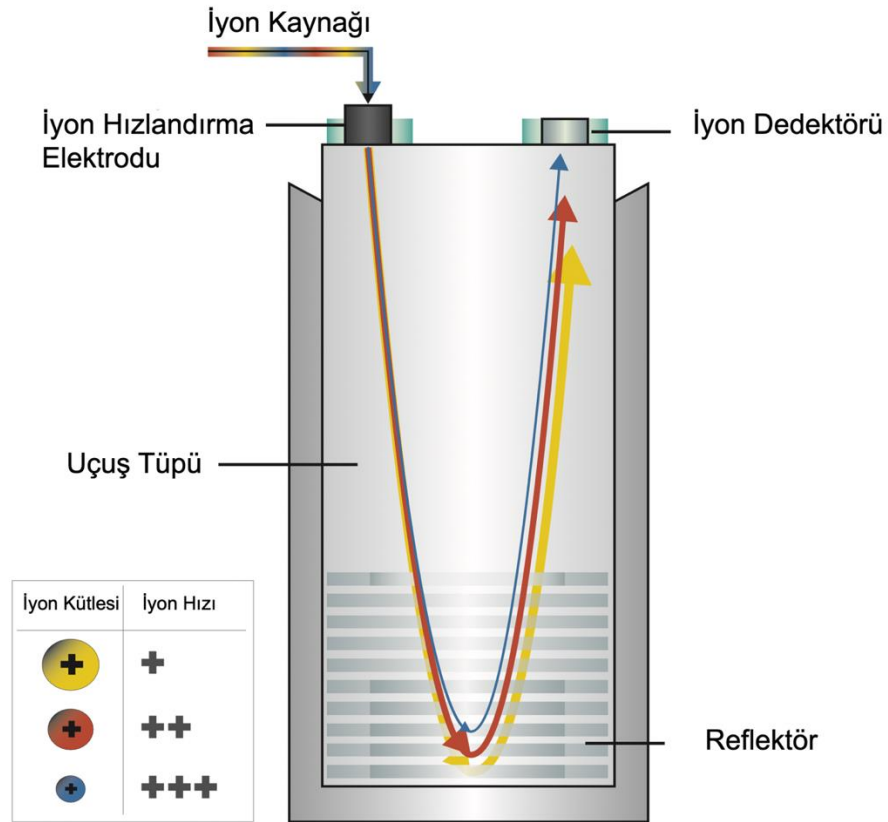
analizörleri geniş bir kütle aralığına ve kütle ölçümlerinde yüksek çözünürlüğe sahip oldukça hassas cihazlardır.

İyon kaynağında üretilen iyonlar biriktirilir ve uçuş tüpüne pulslar halinde verilir. Bu iyonlar elektrotlar arasına uygulanan voltaj ile hızlandırılır (Eşitlik 2.1.). Uçuş süresi (T) m/z'nin karekökü ile orantılıdır yani sabit bir uçuş mesafesi (L) için daha küçük m/z'ye sahip iyonlar daha büyük m/z'ye sahip olanlardan daha önce dedektöre ulaşır (Eşitlik 2.2.). Buna bağlı olarak diğer tüm parametreler sabit tutarak uçuş süresi (T) doğrudan m/z'ye dönüştürülebilir ve karşılığında bir kütle spektrumu üretilir. Dedektör elektron çoğaltıcı tüptür ve burada oluşan akım digital sinyale dönüştürülür.

$$KE_{iyon} = \frac{1}{2}mV^2 = zeV \quad (2.1.)$$

$$T = \frac{uzaklık}{hız} = \sqrt{\frac{m}{z}} \times \frac{L}{\sqrt{2eV}} = zeV \quad (2.2)$$

Eşitlik 2.1. ve Eşitlik 2.2.'de; T, Uçuş zamanı; m, iyonun kütlesi; v, iyonun hızı; z, iyonun yükü; e, temel yük; V, iyonlara uygulanan hızlanma voltajı; L ise TOF cinsinden uçuş mesafesidir.



Şekil 2.15. TOF-MS'nin şematik gösterimi (185).

Dört kutuplu analizör ile birleştirilen TOF iki kütle analizörünün kombine hale getirildiği hibrid MS sistemleridir. Bu sistemlerde dört kutuplu analizör belirlenen  $m/z$  tarama aralığında çalışarak diğer  $m/z$  değerlerine sahip moleküllerin detektöre ulaşmasını engeller. Ayrıca qTOF ile farklı çarpışma enerjileri kullanılarak moleküllerin parçalanma ürünlerine ayrıldığı MS/MS spektrumları üretilir. Bu nedenle qTOF-MS cihazları TOF-MS cihazlarına göre daha iyi bir seçicilik ve hassasiyete sahiptir (207).

### 2.5.5. Veri Analizi

Karmaşık kromatogramların anlaşılmasına yardımcı olmak için veri işleme prosedürü uygulanmalıdır. Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda veri analizi üç adımda gerçekleştirilir. İlk adım karmaşık kromatogramların ayrıştırılması ve alıkonma zamanlarının düzeltilerek kütle özelliklerinin belirlenmesidir. İkinci adım referans kitaplıkları kullanılarak tanımlamaların

yapılmasıdır. Üçüncü ve son adım ise tek değişkenli ve çok değişkenli istatistiksel analizlerle fenotipe dayalı olarak önemli ölçüde değişen metabolitlerin ve lipidlerin belirlenmesidir. Bu adımlar kullanılan yazılım ve kitaplıkların farklı olması dışında GC-MS ve LC-MS metabolomik ve lipidomik analizlerinden elde edilen ham veri dosyaları için aynıdır.

### **Veri İşleme ve Kütle Özelliklerini Belirleme**

Verimli ve güvenilir veri işleme biyolojik açıdan önemli bulgulara yönelik ilk adımdır. GC-MS ve LC-MS analizleri sonucu elde edilen ham veri dosyaları alıkonma süresi, m/z değerleri ve bunların yoğunluklarından oluşan karmaşık üç boyutlu bir veri formatından oluşur (208). Herhangi bir istatistiksel teknik uygulanmadan önce bu kapsamlı bilgileri içeren verilerin analizi için öncelikle işlenmesi gerekir. Veri işleme prosesinin ardından ham veriler iki boyutlu bir veri matrisine dönüştürülür.

Metabolomik ve lipidomik çalışmalarda veri toplama analitik platforma (GC-MS, LC-qTOF-MS gibi) özel olarak çalışan ve üretici firma tarafından sağlanan ticari yazılımlar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu nedenle analitik platformlardan elde edilen ham veriler uygun bir yazılım kullanılarak mzXML gibi standart bir formata dönüştürülmelidir. Bu dönüştürmeden sonra XCMS (209), MS-DIAL (210, 211), MZmine (212), SpectConnect (213), MetaboAnalyst (214) gibi ücretsiz yazılımlar aracılığıyla veri matrisleri oluşturulur.

LC-MS'de farklı günlerde yapılan analizler sonucunda alıkonma zamanlarındaki kaymalar ve bozunma ürünlerinden veya kirleticilerden kaynaklanan çok sayıda pikin varlığı ham verilerin işlenmesini karmaşık hale getirebilmektedir. Bu tür problemler GC-MS ile yapılan analizlerde daha az görülmektedir. Bu nedenle metabolomik ve lipidomik analizler sonunda elde edilen veriler mutlaka gözden geçirilmelidir. Analiz edilecek veriler üzerinde yazılım yönergeleri izlenerek kullanılacak yazılım için uygun parametreler belirlenmelidir. Aksi takdirde yazılım gürültüyü pik olarak tanımlayabilir. Uygun bir yazılım kullanılarak veri işleme prosesleri gerçekleştirildikten sonra uygun olmayan pikler (pik şekilleri, tekrarlanabilirlik, eksik veriler, alıkonma zamanları, m/z değerleri dikkate alınarak) değerlendirilmeden çıkarılmalıdır.

Verilerin işlenmesinin ardından veri matrisi oluşturmanın son adımı gerekiyorsa eksik değerlerin doldurulmasını, veri normalizasyonunu ve ölçeklendirmesini içerir. Normalizasyon işleminin örnek hazırlama ve analiz boyunca cihaz performansındaki farklılıklardan kaynaklanan analitik varyasyonlar ile örnekler arasındaki biyolojik değişkenliği ortadan kaldırmak için mutlaka veri setine uygulanması gerekir (215, 216). İç standart normalizasyonu, toplam iyon kromatogramı (TIC) ve kalite kontrol (QC) temelli yerel olarak tahmin edilen dağılım yumuşatma grafiği (LOESS) normalizasyonu en sık uygulanan normalizasyon teknikleridir (215, 216). Kapsamlı metabolomik ve lipidomik profillemeye çalışmalarında QC temelli LOESS normalizasyonu gruplar arası varyasyonların etkilerini en aza indiren normalizasyon tekniği olarak bilinmektedir. QC örnekleri analiz edilen tüm metabolitleri ve lipidlerin temsilini sağlayacak şekilde çalışmaya dahil edilen tüm örneklerden eşit hacimlerde alınarak hazırlanmalı ve analitik çalışma sırasında aralıklı olarak analiz edilmelidir (217). Öte yandan, metabolomik ve lipidomik çalışmalarda optimum normalizasyon tekniği konusunda henüz tam bir fikir birliği yoktur. Bu nedenle normalizasyon tekniği seçilirken deney koşullarını ve örnek tipini göz önünde bulundurmalıdır.

### **Veri Tabanları**

Metabolomik ve lipidomik çalışmalarda elde edilen kütleleri tanımlamak ve yorumlamak için uygun veri tabanlarının kullanılması esastır. Metabolit ve lipid kimliklerinin tanımlanması için birçok veri tabanı mevcuttur. HMDB, METLIN, Fiehn MetaCyc ve NIST sık kullanılan veri tabanlarından bazılarıdır. GC-MS molekül içeriği açısından zengin kütüphanelere sahiptir. Yüksek kromatografik verim, tekrarlanabilirlik ve kullanılan kütüphanelerin gelişmişliği gibi avantajları sayesinde LC-MS'ye kıyasla metabolomik çalışmalar için evrensel bir yöntem haline gelmiştir. GC-MS'nin aksine LC-MS'de metabolitlerin ve lipidlerin belirlenmesi en zorlu adımdır. Aynı kütleyle sahip yüzlerce izotopun bir arada bulunması nedeniyle kütle bazlı tanımlamalarda yanlış pozitif hata oranı yüksektir. Bu hatayı azaltmak için QC örneklerine farklı çarpışma enerjileri uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumları ile kütüphanelerle karşılaştırmalar yapılır ve böylelikle metabolitler ve lipidlere ait tanımlamaların daha doğru şekilde yapılması sağlanır.

## Veri Analizi

Verilerdeki metabolit ve lipid sayısı ile tanımlanamayan diğer moleküler türler dikkate alındığında tek değişkenli analiz ile istenilen sonuca ulaşmak zaman kaybına ve hatalara neden olabilir. Bu nedenle metabolomik analizlerde tek değişkenli analizler yerine çok değişkenli analizler tercih edilmektedir. Çok değişkenli veri analizi çok sayıda değişken içeren veri kümesinin verilerdeki mevcut varyansları değiştirmeden daha küçük bir boyuta indirilmesini sağlayan bir dönüştürme tekniğidir. Bu tekniklerin amacı mevcut verileri en az sayıda değişkenle ifade etmektir. Böylece veriler daha hızlı görselleştirilebilir ve daha bütünsel bir anlayışla değerlendirilebilir (218). Bu bağlamda metabolomik ve lipidomik veri kümelerinin analizinde genellikle temel bileşen analizi (PCA), kısmi en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA) ve Ortogonal PLS-DA (OPLS-DA) gibi çok değişkenli istatistiksel analizler kullanılmaktadır. Verileri çok değişkenli analizlerle değerlendirdikten sonra önemli ölçüde değişen metabolitleri belirlemek için t-testi gibi tek değişkenli analiz yöntemleri kullanılabilir.

### 2.6. Kemometri

Kemometri deneyleri tasarlamak, optimum deney koşullarını belirlemek/seçmek ve kimyasal analizlerden elde edilen verileri analiz ederek gerçek veya saklı bilginin açığa çıkarılmasını sağlamak için matematiksel ve istatistiksel yöntemler ile bilgisayarı kullanan kimyasal bir disiplindir (219). Kemometri karmaşık örneklerin analizinde çok yönlü ve esnek çözümler sunmanın yanısıra özellikle kimya alanında doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasına olanak sağlar. Kemometrik yöntemler gelişmiş enstrümental cihazlardan elde edilen çok değişkenli ve çok boyutlu veri setlerinin işlenmesi için sıklıkla analitik kimyacılar tarafından kullanılır.

Kemometri;

- Bilgi ve sistem kuramı,
- Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri,
- Deneysel tasarım,
- Modelleme,

- Optimizasyon,
- Sinyal işleme,
- Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik,
- Yapay zeka yöntemleri (yapay sinir ağları) gibi çeşitli kavram ve uygulama alanlarına sahiptir.

Gelişmiş enstrümental cihazlardan elde edilen kapsamlı analitik verilerin işlenmesinde açıklayıcı ve tanımlayıcı istatistik ile uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır. Analitik sinyaller düzleştirme, filtreleme, türev ve integrasyon gibi farklı algoritmalar kullanılarak işlenir (220, 221). Kemometri analitik kimya haricinde organik kimya, fizikokimya, mühendislik gibi farklı disiplinler tarafından da kullanılmaktadır. Kemometrik uygulamaların karmaşık matematiksel hesaplamalar içermesi nedeniyle bilgisayar programlarına veya yazılım araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Excel, MATLAB, SPSS ve SIMCA sıklıkla kemometrik uygulamalar ve hesaplamalarda kullanılan programlardır.

Günümüzde kemometrinin uygulama alanlarından biri olan Deneysel Tasarım (DoE) yaklaşımı test edilen her faktörün (bağımsız değişken) çalışılan yanıtlar (bağımlı değişken) üzerindeki etkisinin sistematik olarak incelenmesinin ve belgelenmesinin yanısıra deneyleri planlama ve yürütmede çok popüler bir metodolojidir. Deneysel tasarımlar ile elde edilen sonuçlar tasarım alanını tek seferde tek faktör (OVAT) yaklaşımından daha kesin bir şekilde temsil edilir. Ayrıca DoE zamandan, maliyetten tasarruf ile kapsamlı sonuçların elde edilmesine olanak sağlar. DoE yaklaşımına olan ilgi birçok farklı disiplin için bir hayli fazla olsa da özellikle metabolomik ve lipidomik araştırmalarda kullanımı oldukça sınırlıdır (18). Bu çalışma kapsamında hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmaların örnek hazırlama basamağından kromatografik ayırımına kadar etki eden birçok faktör deneysel tasarımlarla eş zamanlı değerlendirilerek optimize edilmiştir. Bu bağlamda deneysel tasarım yaklaşımları detaylı şekilde incelenmiştir.

### 2.6.1. Deneysel Tasarım Terminolojisi

**Deneysel Tasarım:** Deneylerden elde edilen verileri planlamak, yürütmek, analiz etmek ve yorumlamak için kullanılan kemometrik teknik.

**Cevap (y, Bağımlı değişken):** Çalışma veya optimizasyon konusu olan ölçülen veya gözlemlenen miktar. Örnek; toplam pik alanı, alıkonma süresi, ayırım gücü.

**Faktör (x, Bağımsız değişken):** Faktörler kontrollü veya kontrolsüz olmak üzere iki çeşittir. Deney sırasının rastgeleleştirilmemesi kontrolsüz faktörlerin etkilerinin yanıtın tekrarlanabilirlik varyansına katkıda bulunmasına neden olabilir. Faktörler kesikli veya sürekli değerler alabilir. Örnek; kolon sıcaklığı, tüketme süresi, hareketli faz akış hızı.

**Bir faktörün seviyesi:** Deneysel tasarımda belirtilen bir faktörün değeri. Örnek; kolon sıcaklığı: 30, 35, 40 °C; tüketme süresi: 1, 3, 5 dak; hareketli faz akış hızı: 0,25, 0,35, 0,40 mL/dak.

**Tepki yüzeyi:** Bir veya daha fazla faktöre verilen cevabın ilişkisini gösteren grafik. Cevap yüzeyi genellikle iki veya üç boyutlu bir grafikdir. Cevap yüzey metodolojisi (RSM), deneysel süreç üzerine etkileri incelenen faktörlerin etkilerini tepki yüzey grafikleri ile görselleştirmeye yarayan bir deneysel tasarım stratejisidir (222). Tepki yüzeyleri ile üçten fazla faktörün etkisi incelenemez.

**Artık:** Bağımlı değişkenin tahmin edilen değerleri ile gözlenen değerleri arasındaki farktır. Artık = gerçek y değeri–tahmin edilen y değeri.

### 2.6.2. DoE

Günümüzde deneyler araştırma hipotezlerimizin geçerliliğini doğrulamanın en iyi yolunu oluşturmaktadır. Bu nedenle deneyler en önemli araştırma faaliyetlerinden biridir. Deneyler kapsamında belirli faktörlerin seçilen cevap değişkenleri üzerindeki etkisi incelenir ve böylelikle ortaya atılan hipotezin doğruluğunu kontrol etmek mümkün hale gelir. Bu sonuçları elde etmek için cevapları etkileyebilecek herhangi bir hatanın yapılmasını önleyici tedbirler almak temel prensiptir. Deneylerin erken bir aşamasında yapılan hatalar diğer deneysel süreçleri de etkiler ve bu hataların yoğunlaşmasıyla birlikte araştırmadan doğruluğu düşük veya yanlış sonuçlar elde edilir. Buna bağlı olarak elde edilen sonuçların başarısı doğrudan deneysel planlama ile ilişkilidir ve deneylerin dikkatli planlanması her araştırma için oldukça önem arz etmektedir. Bu sebeple son yıllarda deneysel tasarım yöntemlerine olan ilgi dinamik bir şekilde artmaktadır. Günümüzde çeşitli yazılımlar aracılığıyla deneysel tasarım

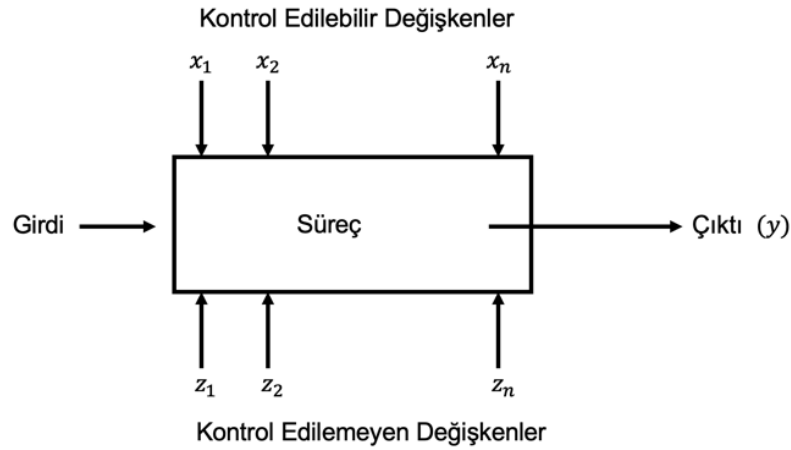
yöntemleri uygulanarak araştırmada etkili olabileceği düşünölen faktörlerin çalışılan yanıtlar üzerindeki etkisi sistematik olarak incelenip belgelenerek deneyler planlanabilir ve yürütölebilir.

Geleneksel olarak deneysel parametrelerin optimizasyonunda faktörlerden biri değiştirilirken diğer faktörler temel seviyelerde sabit tutularak değişkenlerin etkileri incelenir (223). Her bir değişken için bu işlem tekrarlanır. Geleneksel deneysel süreçlerin optimizasyonunda sadece bir veya iki faktör dikkate alınarak analitik yöntemlerin optimizasyonları gerçekleştirilir. Temel seviyelere indirgenmiş deneysel matris ile optimum koşulları tespit etmek için yapılması gereken çok sayıda deneysel analiz OVAT yaklaşımının ana dezavantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca tek değişkenli yaklaşım kullanılarak yapılan analizlerde incelenen faktörler arasındaki etkileşim olasılığının ve gücünün incelenmesi mümkün değildir. OVAT kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarının güvenilirliği düşük, hata oranı yüksektir (18, 224, 225). Kısaca OVAT yaklaşımı karmaşık olmayan deneysel süreçlerin optimizasyonunda yaygın olarak kullanılmasına rağmen genellikle yetersiz, zahmetli, yanlış veya eksik sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir.

Tek değişkenli geleneksel yaklaşımın sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırmak, OVAT yaklaşımının eksikliklerinin üstesinden gelmek ve deneysel süreçler hakkında daha güvenilir ve ayrıntılı sonuçlar elde etmek için kemometrinin uygulama alanlarından biri olan DoE'nin kullanımı önerilmiştir. Bu bağlamda DoE yapılan deneylerin maliyetlerini düşüren, sonuçların güvenilirliğini artıran, az deneyle istenen hedefe kısa sürede ulaşılmasına olanak sağlayan teknik olarak tanımlanır (18, 226).

DoE yaklaşımları deneysel süreç hakkında mümkün olduğunca fazla bilgi elde etmek için elde edilen ölçüm verilerinin modellenmesini ve istatistiksel analizini kullanır. DoE yaklaşımlarında her bir faktörün incelenen deneysel süreç üzerindeki etkisi, var olan diğer tüm faktörlerin birkaç seviyesinde aynı anda ölçölür. Deneysel veriler ile faktörleri ve cevapları birbirine bağlayan deneysel bir model üretilir (şekil 2.16.).

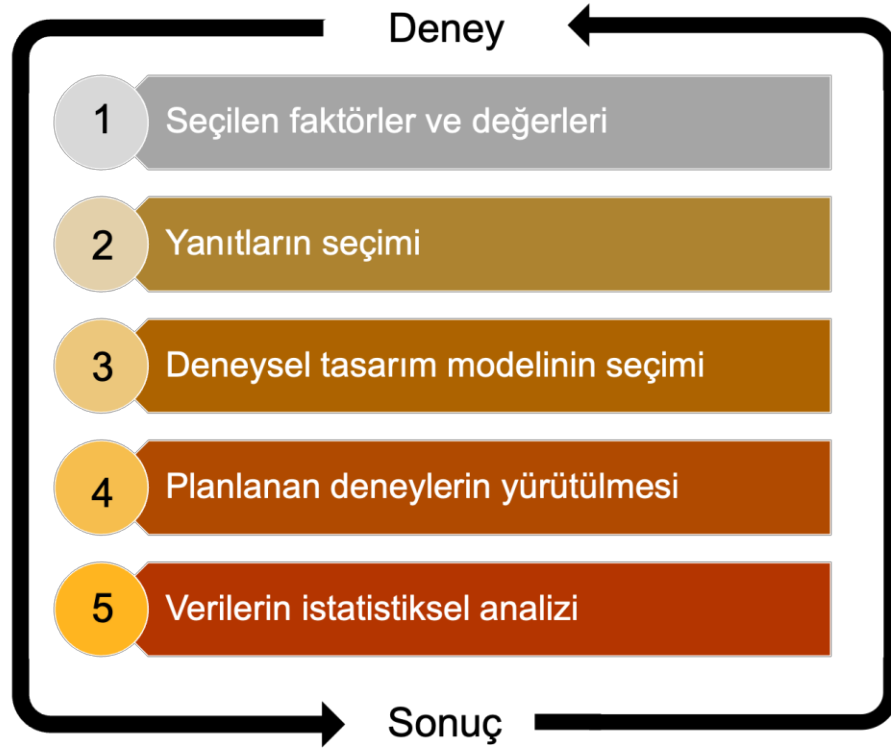




**Şekil 2. 16.** DoE yaklaşımları için genel bir gösterim olan süreç modeli.

DoE yaklaşımları ile faktörler arasında oluşan tüm etkileşimler hesaba katılabilir ve OVAT yaklaşımının aksine tasarım uzayına ait daha kesin ve daha güvenilir sonuçlar elde edilir. Bu durum deneysel tasarım yaklaşımını deneysel süreçlere ait her bir faktörünün çalışılan yanıtlar üzerindeki etkisini sistematik olarak incelemek optimize etmek veya isteklilik değerleri elde etmek için önemli bir araç haline getirir. Yüksek verimde cevap değişkeni değerleri elde etmek için optimum faktör seviyeleri belirlenebilir. Ayrıca DoE yaklaşımlarında önceki deneyimler ve literatür verileri kullanarak tasarımların seviye değerleri belirlenebilir veya tasarımlar basitleştirilerek ön denemelere gerek kalmadan optimizasyon sürecine geçilebilir (18).

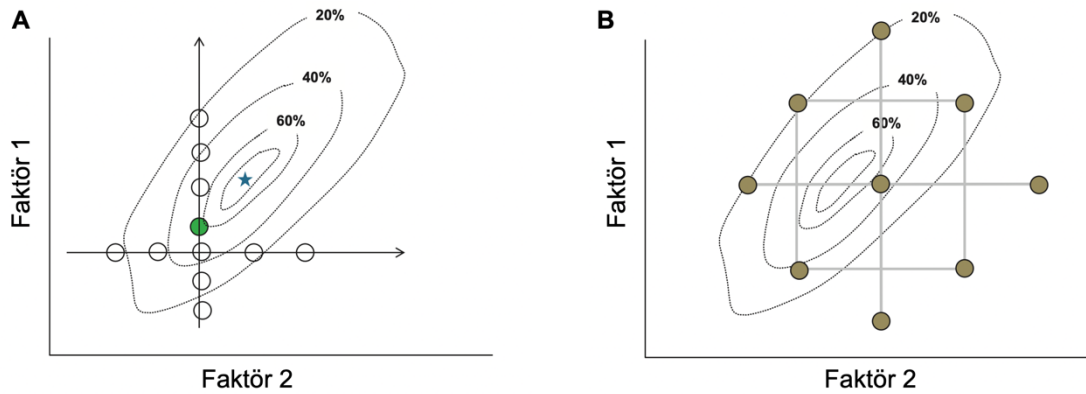
Özetle deneysel tasarımın kullanılması ile birlikte birden çok faktörün etkisi daha az sayıda deney ile incelenebilir kontrol edilmesi gereken bütün faktörler gözlemlenebilir ve deneysel süreçlere ait bilinmeyen etkiler minimum zaman ve maliyet ile ortaya çıkarılabilir (15, 16, 227). Deneysel tasarım çalışmalarında verimli sonuçlar elde etmek için önerilen akış şeması Şekil 2.17.'de sunulmuştur.



Şekil 2.17. DoE metodolojisine ait uygun deneyler yürütmek için genel şema (18).

### 2.6.3. DoE ve OVAT Yaklaşımlarının Karşılaştırılması

Optimum deneysel değerler, deneysel faktörlerin birbiriyle ilişkili olduğu yani bir faktör seviyesindeki bir değişikliğin cevap değişkeninde başka bir faktörün seviyesine bağlı olduğu durumlarda belirlenemez ve bu durumda gereğinden fazla deney yapılması olası değildir. Faktörler arasında etkileşimler (bağımsız faktörler dairesel bir cevap yüzeyine veya eksenler boyunca genişleyen elipse yol açar) olduğunu gösteren ve Şekil 2.18A.'da sunulan yanıt yüzeyi grafiğinde tek seferde tek faktör yaklaşımı ile gerçek optimum değeri belirlemenin mümkün olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte Şekil 2.18B.'de ise optimum değer faktörlerin uzayının tasarım tarafından açıkça kapsanarak deneysel tasarım (merkezi kompozit tasarım) modeli ile belirlenebildiği görülmektedir. Optimum değer belirlendiği cevap yüzey grafiğinde deneysel tasarımdan elde edilen bilgi geleneksel OVAT yaklaşımından elde edilen bilgiden çok daha fazladır.



**Şekil 2.18.** OVAT ve DoE yöntemlerinin karşılaştırılması (228). A) OVAT, B) Merkezi kompozit tasarım yaklaşımına ait yanıt yüzeyi. Yeşil nokta: Belirlenen deneysel değer. Yıldız: Optimum değer.

DeneySEL tasarımlar genel olarak tarama ve optimizasyon tasarımları olarak iki ana başlık altında incelenir.

#### 2.6.4. Tarama Tasarımları

Yapılacak araştırma yeni veya iyi bilinmeyen bir olguya odaklanmışsa çalışmanın ilk aşaması incelenen cevap değişkenlerini (verimlilik, toplam pik alanı vb.) etkileyebilecek faktörlerin seçimidir. Bu faktörlerin kontrol edilebilirliği kolay olmalı (derişim, sıcaklık, akış hızı) ve ayrıca test edilecekleri aralıklar (seviye değerleri) belirlenebilmelidir. Bir dizi tarama tasarımı oluşturularak yapılan deneyler sonucunda deneysel süreci etkileyen önemli faktör(ler) seçilir ve seviye değerleri belirlenir. Buna bağlı olarak optimizasyon sürecinde yapılması gereken deney sayısında önemli ölçüde azaltılabilir. Bir sonraki adım ise faktörler ve bunların seviye değerlerine bağlı olarak değişen cevap değişkeni veya cevap değişkenlerini belirlemektir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevap değişkenleri belirlendikten sonra uygun bir deneysel tarama tasarım planı seçilir. Tam veya kısmi faktöriyel tasarımlar, Plackett-Burman, D-optimal tasarımlar tarama tasarımları için kullanışlıdır. D-optimal tasarım klasik tasarımları kullanmanın imkansız olduğu veya tasarım matrisinin düzensiz olduğu durumlarda tercih edilmekle birlikte optimizasyon amacıyla da kullanılmaktadır (18, 229).

### **2.6.5. Optimizasyon Tasarımları**

Faktörler belirlendikten sonra optimum deneysel koşulları belirlemek için tarama tasarımlardan daha karmaşık olan optimizasyon tasarımları kullanılır. Optimizasyon tasarımlarında kategorik değişkenlikler kullanılamamakta yalnızca sürekli değişkenler kullanılabilir. Optimizasyon tasarımları ile “verimlilik, kromatografik ayırım nasıl iyileştirilebilir ve istenen koşullara nasıl getirilebilir” gibi sorulara cevap aranır. RSM, Box-Behnken, merkezi kompozit ve Taguchi deney tasarımları optimizasyon amacıyla kullanılan deneysel tasarımlardır (18, 229). Faktörler ve cevaplar arasında ilişkilerin grafiksel gösterimi cevap yüzey metodolojisinin en önemli avantajıdır. Ancak bu yöntemde faktörlerin sayısı önemlidir ve faktörlerin sayısı arttıkça tasarımda yapılması gereken deney sayısı da katlanarak artmaktadır ve bu da grafiksel gösterimin kullanımını sınırlandırmaktadır.

### **2.6.6. Tasarım Matrisleri**

Deneysel tasarım sıcaklık, akış hızı, derişim gibi faktörlerin farklı seviye değerlerini içeren bir seri deneyden oluşur. Bu bölümde tez kapsamında metabolomik ve lipidomik çalışmaların tüketme, örnek hazırlama ve kromatografik ayırım parametrelerinin optimizasyonunda kullanılan iki seviyeli kısmi faktöriyel, iki seviyeli tam faktöriyel, D-optimal karışım ve Box-Behnken tasarımları incelenmiştir.

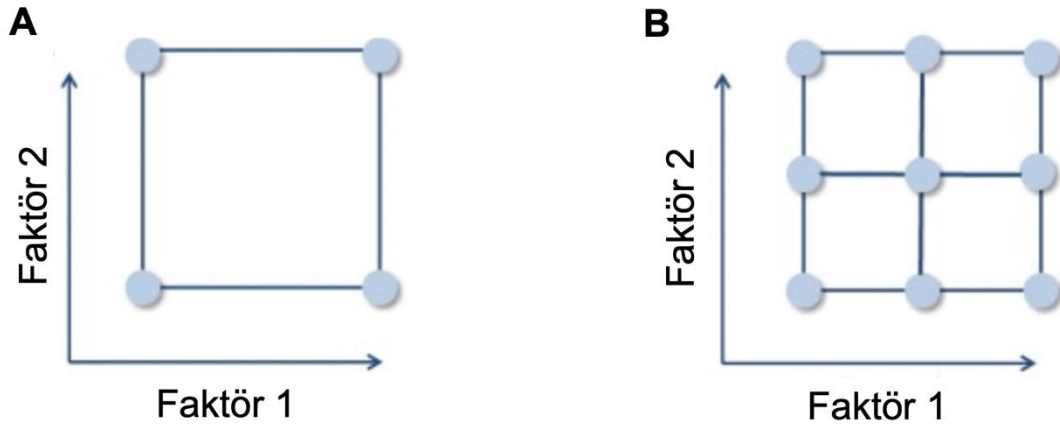
### **2.6.7. Faktöriyel Tasarımlar**

Faktöriyel tasarımlar deneylere etki eden faktörlerin aynı anda değiştiği temeline dayanır. Faktöriyel tasarımlar iki ya da daha fazla faktörün ana etkilerini ve birbirleriyle etkileşimlerini aynı anda araştırmak için kullanılır. Tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmıştır.

#### **Tam Faktöriyel Tasarımlar**

Tam faktöriyel deney tasarımı çok boyutludur. Bu tasarımın en önemli avantajı faktörler arasındaki etkileşimler de dahil olmak üzere deneysel süreçlerin tam ve detaylı bir şekilde incelenebilmesidir. Tam faktöriyel tasarımlar dikkate alınan faktörler arasındaki tüm ana faktörlerin etkilerinin ve birbirleriyle etkileşimlerinin

tahmin edilmesini sağlar. Cevap değişkenini etkileyecek  $k$  adet faktör iki seviyede incelenmek istendiğinde oluşturulan tasarım  $2^k$  tane deney sayısına sahip olacaktır (Şekil 2.19A.). Formüldeki  $k$ , faktör sayısını; 2 ise en yüksek (+1) ve en düşük (-1) olmak üzere faktörlere ait seviye değerlerini gösterir. Genel olarak deneysel sürece etki eden az sayıda faktöre ait olası tüm etkileri incelemek için kullanılır. Buna göre deney sayısı iki faktör için 4, üç faktör için 8, dört faktör için 16'dır (Tablo 2.5.). İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlar çok sayıda faktörün etkisi incelemek için kullanılamaz. Çünkü iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile altı faktörün etkisi 64 deney, yedi faktörün etkisi 128, sekiz faktörün etkisi 256 deney ile gerçekleştirilecektir ki bu pratikte mümkün değildir.



**Şekil 2.19.** Tam faktöriyel tasarımlar (228). A) İki faktörlü iki seviyeli tam faktöriyel tasarım, B) İki faktörlü üç seviyeli tam faktöriyel tasarım. Her nokta bir deney için seviye değerlerini temsil eder.

Tam faktöriyel tasarımlar üç seviyeli olarak da oluşturulabilir. Üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlarda deney sayısı  $3^k$  tanedir (Şekil 2.19B.). Faktörler en düşük (-1), merkez (0) ve en yüksek (+1) olmak üzere 3 farklı seviyede incelenir. Faktör sayısının artmasına bağlı olarak deney sayısında artacağından iki seviyeli tam faktöriyel tasarımlara göre daha az pratiktir. Ancak bu tasarımlar ile parabolik etkiler incelenip faktörlere ait daha fazla bilgi elde edilir ve bu nedenle az sayıda faktör için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımlardan daha avantajlıdır.

**Tablo 2.5.** 2 faktör ( $2^2$ ), 3 faktör ( $2^3$ ) ve 4 faktör ( $2^4$ ) için iki seviyeli tam faktöriyel tasarım tablosu.

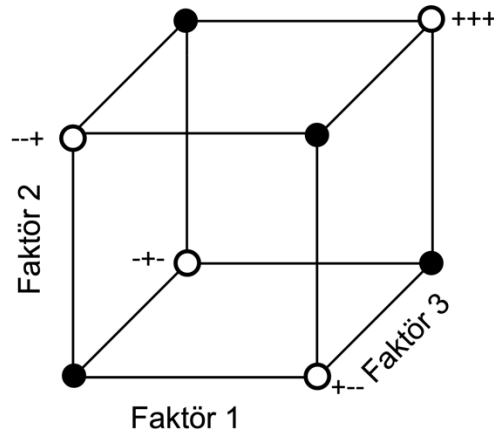
<b>Tam Faktöriyel Tasarımlar</b>											
<b>2 Faktör (<math>2^2</math>)</b>			<b>3 Faktör (<math>2^3</math>)</b>				<b>4 Faktör (<math>2^4</math>)</b>				
<b>Deney</b>	<b>x<sub>1</sub></b>	<b>x<sub>2</sub></b>	<b>Deney</b>	<b>x<sub>1</sub></b>	<b>x<sub>2</sub></b>	<b>x<sub>3</sub></b>	<b>Deney</b>	<b>x<sub>1</sub></b>	<b>x<sub>2</sub></b>	<b>x<sub>3</sub></b>	<b>x<sub>4</sub></b>
1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	2	+1	-1	-1	2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	3	-1	+1	-1	3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	4	+1	+1	-1	4	+1	+1	-1	-1
			5	-1	-1	+1	5	-1	-1	+1	-1
			6	+1	-1	+1	6	+1	-1	+1	-1
			7	-1	+1	+1	7	-1	+1	+1	-1
			8	+1	+1	+1	8	+1	+1	+1	-1
							9	-1	-1	-1	+1
							10	+1	-1	-1	+1
							11	-1	+1	-1	+1
							12	+1	+1	-1	+1
							13	-1	-1	+1	+1
							14	+1	-1	+1	+1
							15	-1	+1	+1	+1
							16	+1	+1	+1	+1

Her tasarımdaki her deneyin değişken düzeylerinin benzersiz bir kombinasyonunu sağlamak için tüm değişkenler kontrollü bir şekilde aynı anda değiştirilir.

### **Kısmi Faktöriyel Tasarımlar**

Bazı durumlarda faktörler arasındaki ikili, üçlü veya daha yüksek mertebeden etkileşimler önemli olmayabilir. İncelenen faktörler arasındaki bazı etkileşimlerin ihmal edilebilir olduğuna dair bir inanç varsa veya faktör sayısına bağlı olarak yapılması gereken deney sayısı çok ise tam faktöriyel tasarım yerine kısmi faktöriyel tasarım tercih edilir. Kısmi faktöriyel tasarım planına bağlı olarak faktörler arasındaki olası etkileşimler (bazen sadece ana faktör etkileri) hakkında sınırlı bilgi elde edilir. Kısmi faktöriyel tasarımda deney sayısı  $2^{k-p} + n$  formülü ile hesaplanır. Formülde k, deney sayısı; p, kısmi faktöriyel tasarımın derecesi, n, merkez noktada yapılan deney sayısıdır (Şekil 2.20.). Örneğin 6 faktör için yarım ( $1:2$ ) faktöriyel tasarım ile 32 deney ( $2^{6-1}$ ) veya çeyrek ( $1:4$ ) faktöriyel tasarım ile 16 deney ( $2^{6-2}$ ) yapılarak tam faktöriyel

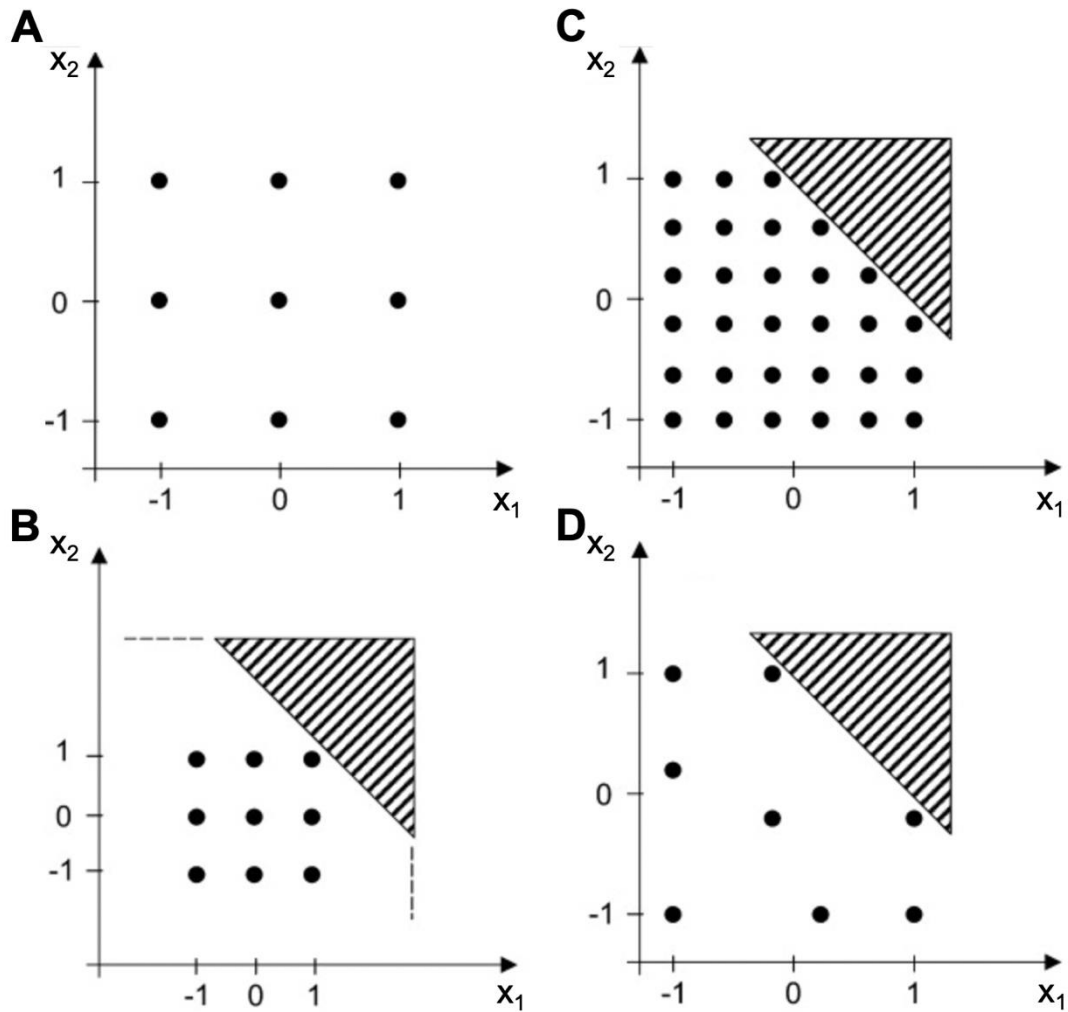
tasarım ile yapılması gereken 64 deneyden ( $2^6$ ) daha az sayıda deney ile faktörlerin cevap değişkenine olan etkileri incelenebilir. Kısmi faktöriyel tasarımlar çözünürlük III, IV veya V olarak tasarlanabilir. Çözünürlük V tasarımında ana faktör ve ikili etkileşimler karıştırılmaz.



**Şekil 2.20.** İki seviyeli ( $2^{k-1}$ ) üç faktörlü kısmi faktöriyel tasarıma ( $2^{3-1}=4$ ) ait şematik gösterimi. • ile gösterilen deneyler gerçekleştirilmez.

### 2.6.8. D-optimal Tasarım (228-230)

Asimetrik bir tasarım olan D-optimal tasarım özellikle imkansız bir deneysel alanda veya klasik tasarımlarla deneysel alanın büyük bir bölümünün kapsamadığı durumlarda tercih edilir. Özellikle çözücü bileşimi ve çözünen derişimi kombinasyonlarının mümkün olmadığı durumlarda kullanılır. D-optimal tasarımlar bir bilgisayar algoritması tarafından oluşturulur. İki faktörün etkisini araştırmak için kullanılan D-optimal tasarıma ait temsili şematik gösterim Şekil 2.21’de sunulmuştur. D-optimal tasarım modelini oluşturmak için asimetrik alandaki (Şekil 2.21C.) aday model noktalarından N tane model noktası (deney) seçilir (Şekil 2.21D.).



**Şekil 2.21.** A) Simetrik  $3^2$  tam faktöriyel tasarım, B) asimetrik  $3^2$  tam faktöriyel tasarım, C) asimetrik tasarımdaki aday model noktaları, D) 8 deneyden oluşan D-optimal tasarım için seçilmiş model noktaları (229). • ile gösterim olası veya seçilmiş deneyler.

D-optimal tasarım basit hesaplaması ve birçok mevcut algoritması nedeniyle diğer optimallik kriterleri (A-optimal, I-optimal, G-optimal) arasında hala en popüler olanıdır. Bir D-optimal tasarımın “optimallığı” modele bağlıdır. Yani bir bilgisayar belirli bir çözücü karışım modelini oluşturmadan önce araştırmacı tasarım için bir model belirtmelidir. Bilgisayar algoritması en az bilgi kaybıyla olası tasarım modelleri kümesinden en uygun alt tasarım kümesini seçer. Bu tasarım, genellikle deneyde kullanılmak istenen çeşitli faktör (çözücü türleri) seviyelerinin (çözücü hacimleri) tüm olası kombinasyonlarından oluşur. Yazılım paketleri D-optimal tasarımları oluşturmak için farklı prosedürlere sahip olabilir. Bu nedenle tasarım kullanılan yazılım paketine bağlı olarak farklılık gösterebilir.



### **D-Optimal Karışım Tasarımı (228-231)**

Karışım tasarımları karışımların bileşimini optimize etmek için kullanılan cevap yüzey tasarımlarıdır. Çözelti karışımları etken madde bileşimlerinin belirlenmesi gibi faktörlerin seviye değerlerinin zorunlu olarak belirli bir sabit değerde sınırlandırılması durumunda tercih edilir. Örneğin sıvı kromatografide hareketli fazların (A hattı ve B hattı) toplam bileşimi %100'dür. Tasarımdaki faktörlerin kısıtlamalarına bağlı olarak tasarım uzayı asimetrik olabilir. Karışım tasarımları ile hareketli fazdaki metanol, asetonitril ve su gibi toplam bileşimi %100 olması gereken üç faktörden diğer ikisi seçildiğinde faktörlerden biri sabitlenir. Böylelikle deneysel tasarım matrisindeki hareketli faz karışım oranları değiştirilerek üç boyutlu faktör uzayında üçgen bir düzlem oluşturur. Diğer kromatografik ayırım tekniklerinde, ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde karışım tasarımları optimal bileşimlerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlıdır. Buna bağlı olarak Bölüm 2.6.8.'de ayrıntıları verilen D-optimal tasarımlar ile tasarım matrisi oluşturulabilir.

Metanol, asetonitril ve asetonan oluşan (sırasıyla A, B ve C olarak kodlanmıştır) bir karışımda optimum çözücü karışımını belirlemek için 3 tekrar, 3 uyum eksikliği ve 6 model noktası olmak üzere toplam 12 deneyden oluşan örnek bir D-optimal karışım tasarımı Tablo 2.6.'da verilmiştir. Karışımdaki bileşenlere ait hacimce sınır değerler;  $0 \leq A \leq 600$ ,  $0 \leq B \leq 600$ ,  $0 \leq C \leq 200$ ,  $0 \leq A + B + C$  (toplam hacim)  $\leq 600 \mu\text{L}$ 'dir. Karışımdaki bileşen oranları asetona bağlı olarak sınırlandırılmıştır ve tasarım uzayı düzensizdir. Bu nedenle Tablo 2.6.'da verilen örnekte asimetrik model noktalarını ve optimum çözücü karışımını belirlemek için bilgisayar destekli D-optimal karışım tasarımı kullanılmıştır. Tasarımda tekrar noktaları hatayı ve sonuçlardaki değişkenliği tahmin etmek için, uyum eksikliği noktaları ise belirlenen tasarım noktalarından olabildiğince uzakta benzersiz tasarım noktaları seçilip gerçek ve tahmin edilen değerler arasındaki farkı tekrarlar arasındaki hatayla karşılaştırmak için kullanılmıştır.

**Tablo 2.6.** Üç faktör için D-optimal karışım tasarımı.

Deney	Metanol (A)	Asetonitril (B)	Aseton (C)
1*	400	0	200
2*	0	600	0
3	0	500	100
4 <sup>#</sup>	125	375	100
5	300	300	0
6	600	0	0
7 <sup>#</sup>	425	125	50
8	0	600	0
9 <sup>#</sup>	200	200	200
10*	600	0	0
11	0	400	200
12	400	0	200

\*Tekrar noktaları, <sup>#</sup>Uyum eksikliği noktaları

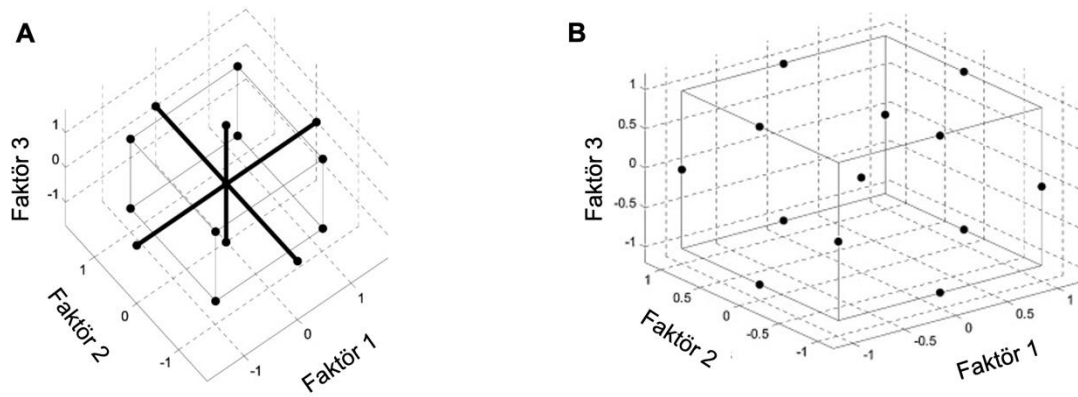
### 2.6.9. Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımı beş seviyeye kadar çıkabilen merkezi kompozit tasarımlardan farklı olarak üç seviyeye sahiptir (Şekil 2.22A.). Box-Behnken tasarımı üç veya daha fazla faktöre sahip optimizasyon çalışmalarında kullanılan kuadratik bir tasarımdır. Tasarım faktöriyel veya uç nokta noktalara sahip olmayıp  $2k(k-1) + n_c$  tane deney içerir. Formüldeki  $k$ , faktör sayısı;  $n_c$  ise merkez noktanın tekrar sayısıdır. İki faktör için Box-Behnken tasarımı oluşturulamaz. Üç faktör için 13 deneyin gerçekleştirileceği örnek Box-Behnken tasarımı ve tasarım matrisinin şematik gösterimi Tablo 2.7. ve Şekil 2.22B.'de verilmiştir. Box-Behnken tasarımları genellikle merkezi kompozit tasarımlardan daha az tasarım noktasına sahiptir, bu nedenle aynı sayıda faktörle çalıştırılmaları daha tasarrufludur. Box-Behnken tasarımları merkezi kompozit tasarım gibi aksel noktalara sahip değildir, bu nedenle tüm tasarım noktalarının çalışma alanını kapsadığından emin olunabilir.

**Tablo 2.7.** Üç faktör için Box-Behnken tasarımı

Deney	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
1	+1	+1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	-1	-1	0
5	+1	0	+1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	-1	0	-1
9	0	+1	+1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	-1	-1
13*	0	0	0

\*Merkez nokta

**Şekil 2.22.** Üç faktör için temsili optimizasyon tasarımları (229). A) 3 faktör için 15 deneyden ( $2^k + 2k + 1$ ) oluşan merkezi kompozit tasarım, B) 3 faktör için 13 deneyden ( $2k(k - 1) + 1$ ) oluşan Box-Behnken tasarımı.

### 2.6.10. Deneysel Tasarım Modellerinin Değerlendirilmesi (221)

Faktörler ve cevap değişkenleri arasındaki ilişki matematiksel denklemlerle açıklanabilir. Üç faktör için tipik olarak üretilen matematiksel model Eşitlik 2.3.'te verilmiştir.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + \varepsilon_0 \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte;

$y$  (Cevap): Faktörlere bağlı olarak değişim gösteren bağımlı değişken yani cevap değişkenidir.

$x$  (Faktör): Cevap değişkeni üzerinde etkisi araştırılan bağımsız değişkenler.

$b_0$  (Kesişim veya ortalama): Oldukça önemli bir parametredir ve kesişimi ifade eder. Her üç ana etki sıfır olduğundaki  $y$ 'nin cevabıdır.

$\varepsilon_0$ : Deneysel hata.

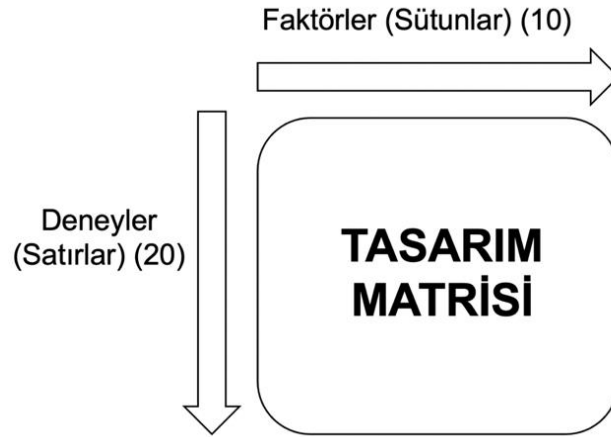
$b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$  (Üç faktöre ait doğrusal terimler): Faktörler ile cevap değişkeni arasındaki doğrusal ilişkiyi verir. Bazı deneysel tasarımlar doğrusal modellerle açıklanır.

$b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$  (Üç faktöre ait kuadratik terimler): Bir değişkendeki farklılıkların ikinci bir değişkendeki farkla nasıl açıklandığı bilgisini verir. Bu terimler ile eğrisel ilişki kurulabilir.

$b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$  (Faktörler arasındaki etkileşim): Faktörler arasındaki etkileşimlerin cevap değişkeni üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılır.

#### Tasarım Matrisi

Kemometrik çalışmalar gerçekleştiren araştırmacılar genel olarak matrislerle çalışırlar. Deneysel tasarım matrisleri deneyleri içeren satırlar ve bağımsız değişkenler olarak ifade edilen faktörlerin değişen seviyelerini içeren ve matematiksel modellerle ilişkilerini gösteren kolonlardan oluşur. On faktör ve yirmi deneyden oluşan temsili iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım Şekil 2.23.'te sunulmuştur.

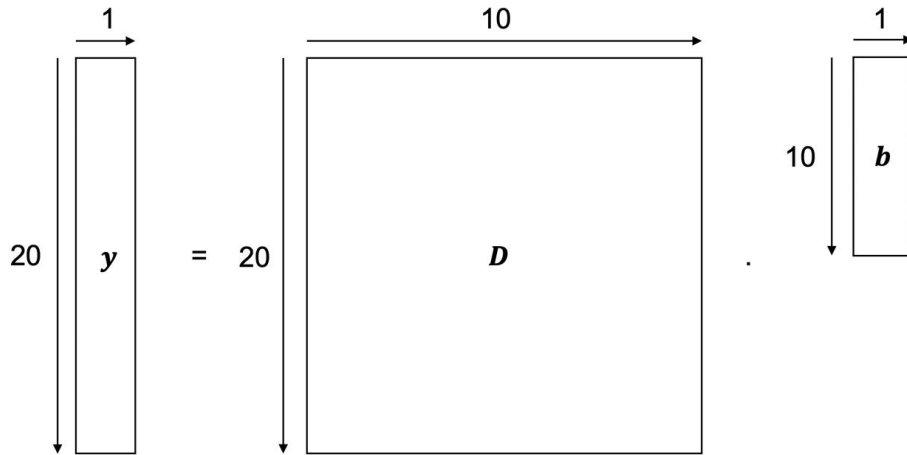


**Şekil 2.23.** Temsili iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım matrisi.

### Deneysel tasarım modelinin hesaplanması

Cevap değişkeni, katsayılar ve deneysel matris arasındaki ilişki Şekil 2.24.'teki şematik gösterim ve Eşitlik 2.4.'le açıklanabilir.

$$y = D \cdot b \quad (2.4)$$



**Şekil 2.24.** Cevap değişkeni, tasarım matrisi ve katsayılar arasındaki ilişkiye ait şematik gösterim.

Oluşturulan deneysel tasarım kare matris şeklindeyse  $b$  katsayısı Eşitlik 2.5. ile oluşturulan deneysel tasarım eğer kare matris şeklinde değilse  $b$  katsayısı Eşitlik 2.6. ile hesaplanır.

$$\mathbf{b} = \mathbf{D}^{-1} \cdot \mathbf{y} \quad (2.5)$$

$$\mathbf{b} = (\mathbf{D}' \cdot \mathbf{D})^{-1} \cdot \mathbf{D}' \cdot \mathbf{y} \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.3.'teki gibi bir matematiksel eşitlikteki faktörler için örnek seviye değerleri Tablo 2.8.'de, regresyon katsayıları ve cevap değerleri ise Tablo 2.9'da sunulmuştur.

**Tablo 2.8.** Örnek faktörler ve seviye değerleri (221).

Faktör	Seviye Değerleri		
$x_1$	4	5	6
$x_2$	20	40	60
$x_3$	2	3	4

**Tablo 2.9.** Örnek regresyon katsayıları ve tahmini cevap değerleri (221).

Parametre	Katsayı	Tahmini Cevap
$b_0$	58.807	35.106
$b_1$	-6.092	15.938
$b_2$	-2.603	45.238
$b_3$	4.808	28.399
$b_{11}$	0.598	19.315
$b_{22}$	0.020	1.552
$b_{33}$	0.154	38.251
$b_{12}$	0.110	22.816
$b_{13}$	0.351	23.150
$b_{23}$	0.029	12.463

$b$  değeri belirlendikten sonra,  $y$  değerini tahmin etmek ve karelerin toplamını ve diğer istatistik hesaplamaları yapmak mümkündür. Katsayılardan hangi parametrenin cevap üzerinde etkili olduğu bulunabilsede Tablo 2.9.'da verilen örnekteki katsayılar parametrenin mutlak bir anlam ifade etmediğini göstermektedir. Örneğin,  $b_{22}$  parametresinin (0.020)  $b_{11}$  parametresine (0.598) göre küçük olduğu

görülmektedir. Ancak bu  $b_{22}$  parametresinin  $b_{11}$  parametresine göre daha önemli olduğunu göstermez. Bu tamamen fiziksel ölçüm birimlerine bağlıdır.

### Parametrelerin Önemlilik Değerlendirmesi

Her faktöre ait fiziksel ölçek farklı olduğu için Tablo 2.9'da verilen ve 10 regresyon katsayısı ile tanımlanan üç faktörlü tasarım örneğinde hangi parametrelerin daha önemli olduğuna karar verilemez. Parametrelerin önemi hakkında daha doğru bir yaklaşım yapmak için faktörler standardize edilmelidir. Bunun için en yaygın yöntem kodlamadır. Her bir faktöre ait en düşük seviye değeri için -1, en yüksek seviye değeri içinse +1 değeri verilir. Deneysel tasarımdaki faktörler Tablo 2.10.'daki gibi kodlanır. Buna göre birinci faktör için kodlanmış en düşük seviye değeri (-1) 4'e, en yüksek seviye değeri (+1) 6'ya karşılık gelir.

**Tablo 2.10.** Tasarımdaki faktörlere ait kodlanmış seviye değerleri (221).

Faktör	Seviye Değerleri		
	-1	0	1
$x_1$	4	5	6
$x_2$	20	40	60
$x_3$	2	3	4

Kodlamaya bağlı olarak tasarım matrisi önemli ölçüde basitleşir ve katsayılar yeniden hesaplandığında regresyon katsayılarının önemli ölçüde değiştiği görülmektedir (Tablo 2.11.). Örneğin,  $b_1$  parametresinin işareti Tablo 2.9.'da negatif (-6.092) iken, Tablo 2.11'de pozitif (+5.343) olarak hesaplanmıştır ve  $b_{11}$  teriminin boyutu ve işareti değişmemiştir.

**Tablo 2.11.** Kodlanmış seviye değerlerine göre Tablo 2.9.'daki katsayılara ait yeni değerler.

Parametre	Katsayı
$b_0$	17.208
$b_1$	5.343
$b_2$	-7.849
$b_3$	8.651
$b_{11}$	0.598
$b_{22}$	7.867
$b_{33}$	0.154
$b_{12}$	2.201
$b_{13}$	0.351
$b_{23}$	0.582

Burdaki gibi önemlilik değerlendirilmesi parametrelere ait katsayıların büyüklüğü ile yapılabildiği gibi F-testi veya t-testi ile de yapılabilmektedir. Verilerin doğru kodlanması koşuluyla katsayı ne kadar büyük olursa önemi de o kadar büyük olur. Yani  $b$  katsayısı ne kadar büyük ise faktör ( $x$ ) cevap ( $y$ ) üzerinde o kadar etkilidir. Katsayıların önünde eksi (-) işareti olması o faktörün deneysel sürece negatif etkisi olduğunu gösterir.

### Deneysel Tasarımların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Deneysel tasarım planlarına göre gerçekleştirilen analizlere bağlı olarak önerilen modeller veya faktörler istatistiksel olarak önemsiz olabilir. Bu nedenle araştırmacı deneysel tasarımdaki her bir deneye karşı ölçülen cevap değişkenlerini girdikten sonra yazılım tarafından önerilen modeli ANOVA, F-testi, t-testi gibi istatistiksel analizlerle kontrol etmelidir. Buna göre önemsiz bulunan faktörler modelden çıkarılabilir. Ayrıca faktöriyel tasarımlarda önemli faktörlerin matematiksel modele dahil edilip edilmeyecekleri Pareto veya Yarı-Normal grafik gibi çeşitli görselleştirme araçları ile belirlenebilir.

Tasarım uzayındaki model noktalarına ait cevap değişkenlerinin normallik varsayımını sağlayıp sağlamadıkları veya normal bir dağılım gösterip göstermedikleri



çeşitli tanı araçları (artıkların normal grafiği, analiz sırasına göre artıkların grafiği gibi) ile kontrol edilmelidir. Ölçülen cevap değişkenlerinin türüne bağlı olarak matematiksel dönüşüm uygulanıp uygulanmayacağı Box-Cox grafiği ile belirlenir. Son olarak ise isteklilik fonksiyonuna dayalı bir kriter kullanılarak deneysel süreçte faktörlerin ayarlanması gereken optimum koşullar belirlenebilir.

Birçok yazılımda var olan optimizasyon modülü ile cevap değişkeni üzerinde etkisi olan faktörlere ait optimal değerler belirlenebilir. Bunun için cevap/cevaplar birimsiz isteklilik skalasına dönüştürülerek  $d = 0$  ve  $d = 1$  arasında değerler alır. İsteklilik fonksiyonunda faktörlere ve cevaplara farklı önem dereceleri atanabilir. Tez kapsamında kullanılan cevap değişkeninin maksimize edilmesine yönelik isteklilik fonksiyonu Eşitlik 2.7’de verilmiştir.

Eşitlik 2.7’de;  $D(X)$ , isteklilik fonksiyonu;  $d_i$ , istenen cevap aralıkları;  $n$ , cevapların sayısıdır. Herhangi bir cevap veya faktör istenen aralığın dışına çıkarsa  $D(X)$  sıfıra eşitlenir.

$$D = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad (2.7.)$$

$d_i = 0$ ;  $i \leq$  küçük değer,

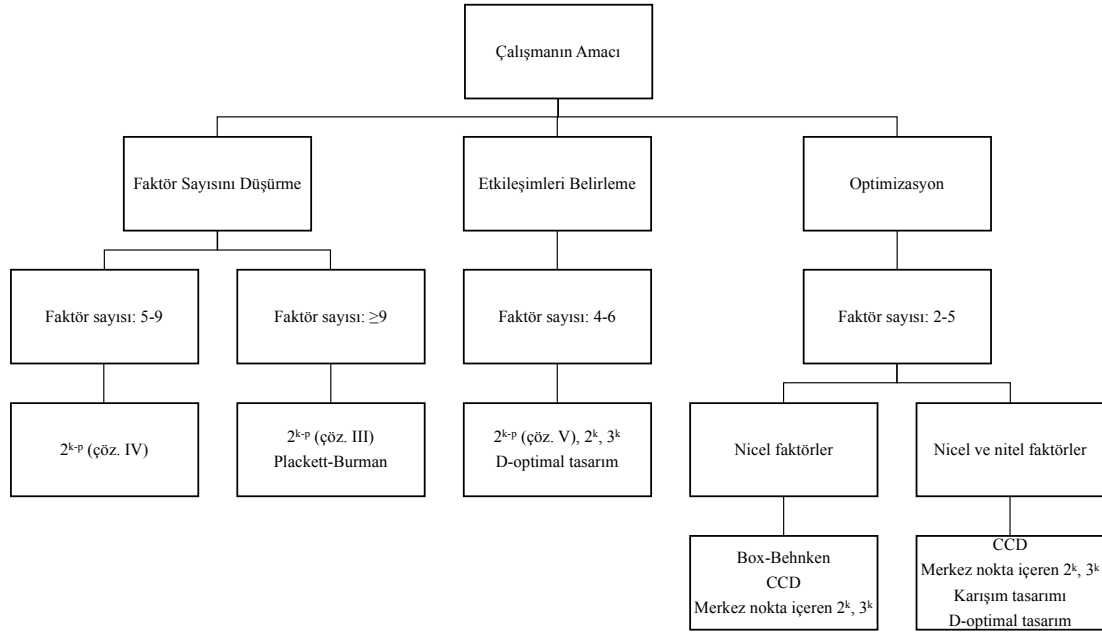
$0 < d_i < 1$ ; küçük değer  $< y_i <$  yüksek değer,

$d_i = 1$ ;  $y_i >$  yüksek değer.

### Uygun Deneysel Tasarımın Seçilmesi

Alınmak istenen bilginin ayrıntısı, maliyet ve süreye bağlı olarak uygun deney tasarım yöntemlerinden biri seçilir (18). Seçilen yöntemde rasgeleleştirme kullanılarak kontrolsüz değişkenlerin elde edilen sonuçlar üzerindeki etkisi en aza indirilmelidir. Öte yandan araştırma planında bazı deneysel noktalar için tekrarların dahil edilmesi, incelenen örneğin rastgele hatalardan nasıl etkilendiğini belirlemeye yardımcı olacaktır. Özetle deney tasarımı ve optimizasyonu yaklaşımında araştırmanın dikkatli bir şekilde planlanması, bir ölçüm verisi matrisi elde etmek için planlanan deneylerin yapılması, deney sonuçlarının istatistiksel analizi ve yorumlanması ile bilimsel süreç

tamamlanır (232, 233). Genel olarak faktör sayısı, türü ve ulaşılmak istenen hedefe yönelik olarak deneysel tasarım seçimi yapılır (Şekil 2.25.).



**Şekil 2.25.** Deneysel tasarım seçim rehberi (234).  $2^{k-p}$ : İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım,  $2^k$ : İki seviyeli tam faktöriyel tasarım,  $3^k$ : Üç seviyeli tam faktöriyel tasarım.

### 2.6.11. Metabolomik ve Lipidomik Çalışmalarda Deneysel Tasarım

Sağlık bilimlerinde yapılan birçok çalışmada istenen hedefe yönelik, hedefi doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Ancak, deneysel tasarım planlarının sağlık bilimlerinde ve özellikle omiks bilimlerinde kullanımı günümüzde oldukça sınırlıdır (18) (Tablo 2.12.). Metabolomik ve lipidomik çalışmaların ortak noktası, uygulanan deneysel prosedürlerin (metabolitlerin ve lipitlerin tüketilmesi, örnek hazırlama, enstrümental analiz, veri analizi) karmaşıklığıdır. Bu sebeple sistem biyolojisinin en önemli disiplinlerinden olan metabolomik ve lipidomik analizlerde yöntem farklılıklarından veya biyolojik matrislerin karmaşıklığından kaynaklanan ve çalışmaların sonucunu etkileyecek birçok faktörün bulunması nedeniyle, uygun deneysel tasarım planlamaları ile uygun analitik yöntem parametrelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

**Tablo 2.12.** Metabolomik ve lipidomik çalışmaların örnek hazırlama ve yöntem geliştirme basamaklarına ait DoE uygulamaları

DoE Stratejisi	Örnek Türü	Analitik Teknik	Omik Yaklaşım	Ref.
<b>Örnek Hazırlama</b>				
D-optimal	İdrar	GC-TOF-MS	Metabolomik	(235)
D-optimal, 2 <sup>6-2</sup>	Plazma	GC-TOF-MS	Metabolomik	(236)
2 <sup>6-2</sup> , MKT	Hücre kültürü	ADK	Profilleme	(237)
D-optimal, 3 <sup>k</sup>	Plazma	GC-TOF-MS	Metabolomik	(238)
2 <sup>k-p</sup>	Bakteri, serum	MALDI-TOF-MS	Lipidomik*	(239)
PlackettBurman	Saç	LC-MS/MS	Metabolomik*	(240)
<b>Analitik Yöntem</b>				
MKT, 3 <sup>k</sup>	Plazma	GC-TOF-MS	Metabolomik	(238)
MKT	Serum	UHPSFC-qTOF-MS	Lipidomik	(241)
D-optimal	Serum	LC-MS/MS	Metabolomik	(202)

\*Hedeflenmiş analizler, ADK: Anyon değişim kromatografisi, MKT: Merkezi kompozit tasarım, UHPSFC: Ultra yüksek performanslı süper kritik akışkan kromatografisi

Özellikle hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalar sırasında tüketilen tüm bileşikler için yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik elde etmek pratik olarak neredeyse imkansızdır (18, 242-244). Çünkü örnek toplama, saklama ve hazırlama, analiz ve veri işleme basamaklarında çeşitli varyasyon kaynakları bulunur (245, 246). Şüphesiz ki deneysel tasarım yöntemlerinin kullanılması ve bu yöntemlere olan ilginin artmasıyla çalışılan biyolojik matrise ve analitik yaklaşıma ait birçok parametrenin optimize edilmesi sonucu bilim insanları yüksek kaliteli omik veriler üretebilir. Bu bağlamda tez çalışması kapsamında metabolomik ve lipidomik analizlerin sonuçlarını etkileyen çok sayıda faktör çeşitli deneysel tasarımlar ile optimize edilerek analitik yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemler GBM, menenjiyom, akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubundan toplanan doku ve plazma örneklerine uygulanmıştır

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Kimyasal	Firma
Aseton (GC saflıkta)	Merck
Asetonitril (LC-MS saflıkta)	Merck
Amonyum format (LC-MS saflıkta)	Sigma Aldrich
Doymuş alkan serisi (C <sub>8</sub> -C <sub>40</sub> )	Sigma Aldrich
DL-fenilalanin-β- <sup>13</sup> C	Isotec
Diklorometan	Merck
Etanol (HPLC saflıkta)	Isolab
ESI-Tune Karışımı	Agilent
Formik asit (LC-MS saflıkta)	Merck
Hegzan	Merck
Helyum gazı (%99,999)	Ankara Gaz
İzopropil alkol (LC-MS saflıkta)	Merck
Kloroform	Merck
Metil tert-butil eter	Merck
Metoksiamin hidroklorür	Sigma Aldrich
Miristik-d <sub>27</sub> asit	Sigma Aldrich
MSTFA + %1 TMCS	Thermo Fisher Scientific
Su (LC-MS saflıkta)	Merck
Piridin (GC saflıkta)	Sigma Aldrich

### 3.2. Cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Firma</b>
Derin donduruculu buzdolabı (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Nüve
GC-MS	Shimadzu (QP2010 Ultra)
Hassas Terazi	Mettler Toledo (AG285)
Kuru blok ısıtıcı	Allsheng MS-100
Milli-Q su cihazı	Barnstead NanoPure Diamond
qTOF-MS	Agilent (6530)
Santrifüj (1)	Hermle (Z233 M-2)
Santrifüj (2)	Hettich (EBA 20)
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex (RK 514 BH)
UPLC	Agilent (1260 Infinity)
Vakum santrifüj	Labconco CentriVap Concentrator
Vorteks karıştırıcı	Ika Vortex 3
Havan	Isolab
Sıvı azot tankı	MVE Lab10

### 3.3. Cam ve Sarf Malzemeler

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma</b>
Balon joje ve beher (çeşitli hacimlerde)	Isolab
C18 kolon (2.1 x 100 mm, 2.7 µm)	Agilent (Poroshell HPH)
GC kolon (30 m +10 m ön kolon, 0,25 mm, 0,25 µm)	Agilent (DB5-MS)
İnsert (200 µL)	Agilent
Mezür (çeşitli hacimlerde)	Isolab
Otomatik mikropipet (0,1-10, 10-100, 100-1000 µL)	Eppendorf
Ön kolon (C18, 4 mm x 3.0 mm)	Phenomenex
Santrifüj tüpü (1,5 ve 2 mL)	Isolab
Şırınga	Hamilton
Vial (2 mL) ve vida kapak	Agilent
Kriyojenik tüp	Tarsons

### 3.4. Yazılımlar

Yazılım	Firma
ABF Converter	Reifycs
Design-Expert (ver. 12.0.3.0)	Stat-Ease
Excel 2020	Microsoft
GraphPad Prism (ver. 7.04)	GraphPad Software
MS-DIAL (ver. 4.60)	RIKEN
MS-FINDER (ver. 3.52)	RIKEN
SIMCA (ver. 14.1)	Umetrics AB
Metaboanalyst (ver. 5.0)	<a href="https://www.metaboanalyst.ca">https://www.metaboanalyst.ca</a>

### 3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

**%0,1 FA çözeltisi:** MS saflıkta bir miktar su içeren bir litrelik balon jojeye derişik FA (%98) çözeltisinden 1 mL aktarılmış ve bir litreye MS saflıkta su ile seyreltilmiştir.

**%0,1 FA içeren asetonitril çözeltisi:** MS saflıkta bir miktar asetonitril içeren bir litrelik balon jojeye derişik FA (%98) çözeltisinden 1 mL aktarılmış ve bir litreye LC-MS saflıkta asetonitril ile seyreltilmiştir.

**%0,1 FA ve 10 mM AF içeren su:asetonitril (6:4, h/h) çözeltisi:** MS saflıkta 400 mL asetonitril ile bir miktar su bulunan bir litrelik balon jojeye 0,6306 g AF tartılarak aktarılmıştır. AF'nin çözünmesi sağlandıktan sonra derişik FA (%98) çözeltisinden 1 mL alınarak balon jojeye ilave edilmiştir. Sonrasında hacim MS saflıkta su ile bir litreye tamamlanmıştır.

**%0,1 FA + 10 mM AF içeren IPA:asetonitril (9:1, h/h) çözeltisi:** MS saflıkta 100 mL asetonitril ile bir miktar IPA bulunan bir litrelik balon jojeye 0,6306 g AF tartılarak aktarılmış ve AF'nin ultrasonik banyoda tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra derişik FA (%98) çözeltisinden 1 mL alınarak balon jojeye ilave edilmiştir. Sonrasında hacim MS saflıkta su ile bir litreye tamamlanmıştır.

**Metoksiamin hidroklorür (MeOX) çözeltisi (10 mg/mL):** 7,5 mg MeOX tartılarak viale aktarılmış ve üzerine 750 µL piridin ilave edilerek vortekslenmiştir. MeOX çözeltisi her analizden önce taze olarak hazırlanmıştır.

**MeOX çözeltisi (30 mg/mL):** 22,5 mg MeOX tartılarak viale aktarılmış ve üzerine 750 µL piridin ilave edilerek vortekslenmiştir. MeOX çözeltisi her analizden önce taze olarak hazırlanmıştır.

**Miristik-d<sub>27</sub> asit çözeltisi (1000 µg/mL):** LC-qTOF-MS analizleri için 1 mg miristik-d<sub>27</sub> asit tartılarak 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1 mL LC-MS saflıkta metanol ilavesinin ardından vortekslenerek çözünmesi sağlanmıştır. GC-MS analizleri için 1 mg miristik-d<sub>27</sub> asit tartılarak 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 1 mL piridin ilave edilmesinin ardından vortekslenerek çözünmesi sağlanmıştır.

**DL-fenilalanin-β-<sup>13</sup>C (1000 µg/mL):** 1 DL-fenilalanin-β-<sup>13</sup>C tartılarak 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 mL LC-MS saflıkta su ilavesinin ardından vortekslenerek çözünmesi sağlanmıştır.

### 3.6. Plazma ve Doku Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından GO 19/720 numaralı “Glioblastoma multiforme, menenjiyom (birincil) ve metastaz (ikincil) beyin tümörlerine ait fenotiplerin belirlenmesinde kullanılacak bütünlük omiks analizler için analitik yöntem geliştirilmesi ve uygulanması” başlıklı proje önerisi 02.07.2019 tarihli toplantıda etik kurul onayı (EK-3) almış ve örnekler başvuru dosyasında belirtilen şartlara bağlı kalınarak projede yer alan doktorlar tarafından Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniğinde toplanmıştır. 18 yaşın altındaki hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Hasta grubunu oluşturan GBM, menenjiyom ve metastaz beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubunu oluşturan serebral hematomla (epidural, subdural, parankimal) başvuru yapan ve tedavisi için hematoma boşaltılmasının yanında dekompresif amaçlı parankimal rezeksiyon yapılması gereken hastalardan, etik kurul raporuna uyan ve onam veren her bir gönüllüden doku ve plazma örnekleri toplanmıştır. Çalışma döneminde beyin metastazı tanısı konulan hastaların çoğunun akciğer kanseri olduğu görülmüş ve buna bağlı olarak metastaz grubuna ait örnekler akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan hastalardan toplanarak oluşturulmuştur. GBM (n=12), menenjiyom (n=12) ve akciğer kanseri beyin metastaz (n=12) tanısı konulan beyin tümörlü hastalardan 36 doku ile 36 kan örneği ve parankimal rezeksiyon

yapılması gereken hastalardan da 36 doku ve 36 kan örneği (n=36) toplanmış ve toplamda 144 örnek ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grubundaki bireylere yapılan cerrahi müdahale esnasında patoloji amaçlı alınan doku örneklerinin bir kısmı hızlıca kriyojenik tüplere konularak sıvı azot içerisine daldırılmış ve böylece örnekler arasında varyasyona sebep vermeden hücrel aktivitenin hızlı ve ani şekilde durdurulması sağlanmıştır. Aynı bireylerden toplanan yaklaşık 2-4 mL'lik kan örnekleri ise EDTA'lı tüplere alınmış ve +4 °C'de 3000 devir/dak'da 10 dak santrifüjlenerek kan plazması elde edilmiştir. Toplanan doku ve plazma örneklerinin Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na transferi gerçekleşene kadar örnekler Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde -80 °C'de saklanmıştır. Kuru buz içerisinde Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na transfer edilen plazma örnekleri -20 °C'de, doku örnekleri ise -80 °C'de analizler gerçekleştirilinceye kadar saklanmıştır.

### **3.7. Bütünleşik Omiks Analizler için Doku Örneklerinin Hazırlanması**

Metabolomik ve lipidomik analizler için doku örnekleri Bölüm 3.7.1., Bölüm 3.7.2. ve Bölüm 3.7.3.'te belirtilen optimize edilmiş koşullar altında hazırlanmıştır.

#### **3.7.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Eş Zamanlı Tüketilmesi**

Derin dondurucuda saklanan (-80 °C) doku örnekleri hızlıca sıvı azot dolu kaba alınmış ve ardından hücrel aktivitenin başlamaması için sürekli sıvı azot ikame edilen havan içerisinde dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen her bir doku örneğinden 10±0,1 mg kadar tartılmış ve 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Metabolitlerin tüketilmesi için doku örneklerine sırasıyla 1 µg/mL DL-fenilalanin-β-<sup>13</sup>C (IS) içeren 400 µL metanol ve 200 µL su ilave edilmiştir. Sonrasında metabolitlerin ve lipitlerin hücre dışına salınımları için örnekler buzlu su doldurulmuş ultrasonik banyoda 10 dak sonikasyona bırakılmıştır. Sonikasyon işleminin ardından oda sıcaklığına getirilen örneklere 600 µL diklorometan eklenerek lipitlerin organik faza geçişi sağlanmıştır. Sonrasında örnekler buz dolu kap içerisinde 800 devir/dak'da 10 dak boyunca çalkalandıktan sonra +4 °C'de 10.000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiştir. Böylelikle hem metabolitlerin hem de lipitlerin eş zamanlı analizine



olanak veren üç fazlı bir çözelti karışımı oluşturulmuştur. Her bir örneğin metabolitleri içeren üst fazlarından hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler için ayrı ayrı 200'er µL, lipitleri içeren alt fazlarından ise LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizler için 200'er µL alınmış ve üç farklı santrüfuj tüpüne aktarılmıştır.

Metabolomik ve lipidomik analizler için ayrı ayrı olmak üzere her bir örneğin sırasıyla üst ve alt fazlarından 50'şer µL alınarak QC örnekleri için havuz oluşturulmuştur. QC örnekleri için oluşturulan iki ayrı havuzdan ayrı ayrı 200'er µL alınmış ve iki ayrı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hazırlanan tüm örnekler vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur.

### **3.7.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme**

Kuruluğa kadar uçurulmuş örneklere 20 µL MeOX (piridin içerisinde 10 mg/mL) çözeltisi eklenmiş ve örnekler kuru blok çalkalayıcıda 30 °C'de 90 dak inkübe edilerek metoksillendirilmiştir. MeOX çözeltisi son hacimde 1 ppm miristik-d<sub>27</sub> asit (IS) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örnekler 80 µL N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit + %1 trimetilklorosilan (MSTFA + %1 TMCS) çözeltisi ile 70 °C'de 120 dak inkübe edilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen örnekler silillenmiş GC-MS viallerine aktarılarak DB5-MS kolon ile Bölüm 3.9.1.'de ayrıntıları verilen optimize edilmiş GC-MS koşullarında analiz edilmiştir.

### **3.7.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik ve Lipidomik Analizler için Örneklerin Hazırlanması**

Kuruluğa kadar uçurulmuş örnekler LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler için 200 µL %0,1 FA içeren asetonitril ile lipidomik analizler için ise 200 µL IPA:asetonitril (7:3, h/h) karışımı ile yeniden çözülmüştür. Ardından viallere aktarılan örnekler C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon ile metabolomik ve lipidomik analizler için sırasıyla Bölüm 3.9.2. ve Bölüm 3.9.3.'te ayrıntıları verilen optimize edilmiş LC-qTOF-MS koşullarında analiz edilmiştir.

### 3.8. Bütünleşik Omiks Analizler için Plazma Örneklerinin Hazırlanması

Metabolomik ve lipidomik analizler için plazma örnekleri Bölüm 3.8.1., Bölüm 3.8.2. ve Bölüm 3.8.3.'te belirtilen optimize koşullar altında hazırlanmıştır.

#### 3.8.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Eş Zamanlı Tüketilmesi

Derin dondurucuda saklanan (-20 °C) plazma örnekleri oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve her bir örnekten 200'er µL alınarak 2 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için örneklere sırasıyla 1 µg/mL DL-fenilalanin-β-<sup>13</sup>C (IS) içeren 600 µL metanol ve 200 µL su ilave edilmiştir. Sonrasında örnekler 30 sn vortekslenmiş ve ardından üzerlerine 600 µL kloroform eklenerek lipitlerin organik faza geçişi sağlanmıştır. Sonrasında örnekler buz dolu kap içerisinde 800 devir/dak'da 10 dak boyunca çalkalandıktan sonra +4 °C'de 10.000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiştir. Böylelikle doku örnekleri için olduğu gibi plazma örnekleri için de hem metabolitlerin hem de lipitlerin eş zamanlı analizine olanak veren üç fazlı bir çözelti karışımı oluşturulmuştur. Her bir örneğin metabolitleri içeren üst fazlarından hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler için ayrı ayrı 200'er µL, lipitleri içeren alt fazlarından ise LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizler için 200'er µL alınmış ve üç farklı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. QC örnekleri için Bölüm 3.7.1.'de belirtildiği gibi iki farklı havuz oluşturulmuştur. İki ayrı havuzdan ayrı ayrı 200'er µL alınarak metabolomik ve lipidomik analizler için QC örnekleri hazırlanmış ve iki ayrı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hazırlanan tüm örnekler vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur.

#### 3.8.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler için Türevlendirme

Kuruluğa kadar uçurulmuş örneklere 20 µL MeOX (piridin içerisinde 30 mg/mL) çözeltisi eklenmiş ve örnekler kuru blok çalkalayıcıda 30 °C'de 90 dak inkübe edilerek metoksillendirilmiştir. MeOX çözeltisi son hacimde 1 ppm miristik-d<sub>27</sub> asit (IS) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örneklere 80 µL MSTFA + %1 TMCS eklenmiş ve örnekler kuru blok çalkalayıcıda 37 °C'de 120 dak inkübe edilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen örnekler silillenmiş GC-MS viallerine

aktarılarak DB5-MS kolon ile Bölüm 3.9.1.'de ayrıntıları verilen optimize edilmiş GC-MS koşullarında analiz edilmiştir.

### **3.8.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik ve Lipidomik Analizler için Örneklerin Hazırlanması**

Kuruluğa kadar uçurulmuş örnekler metabolomik analizler için 200 µL %0,1 FA içeren su:%0,1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) karışımı ile lipidomik analizler içinse 200 µL IPA:asetonitril (7:3, h/h) karışımı ile yeniden çözülmüştür. Ardından viallere aktarılan örnekler C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon ile metabolomik ve lipidomik analizler için sırasıyla Bölüm 3.9.2. ve Bölüm 3.9.3.'te ayrıntıları verilen optimize edilmiş LC-qTOF-MS koşullarında analiz edilmiştir.

## **3.9. Enstrümental Analizler**

Doku ve plazma örneklerinden metabolomik analizler optimize edilmiş koşullarda hem GC-MS hem LC-qTOF-MS ile lipidomik analizler ise LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.9.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizler**

Her bir doku ve plazma örneğine ait türevlendirilmiş örnekler GC-MS ile DB-5MS (30 m + 10 m ön kolon x 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Enjeksiyonlar bölmesiz olarak gerçekleştirilmiş ve enjeksiyon hacmi 1 µL olarak belirlenmiştir. Analizler Tablo 3.1'de verilen optimize edilmiş GC-MS koşullarında gerçekleştirilmiştir. Metabolitlere ait alıkonma zamanlarını kontrol etmek ve alıkonma indekslerini hesaplamak için doymuş alkan serisi (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>) kullanılmıştır.

**Tablo 3.1.** Optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

<b>Fırın sıcaklık programı</b>	Fırın sıcaklığı artışı 60 °C'den (1 dak tutulur) 325 °C'ye 10 °C/dak artışla (10 dak tutulur)
<b>Analiz süresi</b>	37,5 dak
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	1 µL (bölmesiz)
<b>Taşıyıcı Gaz</b>	Helyum 1 mL/dak
<b>MSD geçiş sıcaklığı</b>	290 °C
<b>Çözücü gecikme süresi</b>	5,90 dak
<b>Kütle aralığı</b>	50-650 dalton

### 3.9.2. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizler

Her bir doku ve plazma örneğinin LC-qTOF-MS ile metabolomik analizi (A) %0,1 FA içeren su ile (B) %0,1 FA içeren asetonitril hareketli fazları kullanılarak oluşturulan gradient elüsyonla (Tablo 3.2.) 0,25 mL/dak akış hızında ve C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon kullanılarak 25 dak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. qTOF-MS ile hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modunda çalışılmıştır (Tablo 3.3.). Piklerin tanımlanması amacıyla QC örneklerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak MS/MS spektrumları elde edilmiştir.

**Tablo 3.2.** Metabolomik analizler için gradient elüsyon koşulları.

<b>Zaman (dak)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	90	10
1	90	10
14	10	90
15	10	90
20	90	10
25	90	10

**Tablo 3.3.** Optimize edilmiş LC-qTOF-MS cihaz parametreleri.

<b>Pozitif ve Negatif İyonizasyon</b>	
<b>Kütle aralığı</b>	100-1700 amu
<b>Tarama hızı (spektrum/s)</b>	2
<b>Sprey voltajı (V)</b>	3500
<b>Skimmer voltajı (V)</b>	65
<b>Gaz sıcaklığı (°C)</b>	300
<b>Gaz akışı (L/dak)</b>	8
<b>Nebulizer (psig)</b>	35
<b>Parçalayıcı (V)</b>	175

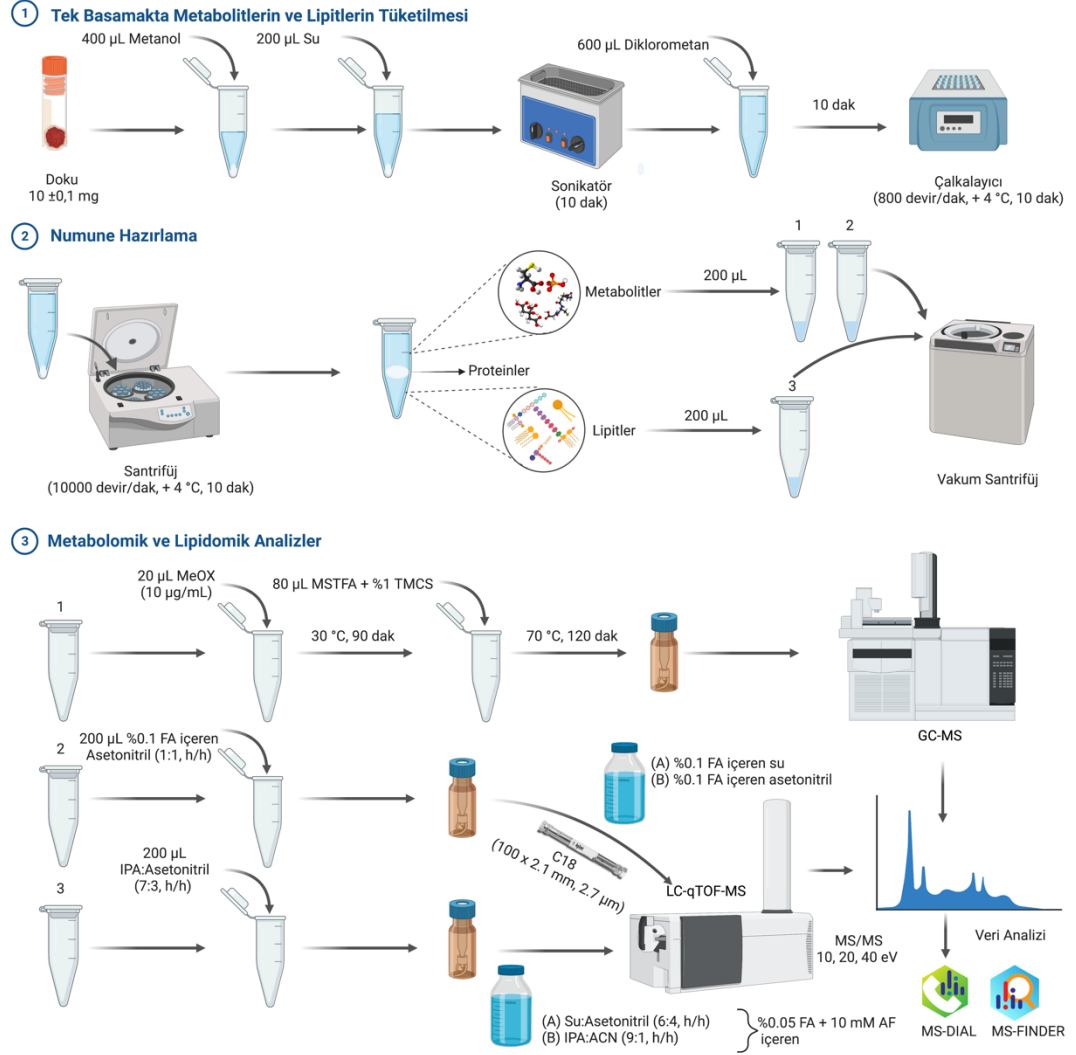
### 3.9.3. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizler

Her bir doku ve plazma örneğinin LC-qTOF-MS ile lipidomik analizi (A) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren su:asetonitril (6:4, v/v) ve (B) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren içeren IPA:asetonitril (9:1, v/v) hareketli fazları ile gradient elüsyonla (Tablo 3.4.) 0,25 mL/dak akış hızında ve C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon kullanılarak 26 dak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 60 °C, enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. qTOF-MS ile negatif ve pozitif iyonizasyon modunda çalışılmıştır (Tablo 3.3.) Piklerin tanımlanması amacıyla QC örneklerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak MS/MS spektrumları elde edilmiştir.

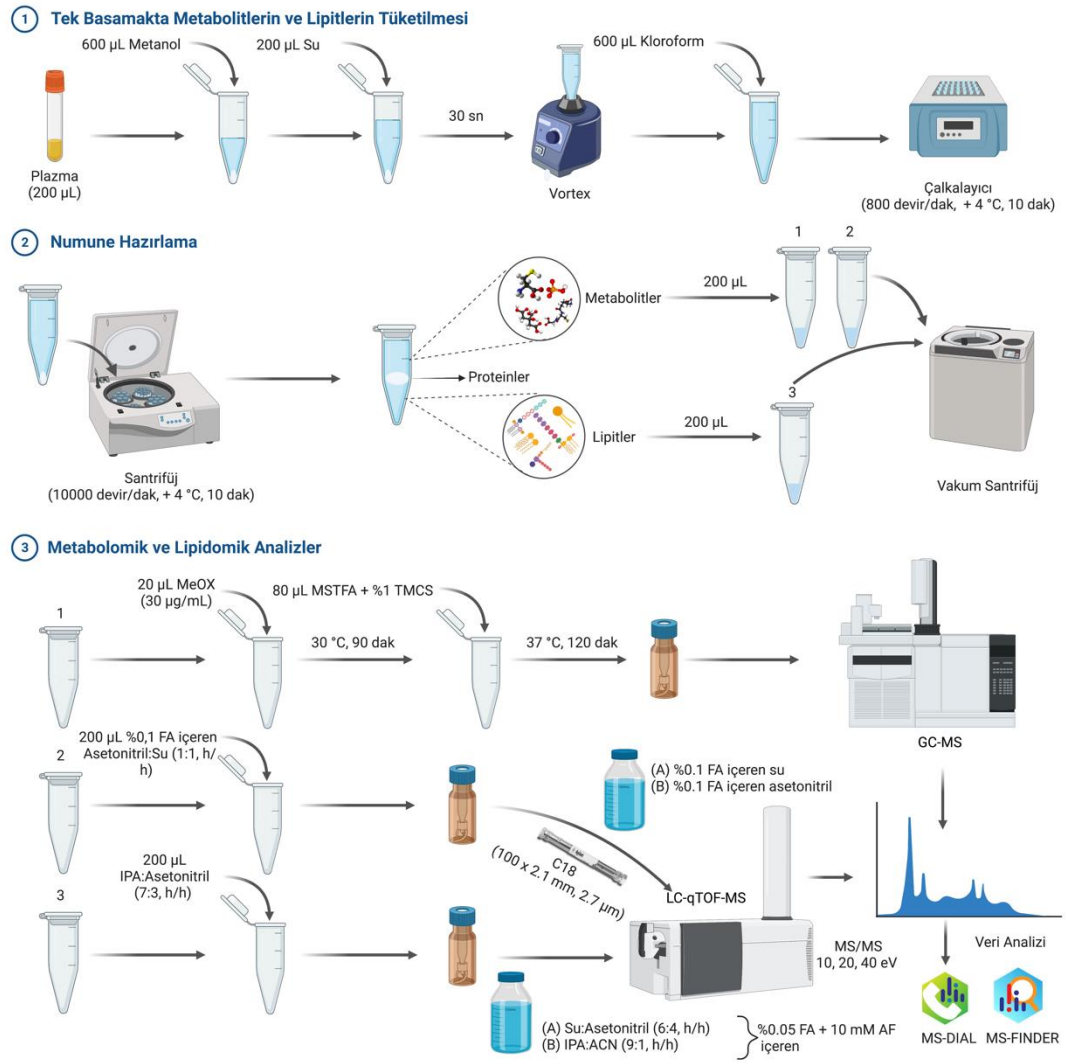
**Tablo 3.4.** Lipidomik analizler için gradient elüsyon koşulları.

Zaman (dak)	%A	%B
0	65	35
1	65	35
5	45	55
10	25	75
15	5	95
17	5	95
20	65	35
26	65	35

Doku örnekleri ve plazma örnekleri ile optimize edilmiş koşullar altında yapılan deneysel çalışmaların özeti Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Doku örnekleri için optimize edilmiş deneysel koşullar (91).



Şekil 3.2. Plazma örnekleri için optimize edilmiş deneysel koşullar (91).

### 3.10. Veri Analizi

GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerinden elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL (ver. 4.60) yazılımı kullanılarak ayrıştırılmış, pik alıkonma zamanları düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. GC-MS analizlerinden elde edilen veri matrisleri Excel çalışma dosyasına aktarılmış ve metabolitlere ait pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm kütüphaneleri kullanılarak tanımlanmıştır. LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlere ait veri matrislerindeki pikler MS1 ve QC örneklerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak elde edilen MS/MS spektrumlarının yazılım üreticisi tarafından sağlanan açık erişimli MS/MS spektral kütüphaneleriyle (pozitif ve negatif, RIKEN)

karşılaştırılması ile tanımlanmıştır. MS-DIAL aracılığıyla açık erişimli kütüphanelerle tanımlanamayan MS/MS spektrumları MS-FINDER yazılımına aktararak metabolomik analizler için HMDB, lipidomik analizler içinse hem HMDB hem de LIPID MAPS veri bankalarında taranmıştır. Böylelikle MS-DIAL ile tanımlanamayan bazı piklerin tanımlanması sağlanmıştır.

Hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS analizlerinden elde edilen veri matrisleri LOESS algoritması kullanılarak QC örneklerine göre normalize edilmiştir. Örneklere ait analiz sırası bilgileri yazılıma doğru bir şekilde girilmiş, ardından normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve böylelikle numune hazırlama ve analizlerden gelebilecek varyasyonlar asgariye indirilmiştir. Verilerdeki eksik değerler metabolit veya lipit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Veri matrisinde %50'den fazla eksik değer içeren, QC örneklerinde %30'dan büyük BSS değerine sahip olan ve hareketli faz içeriğinde tanımlanan metabolit ve lipitler veri matrisinden atılmıştır (247, 248).

Veri ön işlemenin ardından doku ve plazma örnekleri için ayrı ayrı olmak üzere metabolomik ve lipidomik analizlerden elde edilen veri matrisleri birleştirilmiş ve SIMCA yazılımına aktararak PCA, PLS-DA, OPLS-DA çok değişkenli istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirilmiş ve grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur. PCA grafikleri veri setinde herhangi bir sistemik hata ve aykırı bir veri olup olmadığını görselleştirmek için oluşturulmuştur. PLS-DA grafikleri tüm veri gruplarının OPLS-DA grafikleri ise ikili veri gruplarının farklılaşmasını görselleştirmek için oluşturulmuştur. Böylelikle veriler yorumlanabilir hale getirilmiş ve daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. Öte yandan PLS-DA ve OPLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in projection) grafiklerinden yararlanılmıştır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit veya lipit ayırımında en büyük etkiye sahip metabolit veya lipit olarak belirlenmiştir. VIP grafikleri ile önemli olan metabolitlerin ve lipitlerin bulunmasının ardından hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığını bulmak amacıyla OPLS-DA grafikleri için regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayı (coefficient) grafiklerinden yararlanılmıştır.

Kontrol grubuna karşı hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitler ve lipitler t-testi ile belirlenmiş ve gruplara ait ortalama ve

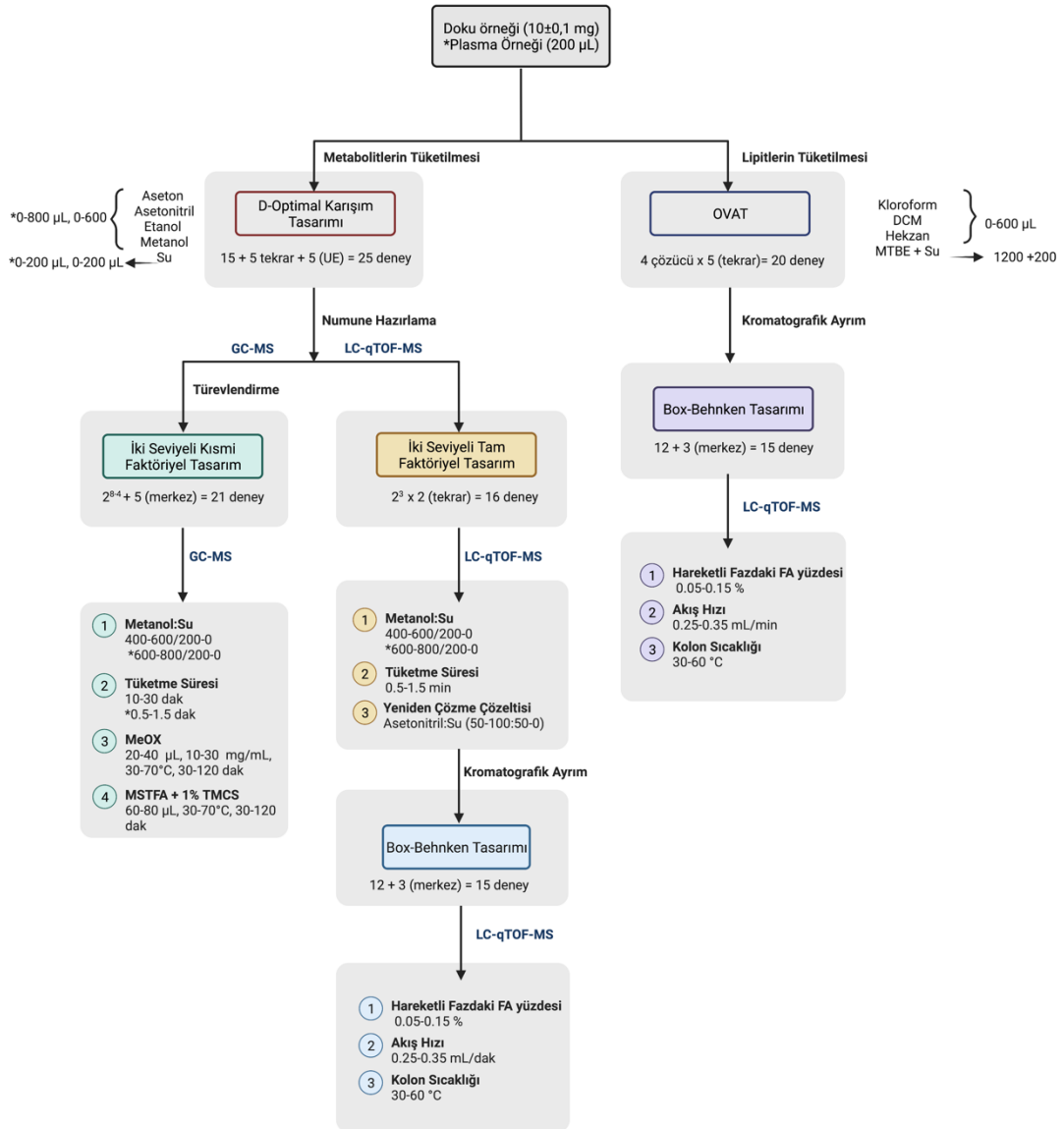


standart hata değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, doku ve plazma örnekleri için ayrı ayrı olmak üzere metabolomik ve lipidomik analizlerden elde edilen veri setleri birleştirilerek Metaboanalyst platformuna aktarılmış ve potansiyel biyobelirteçlerin GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar için ayırt edici gücü (kontrol grubuna karşı) çok değişkenli ROC eğrisi analizleri ile incelenmiştir. Son olarak doku ve plazma örnekleri için istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitler ve lipitler eş zamanlı olarak MetaboAnalyst platformuna aktarılmış ve yolak analizleri yapılmıştır. Böylelikle doku ve plazma örnekleri için eş zamanlı olarak tümör fenotipleriyle en fazla değişim gösteren ortak yolaklar bulunmuştur.

### **3.11. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin DoE ile Optimizasyonu**

Doku ve plazma örneklerinden gerçekteştirilen metabolomik ve lipidomik analizleri etkileyebilecek çok sayıda faktör DoE stratejileri ile izlenmiş ve optimize edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarına ait şematik gösterim şekil 3.3'te gösterilmiştir.

### Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin DOE ile Optimizasyonu



Şekil 3.3. DoE ile yapılan optimizasyon çalışmalarına ait şematik gösterim.

### 3.12. Optimizasyon Çalışmaları

#### 3.12.1. Doku Örneklerinden DoE ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Derin dondurucuda (-80 °C) saklanan tüm doku örnekleri (n=72) hücrel aktivitenin başlamaması için sürekli sıvı azot ikame edilen havan içerisinde dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen her bir doku örneğinden eşit miktarlarda

(20±0,1 mg) tartılmış ve falkon tüpe (sıvı azot içerisinde) aktararak doku havuzu oluşturulmuştur. Oluşturulan doku havuzu tekrar havan içerisinde alınarak sıvı azot varlığında bir kez daha dövülmüş ve bir spatül yardımıyla örneklerin karışması sağlanmıştır. Aşağıda detayları verilen her bir deneysel tasarım planı için bu doku havuzu kullanılmış ve 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine her bir deney için doku havuzundan 10±0,1'er mg örnek tartılmıştır. Doku örneklerinin yer aldığı her bir santrifüj tüpüne iç standart olarak 1 µg/mL miristik-d<sub>27</sub> asit ve 1 µg/mL DL-fenilalanin-β-<sup>13</sup>C eklenmiştir. Sonrasında deneysel tasarımlarda belirtilen koşullar altında örnekler hazırlanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### **Metabolit Tüketme Basamağının Optimizasyonu**

Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesinde en yüksek verimi sağlayan çözücü/çözücü karışımını belirlemek için beş farklı çözücünün etkisi (aseton, asetonitril, etanol, metanol ve su) Design Expert yazılımı ile oluşturulan D-optimal karışım tasarımı ile incelenmiştir. Analizler 15 model, 5 uyum eksikliği ve 5 tekrar noktası olmak üzere toplam 25 deneyden oluşan D-optimal karışım tasarım planına göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1.). Deneysel tasarımdaki 25 deney için doku havuzundan 10±0,1'er mg örnek yirmibeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve her bir örneğin üzerine belirlenen hacimlerde çözücü/çözücüler eklenerek 25 adet örnek hazırlanmıştır. Asetonitril, aseton, etanol ve metanol çözücülerinin hacim (seviye) değerleri 0-600 µL aralığında, suyun ise 0-200 µL aralığında belirlenmiştir. Proteinleri çöktürme gücü olmaması nedeniyle tasarım planında suyun seviye değeri diğer çözücülere göre daha düşük tutulmuştur. Çözücü ilavesinin ardından metabolitlerin ve lipidlerin hücre dışına salınımları için örnekler buzlu su doldurulmuş ultrasonik banyoda 30 dak sonikasyona bırakılmış ve oda sıcaklığına getirildikten sonra +4 °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında hazırlanan 25 örnekten iki farklı santrifüj tüpüne hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS analizleri için ayrı ayrı 200'er µL aktarılmış ve vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Uçurulan örnekler türevlendirildikten sonra GC-MS ve 200 µL %0,1 FA içeren su:%0,1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) karışımı ile yeniden çözüldükten sonra ise LC-qTOF-MS ile Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda analiz edilmiştir.

### **Lipit Tüketme Basamağının Optimizasyonu (OVAT)**

Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesine benzer şekilde lipitlerin tüketilmesinde de en yüksek verimi sağlayan çözücü/çözücü karışımını belirlemek için 4 farklı apolar organik çözücünün etkisi (diklorometan, hegzan, kloroform, MTBE) Design Expert programı ile oluşturulan D-optimal karışım tasarımı kullanılarak araştırılmak istenmiştir. Ancak belirlenen optimize koşullarda (400 µL metanol ve 200 µl su karışımı) doku örneklerinden tüketilen metabolitlerin üzerine, lipitleri tüketme verimliliğini incelemek için oluşturulan D-optimal karışım tasarım planına göre eklenen diklorometan, hegzan, kloroform, MTBE çözücülerin oluşturduğu bazı çözücü kombinasyonlarının polarite farkı meydana getiremediği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak metabolitlerin ve lipitlerin aynı örnekten eş zamanlı olarak tüketilmesi için gereken üç fazlı çözücü sistemi deneysel tasarım yaklaşımı ile oluşturulamamıştır. Bu nedenle lipitlerin yüksek verimde tüketilmesi için 4 farklı apolar organik çözücünün etkisi OVAT yaklaşımı ile incelenmiştir. Analizler beş tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda doku havuzundan  $10 \pm 0,1$  mg örnek yirmi farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler metabolitler için belirlenen optimize edilmiş koşullarda (400 µL metanol ve 200 µL su karışımı) tüketilmiştir. Sonrasında metabolitlerin ve lipitlerin hücre dışına salımları için örnekler buzlu su doldurulmuş ultrasonik banyoda 10 dak sonikasyona bırakılmıştır. Her bir çözücünün lipitlerin tüketilmesine olan etkilerini incelemek için eklenmesi gereken kloroform, diklorometan ve hegzan hacmi 600 µL olarak belirlenmiştir. MTBE ile lipitlerin ikinci bir faz oluşturularak tüketilmesi içinse örneklere 1200 µL MTBE ve ilave 200 µL su eklenmiştir. Ardından örnekler buz dolu kap içerisinde 800 devir/dak'da 10 dak boyunca çalkalandıktan sonra +4 °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve hem metabolitlerin hem de lipitlerin eş zamanlı analizine olanak veren üç fazlı bir çözelti karışımı oluşturulmuştur. Lipitleri içeren fazlardan 200'er µL alınmış ve santrifüj tüplerine aktararak kuruluğa kadar uçurulmuştur. Ardından örnekler 200 µL IPA:asetonitril (7:3, h/h) karışımı ile yeniden çözülmüş ve LC-qTOF-MS ile Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda analiz edilmiştir.

### **GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu**

Doku örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin tüketme ve türevlendirme basamağına etkisi olabilecek faktörler iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir. Bu bağlamda metanol-su hacim oranı ile tüketme süresi, MeOX derişimi, hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile MSTFA + %1 TMCS hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresinin GC-MS tabanlı metabolomik analizlere olan etkisini değerlendirmek için 21 deneylik iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım planı ( $2^{8-4}=16$  model ve 5 merkez nokta) oluşturulmuştur (Tablo 4.3.). Tasarımdaki 21 deney için doku havuzundan  $10\pm 0,1$  mg örnek yirmibir farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve her bir örnek deneysel tasarım planına göre farklı metanol-su hacim oranları ile tüketilmiştir. Metanol hacmi için seviye değerleri 400-600  $\mu$ L aralığında belirlenmiş ve gerekmesi halinde son hacimler su eklenerek 600  $\mu$ L'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüketme süresinin analiz sonuçlarına olan etkisini incelemek için deneysel tasarım planına göre örnekler buzlu su doldurulmuş ultrasonik banyoda 10, 20 ve 30 dak olmak üzere farklı sürelerde sonikasyona bırakılmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örnekler  $+4$  °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve ardından 200'er  $\mu$ L örnek kuruluğa kadar uçurulmuştur. Deneysel tasarım planında örneklere eklenen MeOX derişimi, miktarı, inkübasyon sıcaklığı ve süresine ait seviye değerleri sırasıyla 10-30 mg/mL, 20-40  $\mu$ L, 30-70 °C, 30-120 dak olarak belirlenmiştir. Örneklerin türevlendirilmesi için eklenmesi gereken MSTFA + %1 TMCS hacmi son hacim 100  $\mu$ L olacak şekilde ayarlanmıştır. MSTFA + %1 TMCS inkübasyon sıcaklığı ve süresi ise sırasıyla 30-70 °C ve 30-120 dak olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım planına göre belirlenen koşullarda tüketilen ve türevlendirilen örnekler Bölüm 3.12.3'te belirtilen koşullarda GC-MS ile analiz edilmiştir

### **LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağının Optimizasyonu**

Doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına etkisi olabilecek kritik faktörler (metanol-su hacim oranı, tüketme süresi ve uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşimi) Design Expert programı ile oluşturulan iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile

değerlendirilmiştir (Tablo 4.5.). Analizler 8 model noktası ve 8 tekrar noktası içeren toplam 16 deneyden ( $2^3 \times 2=16$ ) oluşan deneysel tasarım planına göre gerçekleştirilmiştir. Tasarımdaki 16 deney için doku havuzundan  $10\pm 0,1$  mg örnek onaltı farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve her bir örnek deneysel tasarım planına göre farklı metanol-su hacim oranları ile tüketilmiştir. Metanol hacmi için seviye değerleri 400-600  $\mu\text{L}$  aralığında belirlenmiş ve gerekmesi halinde son hacimler su eklenerek 600  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüketme süresinin analiz sonuçlarına olan etkisini incelemek için deneysel tasarım planına göre örnekler buzlu su doldurulmuş ultrasonik banyoda 10 ve 30 dak olmak üzere farklı sürelerde sonikasyona bırakılmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örnekler  $+4$  °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve 200'er  $\mu\text{L}$  örnek kuruluğa kadar uçurulmuştur. Uçurulan örnekler deneysel tasarım planındaki seviye değerlerine göre (en düşük %50 en yüksek %100) %0,1 FA içeren asetonitril ile yeniden çözülmüştür. Gerekmesi halinde son hacim %0,1 FA içeren su ile 200  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Örnekler Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

### **LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu**

LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik ayırımını etkilediği bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Design Expert programı ile oluşturulan Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir (Tablo 4.7.). Analizler 12 model ve 3 merkez nokta olmak üzere toplam 15 deneyden oluşan tasarım planına ( $2 \times 3 (3-1) + 3=15$ ) göre gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesine ait seviye değerleri 0,25-0,35 mL/dak, 30-60 °C ve %0,05-0,15 olarak belirlenmiştir. Tasarımdaki 15 deney için doku havuzundan  $10\pm 0,1$  mg örnek onbeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler sırasıyla Bölüm 3.7.1. ve Bölüm 3.7.3.'teki optimize edilmiş koşullarda tüketilip hazırlandıktan sonra Bölüm 3.12.3'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

## **LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu**

LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik koşullarının optimizasyonuna benzer şekilde lipidomik analizler için de kromatografik ayırımı etkilediği bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Design Expert programı ile oluşturulan 12 model ve 3 merkez nokta içeren Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir (Tablo 4.9.). Faktörlere ait seviye değerleri LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmaya benzer şekilde belirlenmiştir. Tasarımdaki 15 deney için doku havuzundan  $10 \pm 0,1$  mg örnek onbeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler Bölüm 3.7.1. ve 3.7.3.'teki optimize edilmiş koşullarda tüketilip hazırlandıktan sonra Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

### **3.12.2. Plazma Örneklerinden DoE ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları**

Derin dondurucuda ( $-20$  °C) saklanan tüm plazma örnekleri ( $n=72$ ) oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslenmiş ve her bir örnekten  $400$ 'er  $\mu\text{L}$  alınarak  $50$  mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Böylelikle plazma örneklerinden yapılan optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere plazma havuzu oluşturulmuştur. Plazma havuzuna iç standart olarak miristik- $d_{27}$  asit ve  $1$   $\mu\text{g/mL}$  DL-fenilalanin- $\beta$ - $^{13}\text{C}$  son hacim  $1$   $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde eklenmiştir. Aşağıda detayları verilen her bir deneysel tasarım planı için plazma havuzu kullanılmış ve  $1,5$  mL'lik santrifüj tüplerine her bir deney için plazma havuzundan  $200$ 'er  $\mu\text{L}$  örnek aktarılmıştır. Sonrasında deneysel tasarımlarda belirtilen koşullar ile örnekler hazırlanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

### **Metabolit Tüketme Basamağının Optimizasyonu**

Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesinde en yüksek verimi sağlayan çözücü/çözücü karışımını belirlemek için beş farklı çözücünün etkisi (aseton, asetonitril, etanol, metanol ve su) Design Expert programı ile oluşturulan D-optimal karışım tasarımı ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.13.). Analizler 15 model, 5 uyum

eksikliği ve 5 tekrar noktası olmak üzere toplam 25 deneyden oluşan D-optimal karışım tasarım planına göre gerçekleştirilmiştir. Tasarımdaki 25 deney için plazma havuzundan 200'er  $\mu\text{L}$  örnek yirmibeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve deneysel tasarım planına göre her bir örneğin üzerine belirlenen hacimlerde çözücü/çözücüler eklenerek 25 adet örnek hazırlanmıştır. Asetonitril, aseton, etanol ve metanol çözücülerinin seviye değerleri 0-800  $\mu\text{L}$  aralığında, suyun ise 0-200  $\mu\text{L}$  aralığında belirlenmiştir. Proteinleri çöktürememesi nedeniyle D-optimal karışım tasarımında suyun seviye değeri diğer çözücülere göre daha düşük tutulmuştur. Çözücü ilavesinin ardından örnekler 1 dak boyunca vortekslenmiş ve sonrasında +4 °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında 25 ayrı örnekten iki farklı santrifüj tüpüne hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS analizleri için ayrı ayrı 200'er  $\mu\text{L}$  aktarılmış ve örnekler vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Uçurulan örnekler türevlendirildikten sonra GC-MS ve 200  $\mu\text{L}$  %0,1 FA içeren su:%0,1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) ile yeniden çözüldükten sonra ise LC-qTOF-MS ile Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda analiz edilmiştir.

### **Lipit Tüketme Basamağının Optimizasyonu (OVAT)**

Lipitlerin tüketileceği üç fazlı çözücü sistemi doku örneklerine benzer şekilde plazma örnekleri için de deneysel tasarım yaklaşımı ile oluşturulamamıştır. Bu nedenle diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE organik çözücülerinin plazma örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkileri doku örneklerinde olduğu (Bölüm 3.12.1) gibi OVAT yaklaşımı ile incelenmiştir. Analizler beş tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda plazma havuzundan 200'er  $\mu\text{L}$  örnek yirmi farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler metabolitler için belirlenen optimize edilmiş koşullarda (600  $\mu\text{L}$  metanol ve 200  $\mu\text{L}$  su) tüketilmiştir. Ardından örnekler 1 dak boyunca vortekslenmiştir. Kloroform, diklorometan ve hegzan çözücülerinin lipitlerin tüketilmesine olan etkilerini incelemek için eklenmesi gereken çözücü hacmi 600  $\mu\text{L}$  olarak belirlenmiştir. MTBE ile lipitlerin ikinci bir faz oluşturularak tüketilmesi içinse örneklere 1200  $\mu\text{L}$  MTBE ve ilave 200  $\mu\text{L}$  su eklenmiştir. Örnekler buz dolu kap içerisinde 800 devir/dak'da 10 dak boyunca çalkalandıktan sonra +4 °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve hem metabolitlerin hem de lipitlerin eş zamanlı analizine olanak veren üç fazlı bir çözelti karışımı



oluşturulmuştur. Lipitleri içeren fazlardan 200'er µL alınmış ve santrifüj tüplerine aktararak kuruluğa kadar uçurulmuştur. Ardından örnekler 200 µL IPA:asetonitril (7:3, h/h) karışımı ile yeniden çözülmüş ve LC-qTOF-MS ile Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda analiz edilmiştir.

### **GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu**

Plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin tüketme ve türevlendirme basamağına etki eden faktörlerin etkisi iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.15.). Bu bağlamda doku örneklerinde olduğu (Bölüm 3.12.1) gibi plazma örneklerinden de 8 faktörün türevlendirme basamağına olan etkisini değerlendirmek için Design Expert programı aracılığıyla 16 model noktası ( $2^{8-4}=16$ ) ve 5 merkez nokta içeren toplam 21 deneylik iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım planı oluşturulmuştur. Tasarımdaki 21 deney için plazma havuzundan 200'er µL örnek yirmibir farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve her bir örnek deneysel tasarım planına göre farklı metanol-su hacim oranları ile tüketilmiştir. Metanol hacmi için seviye değerleri 600-800 µL aralığında belirlenmiş ve gerekmesi halinde son hacimler su eklenerek 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüketme süresinin analiz sonuçlarına olan etkisini incelemek için deneysel tasarım planına göre örnekler 0,5; 1 ve 1,5 dak olmak üzere farklı sürelerde vortekslenmiştir. Ardından örnekler +4 °C'de 10000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve 200'er µL örnek kuruluğa kadar uçurulmuştur. Uçurulan örnekler deneysel tasarım planına göre türevlendirilmiştir. Türevlendirme için MeOX derişimi, hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile MSTFA + %1 TMCS hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresine ait seviye değerleri doku örnekleri (Bölüm 3.12.1) için oluşturulan tasarım planındaki gibi belirlenmiştir. Deneysel tasarım planına göre belirlenen koşullarda tüketilen ve türevlendirilen örnekler Bölüm 3.12.3'te belirtilen koşullarda GC-MS ile analiz edilmiştir

### **LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağının Optimizasyonu**

Doku örneklerine benzer şekilde plazma örneklerinden de LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına etkisi olabilecek 3 faktörün etkisi (metanol-su hacim oranı, tüketme süresi ve uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşimi) iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.17.). Tasarımdaki 16 deney ( $2^3 \times 2=16$ ) için plazma havuzundan 200'er  $\mu\text{L}$  örnek onaltı farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve her bir örnek deneysel tasarım planına göre farklı metanol-su hacim oranları ile tüketilmiştir. Metanol hacmi için seviye değerleri 600-800  $\mu\text{L}$  aralığında belirlenmiş ve gerekmesi halinde son hacimler su eklenerek 1000  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüketme süresinin analiz sonuçlarına olan etkisini incelemek için deneysel tasarım planına göre örnekler 0,5; 1 ve 1,5 dak olmak üzere farklı sürelerde vortekslenmiştir. Devamında örnekler +4 °C'de 10 000 devir/dak'da 10 dak boyunca santrifüjlenmiş ve 200'er  $\mu\text{L}$  örnek kuruluğa kadar uçurulmuştur. Uçurulan örnekler %0,1 FA içeren asetonitril ile deneysel tasarım planındaki seviye değerlerine göre (en düşük %50 en yüksek %100) yeniden çözülmüştür. Gerekmesi halinde son hacim %0,1 FA içeren su ile 200  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Ardından örnekler Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

### **LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu**

Doku örneklerine benzer şekilde plazma örnekleri ile yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik ayırımını etkilediği bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Design Expert programı ile oluşturulan 12 model ve 3 merkez nokta içeren Box-Behnken tasarımı ( $2 \times 3 (3-1) + 3 =15$ ) ile optimize edilmiştir (Tablo 4.19.). Hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesine ait seviye değerleri doku örnekleri için oluşturulan tasarıma (Bölüm 3.12.1) benzer şekilde belirlenmiştir. Tasarımdaki 15 deney için plazma havuzundan 200'er  $\mu\text{L}$  örnek onbeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler sırasıyla Bölüm 3.8.1 ve Bölüm 3.8.3'teki optimize edilmiş koşullarda

tüketilip hazırlandıktan sonra Bölüm 3.12.3'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

### **LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu**

Doku örneklerine benzer şekilde LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik ayırımını etkilediği bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Design Expert programı ile oluşturulan 12 model ve 3 merkez nokta içeren Box-Behnken tasarımı ( $2 \times 3 (3-1) + 3 = 15$ ) ile optimize edilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri doku örnekleri için oluşturulan deneysel tasarıma (Bölüm 3.12.1) benzer şekilde belirlenmiştir. Tasarımdaki 15 deney için plazma havuzundan 200'er  $\mu\text{L}$  örnek onbeş farklı santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve örnekler sırasıyla Bölüm 3.8.1. ve Bölüm 3.8.3.'teki optimize edilmiş koşullarda tüketilip hazırlandıktan sonra Bölüm 3.12.3.'te belirtilen koşullarda LC-qTOF-MS ile analiz edilmiştir.

#### **3.12.3. Enstrümental Analizler**

Doku (Bölüm 3.12.1.) plazma (Bölüm 3.12.2.) örneklerinden metabolomik ve lipidomik analiz basamaklarının optimize edilmesine yönelik yapılan çalışmalarda deneysel tasarım planlarına göre hazırlanan her bir örnek aşağıda belirtilen koşullarda analiz edilmiştir.

#### **GC-MS Temelli Metabolomik Analizler**

İki seviyeli kısmi faktöriyel deneysel tasarım planlarına göre hazırlanan ve türevlendirilen her bir doku ve plazma örneği DB-5MS (30 m +10 m ön kolon x 0,25 mm iç çap ve 0,25  $\mu\text{m}$  film kalınlığı) kolon kullanılarak GC-MS ile analiz edilmiştir. Enjeksiyonlar bölmesiz olarak gerçekleştirilmiş ve enjeksiyon hacmi 1  $\mu\text{L}$  olarak belirlenmiştir. Analizler optimize edilmiş GC-MS koşullarında (Bkz. Tablo 3.1.) gerçekleştirilmiştir.

### LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizler

Deneysel tasarım planlarına göre hazırlanan her bir doku ve plazma örneğinin (Bölüm 3.12.1. ve Bölüm 3.12.2.) LC-qTOF-MS ile metabolomik analizleri (A) %0,1 FA içeren su ve (B) %0,1 FA içeren asetonitril hareketli fazları ile gradient elüsyonla (Bkz. Tablo 3.2.) 0,3 mL/dak akış hızında C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon kullanılarak 25 dak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 35 °C, enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. qTOF-MS ile hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modunda çalışılmıştır (Bkz. Tablo 3.3.). Bölüm 3.12.1. ve Bölüm 3.12.2.'de doku ve plazma örneklerinden Box-Behnken tasarımı ile metabolomik analizlerin kromatografik koşullarının optimizasyonuna yönelik gerçekleştirilen analizlerde kromatografik koşullar tasarım planındaki gibi ayarlanmış olup diğer tüm analiz şartları yukarıdaki gibi belirlenmiştir.

### LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizler

OVAT yaklaşımına göre hazırlanan ve Bölüm 3.12.1. ve Bölüm 3.12.2.'de ayrıntıları sunulan her bir doku ve plazma örneğinin LC-qTOF-MS ile lipidomik analizi (A) %0,1 FA ve 10 mM AF içeren içeren su:asetonitril (6:4, v/v) ve (B) % 0,1 FA ve 10 mM AF içeren içeren IPA:asetonitril (9:1, v/v) hareketli fazları ile gradient elüsyonla (Tablo 3.4.) 0,3 mL/dak akış hızında C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) kolon kullanılarak 26 dak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 60 °C, enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. qTOF-MS ile hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modunda çalışılmıştır (Bkz. Tablo 3.3.). Bölüm 3.12.1. ve Bölüm 3.12.2.'de doku ve plazma örneklerinden Box-Behnken tasarımı ile lipidomik analizlerin kromatografik koşullarının optimizasyonuna yönelik gerçekleştirilen analizlerde kromatografik koşullar tasarım planındaki gibi ayarlanmış olup diğer tüm analiz şartları yukarıdaki gibi belirlenmiştir.

#### 3.12.4. Veri Analizi

Optimizasyon çalışmalarında deneysel tasarımların oluşturulması için Design Expert programından yararlanılmıştır. Deneysel beklenmeyen varyasyon kaynaklarının riskini en aza indirmek için deneysel tasarımlarda rastgele sıralanmıştır.

Her bir optimizasyon çalışması için toplam pik alanı (TPA) cevap değişkeni olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım planlarına bağlı olarak gerçekleştirilen GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli analizlerinden elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL yazılımı (ver. 4.60) kullanılarak ayrıştırılmış, pik alıkonma zamanları düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşturulan veri matrisleri Excel'e aktarılmış, veriler kontrol edilerek her bir deneysel tasarım planına göre yapılan deneylere ait toplam pik alanı değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda elde edilen cevap değişkenleri her bir deneysel tasarım için Design-Expert yazılımına aktarılmıştır.

Tam ve kesirli faktöriyel tasarımlarda modeli etkileyen istatistiksel olarak anlamlı faktörleri belirlemek için Yarı Normal ve Pareto grafiklerinden yararlanılmıştır. Hesaplanan cevap değişkenlerine bağlı olarak her bir deneysel tasarım için Design-Expert programı tarafından önerilen modellerin geçerliliği ANOVA testi ve uyum istatistikleri ( $R^2$ , tahmini  $R^2$ , düzeltilmiş  $R^2$ , yeterli hassasiyet) ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak geçerli bulunan modeller artıkların normal grafiği ve analiz sırasına göre artıkların grafiği gibi farklı tanı araçları ile değerlendirilerek veri setinin aykırı bir değer içerip içermediği belirlenmiştir. Tasarımda aykırı değer olarak belirlenen örnekler için tekrar analizleri yapılmış ve hataların rastgele olduğu belirlendikten sonra bu örnekler deneysel tasarım planına yeniden dahil edilmiştir.

Hesaplanan cevap değişkenlerine matematiksel dönüşüm uygulanıp uygulanmayacağı Box-Cox grafiği ile kontrol edilmiş ve yazılım tarafından önerilmesi halinde gerekli matematiksel dönüşüm uygulanmıştır.

Metabolitlerin tüketme basamaklarına ait optimize koşullar isteklilik fonksiyonu kriteri ile Design-Expert yazılımı tarafından sağlanan optimizasyon modülü ile belirlenmiştir. GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağına, LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin kromatografik ayırım basamağına ait optimum koşullar tüm faktörlerin etkilerinin eş zamanlı izlendiği model grafikleri ile belirlenmiştir. Yazılım tarafından optimum koşulları belirlemek amacıyla önerilen modellere istatistiksel olarak anlamsız bulunan faktörler için önceki çalışma koşullarına ait rutin veya analiz süresini kısaltmaya yönelik değerler atanmıştır. Doku ve plazma örneklerinden lipitlerin yüksek verimde

tüketilmesine yönelik OVAT yaklaşımı ile yapılan optimizasyon çalışmasında her bir çözücünün etkisi SIMCA yazılımı ile çok değişkenli bir istatistiksel analiz yöntemi olan PLS-DA ile Biplot grafikleri ve çubuk grafikleri ile değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Doku Örneklerine ait Metabolomik ve Lipidomik Analiz Sonuçları

GBM, menenjiyom ve akciğerden beyne metastaz tanısı konan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubundan alınan doku örneklerinin metabolomik ve lipidomik analizleri için analitik yöntemler öncelikle optimize edilmiş ve daha sonra örneklerle uygulanmıştır. Optimizasyon çalışmaları altı basamakta dört farklı deneysel tasarım ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için; (i) metabolitlerin tüketme verimliliğini etkileyen polar (aseton, asetonitril, etanol, metanol ve su) çözücüler deneysel tasarım matrisinin düzensiz olması nedeniyle D-optimal karışım tasarım ile, (ii) lipidlerin metabolitlerle eş zamanlı olarak deneysel tasarımlar ile tüketilememesi nedeniyle lipidlerin tüketme verimliliği üzerinde farklı davranışlar gösteren apolar organik çözücüler (hegzan, kloroform, diklorometan ve MTBE) OVAT yaklaşımı ile, (iii) GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağı için 8 faktörün etkisi iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile, (iv) LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için 3 faktörün etkisi iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile, (v) LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve (vi) lipidomik analizlerin kromatografik koşullarını etkileyen 3 faktörün etkisi ise Box-Behnken tasarımı ile değerlendirilerek faktörlere ait optimum koşullar belirlenmiştir. Deneysel faktörler ve seviye değerleri literatür çalışmasına bağlı olarak belirlenmiş ve cevap değişkeni olarak toplam pik alanı değerleri kullanılmıştır. Deneysel tasarımlarda analiz sonuçları üzerinde anlamlı etkiye sahip olan faktörler istatistiksel analizlerle tespit edilmiş, cevap değişkenine ait aykırı değer kontrolü yapılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir.

#### 4.1.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Tüketme Basamağının Optimizasyonu

Literatürde metabolomik analizlerde sıklıkla kullanılan 5 farklı çözücü olan aseton, asetonitril, etanol, metanol ve suyun doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesine olan etkileri 25 deneyden oluşan D-optimal karışımı tasarımı ile değerlendirilmiştir. Analizler hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS ile gerçekleştirildiği için her iki cihazdan da elde edilen pik alanları toplanmış ve ortak cevap değişkeni olarak kullanılmıştır. Sistemik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak

analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Cevap
	A:Metanol	B:Asetonitril	C:Aseton	D:Etanol	E:Su	TPA
1	0	0	500	0	100	228131567
2*	0	200	200	0	200	229641240
3	0	0	0	600	0	251133947
4*	200	200	0	0	200	244582323
5 <sup>#</sup>	0	0	300	300	0	230911652
6	400	0	0	0	200	271234514
7	600	0	0	0	0	258305819
8 <sup>#</sup>	0	0	0	600	0	246859062
9	300	0	0	300	0	255382115
10	0	600	0	0	0	208198232
11	300	300	0	0	0	234317178
12	0	400	0	0	200	224147952
13	0	300	0	300	0	231064656
14*	150	150	150	150	0	228163250
15	0	0	300	300	0	227051270
16 <sup>#</sup>	0	300	0	300	0	233345462
17 <sup>#</sup>	0	600	0	0	0	201516810
18*	200	0	200	0	200	251435726
19*	200	0	0	200	200	255702908
20	0	0	0	400	200	259122632
21 <sup>#</sup>	0	0	500	0	100	232567824
22	300	0	300	0	0	238233008
23	0	0	400	0	200	235972346
24	0	300	300	0	0	204388402
25	0	0	600	0	0	211952669

\*Uyum eksikliği noktası, <sup>#</sup>Tekrar noktası. TPA: Toplam pik alanı



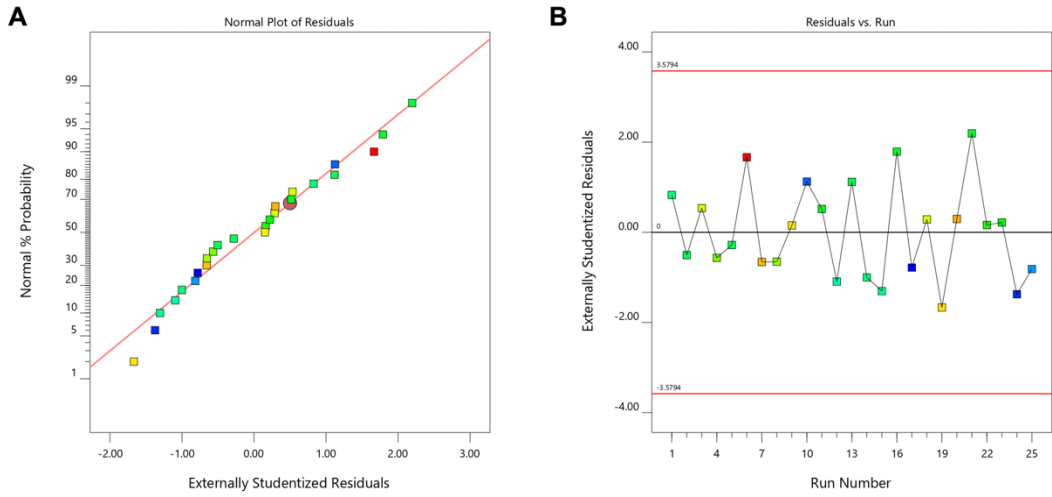
Elde edilen cevaplara bağılı olarak deneysel tasarım için doğrusal bir model önerilmiştir. Önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için oluşturulan D-optimal karışım tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

<b>ANOVA</b>				
<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>SD</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F/p-değeri</b>
<b>Model</b>	$7.350 \times 10^{15}$	4	$1.838 \times 10^{15}$	$106.46/3.5 \times 10^{-13}$
<b>Artık</b>	$3.452 \times 10^{14}$	20	$1.726 \times 10^{13}$	
Uyum Eksikliği	$2.938 \times 10^{14}$	15	$1.959 \times 10^{13}$	1.91/0.2456
Saf Hata	$5.135 \times 10^{13}$	5	$1.027 \times 10^{13}$	
<b>DKT</b>	$7.695 \times 10^{15}$	24		
<b>Uyum İstatistikleri</b>				
<b>SS</b>	$4.155 \times 10^6$	<b>R<sup>2</sup></b>		0.9551
<b>Ortalama</b>	$2.357 \times 10^8$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>		0.9462/0.9317
<b>% BSS</b>	1.76	<b>Yeterli Hassasiyet</b>		32.9387

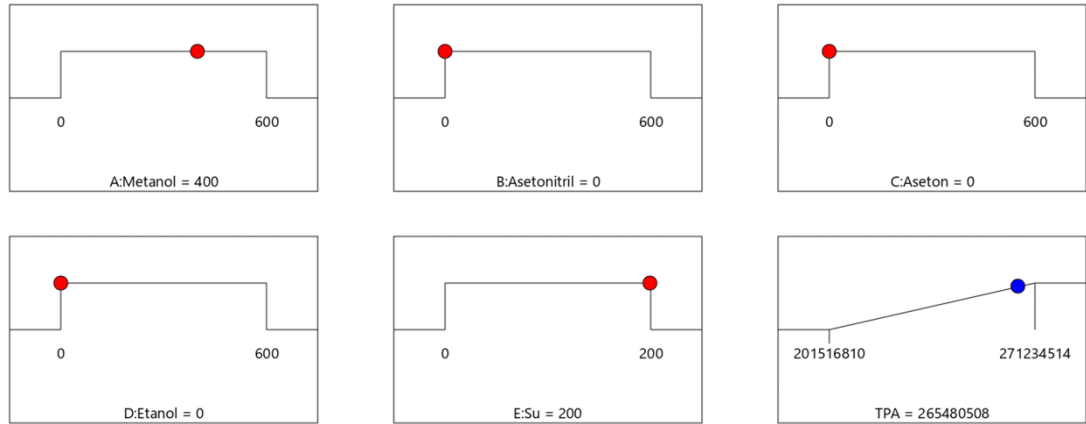
BSS: Bağılı standart sapma, DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi.

Anova ve uyum istatistikleri sonuçlarına göre model geçerli bulunmuş ve modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Doku örnekleri için D-optimal karışım tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

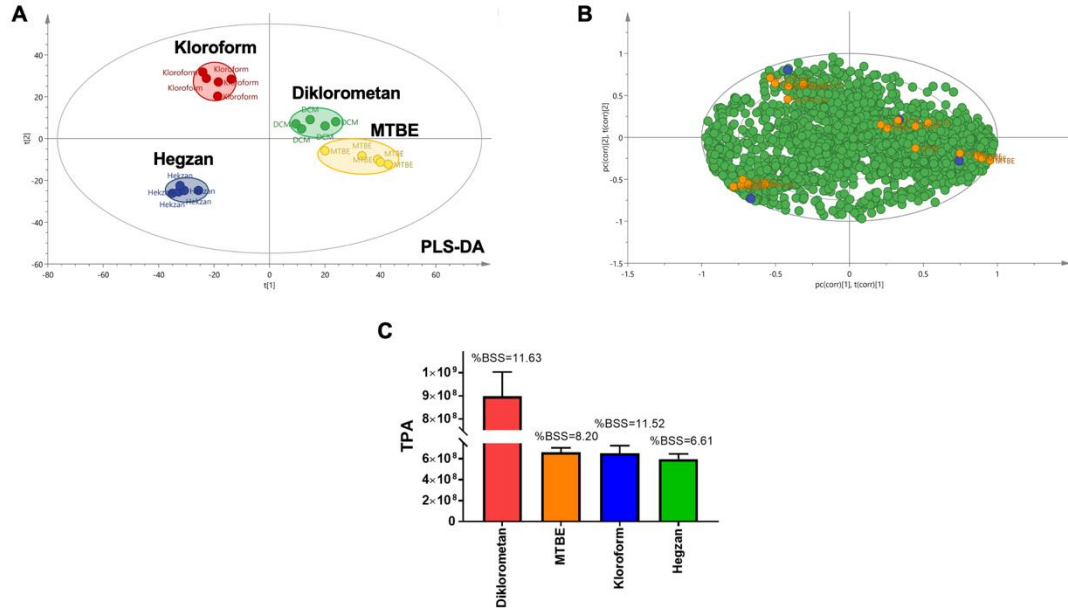
Doku örneklerinden metabolitlerin yüksek verimde tüketilmesi için isteklilik fonksiyonuna dayalı bir kriter kullanılmıştır. En yüksek isteklilik değerine sahip öneri doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesinde optimum çözücü karışımı olarak belirlenmiştir. Buna göre en yüksek isteklilik değeri 0,917 olarak bulunmuş ve elde edilen rampa grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için en yüksek isteklilik değerine sahip optimum çözücü karışımını gösteren rampa grafikleri. TPA, toplam pik alanı.

Farklı polaritelerde olan diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin doku örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkileri OVAT yaklaşımı ile değerlendirilmiş ve çözücülerin verimlilikleri PLS-DA, Biplot ve her bir

çözücüye ait toplam pik alanı değerleri kullanılarak çizilen bar grafikleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.** Diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin doku örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkilerinin incelenmesi. A) PLS-DA grafiği, B) Biplot, C) Bar grafiği.

#### 4.1.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

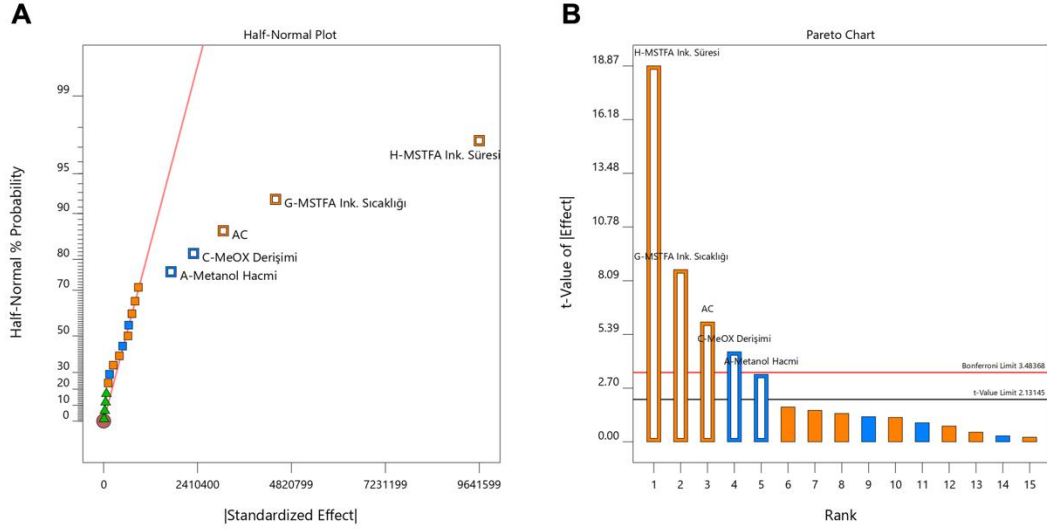
GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağına etkisi olabilecek kritik faktörler olarak belirlenen metanol-su hacim oranı, tüketme süresi, MeOX derişimi, hacmi, inkübasyon sıcaklığı, süresi ve MSTFA + %1 TMCS hacmi, inkübasyon sıcaklığı ve süresi beş merkez nokta içeren iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ( $2^{8-4} + 5 = 21$  deney) ile değerlendirilmiştir. Sistematik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.3.'te verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Faktör 6	Faktör 7	Faktör 8	Cevap
	A:Metanol Hacmi	B:Tüketme Süresi	C:MeOX Derişimi	D:MeOX Hacmi	E:MeOX İnk.Sıcaklığı	F:MeOX İnk.Süresi	G:MSTFA İnk.Sıcaklığı	H:MSTFA İnk. Süresi	TPA
	$\mu\text{L}$	dak	mg/mL	$\mu\text{L}$	$^{\circ}\text{C}$	dak	$^{\circ}\text{C}$	dak	
1	400	30	30	40	30	120	30	30	12058645
2	600	10	30	40	30	30	70	30	18462219
3	600	30	30	20	70	30	30	30	14286013
4	500*	20	20	30	50	75	50	75	21607426
5	500*	20	20	30	50	75	50	75	21293648
6	400	10	10	40	30	120	70	120	31846904
7	400	30	10	20	70	120	30	120	26974102
8	400	10	30	20	70	120	70	30	17528548
9	500*	20	20	30	50	75	50	75	20291115
10	600	10	10	20	70	30	70	120	28200624
11	600	10	30	20	30	120	30	120	23520921
12	400	10	30	40	70	30	30	120	23253830
13	500*	20	20	30	50	75	50	75	21894173
14	600	30	10	40	30	30	30	120	23110944
15	600	30	10	20	30	120	70	30	16603851
16	400	30	10	40	70	30	70	30	23357236
17	500*	20	20	30	50	75	50	75	21010523
18	400	10	10	20	30	30	30	30	20056982
19	600	30	30	40	70	120	70	120	29818651
20	400	30	30	20	30	30	70	120	27876092
21	600	10	10	40	70	120	30	30	15115786

\* Merkez nokta, İnk: İnkübasyon.

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait model seçimi ve istatistiksel olarak anlamlı faktörler Şekil 4.4.'te verilen Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir.



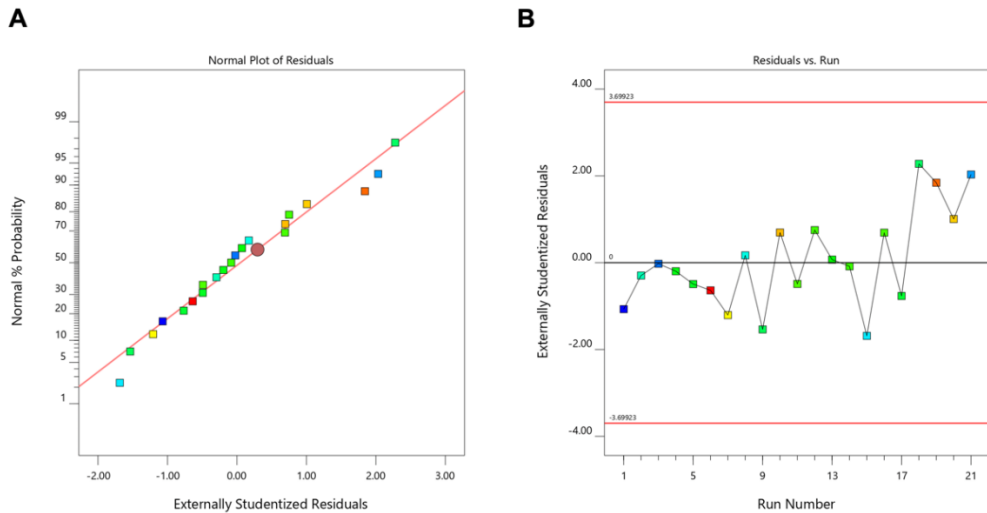
**Şekil 4.4.** Doku örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. A) Yarı-Normal grafik. Mavi kare → negatif etki, turuncu kare → pozitif etki, B) Faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisini gösteren Pareto grafiği. Kırmızı yatay çizgi → Bonferroni limiti, siyah yatay çizgi → t-değeri limiti.

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım için önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmış (Tablo 4.4.) ve modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.5.).

**Tablo 4.4.** Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

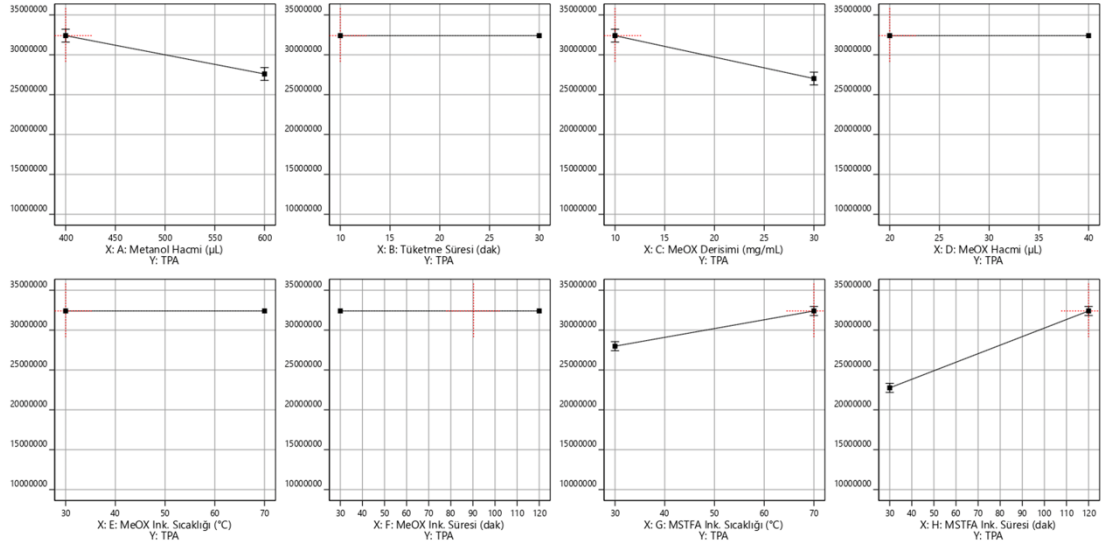
ANOVA				
Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Kareler Ortalaması	F/p-değeri
<b>Model</b>	$5.208 \times 10^{14}$	5	$1.042 \times 10^{14}$	$92.09/1 \times 10^{-10}$
A	$1.196 \times 10^{13}$	1	$1.196 \times 10^{13}$	10.57/0.0054
C	$2.130 \times 10^{13}$	1	$2.130 \times 10^{13}$	18.83/0.0006
G	$7.796 \times 10^{13}$	1	$7.796 \times 10^{13}$	$68.92/5.4 \times 10^{-7}$
H	$3.718 \times 10^{14}$	1	$3.718 \times 10^{14}$	$328.77/1.3 \times 10^{-11}$
AC	$3.774 \times 10^{13}$	1	$3.774 \times 10^{13}$	$33.37/3.7 \times 10^{-5}$
<b>Artık</b>	$1.697 \times 10^{13}$	15	$1.131 \times 10^{12}$	
Uyum Eksikliği	$1.545 \times 10^{13}$	11	$1.404 \times 10^{12}$	3.70/0.1088
Saf Hata	$1.517 \times 10^{12}$	4	$3.792 \times 10^{11}$	
<b>DKT</b>	$5.378 \times 10^{14}$	20		
Uyum İstatistikleri				
<b>SS</b>	$1.063 \times 10^6$	<b>R<sup>2</sup></b>		0.9685
<b>Ortalama</b>	$2.182 \times 10^7$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>		0.9579/0.9312
<b>% BSS</b>	4.87	<b>Yeterli Hassasiyet</b>		34.1900

A: Metanol Hacmi, C: MeOX derişimi, G: MSTFA + %1TMCS inkübasyon sıcaklığı, H: MSTFA + %1TMCS inkübasyon süresi, AC: Metanol hacmi-MeOX derişimi ikili etkileşimi. BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.5.** Doku örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği B) Analiz sırasında göre artıkların grafiği.

Doku örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağına ait optimum koşulları gösteren model grafiğı Şekil 4.6.'da sunulmuştur.



**Şekil 4.6.** Doku örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı.

#### 4.1.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağına Optimizasyonu

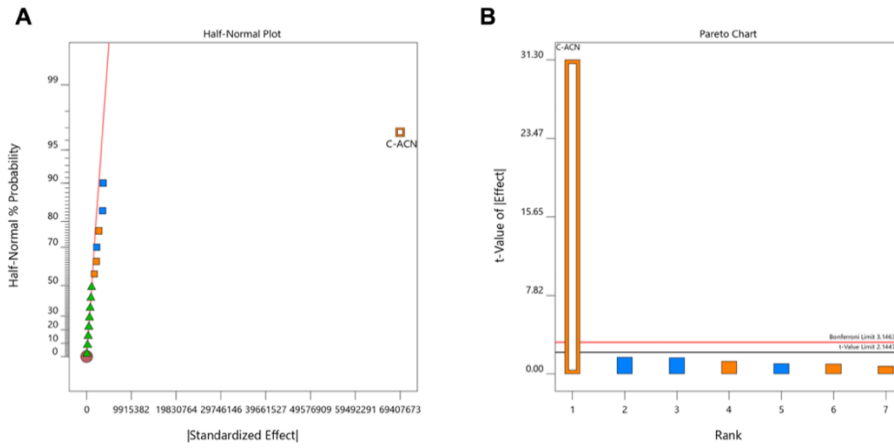
Metanol-su hacim oranı, tüketme süresi ve uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşimi (%ACN) LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyebilecek kritik faktörler olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin etkisi iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile ( $2^3 \times 2 = 16$  deney) değerlendirilmiştir. Sistematik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.5.'te verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A:Metanol Hacmi	B:Tüketme Süresi	C:Asetonitril	TPA
	$\mu\text{L}$	dak	%	
1	400	10	100	304114321
2	600	10	100	297015569
3	400	30	100	294475242
4	400	10	50	230854160
5	600	30	50	219106927
6	400	10	100	299061355
7	400	30	100	289324613
8	600	30	100	298432392
9	400	30	50	230280453
10	400	10	50	231097845
11	400	30	50	228123952
12	600	30	100	291297032
13	600	10	100	296571618
14	600	10	50	225009456
15	600	30	50	227379312
16	600	10	50	223178653

İki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait model seçimi ve istatistiksel olarak anlamlı faktörler Şekil 4.7.'de verilen Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir.





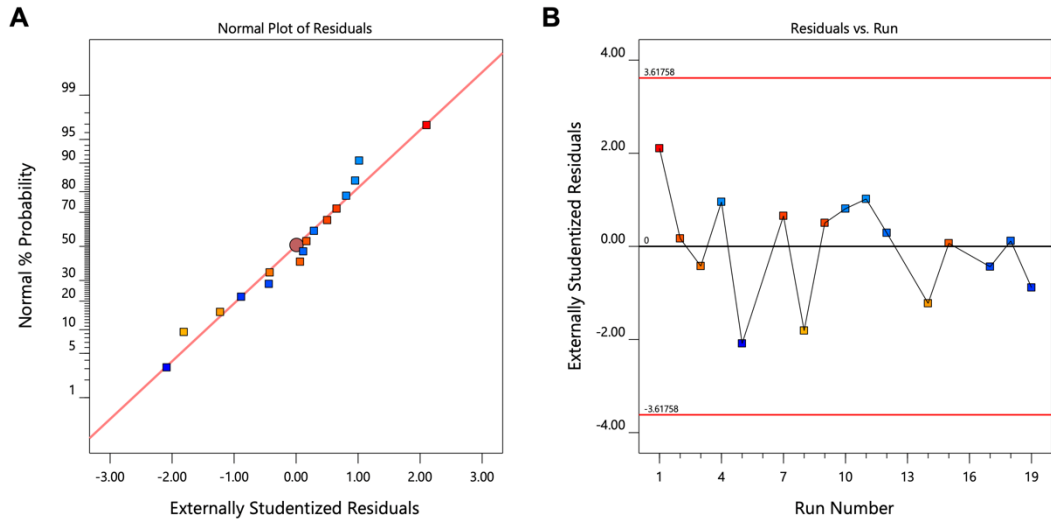
**Şekil 4.7.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. A) Yarı-Normal grafik. Mavi kare → negatif etki, turuncu kare → pozitif etki, B) Faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisini gösteren Pareto grafiği. Kırmızı yatay çizgi → Bonferroni limiti, siyah yatay çizgi → t-değeri limiti.

İki seviyeli tam faktöriyel tasarım için önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmış (Tablo 4.6.) ve modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.8.).

**Tablo 4.6.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistiklerine ait sonuçlar.

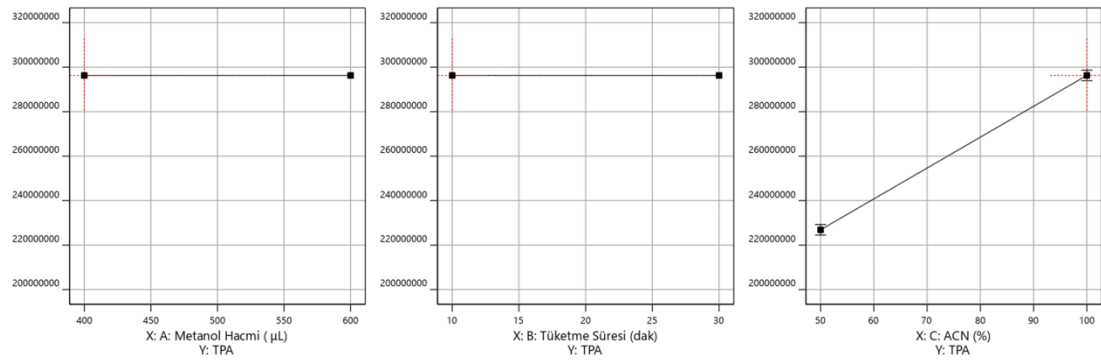
ANOVA				
Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Kareler Ortalaması	F/p-değeri
<b>Model</b>	$1.927 \times 10^{16}$	1	$1.927 \times 10^{16}$	$979.58/2.3 \times 10^{-14}$
C-%ACN	$1.927 \times 10^{16}$	1	$1.927 \times 10^{16}$	$979.58/2.3 \times 10^{-14}$
<b>Artık</b>	$2.754 \times 10^{14}$	14	$1.967 \times 10^{13}$	
Uyum Eksikliği	$1.856 \times 10^{14}$	6	$3.093 \times 10^{13}$	2.75/0.0932
Saf Hata	$8.983 \times 10^{13}$	8	$1.123 \times 10^{13}$	
<b>DKT</b>	$1.955 \times 10^{16}$	15		
Uyum İstatistikleri				
<b>SS</b>	$4.435 \times 10^6$	<b>R<sup>2</sup></b>		0.9859
<b>Ortalama</b>	$2.616 \times 10^8$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>		0.9849/0.9816
<b>% BSS</b>	1.70	<b>Yeterli Hassasiyet</b>		44.2624

BSS: Bağıl standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4. 8.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiğı, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiğı.

Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına ait optimum koşulları gösteren model grafiğı Şekil 4.9.'da sunulmuştur.



**Şekil 4.9.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı.

#### 4.1.4. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu

LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik ayırımında etkili olduğu bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi

Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. Sistematik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.7.'de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A: FA	B: Akış Hızı	C: Kolon sıcaklığı	TPA
	%	mL/min	°C	
1*	0.1	0.3	45	310817345
2	0.05	0.25	45	241270562
3*	0.1	0.3	45	300950754
4	0.15	0.35	45	176326671
5	0.05	0.3	60	170468563
6	0.1	0.25	30	391221284
7	0.1	0.35	30	340139840
8	0.15	0.3	30	291452175
9	0.05	0.35	45	161237773
10	0.1	0.25	60	302196964
11	0.1	0.35	60	195646846
12*	0.1	0.3	45	315284084
13	0.05	0.3	30	246364323
14	0.15	0.3	60	171956996
15	0.15	0.25	45	242237924

\* Merkez nokta.

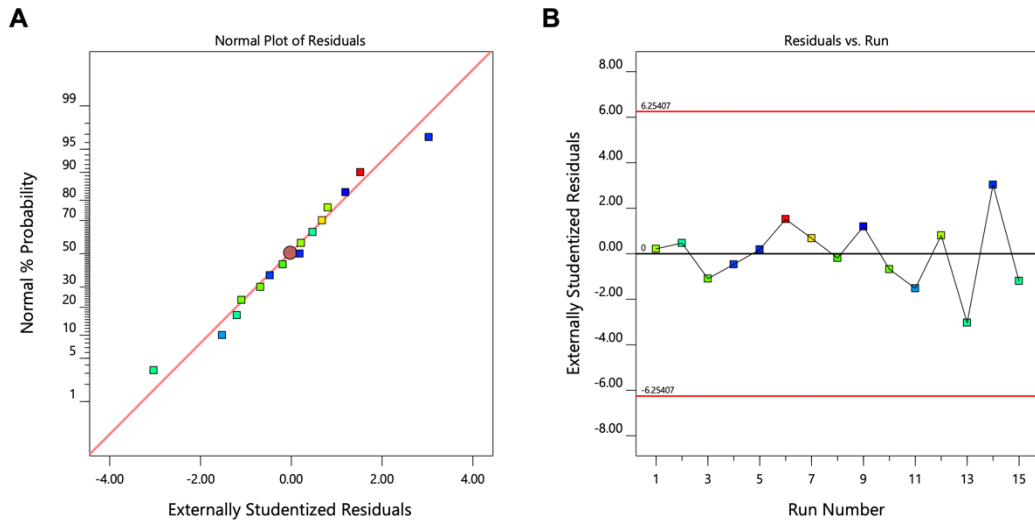
Elde edilen cevaplara bağlı olarak deneysel tasarım için kuadratik bir model önerilmiştir ve Box-Behnken tasarımı için önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmıştır (Tablo 4.8.). Deneysel tasarımdan kodlanmış faktörler (yüksek seviyeler, +1; düşük seviyeler, -1) için elde edilen matematiksel model örnek olarak EK-2'de sunulmuştur. Böyle bir denklem faktörlerin katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini belirlemek için kullanışlıdır. Modele ait

elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.10.).

**Tablo 4.8.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

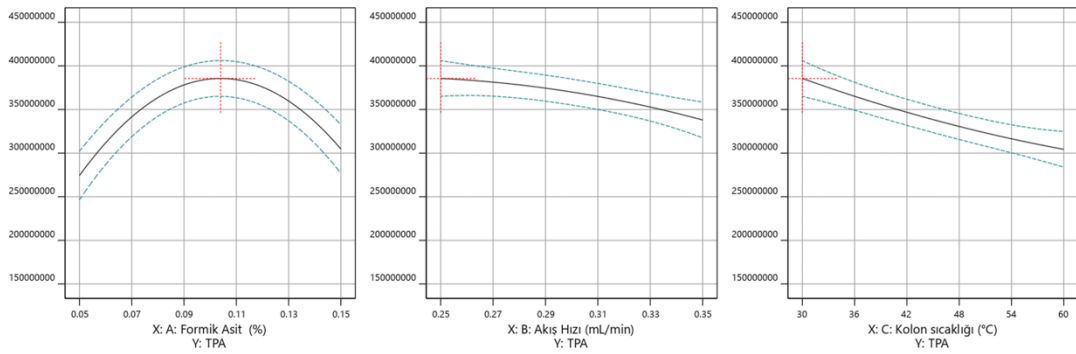
<b>ANOVA</b>				
<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>SD</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F/p-değeri</b>
<b>Model</b>	$7.070 \times 10^{16}$	9	$7.856 \times 10^{15}$	$92.90/5 \times 10^{-5}$
A	$4.904 \times 10^{14}$	1	$4.904 \times 10^{14}$	5.80/0.0610
B	$1.152 \times 10^{16}$	1	$1.152 \times 10^{16}$	$136.2/8 \times 10^{-5}$
C	$2.300 \times 10^{16}$	1	$2.300 \times 10^{16}$	$271.9/2 \times 10^{-5}$
AB	$4.985 \times 10^{13}$	1	$4.985 \times 10^{13}$	0.59/0.4773
AC	$4.752 \times 10^{14}$	1	$4.752 \times 10^{14}$	5.62/0.0639
BC	$7.692 \times 10^{14}$	1	$7.692 \times 10^{14}$	9.10/0.0295
A <sup>2</sup>	$3.367 \times 10^{16}$	1	$3.367 \times 10^{16}$	$398.2/6 \times 10^{-6}$
B <sup>2</sup>	$2.516 \times 10^{14}$	1	$2.516 \times 10^{14}$	2.98/0.1452
C <sup>2</sup>	$1.578 \times 10^{14}$	1	$1.578 \times 10^{14}$	1.87/0.2301
<b>Artık</b>	$4.228 \times 10^{14}$	5	$8.456 \times 10^{13}$	
Uyum Eksikliği	$3.152 \times 10^{14}$	3	$1.051 \times 10^{14}$	1.95/0.3563
Saf Hata	$1.076 \times 10^{14}$	2	$5.379 \times 10^{13}$	
<b>DKT</b>	$7.112 \times 10^{16}$	14		
<b>Uyum İstatistikleri</b>				
<b>SS</b>	$9.196 \times 10^6$	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9941	
<b>Ortalama</b>	$2.572 \times 10^8$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>	0.9834/0.9257	
<b>% BSS</b>	3.58	<b>Yeterli Hassasiyet</b>	30.5045	

A: Formik asit (%), B: Akış hızı, C: Kolon sıcaklığı. BSS: Bağıl standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.10.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik ayırım parametrelerine ait optimum koşulları gösteren model grafiği Şekil 4.11.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.11.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiği.

#### 4.1.5. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu

LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizler için de Bölüm 4.1.4.'e benzer şekilde hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiş ve analizler sistematik hatayı engellemek için rastgele

gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.9.'da verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A:FA	B:Akış Hızı	C:Kolon Sıcaklığı	TPA
	%	mL/min	°C	
1*	0.1	0.3	45	2315544562
2	0.05	0.25	45	2743457901
3*	0.1	0.3	45	2381025642
4	0.15	0.35	45	1710276744
5	0.05	0.3	60	3081762488
6	0.1	0.25	30	1942108531
7	0.1	0.35	30	1805950513
8	0.15	0.3	30	1965028561
9	0.05	0.35	45	2063700405
10	0.1	0.25	60	3149722678
11	0.1	0.35	60	2426948624
12*	0.1	0.3	45	2253055432
13	0.05	0.3	30	2123785288
14	0.15	0.3	60	2441190023
15	0.15	0.25	45	2046984564

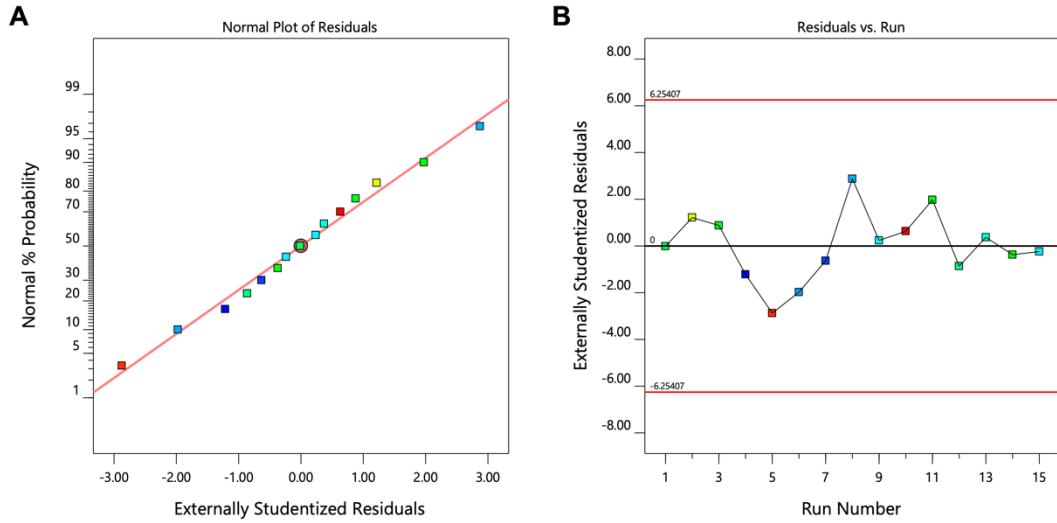
\* Merkez nokta.

Deneyel tasarım için önerilen kuadratik modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmıştır (Tablo 4.10.). Modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.12.).

**Tablo 4. 10.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

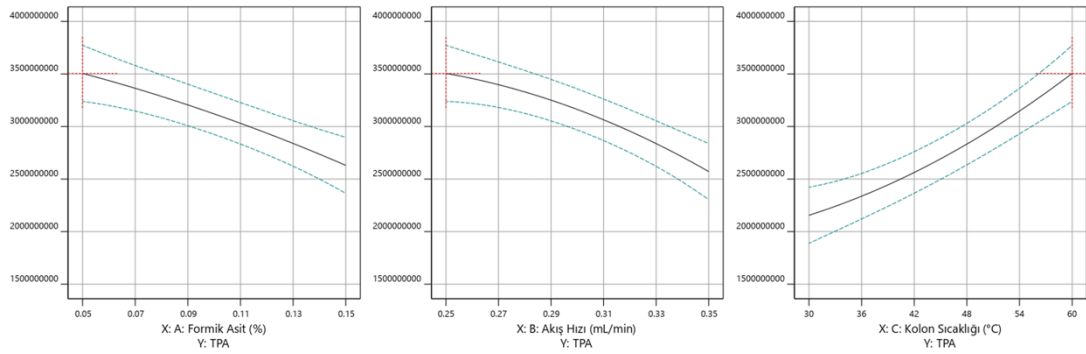
<b>ANOVA</b>				
<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>SD</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F/p-değeri</b>
<b>Model</b>	2.519 x 10 <sup>18</sup>	9	2.799 x 10 <sup>17</sup>	36.27/0.0005
A	4.275 x 10 <sup>17</sup>	1	4.275 x 10 <sup>17</sup>	55.38/0.0007
B	4.396 x 10 <sup>17</sup>	1	4.396 x 10 <sup>17</sup>	56.96/0.0006
C	1.331 x 10 <sup>18</sup>	1	1.331 x 10 <sup>18</sup>	172.4/4.6x10 <sup>-5</sup>
AB	2.942 x 10 <sup>16</sup>	1	2.942 x 10 <sup>16</sup>	3.81/0.1083
AC	5.804 x 10 <sup>16</sup>	1	5.804 x 10 <sup>16</sup>	7.52/0.0407
BC	8.603 x 10 <sup>16</sup>	1	8.603 x 10 <sup>16</sup>	11.15/0.0206
A <sup>2</sup>	9.922 x 10 <sup>15</sup>	1	9.922 x 10 <sup>15</sup>	1.29/0.3083
B <sup>2</sup>	5.641 x 10 <sup>16</sup>	1	5.641 x 10 <sup>16</sup>	7.31/0.0426
C <sup>2</sup>	7.056 x 10 <sup>16</sup>	1	7.056 x 10 <sup>16</sup>	9.14/0.0293
<b>Artık</b>	3.859 x 10 <sup>16</sup>	5	7.718 x 10 <sup>15</sup>	
Uyum Eksikliği	3.040 x 10 <sup>16</sup>	3	1.013 x 10 <sup>16</sup>	2.47/0.3008
Saf Hata	8.190 x 10 <sup>15</sup>	2	4.095 x 10 <sup>15</sup>	
<b>DKT</b>	2.558 x 10 <sup>18</sup>	14		
<b>Uyum İstatistikleri</b>				
<b>SS</b>	8.785 x 10 <sup>7</sup>	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9849	
<b>Ortalama</b>	2.297 x 10 <sup>9</sup>	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>	0.9578/0.8026	
<b>% BSS</b>	3.83	<b>Yeterli Hassasiyet</b>	19.5325	

A: Formik asit (%), B: Akış hızı, C: Kolon sıcaklığı. BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.12.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

Doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik ayırım parametrelerine ait optimum koşulları gösteren model grafiği Şekil 4.13.'te sunulmuştur.



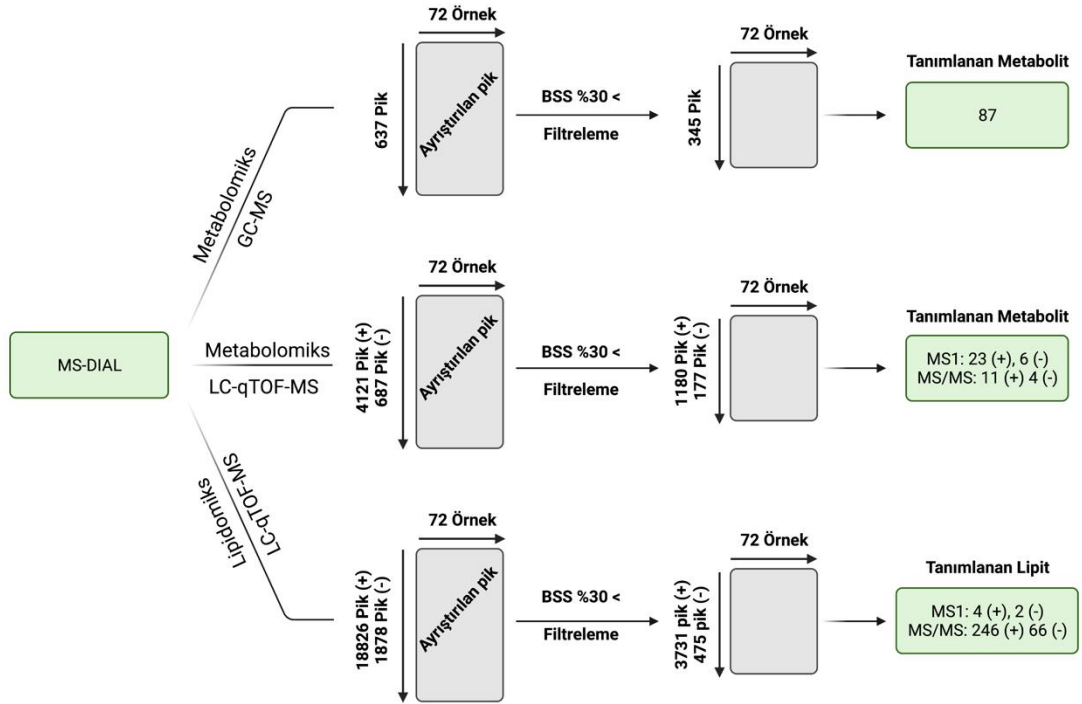
**Şekil 4.13.** Doku örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiği.

#### 4.1.6. Doku Örneklerine ait Tanımlanan Metabolitler, Lipitler ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

Hasta grubunu oluşturan GBM (n=12), menenjiyom (n=12) ve akciğer kanseri beyin metastazı (n=12) tanısı konulan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubunu oluşturan ve parankimal rezeksiyon (n=36) yapılması gereken bireylerden toplanan



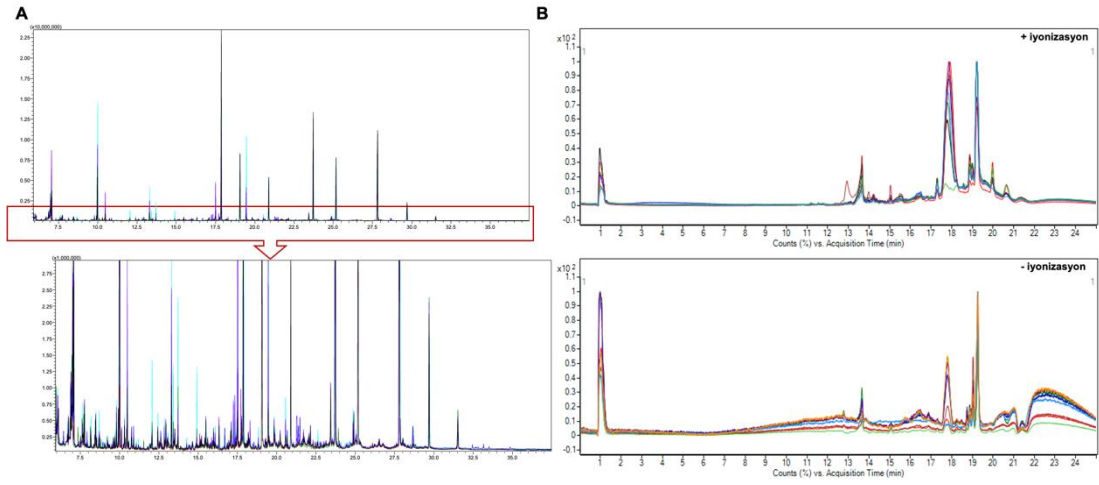
toplam 72 doku örneğinden gerçekleştirilen metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipit sayıları Şekil 4.14.'te verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Doku örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipit sayıları. MS1, m/z değerlerine göre; MS/MS, parçalanma ürünlerine göre; (+), pozitif iyonizasyon modunda; (-) negatif iyonizasyon modunda tanımlanan metabolitler.

### Metabolomik Analiz Sonuçları

Doku örnekleri ile gerçekleştirilen GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.15.'te tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.11.'de verilmiştir. Toplamda 131 metabolit tanımlanmıştır. Kontrol grubu ile GBM hastaları arasında GC-MS, LC-qTOF-MS pozitif, LC-qTOF-MS negatif iyonizasyon modunda tanımlanan metabolitlerden sırasıyla 32, 20 ve 9 metabolit istatistiksel ( $p < 0,05$ ) olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile menenjiyom hastaları arasında 39, 17 ve 7 metabolitin ve kontrol grubu ile akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalar arasında ise 30, 17 ve 7 metabolitin istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.15.** Doku örneklerinden metabolomik analizlere ait örnek kromatogramlar. A) GC-MS, B) LC-qTOF-MS pozitif ve negatif iyonizasyon.

**Tablo 4.11.** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	(3beta,22E)-26,27-Dinorergosta-5,22-dien-3-ol	1.077 ± 0.116	0.912 ± 0.104	0.439	1.030 ± 0.127	0.829	0.828 ± 0.084	0.238
LC-MS (-)	11A-Acetoxyprogesterone	0.893 ± 0.038	1.148 ± 0.046	<b>0.001</b>	0.993 ± 0.122	0.300	1.181 ± 0.053	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	12-Oxo-10,15(Z)-Phytodienoic Acid	0.915 ± 0.036	1.129 ± 0.057	<b>0.004</b>	1.017 ± 0.064	0.165	1.110 ± 0.110	<b>0.033</b>
LC-MS/MS (-)	1-Acetoxy-2-hydroxy-16-heptadecyn-4-one	0.953 ± 0.017	1.096 ± 0.046	<b>0.001</b>	1.036 ± 0.044	<b>0.036</b>	1.010 ± 0.046	0.153
LC-MS (+)	1-Monostearin	1.024 ± 0.010	0.964 ± 0.030	<b>0.019</b>	0.972 ± 0.024	<b>0.025</b>	0.992 ± 0.027	0.184
LC-MS (+)	2,3-dihydroxypropyl stearate	1.028 ± 0.017	0.912 ± 0.077	<b>0.033</b>	1.035 ± 0.081	0.892	0.970 ± 0.055	0.183
GC-MS	2-hydroxybutyric acid	1.132 ± 0.127	1.095 ± 0.135	0.875	0.634 ± 0.163	<b>0.044</b>	0.876 ± 0.081	0.264
LC-MS/MS (-)	2-hydroxystearate	0.843 ± 0.100	1.191 ± 0.224	0.115	1.247 ± 0.334	0.124	1.032 ± 0.163	0.347
LC-MS (+)	2-Myristoylglycerol	0.773 ± 0.034	1.154 ± 0.053	<b>0.000</b>	1.107 ± 0.066	<b>0.000</b>	1.419 ± 0.121	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	3-Allyl-1-cyclohexene	1.015 ± 0.017	0.928 ± 0.068	0.080	1.016 ± 0.074	0.990	1.012 ± 0.062	0.947
GC-MS	3-hydroxy-3-methylglutaric acid	0.784 ± 0.091	1.590 ± 0.266	<b>0.001</b>	0.589 ± 0.092	0.246	1.469 ± 0.531	<b>0.049</b>
GC-MS	3-phenyllactic acid	0.407 ± 0.020	1.098 ± 0.245	<b>0.000</b>	0.789 ± 0.227	<b>0.006</b>	2.892 ± 0.602	<b>0.000</b>
GC-MS	3-phosphoglyceraldehyde	0.861 ± 0.110	2.065 ± 0.246	<b>0.000</b>	0.612 ± 0.207	0.272	0.742 ± 0.176	0.583
GC-MS	3-phosphoglyceric acid	0.958 ± 0.130	1.720 ± 0.847	0.156	0.997 ± 0.389	0.902	0.409 ± 0.079	<b>0.022</b>
GC-MS	6-phosphogluconic acid	1.066 ± 0.142	0.749 ± 0.151	0.233	0.871 ± 0.199	0.478	1.183 ± 0.242	0.679
GC-MS	Adenosine	0.963 ± 0.060	1.260 ± 0.118	<b>0.022</b>	0.669 ± 0.201	0.063	1.181 ± 0.120	0.089
GC-MS	Alanine	0.693 ± 0.082	1.178 ± 0.272	<b>0.026</b>	1.838 ± 0.692	<b>0.008</b>	0.906 ± 0.197	0.247
GC-MS	Arabitol	0.990 ± 0.022	1.058 ± 0.053	0.168	1.016 ± 0.039	0.567	0.956 ± 0.029	0.429
GC-MS	Aspartic acid	0.998 ± 0.014	0.985 ± 0.023	0.635	1.008 ± 0.025	0.734	1.014 ± 0.018	0.552
GC-MS	Behenic acid	1.014 ± 0.063	1.008 ± 0.085	0.959	0.936 ± 0.046	0.491	1.012 ± 0.099	0.982
GC-MS	Beta-alanine	0.767 ± 0.087	0.696 ± 0.155	0.688	2.050 ± 1.007	<b>0.034</b>	0.954 ± 0.152	0.288
LC-MS (+)	Chenodeoxycholic acid	0.399 ± 0.049	1.294 ± 0.341	<b>0.000</b>	2.327 ± 1.494	<b>0.028</b>	1.182 ± 0.509	<b>0.012</b>
LC-MS (+)	Cholest-4,6-Dien-3-One	0.856 ± 0.029	1.128 ± 0.036	<b>0.000</b>	1.131 ± 0.039	<b>0.000</b>	1.172 ± 0.074	<b>0.000</b>

**Tablo 4.11. (Devam)** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	Cholesterol	1.463 ± 0.270	0.536 ± 0.089	0.056	0.712 ± 0.197	0.127	0.363 ± 0.064	<b>0.024</b>
LC-MS/MS (+)	Cholic Acid	1.072 ± 0.032	0.927 ± 0.068	<b>0.036</b>	0.976 ± 0.099	0.227	0.882 ± 0.091	<b>0.015</b>
GC-MS	Citraconic acid	0.619 ± 0.119	0.371 ± 0.043	0.242	2.729 ± 2.051	0.079	1.043 ± 0.455	0.205
GC-MS	Citric acid	1.197 ± 0.160	0.793 ± 0.190	0.183	1.106 ± 0.553	0.829	0.509 ± 0.103	<b>0.020</b>
LC-MS (+)	Corticosterone	1.041 ± 0.079	0.986 ± 0.107	0.715	1.028 ± 0.078	0.931	0.865 ± 0.05	0.214
GC-MS	Creatinine	1.657 ± 0.165	0.497 ± 0.103	<b>0.000</b>	0.255 ± 0.103	<b>0.000</b>	0.276 ± 0.061	<b>0.000</b>
GC-MS	Cytidine	0.599 ± 0.068	0.544 ± 0.140	0.700	2.937 ± 1.011	<b>0.000</b>	0.720 ± 0.139	0.399
GC-MS	Dehydroascorbic acid	0.962 ± 0.152	0.702 ± 0.230	0.382	1.363 ± 0.344	0.228	1.047 ± 0.359	0.801
LC-MS/MS (+)	DG(8:0/0:0/a-13:0)	0.885 ± 0.023	1.106 ± 0.041	<b>0.000</b>	1.092 ± 0.035	<b>0.000</b>	1.147 ± 0.075	<b>0.000</b>
GC-MS	D-glucosaminic acid	1.286 ± 0.145	0.843 ± 0.175	0.110	0.492 ± 0.170	<b>0.005</b>	0.808 ± 0.280	0.116
GC-MS	D-glucose	0.376 ± 0.071	1.906 ± 0.262	<b>0.000</b>	1.661 ± 0.470	<b>0.000</b>	1.304 ± 0.345	<b>0.000</b>
GC-MS	Dihydroxyacetone phosphate	0.785 ± 0.156	0.455 ± 0.260	0.292	0.138 ± 0.054	<b>0.023</b>	3.053 ± 2.825	0.168
GC-MS	DL-3-aminoisobutyric acid	0.369 ± 0.041	0.915 ± 0.264	<b>0.002</b>	3.479 ± 1.233	<b>0.000</b>	0.498 ± 0.164	0.278
GC-MS	DL-glyceraldehyde	1.002 ± 0.029	1.016 ± 0.100	0.857	0.917 ± 0.073	0.197	1.061 ± 0.043	0.307
GC-MS	DL-glyceraldehyde 3-phosphate	0.961 ± 0.076	1.178 ± 0.301	0.320	0.818 ± 0.124	0.347	1.123 ± 0.154	0.313
GC-MS	DL-isoleucine	0.943 ± 0.060	1.138 ± 0.194	0.204	0.926 ± 0.233	0.919	1.109 ± 0.166	0.244
GC-MS	D-malic acid	1.202 ± 0.090	0.915 ± 0.078	0.084	0.720 ± 0.197	<b>0.015</b>	0.758 ± 0.114	<b>0.012</b>
LC-MS/MS (-)	Docosahexanoic acid	0.942 ± 0.100	1.545 ± 0.248	<b>0.010</b>	0.326 ± 0.138	<b>0.002</b>	1.301 ± 0.229	0.104
LC-MS/MS (-)	Docosapentaenoic acid (22n-6)	0.514 ± 0.065	1.850 ± 0.402	<b>0.000</b>	0.803 ± 0.208	0.083	1.805 ± 0.533	<b>0.000</b>
GC-MS	D-Ribulose 5-phosphate	0.663 ± 0.103	2.459 ± 0.634	<b>0.000</b>	0.629 ± 0.231	0.880	0.924 ± 0.220	0.236
GC-MS	D-sorbitol	0.024 ± 0.002	2.443 ± 0.541	<b>0.000</b>	1.837 ± 0.663	<b>0.000</b>	1.649 ± 0.599	<b>0.000</b>
GC-MS	D-threitol	1.147 ± 0.114	0.770 ± 0.088	0.072	1.225 ± 0.289	0.763	0.565 ± 0.067	<b>0.006</b>
GC-MS	Erythrose 4-phosphate	0.786 ± 0.133	1.634 ± 0.271	<b>0.004</b>	0.895 ± 0.345	0.723	1.113 ± 0.360	0.296
GC-MS	Estrone	1.136 ± 0.090	0.861 ± 0.159	0.136	0.708 ± 0.151	<b>0.021</b>	1.023 ± 0.165	0.541

**Tablo 4.11. (Devam)** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS (-)	Ethyl dodecanoate	0.798 ± 0.029	1.220 ± 0.112	<b>0.000</b>	0.969 ± 0.064	<b>0.008</b>	1.418 ± 0.211	<b>0.000</b>
GC-MS	Fumaric acid	1.174 ± 0.090	1.141 ± 0.114	0.843	0.516 ± 0.078	<b>0.000</b>	0.821 ± 0.101	<b>0.039</b>
GC-MS	Galactinol	0.789 ± 0.097	1.149 ± 0.187	0.077	0.704 ± 0.152	0.659	1.781 ± 0.741	<b>0.033</b>
GC-MS	Galacturonic acid	0.923 ± 0.025	1.200 ± 0.193	<b>0.022</b>	1.056 ± 0.042	<b>0.010</b>	0.973 ± 0.048	0.334
LC-MS (-)	gamma-Linolenic acid	0.257 ± 0.033	1.951 ± 0.355	<b>0.000</b>	0.85 ± 0.346	<b>0.006</b>	2.426 ± 0.728	<b>0.000</b>
GC-MS	Glucoheptonic acid	1.271 ± 0.134	0.888 ± 0.175	0.138	0.496 ± 0.158	<b>0.003</b>	0.803 ± 0.253	0.094
GC-MS	gluconic acid	0.370 ± 0.027	0.663 ± 0.075	<b>0.000</b>	3.565 ± 0.835	<b>0.000</b>	0.661 ± 0.162	<b>0.007</b>
GC-MS	Glucosamine-1P	0.402 ± 0.033	1.896 ± 0.287	<b>0.000</b>	1.600 ± 0.500	<b>0.000</b>	1.300 ± 0.208	<b>0.000</b>
GC-MS	Glucose 6-phosphate	0.643 ± 0.178	1.753 ± 0.320	<b>0.003</b>	1.229 ± 0.369	0.124	1.087 ± 0.267	0.204
GC-MS	Glutamic acid	1.023 ± 0.105	0.942 ± 0.149	0.688	1.304 ± 0.280	0.252	0.685 ± 0.096	0.083
GC-MS	Glyceric acid	0.910 ± 0.077	0.794 ± 0.089	0.420	1.899 ± 0.565	<b>0.006</b>	0.576 ± 0.075	<b>0.021</b>
GC-MS	Glycerol	0.781 ± 0.219	0.397 ± 0.040	0.321	1.799 ± 0.464	<b>0.033</b>	1.459 ± 0.838	0.271
GC-MS	Glycerol 1-phosphate	1.380 ± 0.209	0.827 ± 0.184	0.152	0.371 ± 0.054	<b>0.008</b>	0.661 ± 0.177	0.064
LC-MS (+)	Glyceryl monostearate	0.997 ± 0.010	1.038 ± 0.027	0.079	0.997 ± 0.02	0.978	0.976 ± 0.027	0.371
GC-MS	Glycine	0.723 ± 0.065	1.579 ± 0.331	<b>0.000</b>	1.075 ± 0.312	0.100	1.176 ± 0.188	<b>0.005</b>
LC-MS (+)	Glycochenodeoxycholic acid	0.362 ± 0.027	2.970 ± 0.701	<b>0.000</b>	0.503 ± 0.091	0.051	1.44 ± 0.463	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	Guanine	1.037 ± 0.021	0.917 ± 0.076	<b>0.041</b>	0.996 ± 0.064	0.437	0.976 ± 0.069	0.261
GC-MS	Heptadecanoic acid	0.974 ± 0.033	1.094 ± 0.087	0.121	1.009 ± 0.053	0.603	0.974 ± 0.045	0.993
LC-MS (+)	Heptadecanoyl ethanolamide	1.141 ± 0.136	0.787 ± 0.122	0.161	0.81 ± 0.134	0.191	0.981 ± 0.144	0.528
GC-MS	Hydroxyphenyllactic acid	1.013 ± 0.179	0.939 ± 0.254	0.830	0.819 ± 0.247	0.571	1.202 ± 0.359	0.614
LC-MS (-)	Hydroxyprogesterone	0.192 ± 0.019	2.058 ± 0.411	<b>0.000</b>	0.990 ± 0.496	<b>0.007</b>	2.376 ± 0.410	<b>0.000</b>
GC-MS	Hypotaurine	0.171 ± 0.035	2.255 ± 0.776	<b>0.000</b>	2.447 ± 1.509	<b>0.011</b>	0.786 ± 0.132	<b>0.000</b>
GC-MS	Inosine	0.806 ± 0.666	0.045 ± 0.016	0.515	2.575 ± 2.358	0.322	0.961 ± 0.523	0.898
GC-MS	Isoleucine	0.962 ± 0.062	1.121 ± 0.190	0.304	0.801 ± 0.205	0.317	1.192 ± 0.172	0.123

**Tablo 4.11. (Devam)** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p
GC-MS	Isomaltose	0.408 $\pm$ 0.042	1.726 $\pm$ 0.347	<b>0.000</b>	1.207 $\pm$ 0.422	<b>0.002</b>	1.843 $\pm$ 0.521	<b>0.000</b>
GC-MS	L-(+) lactic acid	0.968 $\pm$ 0.117	0.734 $\pm$ 0.172	0.306	1.140 $\pm$ 0.327	0.536	1.222 $\pm$ 0.256	0.315
GC-MS	L-alanine	0.590 $\pm$ 0.093	0.935 $\pm$ 0.277	0.133	2.512 $\pm$ 1.373	<b>0.019</b>	0.785 $\pm$ 0.226	0.351
GC-MS	L-ascorbic acid	0.266 $\pm$ 0.042	0.962 $\pm$ 0.599	0.051	3.441 $\pm$ 1.641	<b>0.001</b>	0.799 $\pm$ 0.479	0.063
LC-MS (+)	Lauroylcarnitine	0.103 $\pm$ 0.028	2.85 $\pm$ 1.201	<b>0.000</b>	0.793 $\pm$ 0.203	<b>0.000</b>	2.047 $\pm$ 1.056	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	L-Cystathionine	0.862 $\pm$ 0.035	1.161 $\pm$ 0.272	0.077	0.891 $\pm$ 0.066	0.692	1.361 $\pm$ 0.373	<b>0.028</b>
GC-MS	L-homoserine	0.682 $\pm$ 0.078	1.444 $\pm$ 0.341	<b>0.002</b>	1.448 $\pm$ 0.552	<b>0.029</b>	1.062 $\pm$ 0.25	0.058
LC-MS (-)	Linoleic acid	0.495 $\pm$ 0.054	1.376 $\pm$ 0.219	<b>0.000</b>	0.985 $\pm$ 0.233	<b>0.004</b>	2.156 $\pm$ 0.606	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	Lithocholic Acid	1.024 $\pm$ 0.018	0.946 $\pm$ 0.048	0.067	1.002 $\pm$ 0.047	0.597	0.981 $\pm$ 0.054	0.341
GC-MS	L-leucine	0.944 $\pm$ 0.060	1.135 $\pm$ 0.196	0.216	0.925 $\pm$ 0.234	0.913	1.109 $\pm$ 0.167	0.245
GC-MS	L-methionine	0.995 $\pm$ 0.059	1.082 $\pm$ 0.097	0.459	0.911 $\pm$ 0.118	0.499	1.023 $\pm$ 0.113	0.817
GC-MS	L-proline	0.548 $\pm$ 0.043	1.58 $\pm$ 0.276	<b>0.000</b>	1.198 $\pm$ 0.293	<b>0.001</b>	1.578 $\pm$ 0.365	<b>0.000</b>
GC-MS	L-pyroglutamic acid	0.979 $\pm$ 0.078	1.033 $\pm$ 0.128	0.730	1.300 $\pm$ 0.299	0.145	0.730 $\pm$ 0.096	0.093
GC-MS	L-serine	0.873 $\pm$ 0.175	0.841 $\pm$ 0.265	0.925	1.861 $\pm$ 1.163	0.179	0.681 $\pm$ 0.335	0.596
GC-MS	L-threonine	0.679 $\pm$ 0.137	0.905 $\pm$ 0.289	0.438	2.207 $\pm$ 1.299	0.054	0.851 $\pm$ 0.355	0.584
GC-MS	L-tryptophan	0.802 $\pm$ 0.101	1.093 $\pm$ 0.250	0.205	1.204 $\pm$ 0.773	0.398	1.296 $\pm$ 0.242	<b>0.032</b>
GC-MS	L-tyrosine	0.796 $\pm$ 0.106	1.067 $\pm$ 0.175	0.204	1.366 $\pm$ 0.611	0.152	1.178 $\pm$ 0.198	0.085
GC-MS	L-valine	0.813 $\pm$ 0.103	1.204 $\pm$ 0.297	0.118	1.060 $\pm$ 0.380	0.382	1.296 $\pm$ 0.342	0.073
GC-MS	Lysine	0.360 $\pm$ 0.094	0.665 $\pm$ 0.244	0.161	3.259 $\pm$ 2.681	0.063	0.995 $\pm$ 0.317	<b>0.012</b>
LC-MS/MS (+)	LysoPC(16:0/0:0)	0.447 $\pm$ 0.024	1.730 $\pm$ 0.265	<b>0.000</b>	0.897 $\pm$ 0.262	<b>0.005</b>	2.031 $\pm$ 0.447	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	LysoPC(18:1)	0.478 $\pm$ 0.022	1.485 $\pm$ 0.265	<b>0.000</b>	1.106 $\pm$ 0.221	<b>0.000</b>	1.974 $\pm$ 0.389	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	LysoPC(18:2)	1.646 $\pm$ 0.449	0.292 $\pm$ 0.048	0.091	0.444 $\pm$ 0.091	0.132	0.326 $\pm$ 0.053	0.099
GC-MS	Malonic acid	0.816 $\pm$ 0.256	1.327 $\pm$ 0.515	0.342	0.835 $\pm$ 0.471	0.970	1.390 $\pm$ 0.541	0.294
GC-MS	Maltose	0.391 $\pm$ 0.099	1.990 $\pm$ 0.365	<b>0.000</b>	0.948 $\pm$ 0.296	<b>0.025</b>	1.888 $\pm$ 0.560	<b>0.000</b>

**Tablo 4.11. (Devam)** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	Maltotriose	0.624 ± 0.057	1.916 ± 0.974	<b>0.025</b>	0.739 ± 0.078	0.294	1.474 ± 0.421	<b>0.002</b>
LC-MS (+)	MG(0:0/16:0/0:0)	0.858 ± 0.032	1.147 ± 0.040	<b>0.000</b>	1.048 ± 0.047	<b>0.004</b>	1.232 ± 0.076	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	MG(0:0/20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)	0.970 ± 0.015	1.075 ± 0.027	<b>0.001</b>	1.016 ± 0.043	0.197	0.998 ± 0.038	0.402
LC-MS (+)	MG(18:2(9Z,12Z)/0:0/0:0)	0.992 ± 0.011	1.004 ± 0.019	0.569	1.053 ± 0.028	<b>0.018</b>	0.969 ± 0.023	0.329
LC-MS/MS (+)	MG(18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0/0:0)	0.946 ± 0.012	1.115 ± 0.033	<b>0.000</b>	1.052 ± 0.035	<b>0.001</b>	0.996 ± 0.047	0.140
GC-MS	Myo-inositol	1.533 ± 0.115	0.529 ± 0.075	<b>0.000</b>	0.406 ± 0.104	<b>0.000</b>	0.464 ± 0.145	<b>0.000</b>
GC-MS	Myristic acid	0.974 ± 0.028	1.076 ± 0.083	0.135	0.986 ± 0.054	0.837	1.017 ± 0.038	0.417
GC-MS	N-acetyl-D-glucosamine	0.980 ± 0.043	1.087 ± 0.084	0.241	1.011 ± 0.060	0.712	0.961 ± 0.063	0.814
GC-MS	N-acetyl-l-aspartic acid	1.871 ± 0.235	0.162 ± 0.032	<b>0.000</b>	0.031 ± 0.003	<b>0.000</b>	0.195 ± 0.070	<b>0.000</b>
GC-MS	N-acetyl-l-glutamic acid	1.446 ± 0.212	0.635 ± 0.079	<b>0.035</b>	0.493 ± 0.095	<b>0.014</b>	0.535 ± 0.087	<b>0.018</b>
GC-MS	Nicotinamide	0.934 ± 0.089	0.987 ± 0.157	0.772	1.583 ± 0.750	0.157	0.627 ± 0.144	0.086
GC-MS	O-phosphoethanolamine	0.790 ± 0.103	1.809 ± 0.560	<b>0.007</b>	0.565 ± 0.205	0.295	1.255 ± 0.401	0.114
GC-MS	Oxalic acid	0.655 ± 0.064	1.967 ± 0.543	<b>0.000</b>	1.226 ± 0.419	<b>0.034</b>	0.842 ± 0.220	0.271
LC-MS/MS (+)	PA(20:0/19:0)	1.007 ± 0.027	0.993 ± 0.054	0.800	0.991 ± 0.052	0.780	0.995 ± 0.052	0.834
GC-MS	Palmitoleic acid	0.763 ± 0.045	1.284 ± 0.160	<b>0.000</b>	1.034 ± 0.175	<b>0.037</b>	1.392 ± 0.357	<b>0.006</b>
LC-MS/MS (+)	Palmitoylcarnitine	0.067 ± 0.011	3.458 ± 1.039	<b>0.000</b>	0.709 ± 0.156	<b>0.000</b>	1.633 ± 0.438	<b>0.000</b>
GC-MS	Pantothenic acid	1.188 ± 0.150	0.894 ± 0.096	0.278	0.824 ± 0.294	0.247	0.716 ± 0.145	0.093
LC-MS (-)	Pentadecanoic acid	0.871 ± 0.037	1.150 ± 0.100	<b>0.002</b>	1.052 ± 0.077	<b>0.026</b>	1.185 ± 0.120	<b>0.002</b>
LC-MS (+)	Pentanamide	0.927 ± 0.019	0.974 ± 0.025	0.199	1.235 ± 0.218	<b>0.020</b>	1.011 ± 0.044	<b>0.048</b>
LC-MS (+)	Phenylacetylglutamine	0.676 ± 0.091	1.422 ± 0.299	<b>0.002</b>	1.118 ± 0.654	0.277	1.432 ± 0.587	<b>0.046</b>
GC-MS	Phenylalanine	1.058 ± 0.085	1.047 ± 0.145	0.944	0.732 ± 0.196	0.084	1.046 ± 0.156	0.943
LC-MS (+)	Phosphocholine	0.406 ± 0.030	1.515 ± 0.320	<b>0.000</b>	1.080 ± 0.293	<b>0.000</b>	2.187 ± 0.601	<b>0.000</b>
GC-MS	Phosphoric acid	1.086 ± 0.052	0.896 ± 0.088	0.072	0.975 ± 0.181	0.421	0.872 ± 0.109	0.057
GC-MS	Pyruvic acid	1.052 ± 0.027	0.936 ± 0.086	0.093	0.943 ± 0.093	0.128	0.965 ± 0.094	0.224

**Tablo 4.11. (Devam)** Doku örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

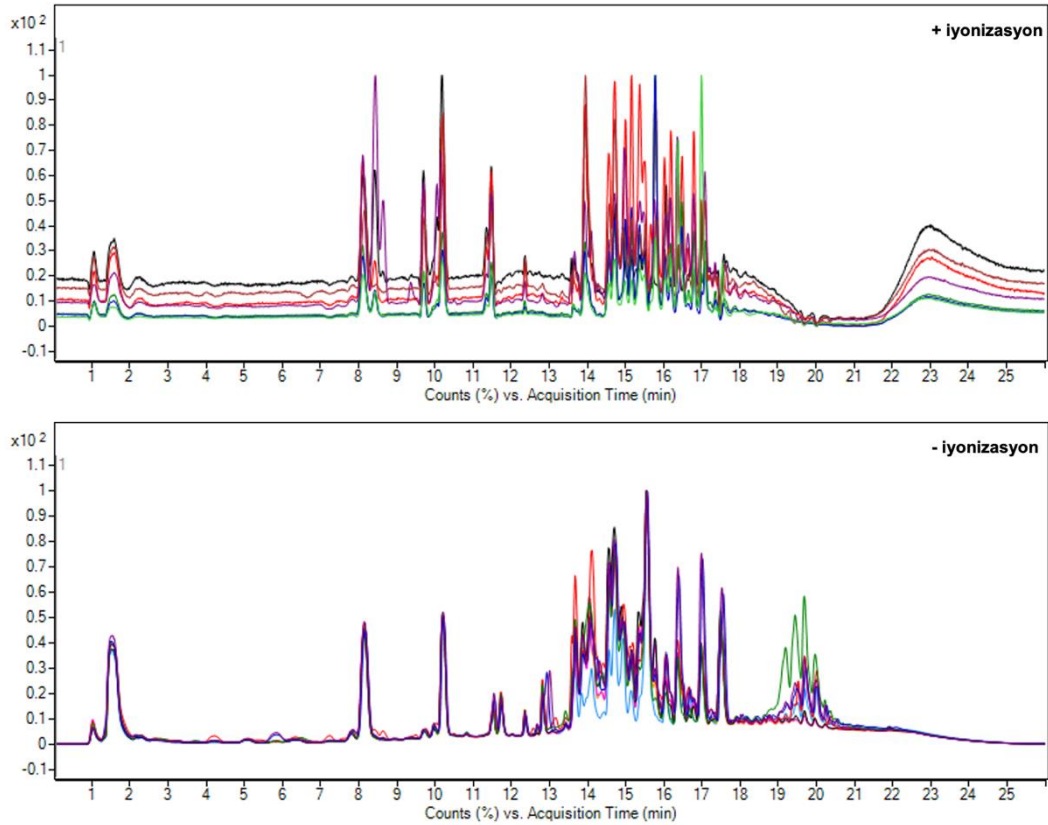
Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	Ribitol	0.692 ± 0.053	0.801 ± 0.076	0.289	1.896 ± 0.497	<b>0.000</b>	1.229 ± 0.222	<b>0.001</b>
GC-MS	Ribose	0.587 ± 0.042	1.119 ± 0.111	<b>0.000</b>	2.442 ± 1.198	<b>0.009</b>	0.679 ± 0.091	0.310
GC-MS	Serine	0.864 ± 0.057	1.303 ± 0.222	<b>0.009</b>	1.246 ± 0.230	<b>0.024</b>	0.858 ± 0.120	0.956
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/14:1(9Z)(OH))	1.013 ± 0.011	0.993 ± 0.015	0.337	0.994 ± 0.020	0.371	0.974 ± 0.015	0.061
GC-MS	Succinic acid	0.743 ± 0.058	0.950 ± 0.210	0.191	1.667 ± 0.402	<b>0.001</b>	1.153 ± 0.313	0.050
GC-MS	Sucrose	0.799 ± 0.084	1.474 ± 0.600	0.074	1.030 ± 0.208	0.224	1.100 ± 0.229	0.130
LC-MS (+)	Taurocholic acid	0.961 ± 0.014	0.982 ± 0.049	0.572	1.068 ± 0.021	<b>0.000</b>	1.068 ± 0.031	<b>0.001</b>
GC-MS	Threonine	0.831 ± 0.070	1.337 ± 0.158	<b>0.002</b>	1.218 ± 0.226	<b>0.033</b>	0.953 ± 0.126	0.390
GC-MS	Trans-4-hydroxy-l-proline	0.538 ± 0.050	1.087 ± 0.139	<b>0.000</b>	2.471 ± 0.520	<b>0.000</b>	0.828 ± 0.159	<b>0.025</b>
GC-MS	Trehalose	1.028 ± 0.062	1.137 ± 0.111	0.385	1.018 ± 0.119	0.937	0.762 ± 0.093	<b>0.032</b>
LC-MS (+)	Tricosanoic acid	0.985 ± 0.013	1.012 ± 0.017	0.257	1.045 ± 0.031	<b>0.036</b>	0.987 ± 0.018	0.930
LC-MS (+)	Tryptamine	1.121 ± 0.062	0.841 ± 0.031	<b>0.013</b>	0.891 ± 0.032	<b>0.041</b>	0.904 ± 0.036	0.054

SH: Standart hata.  $p < 0,05$  (**koyu**) kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı metabolitler.



### Lipidomik Analiz Sonuçları

Doku örnekleri ile pozitif ve negatif iyonizasyon modunda gerçekleştirilen LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlere ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.16.'da verilmiştir. Pozitif ve negatif iyonizasyon modunda toplamda 318 lipit tanımlanmıştır. Tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.12.'de verilmiştir. Kontrol grubu ile GBM hastaları arasında LC-qTOF-MS pozitif ve LC-qTOF-MS negatif iyonizasyon modunda tanımlanan lipitlerden sırasıyla 163 ve 54 lipit, kontrol grubu ile menenjiyom hastaları arasında 169 ve 56 metabolit ve kontrol grubu ile akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar arasında 162 ve 49 lipit istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



**Şekil 4.16.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS (pozitif ve negatif iyonizasyon) ile yapılan lipidomik analizlere ait örnek kromatogramlar.

**Tablo 4.12.** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	(4E,8E,9Me-d19:2)sphingosine	0.938 ± 0.094	0.800 ± 0.200	0.490	0.779 ± 0.356	0.542	1.607 ± 0.473	<b>0.038</b>
LC-MS/MS (+)	(9Z,12Z)-octadecadien-1-ol	1.000 ± 0.046	1.025 ± 0.029	0.758	0.886 ± 0.036	0.173	1.089 ± 0.031	0.285
LC-MS/MS (+)	11,12-DiHETrE	1.048 ± 0.030	1.000 ± 0.025	0.372	0.878 ± 0.043	<b>0.005</b>	0.979 ± 0.035	0.215
LC-MS/MS (+)	16:3 Cholesteryl ester	0.600 ± 0.038	1.347 ± 0.160	<b>0.000</b>	1.027 ± 0.208	<b>0.003</b>	1.825 ± 0.284	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	18-oxo-nonadecanoic acid	0.981 ± 0.059	1.227 ± 0.079	<b>0.033</b>	0.877 ± 0.05	0.332	0.952 ± 0.062	0.792
LC-MS/MS (+)	20-oxo-heneicosanoic acid	1.012 ± 0.012	0.990 ± 0.011	0.336	0.964 ± 0.017	0.050	1.009 ± 0.017	0.881
LC-MS/MS (+)	22-oxo-tricosanoic acid	1.039 ± 0.044	1.005 ± 0.028	0.664	0.861 ± 0.034	<b>0.029</b>	1.016 ± 0.028	0.772
LC-MS/MS (+)	27-Norcholestanehexol	1.029 ± 0.047	1.003 ± 0.029	0.755	0.893 ± 0.035	0.117	1.017 ± 0.039	0.894
LC-MS/MS (+)	2-Arachidonyl Glycerol ether	0.665 ± 0.042	1.378 ± 0.222	<b>0.000</b>	1.435 ± 0.38	<b>0.001</b>	1.19 ± 0.221	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	2-Arachidonylglycerol	1.004 ± 0.034	1.041 ± 0.030	0.546	0.949 ± 0.025	0.369	0.997 ± 0.061	0.917
LC-MS/MS (+)	3-Dehydrosphinganine	0.833 ± 0.05	0.943 ± 0.164	0.392	1.078 ± 0.258	0.156	1.481 ± 0.426	<b>0.015</b>
LC-MS/MS (+)	3Z,6Z,9Z-Octadecatriene	1.009 ± 0.013	0.998 ± 0.015	0.651	0.963 ± 0.021	0.074	1.013 ± 0.022	0.871
LC-MS/MS (+)	5-Ethyl-7-methyl-3E,5E,7E-undecatriene	1.013 ± 0.017	1.003 ± 0.019	0.769	0.932 ± 0.024	<b>0.019</b>	1.026 ± 0.016	0.682
LC-MS/MS (+)	Allopregnanolone	1.248 ± 0.097	0.613 ± 0.163	<b>0.002</b>	0.743 ± 0.275	<b>0.033</b>	0.898 ± 0.224	0.105
LC-MS/MS (+)	Alpha-Linolenoyl ethanolamide	1.132 ± 0.042	0.880 ± 0.033	<b>0.002</b>	0.757 ± 0.017	<b>0.000</b>	0.966 ± 0.051	<b>0.041</b>
LC-MS/MS (+)	Anandamide (20:3, n-3)	0.839 ± 0.055	1.267 ± 0.291	<b>0.029</b>	0.777 ± 0.292	0.748	1.440 ± 0.397	<b>0.017</b>
LC-MS/MS (-)	Arachidic acid	0.940 ± 0.039	1.050 ± 0.060	0.157	0.84 ± 0.035	0.165	1.290 ± 0.224	<b>0.019</b>
LC-MS/MS (+)	Arachidonic acid	0.819 ± 0.046	0.861 ± 0.155	0.728	1.213 ± 0.293	<b>0.038</b>	1.469 ± 0.472	<b>0.024</b>
LC-MS/MS (+)	CE (18:0)	0.256 ± 0.051	3.466 ± 0.603	<b>0.000</b>	0.29 ± 0.115	0.758	1.478 ± 0.292	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE (18:2)	0.664 ± 0.073	1.625 ± 0.176	<b>0.000</b>	0.927 ± 0.179	0.112	1.456 ± 0.197	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE (20:3)	0.097 ± 0.013	3.198 ± 0.526	<b>0.000</b>	0.753 ± 0.303	<b>0.000</b>	1.758 ± 0.418	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE (22:3)	0.060 ± 0.014	3.874 ± 0.589	<b>0.000</b>	0.714 ± 0.357	<b>0.002</b>	1.232 ± 0.331	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(12:0)	0.857 ± 0.046	1.195 ± 0.033	<b>0.000</b>	1.069 ± 0.039	<b>0.014</b>	1.164 ± 0.043	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	CE(14:0)	0.929 ± 0.029	1.108 ± 0.024	<b>0.001</b>	1.015 ± 0.031	0.111	1.089 ± 0.026	<b>0.004</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p
LC-MS/MS (+)	CE(14:1(9Z))	0.860 $\pm$ 0.063	0.726 $\pm$ 0.069	0.258	1.45 $\pm$ 0.229	<b>0.001</b>	1.243 $\pm$ 0.160	<b>0.010</b>
LC-MS/MS (-)	CE(15:0)	1.123 $\pm$ 0.060	0.840 $\pm$ 0.078	<b>0.016</b>	0.83 $\pm$ 0.075	<b>0.012</b>	0.961 $\pm$ 0.059	0.147
LC-MS/MS (+)	CE(16:0)	0.974 $\pm$ 0.018	1.032 $\pm$ 0.014	0.073	0.985 $\pm$ 0.018	0.732	1.062 $\pm$ 0.017	<b>0.009</b>
LC-MS/MS (+)	CE(16:1(9Z))	0.351 $\pm$ 0.035	2.380 $\pm$ 0.384	<b>0.000</b>	0.996 $\pm$ 0.354	<b>0.003</b>	1.570 $\pm$ 0.352	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	CE(16:2)	0.505 $\pm$ 0.051	0.869 $\pm$ 0.134	<b>0.003</b>	1.55 $\pm$ 0.302	<b>0.000</b>	2.066 $\pm$ 0.323	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(18:0)	1.021 $\pm$ 0.034	1.031 $\pm$ 0.020	0.867	0.873 $\pm$ 0.032	<b>0.019</b>	1.032 $\pm$ 0.022	0.860
LC-MS/MS (+)	CE(18:1(9Z))	0.338 $\pm$ 0.051	2.289 $\pm$ 0.145	<b>0.000</b>	0.918 $\pm$ 0.247	<b>0.001</b>	1.779 $\pm$ 0.265	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(18:3(9Z,12Z,15Z))	0.458 $\pm$ 0.046	1.880 $\pm$ 0.272	<b>0.000</b>	1.024 $\pm$ 0.296	<b>0.004</b>	1.721 $\pm$ 0.315	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(19:0)	0.954 $\pm$ 0.017	1.129 $\pm$ 0.036	<b>0.000</b>	0.943 $\pm$ 0.019	0.745	1.067 $\pm$ 0.029	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	CE(20:0)	0.970 $\pm$ 0.026	1.093 $\pm$ 0.028	<b>0.012</b>	0.914 $\pm$ 0.026	0.244	1.084 $\pm$ 0.033	<b>0.023</b>
LC-MS/MS (+)	CE(20:1(11Z))	0.164 $\pm$ 0.056	2.827 $\pm$ 0.300	<b>0.000</b>	0.599 $\pm$ 0.248	<b>0.014</b>	2.083 $\pm$ 0.546	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(20:3(8Z,11Z,14Z))	1.008 $\pm$ 0.028	1.033 $\pm$ 0.019	0.617	0.925 $\pm$ 0.031	0.112	1.017 $\pm$ 0.018	0.865
LC-MS/MS (+)	CE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0.365 $\pm$ 0.026	1.916 $\pm$ 0.270	<b>0.000</b>	1.175 $\pm$ 0.433	<b>0.002</b>	1.813 $\pm$ 0.234	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	0.237 $\pm$ 0.020	2.040 $\pm$ 0.363	<b>0.000</b>	0.785 $\pm$ 0.282	<b>0.002</b>	2.464 $\pm$ 0.651	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(22:0)	0.998 $\pm$ 0.020	1.028 $\pm$ 0.042	0.482	0.912 $\pm$ 0.034	<b>0.036</b>	1.067 $\pm$ 0.055	0.151
LC-MS/MS (+)	CE(22:1(13Z))	1.248 $\pm$ 0.178	0.629 $\pm$ 0.141	0.060	0.232 $\pm$ 0.067	<b>0.002</b>	1.397 $\pm$ 0.538	0.733
LC-MS/MS (+)	CE(22:2(13Z,16Z))	0.083 $\pm$ 0.021	3.324 $\pm$ 0.624	<b>0.000</b>	0.651 $\pm$ 0.266	<b>0.001</b>	1.778 $\pm$ 0.451	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	CE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.260 $\pm$ 0.019	2.821 $\pm$ 0.492	<b>0.000</b>	0.442 $\pm$ 0.13	<b>0.029</b>	1.957 $\pm$ 0.810	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	Cer(d14:1(4E)/20:0(2OH))	0.913 $\pm$ 0.065	1.430 $\pm$ 0.217	<b>0.003</b>	0.259 $\pm$ 0.051	<b>0.000</b>	1.573 $\pm$ 0.299	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (-)	Cer(d14:2(4E,6E)/20:0)	0.805 $\pm$ 0.062	1.457 $\pm$ 0.233	<b>0.000</b>	0.241 $\pm$ 0.048	<b>0.000</b>	1.887 $\pm$ 0.434	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	Cer(d15:1/22:0)	1.807 $\pm$ 0.178	0.279 $\pm$ 0.066	<b>0.000</b>	0.029 $\pm$ 0.01	<b>0.000</b>	0.272 $\pm$ 0.057	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	Cer(d16:1/23:0)	1.382 $\pm$ 0.098	0.750 $\pm$ 0.159	<b>0.002</b>	0.234 $\pm$ 0.032	<b>0.000</b>	0.871 $\pm$ 0.109	<b>0.007</b>
LC-MS/MS (+)	Cer(d16:2(4E,6E)/22:0)	1.764 $\pm$ 0.148	0.361 $\pm$ 0.088	<b>0.000</b>	0.057 $\pm$ 0.032	<b>0.000</b>	0.290 $\pm$ 0.091	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	Cer(d16:2(4E,6E)/22:1(13Z)(2OH))	1.360 $\pm$ 0.042	1.098 $\pm$ 0.105	<b>0.008</b>	0.163 $\pm$ 0.03	<b>0.000</b>	0.658 $\pm$ 0.081	<b>0.000</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	Cer(d18:0/16:0)	0.388 ± 0.030	1.287 ± 0.254	<b>0.000</b>	0.739 ± 0.1	<b>0.000</b>	2.810 ± 0.949	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	Cer(d18:0/24:0)	0.430 ± 0.020	1.489 ± 0.414	<b>0.000</b>	1.159 ± 0.136	<b>0.000</b>	2.063 ± 0.882	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	Cer(d18:1/18:1(9Z))	1.728 ± 0.111	0.563 ± 0.109	<b>0.000</b>	0.024 ± 0.01	<b>0.000</b>	0.230 ± 0.084	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	CerP 12:2;20/22:6	0.917 ± 0.029	1.018 ± 0.068	0.118	1.171 ± 0.062	<b>0.000</b>	1.060 ± 0.060	<b>0.022</b>
LC-MS/MS (+)	cholest-5-en-3beta-yl(11Z,14Z-eicosadienoate)	0.093 ± 0.024	3.086 ± 0.412	<b>0.000</b>	0.641 ± 0.246	<b>0.000</b>	1.993 ± 0.414	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	Cholesta-4,6-dien-3-one	0.820 ± 0.009	1.133 ± 0.161	<b>0.001</b>	0.904 ± 0.019	<b>0.000</b>	1.504 ± 0.606	0.052
LC-MS/MS (+)	DG 30:0 DG 14:0_16:0	1.036 ± 0.028	0.948 ± 0.030	0.089	0.88 ± 0.031	<b>0.004</b>	1.063 ± 0.042	0.622
LC-MS/MS (+)	DG 32:1 DG 16:0_16:1	0.635 ± 0.052	0.745 ± 0.081	0.280	1.096 ± 0.176	<b>0.001</b>	2.255 ± 0.317	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	DG 34:2 DG 16:0_18:2	0.579 ± 0.058	0.981 ± 0.129	<b>0.002</b>	1.325 ± 0.232	<b>0.000</b>	1.956 ± 0.176	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	DG 35:0 DG 17:0_18:0	0.936 ± 0.039	1.076 ± 0.030	0.052	0.972 ± 0.04	0.619	1.142 ± 0.048	<b>0.007</b>
LC-MS/MS (+)	DG 38:4 DG 18:0_20:4	1.053 ± 0.086	0.751 ± 0.108	0.069	1.334 ± 0.214	0.153	0.756 ± 0.104	0.072
LC-MS/MS (+)	DG 40:4 DG 18:0_22:4	1.209 ± 0.078	0.865 ± 0.192	0.053	0.657 ± 0.102	<b>0.000</b>	0.850 ± 0.111	<b>0.020</b>
LC-MS/MS (+)	DG 40:5 DG 18:0_22:5	1.117 ± 0.082	0.702 ± 0.118	<b>0.011</b>	1.127 ± 0.521	0.977	0.819 ± 0.147	0.077
LC-MS/MS (+)	DG 41:0 DG 16:0_25:0	1.012 ± 0.022	1.012 ± 0.040	0.998	0.939 ± 0.017	0.070	1.013 ± 0.036	0.988
LC-MS (+)	DG O-8:0_15:0	1.049 ± 0.023	1.041 ± 0.073	0.896	0.928 ± 0.046	<b>0.016</b>	0.885 ± 0.050	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	DG(15:0/20:1(11Z)/0:0)	0.842 ± 0.072	0.872 ± 0.125	0.833	0.839 ± 0.108	0.986	1.763 ± 0.389	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	DG(16:0/20:1(11Z)/0:0)	0.925 ± 0.100	0.544 ± 0.066	<b>0.039</b>	1.429 ± 0.236	<b>0.027</b>	1.252 ± 0.243	0.148
LC-MS/MS (+)	DG(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0)	0.925 ± 0.075	0.724 ± 0.103	0.166	1.419 ± 0.221	<b>0.009</b>	1.083 ± 0.161	0.325
LC-MS/MS (+)	DG(16:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	1.277 ± 0.115	0.584 ± 0.062	<b>0.001</b>	0.845 ± 0.135	0.051	0.741 ± 0.104	<b>0.014</b>
LC-MS/MS (+)	DG(18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/0:0)	0.916 ± 0.022	1.105 ± 0.017	<b>0.000</b>	1.086 ± 0.017	<b>0.000</b>	1.061 ± 0.024	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	DG(18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	0.817 ± 0.049	1.080 ± 0.079	<b>0.009</b>	1.496 ± 0.095	<b>0.000</b>	0.973 ± 0.060	0.099
LC-MS/MS (+)	DG(18:3(6Z,9Z,12Z)/16:0/0:0)	0.764 ± 0.049	1.290 ± 0.032	<b>0.000</b>	1.251 ± 0.028	<b>0.000</b>	1.166 ± 0.062	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	DG(22:0/22:2(13Z,16Z)/0:0)	1.399 ± 0.250	0.308 ± 0.081	<b>0.017</b>	0.055 ± 0.009	<b>0.004</b>	1.440 ± 0.733	0.946
LC-MS/MS (+)	DG(8:0/0:0/i-13:0)	1.025 ± 0.052	0.989 ± 0.035	0.706	0.898 ± 0.04	0.184	1.038 ± 0.047	0.886

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	DG(P-14:0/18:1(9Z))	0.550 ± 0.015	1.758 ± 0.261	<b>0.000</b>	0.647 ± 0.036	<b>0.005</b>	1.945 ± 0.425	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	Docosapentaenoic acid	0.753 ± 0.069	1.370 ± 0.337	<b>0.009</b>	0.926 ± 0.293	0.403	1.445 ± 0.580	0.054
LC-MS/MS (+)	Eicosapentaenoic acid	0.548 ± 0.055	1.484 ± 0.336	<b>0.000</b>	1.269 ± 0.365	<b>0.003</b>	1.603 ± 0.330	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	Galabiosylceramide (d18:1/18:0)	1.860 ± 0.313	0.132 ± 0.034	<b>0.003</b>	0.003 ± 0	<b>0.001</b>	0.285 ± 0.133	<b>0.006</b>
LC-MS/MS (+)	Galabiosylceramide (d18:1/24:1(15Z))	1.087 ± 0.086	0.837 ± 0.176	0.168	0.256 ± 0.055	<b>0.000</b>	1.645 ± 0.881	0.289
LC-MS/MS (+)	Linoleoyl ethanolamide	0.450 ± 0.028	1.803 ± 0.409	<b>0.000</b>	0.999 ± 0.266	<b>0.001</b>	1.847 ± 0.673	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	LysoPA(18:0e/0:0)	1.006 ± 0.011	1.003 ± 0.010	0.886	0.979 ± 0.019	0.213	1.001 ± 0.028	0.827
LC-MS/MS (+)	LysoPC(15:0)	0.980 ± 0.064	0.75 ± 0.121	0.087	0.51 ± 0.096	<b>0.000</b>	1.800 ± 0.612	<b>0.029</b>
LC-MS/MS (+)	LysoPC(16:0)	1.040 ± 0.066	0.811 ± 0.105	0.084	0.48 ± 0.109	<b>0.000</b>	1.589 ± 0.450	0.055
LC-MS/MS (+)	LysoPC(18:0)	1.010 ± 0.067	0.771 ± 0.085	0.064	0.741 ± 0.216	0.117	1.459 ± 0.380	0.072
LC-MS/MS (+)	LysoPC(18:1(9Z))	1.082 ± 0.062	0.813 ± 0.115	<b>0.038</b>	0.599 ± 0.109	<b>0.000</b>	1.343 ± 0.250	0.147
LC-MS/MS (+)	LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))	0.959 ± 0.075	0.745 ± 0.086	0.134	0.708 ± 0.227	0.178	1.671 ± 0.510	<b>0.029</b>
LC-MS/MS (+)	lysoPC(26:1(5Z))	1.500 ± 0.295	0.599 ± 0.126	0.090	0.076 ± 0.013	<b>0.008</b>	0.826 ± 0.253	0.214
LC-MS/MS (+)	LysoPG(16:0/0:0)	1.014 ± 0.439	0.637 ± 0.065	0.625	0.55 ± 0.02	0.547	1.772 ± 1.153	0.454
LC-MS/MS (+)	MG(0:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)	1.012 ± 0.012	0.992 ± 0.009	0.367	0.967 ± 0.02	0.070	1.005 ± 0.019	0.769
LC-MS/MS (+)	MG(0:0/i-14:0/0:0)	1.037 ± 0.037	0.997 ± 0.032	0.553	0.878 ± 0.036	<b>0.024</b>	1.013 ± 0.027	0.711
LC-MS/MS (+)	MG(16:0/0:0/0:0)	1.020 ± 0.016	0.991 ± 0.015	0.317	0.941 ± 0.022	<b>0.013</b>	1.008 ± 0.015	0.669
LC-MS/MS (+)	MG(17:0/0:0/0:0)	1.013 ± 0.040	1.006 ± 0.032	0.923	0.877 ± 0.028	0.062	1.079 ± 0.038	0.371
LC-MS/MS (+)	MG(18:0/0:0/0:0)	1.013 ± 0.013	0.986 ± 0.011	0.259	0.965 ± 0.021	0.072	1.010 ± 0.020	0.895
LC-MS/MS (+)	MG(18:1(9Z)/0:0/0:0)	0.998 ± 0.039	1.053 ± 0.026	0.432	0.925 ± 0.04	0.323	1.029 ± 0.047	0.674
LC-MS/MS (+)	MG(18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0/0:0)	0.992 ± 0.022	1.026 ± 0.019	0.388	0.947 ± 0.024	0.272	1.050 ± 0.022	0.150
LC-MS/MS (+)	MG(20:0/0:0/0:0)	1.042 ± 0.047	0.985 ± 0.031	0.500	0.867 ± 0.034	<b>0.043</b>	1.020 ± 0.030	0.794
LC-MS/MS (+)	MG(a-15:0/0:0/0:0)[rac]	1.022 ± 0.032	0.993 ± 0.031	0.617	0.881 ± 0.039	<b>0.022</b>	1.062 ± 0.035	0.497
LC-MS/MS (+)	MG(i-22:0/0:0/0:0)	1.121 ± 0.069	0.978 ± 0.082	0.275	0.746 ± 0.029	<b>0.004</b>	0.911 ± 0.040	0.094

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	MG(P-18:0e/0:0/0:0)	0.679 ± 0.044	1.299 ± 0.224	<b>0.000</b>	1.489 ± 0.425	<b>0.002</b>	1.173 ± 0.228	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	N-(2-hydroxyeicosanoyl)sphinganine	0.960 ± 0.012	1.044 ± 0.015	<b>0.000</b>	1.033 ± 0.017	<b>0.002</b>	1.042 ± 0.025	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	N-(2-hydroxytetraacosanoyl)sphinganine	0.914 ± 0.074	1.065 ± 0.265	0.447	0.876 ± 0.113	0.794	1.316 ± 0.411	0.136
LC-MS/MS (+)	N,N-diethyl arachidonoyl amine	1.012 ± 0.059	0.981 ± 0.057	0.772	1.006 ± 0.068	0.953	0.976 ± 0.088	0.747
LC-MS/MS (+)	NAE 17:0	1.201 ± 0.096	0.698 ± 0.176	<b>0.013</b>	0.625 ± 0.263	<b>0.013</b>	1.073 ± 0.234	0.550
LC-MS/MS (+)	N-ethyl arachidonoyl amine	0.963 ± 0.057	1.03 ± 0.084	0.545	1.094 ± 0.131	0.293	0.985 ± 0.094	0.847
LC-MS/MS (+)	Nonadeca-10(Z)-enoic acid	1.208 ± 0.095	0.679 ± 0.167	<b>0.008</b>	0.616 ± 0.256	<b>0.010</b>	1.081 ± 0.233	0.551
LC-MS/MS (+)	Norcholic acid	1.002 ± 0.044	1.051 ± 0.025	0.532	0.909 ± 0.043	0.253	1.033 ± 0.039	0.697
LC-MS/MS (+)	Oleamide	1.004 ± 0.114	0.739 ± 0.166	0.235	1.011 ± 0.315	0.978	1.237 ± 0.333	0.399
LC-MS/MS (-)	Oleic acid	0.784 ± 0.048	0.928 ± 0.163	0.255	1.073 ± 0.268	0.101	1.647 ± 0.470	<b>0.003</b>
LC-MS/MS (+)	Oleoylethanolamide	0.747 ± 0.060	0.913 ± 0.167	0.245	0.902 ± 0.243	0.373	1.944 ± 0.509	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PA(14:1(9Z)/14:0)	0.960 ± 0.040	1.175 ± 0.046	<b>0.006</b>	0.882 ± 0.041	0.296	1.063 ± 0.073	0.209
LC-MS/MS (+)	PA(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0.984 ± 0.023	1.046 ± 0.016	0.132	0.961 ± 0.025	0.588	1.043 ± 0.046	0.215
LC-MS/MS (+)	PA(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/16:0)	0.920 ± 0.017	1.093 ± 0.023	<b>0.000</b>	1.082 ± 0.027	<b>0.000</b>	1.067 ± 0.034	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PA(20:1(11Z)/15:0)	1.334 ± 0.308	1.387 ± 0.482	0.931	0.35 ± 0.084	0.074	0.260 ± 0.071	0.052
LC-MS/MS (+)	PA(O-16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.032 ± 0.060	1.039 ± 0.026	0.949	0.882 ± 0.057	0.175	0.982 ± 0.057	0.647
LC-MS/MS (-)	PA(P-18:0/14:1(9Z))	0.801 ± 0.077	0.796 ± 0.159	0.974	1.423 ± 0.452	<b>0.036</b>	1.379 ± 0.401	<b>0.033</b>
LC-MS/MS (+)	Palmitic acid	1.020 ± 0.016	0.986 ± 0.016	0.244	0.939 ± 0.022	<b>0.009</b>	1.015 ± 0.018	0.866
LC-MS/MS (+)	Palmitoleoyl Ethanolamide	0.551 ± 0.053	1.322 ± 0.275	<b>0.000</b>	1.306 ± 0.375	<b>0.002</b>	1.718 ± 0.387	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC 32:0 PC 16:0_16:0	1.386 ± 0.086	0.725 ± 0.075	<b>0.000</b>	0.503 ± 0.051	<b>0.000</b>	0.614 ± 0.091	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 33:0 PC 12:0_21:0	0.806 ± 0.037	1.397 ± 0.378	<b>0.011</b>	0.544 ± 0.11	<b>0.005</b>	1.641 ± 0.396	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (-)	PC 34:0 PC 16:0_18:0	1.632 ± 0.138	0.466 ± 0.054	<b>0.000</b>	0.284 ± 0.055	<b>0.000</b>	0.355 ± 0.047	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 34:0 PC 17:0_17:0	1.466 ± 0.061	0.664 ± 0.073	<b>0.000</b>	0.447 ± 0.067	<b>0.000</b>	0.490 ± 0.050	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC 34:1 PC 16:0_18:1	1.342 ± 0.053	0.713 ± 0.07	<b>0.000</b>	0.573 ± 0.061	<b>0.000</b>	0.688 ± 0.091	<b>0.000</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (-)	PC 34:2 PC 16:1_18:1	0.681 ± 0.040	1.221 ± 0.132	<b>0.000</b>	1.097 ± 0.166	<b>0.001</b>	1.641 ± 0.194	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 35:1 PC 19:0_16:1	1.431 ± 0.053	0.630 ± 0.075	<b>0.000</b>	0.401 ± 0.06	<b>0.000</b>	0.674 ± 0.107	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 36:0 PC 18:0_18:0	1.591 ± 0.153	0.642 ± 0.076	<b>0.001</b>	0.087 ± 0.037	<b>0.000</b>	0.500 ± 0.071	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 36:1 PC 10:0_26:1	1.312 ± 0.018	0.639 ± 0.064	<b>0.000</b>	0.764 ± 0.085	<b>0.000</b>	0.662 ± 0.069	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC 36:1 PC 16:0_20:1	1.500 ± 0.071	0.441 ± 0.050	<b>0.000</b>	0.538 ± 0.101	<b>0.000</b>	0.520 ± 0.077	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC 36:3 PC 18:1_18:2	0.804 ± 0.042	1.012 ± 0.139	0.057	1.049 ± 0.23	0.107	1.528 ± 0.271	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC 36:4 PC 16:0_20:4	1.171 ± 0.080	0.692 ± 0.065	<b>0.002</b>	0.858 ± 0.103	<b>0.044</b>	0.936 ± 0.183	0.182
LC-MS/MS (+)	PC 40:2 PC 15:1_25:1	1.429 ± 0.116	0.577 ± 0.103	<b>0.000</b>	0.253 ± 0.035	<b>0.000</b>	0.883 ± 0.172	<b>0.019</b>
LC-MS/MS (+)	PC 42:0 PC 21:0_21:0	1.372 ± 0.157	0.886 ± 0.347	0.157	0.139 ± 0.018	<b>0.000</b>	0.859 ± 0.201	0.091
LC-MS/MS (+)	PC 42:2 PC 21:1_21:1	1.690 ± 0.219	0.337 ± 0.126	<b>0.001</b>	0.064 ± 0.008	<b>0.000</b>	0.528 ± 0.17	<b>0.005</b>
LC-MS/MS (+)	PC 44:1 PC 11:0_33:1	1.694 ± 0.244	0.215 ± 0.051	<b>0.001</b>	0.024 ± 0.005	<b>0.000</b>	0.678 ± 0.249	<b>0.028</b>
LC-MS/MS (+)	PC 44:2 PC 22:1_22:1	1.828 ± 0.253	0.133 ± 0.036	<b>0.000</b>	0.009 ± 0.002	<b>0.000</b>	0.374 ± 0.176	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/14:0)	0.899 ± 0.047	1.297 ± 0.522	0.200	0.363 ± 0.045	<b>0.000</b>	1.642 ± 0.419	<b>0.005</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/15:0)	0.822 ± 0.050	1.035 ± 0.274	0.235	0.431 ± 0.061	<b>0.000</b>	2.069 ± 0.653	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/16:0)	1.313 ± 0.064	0.770 ± 0.117	<b>0.000</b>	0.542 ± 0.033	<b>0.000</b>	0.748 ± 0.095	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/18:0)	1.242 ± 0.037	0.862 ± 0.064	<b>0.000</b>	0.689 ± 0.054	<b>0.000</b>	0.724 ± 0.076	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.406 ± 0.079	0.953 ± 0.292	<b>0.041</b>	0.351 ± 0.064	<b>0.000</b>	0.479 ± 0.127	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.644 ± 0.094	0.513 ± 0.136	<b>0.000</b>	0.019 ± 0.004	<b>0.000</b>	0.537 ± 0.122	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(14:1(9Z)/16:0)	0.909 ± 0.049	0.634 ± 0.180	<b>0.045</b>	0.361 ± 0.035	<b>0.000</b>	2.279 ± 0.821	<b>0.006</b>
LC-MS/MS (-)	PC(14:1(9Z)/18:0)	1.047 ± 0.062	1.362 ± 0.348	0.167	0.399 ± 0.044	<b>0.000</b>	1.098 ± 0.254	0.775
LC-MS/MS (+)	PC(15:0/16:0)	0.708 ± 0.039	1.282 ± 0.569	0.088	0.434 ± 0.079	<b>0.001</b>	2.159 ± 0.474	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(15:0/18:1(9Z))	1.380 ± 0.061	0.67 ± 0.100	<b>0.000</b>	0.293 ± 0.034	<b>0.000</b>	0.896 ± 0.170	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PC(15:0/18:2(9Z,12Z))	0.602 ± 0.071	1.507 ± 0.318	<b>0.000</b>	0.824 ± 0.17	0.164	1.863 ± 0.286	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(15:0/20:1(11Z))	1.320 ± 0.070	0.836 ± 0.109	<b>0.001</b>	0.387 ± 0.061	<b>0.000</b>	0.817 ± 0.120	<b>0.001</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	PC(15:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.093 ± 0.081	0.917 ± 0.139	0.282	0.713 ± 0.122	<b>0.020</b>	1.091 ± 0.268	0.993
LC-MS/MS (+)	PC(16:0/18:0)	0.584 ± 0.065	1.281 ± 0.150	<b>0.000</b>	0.634 ± 0.047	0.672	2.333 ± 0.716	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(16:0/18:1(11Z))	1.159 ± 0.008	0.888 ± 0.052	<b>0.000</b>	0.805 ± 0.047	<b>0.000</b>	0.830 ± 0.054	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))	0.817 ± 0.059	1.301 ± 0.275	<b>0.013</b>	0.76 ± 0.153	0.674	1.487 ± 0.259	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PC(16:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	1.047 ± 0.073	0.869 ± 0.215	0.316	0.829 ± 0.17	0.179	1.162 ± 0.323	0.605
LC-MS/MS (+)	PC(16:1(9Z)/20:1(11Z))	1.255 ± 0.046	0.755 ± 0.070	<b>0.000</b>	0.623 ± 0.074	<b>0.000</b>	0.856 ± 0.097	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(16:1(9Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1.113 ± 0.059	0.782 ± 0.117	<b>0.010</b>	0.954 ± 0.181	0.280	0.925 ± 0.153	0.171
LC-MS/MS (-)	PC(18:0/20:0)	1.685 ± 0.092	0.414 ± 0.071	<b>0.000</b>	0.014 ± 0.002	<b>0.000</b>	0.515 ± 0.112	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(11Z)/14:0)	1.371 ± 0.085	0.910 ± 0.325	0.057	0.481 ± 0.106	<b>0.000</b>	0.496 ± 0.130	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(11Z)/16:1(9Z))	0.821 ± 0.035	1.134 ± 0.099	<b>0.000</b>	1.022 ± 0.137	<b>0.047</b>	1.381 ± 0.123	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(11Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.741 ± 0.036	1.131 ± 0.293	<b>0.033</b>	1.418 ± 0.373	<b>0.003</b>	1.227 ± 0.198	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(9Z)/14:1(9Z))	0.706 ± 0.040	1.097 ± 0.286	<b>0.031</b>	0.678 ± 0.132	0.786	2.109 ± 0.539	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(9Z)/20:2(11Z,14Z))	0.311 ± 0.021	1.716 ± 0.094	<b>0.000</b>	1.54 ± 0.196	<b>0.000</b>	1.810 ± 0.278	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.261 ± 0.095	0.846 ± 0.150	<b>0.030</b>	0.426 ± 0.06	<b>0.000</b>	0.945 ± 0.166	0.103
LC-MS/MS (+)	PC(18:2(9Z,12Z)/14:1(9Z))	1.270 ± 0.047	0.871 ± 0.134	<b>0.001</b>	0.569 ± 0.04	<b>0.000</b>	0.749 ± 0.083	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	0.644 ± 0.043	1.162 ± 0.199	<b>0.000</b>	1.3 ± 0.328	<b>0.002</b>	1.605 ± 0.352	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/20:0)	0.916 ± 0.059	1.238 ± 0.115	<b>0.011</b>	0.891 ± 0.077	0.826	1.123 ± 0.177	0.154
LC-MS/MS (+)	PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/20:3(8Z,11Z,14Z))	0.855 ± 0.073	0.921 ± 0.199	0.698	1.119 ± 0.272	0.192	1.394 ± 0.243	<b>0.006</b>
LC-MS/MS (+)	PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0.916 ± 0.026	1.006 ± 0.069	0.138	1.252 ± 0.04	<b>0.000</b>	0.995 ± 0.076	0.211
LC-MS/MS (+)	PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	0.891 ± 0.066	0.935 ± 0.176	0.773	1.068 ± 0.232	0.314	1.322 ± 0.212	<b>0.013</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.009 ± 0.033	1.181 ± 0.232	0.235	0.775 ± 0.116	<b>0.010</b>	1.017 ± 0.139	0.932
LC-MS/MS (-)	PC(20:1(11Z)/15:0)	1.551 ± 0.095	0.389 ± 0.047	<b>0.000</b>	0.41 ± 0.064	<b>0.000</b>	0.548 ± 0.134	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:2(11Z,14Z)/15:0)	1.375 ± 0.116	0.629 ± 0.101	<b>0.001</b>	0.346 ± 0.077	<b>0.000</b>	0.899 ± 0.111	<b>0.029</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:2(11Z,14Z)/16:0)	0.326 ± 0.027	1.645 ± 0.120	<b>0.000</b>	1.39 ± 0.154	<b>0.000</b>	1.986 ± 0.278	<b>0.000</b>



**Tablo 4.12. (Devam)** LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	PC(20:2(11Z,14Z)/18:0)	0.736 ± 0.045	2.132 ± 0.482	<b>0.000</b>	0.627 ± 0.053	0.201	1.034 ± 0.114	<b>0.005</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:2(11Z,14Z)/20:2(11Z,14Z))	1.267 ± 0.053	1.084 ± 0.221	0.245	0.452 ± 0.083	<b>0.000</b>	0.663 ± 0.080	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:2(11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.037 ± 0.054	0.966 ± 0.297	0.711	0.885 ± 0.179	0.273	1.038 ± 0.228	0.997
LC-MS/MS (-)	PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/16:0)	0.981 ± 0.066	1.226 ± 0.145	0.088	0.678 ± 0.031	<b>0.012</b>	1.153 ± 0.205	0.297
LC-MS/MS (+)	PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.179 ± 0.109	0.694 ± 0.093	<b>0.017</b>	0.42 ± 0.05	<b>0.000</b>	1.349 ± 0.329	0.524
LC-MS/MS (+)	PC(20:3(8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.505 ± 0.137	0.728 ± 0.058	<b>0.002</b>	0.08 ± 0.011	<b>0.000</b>	0.676 ± 0.130	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.632 ± 0.176	0.360 ± 0.048	<b>0.000</b>	0.078 ± 0.013	<b>0.000</b>	0.667 ± 0.173	<b>0.004</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/18:1(11Z))	1.278 ± 0.063	0.687 ± 0.103	<b>0.000</b>	0.735 ± 0.141	<b>0.000</b>	0.746 ± 0.098	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/16:0)	1.149 ± 0.077	0.745 ± 0.172	<b>0.019</b>	0.848 ± 0.214	0.103	0.960 ± 0.249	0.338
LC-MS/MS (+)	PC(22:0/14:0)	1.318 ± 0.181	0.671 ± 0.071	<b>0.048</b>	0.33 ± 0.043	<b>0.003</b>	1.045 ± 0.261	0.439
LC-MS/MS (+)	PC(22:2(13Z,16Z)/20:2(11Z,14Z))	1.662 ± 0.174	0.448 ± 0.077	<b>0.000</b>	0.151 ± 0.019	<b>0.000</b>	0.416 ± 0.092	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:0)	1.643 ± 0.123	0.500 ± 0.053	<b>0.000</b>	0.064 ± 0.014	<b>0.000</b>	0.507 ± 0.079	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:0)	0.606 ± 0.062	1.658 ± 0.495	<b>0.001</b>	0.282 ± 0.045	<b>0.005</b>	2.241 ± 1.096	<b>0.012</b>
LC-MS/MS (+)	PC(o-14:0/16:0)	0.768 ± 0.039	1.480 ± 0.256	<b>0.000</b>	0.609 ± 0.102	0.077	1.606 ± 0.300	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(o-14:0/16:1(9Z))	0.175 ± 0.020	1.462 ± 0.390	<b>0.000</b>	1.282 ± 0.167	<b>0.000</b>	2.730 ± 0.722	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(o-16:0/16:1(9Z))	0.390 ± 0.029	1.646 ± 0.330	<b>0.000</b>	1.135 ± 0.087	<b>0.000</b>	2.050 ± 0.524	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PC(o-16:0/18:0)	1.283 ± 0.105	1.139 ± 0.159	0.484	0.492 ± 0.093	<b>0.000</b>	0.521 ± 0.101	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(o-22:2(13Z,16Z)/20:2(11Z,14Z))	1.044 ± 0.406	0.582 ± 0.021	0.518	0.61 ± 0.014	0.543	1.678 ± 1.063	0.498
LC-MS/MS (+)	PC(P-16:0/16:1(9Z))	1.475 ± 0.184	0.292 ± 0.038	<b>0.001</b>	0.733 ± 0.135	<b>0.030</b>	0.550 ± 0.128	<b>0.007</b>
LC-MS/MS (+)	PC(P-16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	0.888 ± 0.529	0.467 ± 0.022	0.651	0.507 ± 0.019	0.681	2.362 ± 1.879	0.300
LC-MS/MS (-)	PC(P-16:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	0.876 ± 0.045	0.998 ± 0.133	0.266	1.263 ± 0.175	<b>0.004</b>	1.111 ± 0.196	0.090
LC-MS/MS (-)	PC(P-16:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.065 ± 0.129	0.398 ± 0.038	<b>0.005</b>	1.684 ± 0.264	<b>0.027</b>	0.722 ± 0.138	0.157
LC-MS/MS (+)	PC(P-18:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	0.149 ± 0.016	1.393 ± 0.222	<b>0.000</b>	2.119 ± 0.206	<b>0.000</b>	2.040 ± 0.391	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PC(P-18:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	0.855 ± 0.026	1.644 ± 0.172	<b>0.000</b>	0.665 ± 0.053	<b>0.001</b>	1.126 ± 0.140	<b>0.005</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (-)	PC(P-18:1(11Z)/14:0)	1.631 ± 0.220	0.085 ± 0.000	<b>0.000</b>	0.522 ± 0.23	<b>0.009</b>	0.501 ± 0.222	<b>0.008</b>
LC-MS/MS (-)	PE 36:1 PE 18:0_18:1	1.168 ± 0.058	0.465 ± 0.063	<b>0.000</b>	1.14 ± 0.088	0.803	0.890 ± 0.156	<b>0.043</b>
LC-MS/MS (-)	PE 36:4 PE 16:0_20:4	1.027 ± 0.067	0.607 ± 0.086	<b>0.002</b>	1.321 ± 0.106	<b>0.030</b>	0.992 ± 0.275	0.857
LC-MS/MS (-)	PE 38:5 PE 18:1_20:4	1.487 ± 0.083	0.497 ± 0.066	<b>0.000</b>	0.443 ± 0.081	<b>0.000</b>	0.599 ± 0.150	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE 38:6 PE 16:0_22:6	1.749 ± 0.132	0.373 ± 0.083	<b>0.000</b>	0.088 ± 0.012	<b>0.000</b>	0.292 ± 0.078	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE 38:6 PE 19:3_19:3	1.763 ± 0.112	0.372 ± 0.085	<b>0.000</b>	0.081 ± 0.011	<b>0.000</b>	0.259 ± 0.056	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE 40:5 PE 18:0_22:5	1.663 ± 0.158	0.454 ± 0.110	<b>0.000</b>	0.198 ± 0.051	<b>0.000</b>	0.360 ± 0.089	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE 40:6 PE 14:0_26:6	1.781 ± 0.078	0.341 ± 0.096	<b>0.000</b>	0.028 ± 0.008	<b>0.000</b>	0.289 ± 0.076	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE 40:6 PE 18:0_22:6	1.881 ± 0.151	0.168 ± 0.053	<b>0.000</b>	0.017 ± 0.003	<b>0.000</b>	0.171 ± 0.051	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE 40:7 PE 18:1_22:6	1.765 ± 0.129	0.345 ± 0.124	<b>0.000</b>	0.107 ± 0	<b>0.000</b>	0.254 ± 0.078	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE O-34:2 PE O-16:1_18:1	1.104 ± 0.139	0.293 ± 0.045	<b>0.002</b>	1.602 ± 0.225	0.075	0.793 ± 0.208	0.255
LC-MS/MS (-)	PE O-36:2 PE O-16:1_20:1	1.429 ± 0.133	0.274 ± 0.038	<b>0.000</b>	0.904 ± 0.212	0.050	0.536 ± 0.125	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (-)	PE O-40:5 PE O-18:2_22:3	1.799 ± 0.105	0.261 ± 0.054	<b>0.000</b>	0.101 ± 0.021	<b>0.000</b>	0.240 ± 0.056	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE O-40:7 PE O-18:1_22:6	1.801 ± 0.150	0.280 ± 0.061	<b>0.000</b>	0.054 ± 0.011	<b>0.000</b>	0.264 ± 0.073	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE O-40:8 PE O-18:2_22:6	1.711 ± 0.091	0.385 ± 0.067	<b>0.000</b>	0.09 ± 0.014	<b>0.000</b>	0.391 ± 0.109	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-34:0 PE P-18:0_16:0	1.576 ± 0.084	0.510 ± 0.094	<b>0.000</b>	0.397 ± 0.046	<b>0.000</b>	0.365 ± 0.054	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-34:2 PE P-18:1_16:1	0.757 ± 0.045	0.561 ± 0.071	<b>0.030</b>	0.929 ± 0.105	0.086	2.240 ± 0.737	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-36:1 PE P-16:0_20:1	1.352 ± 0.072	0.349 ± 0.047	<b>0.000</b>	1.013 ± 0.2	0.050	0.581 ± 0.121	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-40:2 PE P-18:1_22:1	1.627 ± 0.165	0.263 ± 0.030	<b>0.000</b>	0.273 ± 0.023	<b>0.000</b>	0.581 ± 0.161	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-40:4 PE P-20:0_20:4	1.712 ± 0.055	0.380 ± 0.078	<b>0.000</b>	0.163 ± 0.031	<b>0.000</b>	0.319 ± 0.072	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-42:4 PE P-18:0_24:4	1.517 ± 0.099	0.582 ± 0.127	<b>0.000</b>	0.299 ± 0.057	<b>0.000</b>	0.569 ± 0.161	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE P-42:5 PE P-18:1_24:4	1.873 ± 0.321	0.086 ± 0.015	<b>0.003</b>	0.037 ± 0.006	<b>0.002</b>	0.257 ± 0.119	<b>0.006</b>
LC-MS/MS (+)	PE(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.194 ± 0.082	0.569 ± 0.099	<b>0.000</b>	1.005 ± 0.086	0.213	0.843 ± 0.258	0.091
LC-MS/MS (-)	PE(16:1(9Z)/18:1(9Z))	0.671 ± 0.060	1.023 ± 0.195	<b>0.024</b>	1.269 ± 0.175	<b>0.000</b>	1.696 ± 0.311	<b>0.000</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC- $\alpha$ TOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p	Ortalama $\pm$ SH	p
LC-MS/MS (-)	PE(16:1(9Z)/20:0)	1.290 $\pm$ 0.063	0.758 $\pm$ 0.093	<b>0.000</b>	0.333 $\pm$ 0.036	<b>0.000</b>	1.038 $\pm$ 0.191	0.109
LC-MS/MS (-)	PE(16:1(9Z)/20:1(11Z))	1.385 $\pm$ 0.082	0.463 $\pm$ 0.071	<b>0.000</b>	0.403 $\pm$ 0.059	<b>0.000</b>	0.980 $\pm$ 0.205	<b>0.033</b>
LC-MS/MS (-)	PE(18:3(9Z,12Z,15Z)/20:0)	1.077 $\pm$ 0.078	0.899 $\pm$ 0.130	0.258	0.719 $\pm$ 0.114	<b>0.022</b>	1.151 $\pm$ 0.273	0.722
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/18:3(6Z,9Z,12Z))	0.933 $\pm$ 0.137	0.396 $\pm$ 0.126	<b>0.036</b>	2.326 $\pm$ 0.702	<b>0.004</b>	0.478 $\pm$ 0.131	0.075
LC-MS/MS (-)	PE(20:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	1.472 $\pm$ 0.072	0.759 $\pm$ 0.176	<b>0.000</b>	0.356 $\pm$ 0.041	<b>0.000</b>	0.468 $\pm$ 0.067	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/20:2(11Z,14Z))	1.303 $\pm$ 0.114	0.662 $\pm$ 0.101	<b>0.003</b>	0.402 $\pm$ 0.071	<b>0.000</b>	1.027 $\pm$ 0.113	0.193
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.135 $\pm$ 0.067	0.742 $\pm$ 0.098	<b>0.004</b>	0.774 $\pm$ 0.156	<b>0.018</b>	1.079 $\pm$ 0.205	0.733
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.564 $\pm$ 0.114	0.576 $\pm$ 0.076	<b>0.000</b>	0.122 $\pm$ 0.015	<b>0.000</b>	0.609 $\pm$ 0.108	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(20:1(11Z)/14:0)	0.819 $\pm$ 0.053	1.304 $\pm$ 0.532	0.130	0.315 $\pm$ 0.036	<b>0.000</b>	1.925 $\pm$ 0.549	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/18:0)	1.144 $\pm$ 0.084	0.930 $\pm$ 0.190	0.245	0.962 $\pm$ 0.21	0.339	0.675 $\pm$ 0.156	<b>0.009</b>
LC-MS/MS (-)	PE(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	1.596 $\pm$ 0.127	0.476 $\pm$ 0.132	<b>0.000</b>	0.107 $\pm$ 0.029	<b>0.000</b>	0.629 $\pm$ 0.184	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.916 $\pm$ 0.145	0.133 $\pm$ 0.044	<b>0.000</b>	0.016 $\pm$ 0.003	<b>0.000</b>	0.102 $\pm$ 0.034	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:1(9Z))	1.684 $\pm$ 0.117	0.491 $\pm$ 0.076	<b>0.000</b>	0.061 $\pm$ 0.012	<b>0.000</b>	0.395 $\pm$ 0.090	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:2(9Z,12Z))	1.631 $\pm$ 0.098	0.459 $\pm$ 0.075	<b>0.000</b>	0.198 $\pm$ 0.028	<b>0.000</b>	0.450 $\pm$ 0.064	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.882 $\pm$ 0.189	0.132 $\pm$ 0.037	<b>0.000</b>	0.041 $\pm$ 0.005	<b>0.000</b>	0.182 $\pm$ 0.052	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE(O-16:0/19:0)	0.708 $\pm$ 0.038	1.785 $\pm$ 0.193	<b>0.000</b>	0.911 $\pm$ 0.095	<b>0.020</b>	1.181 $\pm$ 0.223	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	PE(O-18:1(1Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.460 $\pm$ 0.074	0.663 $\pm$ 0.132	<b>0.000</b>	0.401 $\pm$ 0.052	<b>0.000</b>	0.556 $\pm$ 0.099	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(O-18:1(9Z)/0:0)	0.823 $\pm$ 0.046	0.967 $\pm$ 0.139	0.207	0.952 $\pm$ 0.394	0.589	1.611 $\pm$ 0.487	<b>0.009</b>
LC-MS/MS (+)	PE(O-20:0/20:2(11Z,14Z))	1.415 $\pm$ 0.130	0.466 $\pm$ 0.049	<b>0.000</b>	0.628 $\pm$ 0.069	<b>0.001</b>	0.66 $\pm$ 0.143	<b>0.003</b>
LC-MS/MS (-)	PE(O-20:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.872 $\pm$ 0.306	0.084 $\pm$ 0.018	<b>0.002</b>	0.019 $\pm$ 0.007	<b>0.001</b>	0.281 $\pm$ 0.130	<b>0.005</b>
LC-MS/MS (+)	PE(P-16:0/18:1(9Z))	0.964 $\pm$ 0.100	0.428 $\pm$ 0.062	<b>0.004</b>	1.836 $\pm$ 0.243	<b>0.000</b>	0.844 $\pm$ 0.148	0.539
LC-MS/MS (-)	PE(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0.436 $\pm$ 0.023	0.904 $\pm$ 0.178	<b>0.000</b>	2.293 $\pm$ 0.207	<b>0.000</b>	1.494 $\pm$ 0.372	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PE(P-18:0/20:2(11Z,14Z))	1.851 $\pm$ 0.249	0.101 $\pm$ 0.024	<b>0.000</b>	0.049 $\pm$ 0.005	<b>0.000</b>	0.296 $\pm$ 0.123	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	PE(P-18:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	1.223 $\pm$ 0.167	0.448 $\pm$ 0.139	<b>0.013</b>	1.366 $\pm$ 0.554	0.739	0.517 $\pm$ 0.135	<b>0.023</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	PE(P-18:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	0.930 ± 0.048	0.981 ± 0.308	0.793	1.509 ± 0.412	<b>0.024</b>	0.720 ± 0.160	0.096
LC-MS/MS (+)	PE(P-18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.531 ± 0.039	0.600 ± 0.084	<b>0.000</b>	0.199 ± 0.027	<b>0.000</b>	0.607 ± 0.113	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PE(P-20:0/22:2(13Z,16Z))	1.257 ± 0.135	0.411 ± 0.071	<b>0.001</b>	0.784 ± 0.068	0.053	1.035 ± 0.365	0.482
LC-MS/MS (-)	PE(P-20:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1.648 ± 0.167	0.416 ± 0.103	<b>0.000</b>	0.197 ± 0.052	<b>0.000</b>	0.441 ± 0.117	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PG(16:0/18:1(11Z))	1.041 ± 0.094	0.533 ± 0.133	<b>0.007</b>	1.506 ± 0.392	0.099	0.837 ± 0.188	0.301
LC-MS/MS (+)	PG(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0.731 ± 0.089	0.377 ± 0.084	<b>0.034</b>	2.637 ± 1.053	<b>0.003</b>	0.793 ± 0.345	0.802
LC-MS/MS (+)	PG(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)	1.023 ± 0.077	1.088 ± 0.067	0.642	0.866 ± 0.062	0.262	0.979 ± 0.076	0.756
LC-MS/MS (+)	PI(14:1(9Z)/14:1(9Z))	1.013 ± 0.037	1.038 ± 0.021	0.709	0.877 ± 0.051	0.063	1.046 ± 0.083	0.682
LC-MS/MS (+)	PI(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.233 ± 0.110	0.840 ± 0.266	0.114	0.702 ± 0.086	<b>0.010</b>	0.759 ± 0.269	0.059
LC-MS/MS (+)	PI(18:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.259 ± 0.096	0.787 ± 0.229	<b>0.030</b>	0.747 ± 0.115	<b>0.006</b>	0.689 ± 0.219	<b>0.009</b>
LC-MS/MS (+)	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/18:1(9Z))	1.000 ± 0.058	1.094 ± 0.045	0.373	0.846 ± 0.048	0.149	1.059 ± 0.088	0.606
LC-MS/MS (-)	PS 40:6 PS 18:0_22:6	1.732 ± 0.151	0.386 ± 0.069	<b>0.000</b>	0.079 ± 0.011	<b>0.000</b>	0.339 ± 0.092	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PS(18:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	1.577 ± 0.156	0.584 ± 0.188	<b>0.001</b>	0.335 ± 0.136	<b>0.000</b>	0.351 ± 0.104	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PS(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/18:0)	0.817 ± 0.044	0.831 ± 0.102	0.880	1.823 ± 0.257	<b>0.000</b>	0.896 ± 0.124	0.448
LC-MS/MS (-)	PS(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/18:0)	1.332 ± 0.078	0.895 ± 0.145	<b>0.009</b>	0.407 ± 0.057	<b>0.000</b>	0.700 ± 0.140	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PS(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/20:2(11Z,14Z))	1.516 ± 0.087	0.670 ± 0.102	<b>0.000</b>	0.227 ± 0.041	<b>0.000</b>	0.555 ± 0.089	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PS(O-16:0/19:1(9Z))	1.404 ± 0.053	0.969 ± 0.147	<b>0.001</b>	0.163 ± 0.054	<b>0.000</b>	0.657 ± 0.138	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PS(O-20:0/16:0)	1.094 ± 0.016	0.937 ± 0.03	<b>0.000</b>	0.883 ± 0.025	<b>0.000</b>	0.900 ± 0.013	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	PS(P-16:0/20:0)	1.666 ± 0.085	0.512 ± 0.113	<b>0.000</b>	0.104 ± 0.022	<b>0.000</b>	0.386 ± 0.084	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d16:1/17:0)	0.250 ± 0.021	1.100 ± 0.181	<b>0.000</b>	2.44 ± 0.398	<b>0.000</b>	1.710 ± 0.243	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/16:1(9Z))	0.646 ± 0.026	0.972 ± 0.058	<b>0.000</b>	1.641 ± 0.108	<b>0.000</b>	1.449 ± 0.101	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/18:0)	1.224 ± 0.072	0.662 ± 0.15	<b>0.001</b>	1.185 ± 0.101	0.782	0.481 ± 0.082	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/18:1(9Z))	1.465 ± 0.050	0.700 ± 0.077	<b>0.000</b>	0.515 ± 0.106	<b>0.000</b>	0.390 ± 0.090	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/22:0)	0.364 ± 0.027	0.402 ± 0.086	0.571	3.839 ± 0.354	<b>0.000</b>	0.668 ± 0.127	<b>0.001</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/24:0)	0.582 ± 0.084	0.541 ± 0.135	0.802	2.977 ± 0.428	<b>0.000</b>	0.735 ± 0.184	0.396
LC-MS/MS (+)	SM(d18:0/24:1(15Z))	0.973 ± 0.155	0.332 ± 0.065	<b>0.023</b>	2.162 ± 0.314	<b>0.001</b>	0.585 ± 0.099	0.167
LC-MS/MS (-)	SM(d18:0/26:1(17Z))	1.677 ± 0.200	0.140 ± 0.029	<b>0.000</b>	0.501 ± 0.078	<b>0.002</b>	0.329 ± 0.098	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:1/14:0)	0.394 ± 0.023	0.837 ± 0.097	<b>0.000</b>	2.164 ± 0.451	<b>0.000</b>	1.817 ± 0.269	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:1/17:0)	0.780 ± 0.054	1.338 ± 0.168	<b>0.000</b>	1.385 ± 0.214	<b>0.000</b>	0.938 ± 0.083	0.140
LC-MS/MS (+)	SM(d18:1/18:1(9Z))	1.315 ± 0.095	1.226 ± 0.205	0.661	0.358 ± 0.117	<b>0.000</b>	0.472 ± 0.121	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:1/22:0)	0.469 ± 0.023	0.615 ± 0.076	<b>0.018</b>	3.002 ± 0.221	<b>0.000</b>	0.975 ± 0.115	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	SM(d18:1/23:0)	0.847 ± 0.068	0.820 ± 0.107	0.837	1.226 ± 0.092	<b>0.005</b>	1.413 ± 0.196	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (-)	SM(d18:1/24:1(15Z))	0.989 ± 0.039	0.965 ± 0.045	0.744	0.961 ± 0.032	0.687	1.107 ± 0.106	0.201
LC-MS/MS (+)	SM(d18:2/16:0)	0.118 ± 0.022	1.392 ± 0.277	<b>0.000</b>	1.589 ± 0.368	<b>0.000</b>	2.667 ± 0.447	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	SM(d18:2/24:1)	0.323 ± 0.035	0.862 ± 0.127	<b>0.000</b>	2.932 ± 0.262	<b>0.000</b>	1.236 ± 0.177	<b>0.000</b>
LC-MS (-)	sn-3-O-(geranylgeranyl)glycerol 1-phosphate	0.935 ± 0.041	1.091 ± 0.070	0.062	0.864 ± 0.036	0.351	1.241 ± 0.241	0.052
LC-MS/MS (+)	Sphingosine	1.120 ± 0.041	0.871 ± 0.034	<b>0.002</b>	0.759 ± 0.023	<b>0.000</b>	1.008 ± 0.054	0.159
LC-MS/MS (-)	Stearic acid	1.253 ± 0.102	0.944 ± 0.160	0.129	0.16 ± 0.07	<b>0.000</b>	1.138 ± 0.442	0.710
LC-MS/MS (+)	Stearoylethanolamide	1.036 ± 0.046	1.005 ± 0.048	0.710	0.831 ± 0.027	<b>0.016</b>	1.055 ± 0.041	0.824
LC-MS (-)	Tetracosanoic acid	0.759 ± 0.027	1.224 ± 0.095	<b>0.000</b>	0.901 ± 0.033	<b>0.007</b>	1.599 ± 0.249	<b>0.000</b>
LC-MS (+)	TG 20:0_22:2_22:6;1O	0.978 ± 0.018	0.995 ± 0.039	0.661	1.072 ± 0.035	<b>0.015</b>	0.997 ± 0.042	0.634
LC-MS/MS (+)	TG 44:0 TG 14:0_14:0_16:0	0.596 ± 0.006	1.175 ± 0.127	<b>0.000</b>	0.682 ± 0.014	<b>0.000</b>	2.354 ± 1.155	<b>0.010</b>
LC-MS/MS (+)	TG 46:0 TG 14:0_15:0_17:0	0.625 ± 0.006	1.328 ± 0.159	<b>0.000</b>	0.732 ± 0.018	<b>0.000</b>	2.064 ± 0.738	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	TG 46:1 TG 14:0_16:0_16:1	0.292 ± 0.006	1.373 ± 0.338	<b>0.000</b>	0.373 ± 0.036	<b>0.001</b>	3.377 ± 1.540	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	TG 47:0 TG 15:0_16:0_16:0	0.918 ± 0.009	1.045 ± 0.038	<b>0.000</b>	0.959 ± 0.017	<b>0.026</b>	1.243 ± 0.170	<b>0.002</b>
LC-MS/MS (+)	TG 48:0 TG 16:0_16:0_16:0	0.596 ± 0.014	1.681 ± 0.225	<b>0.000</b>	0.736 ± 0.037	<b>0.000</b>	1.796 ± 0.426	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 48:1 TG 14:0_16:0_18:1	0.326 ± 0.016	1.771 ± 0.399	<b>0.000</b>	0.435 ± 0.046	<b>0.006</b>	2.817 ± 0.843	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 50:0 TG 16:0_16:0_18:0	0.657 ± 0.023	1.679 ± 0.199	<b>0.000</b>	0.798 ± 0.046	<b>0.005</b>	1.551 ± 0.285	<b>0.000</b>

**Tablo 4.12. (Devam)** Doku örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	TG 50:1 TG 16:0_16:0_18:1	0.369 ± 0.025	2.013 ± 0.299	<b>0.000</b>	0.508 ± 0.058	<b>0.014</b>	2.371 ± 0.496	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 51:0 TG 16:0_17:0_18:0	0.681 ± 0.010	1.532 ± 0.228	<b>0.000</b>	0.733 ± 0.04	0.069	1.693 ± 0.314	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 52:3 TG 16:0_18:1_18:2	0.687 ± 0.100	1.722 ± 0.447	<b>0.002</b>	0.508 ± 0.102	0.334	1.709 ± 0.368	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 52:4 TG 16:1_18:1_18:2	0.743 ± 0.139	1.896 ± 0.668	<b>0.013</b>	0.391 ± 0.07	0.158	1.485 ± 0.397	<b>0.029</b>
LC-MS/MS (+)	TG 53:0 TG 16:0_18:0_19:0	0.854 ± 0.019	1.330 ± 0.186	<b>0.000</b>	0.818 ± 0.072	0.506	1.291 ± 0.126	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 54:2 TG 18:0_18:1_18:1	0.273 ± 0.030	1.640 ± 0.280	<b>0.000</b>	0.403 ± 0.069	0.052	3.139 ± 0.841	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 54:4 TG 18:1_18:1_18:2	0.502 ± 0.065	1.754 ± 0.405	<b>0.000</b>	0.416 ± 0.075	0.481	2.325 ± 0.674	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 54:6 TG 18:2_18:2_18:2	0.687 ± 0.081	1.607 ± 0.450	<b>0.003</b>	0.551 ± 0.037	0.347	1.783 ± 0.858	<b>0.035</b>
LC-MS/MS (+)	TG 56:1 TG 16:0_22:0_18:1	0.228 ± 0.017	2.507 ± 0.688	<b>0.000</b>	0.37 ± 0.046	<b>0.001</b>	2.439 ± 0.733	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG 56:2 TG 18:0_18:1_20:1	0.174 ± 0.023	1.943 ± 0.466	<b>0.000</b>	0.327 ± 0.045	<b>0.002</b>	3.208 ± 0.966	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(12:0/12:0/12:0)	1.019 ± 0.060	1.058 ± 0.030	0.717	0.932 ± 0.064	0.434	0.953 ± 0.077	0.564
LC-MS/MS (+)	TG(12:0/14:0/16:0)	0.678 ± 0.006	0.996 ± 0.065	<b>0.000</b>	0.753 ± 0.013	<b>0.000</b>	2.219 ± 1.174	<b>0.025</b>
LC-MS/MS (-)	TG(12:0/14:1(9Z)/14:1(9Z))[iso3]	0.819 ± 0.051	1.193 ± 0.178	<b>0.007</b>	0.588 ± 0.171	0.085	1.762 ± 0.536	<b>0.004</b>
LC-MS/MS (-)	TG(12:0/14:1(9Z)/17:2(9Z,12Z))[iso6]	1.529 ± 0.091	0.614 ± 0.071	<b>0.000</b>	0.448 ± 0.11	<b>0.000</b>	0.350 ± 0.091	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(12:0/15:0/16:0)	0.896 ± 0.008	1.060 ± 0.024	<b>0.000</b>	0.966 ± 0.014	<b>0.000</b>	1.286 ± 0.227	<b>0.004</b>
LC-MS/MS (+)	TG(14:0/14:1(9Z)/20:3n6)	1.150 ± 0.180	0.314 ± 0.050	<b>0.011</b>	1.653 ± 0.108	0.122	0.582 ± 0.090	0.080
LC-MS/MS (+)	TG(14:0/16:1(9Z)/16:1(9Z))	0.292 ± 0.028	1.567 ± 0.400	<b>0.000</b>	0.431 ± 0.068	<b>0.031</b>	3.126 ± 1.248	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(14:1(9Z)/14:1(9Z)/20:1(11Z))	0.817 ± 0.084	0.821 ± 0.123	0.979	1.405 ± 0.096	<b>0.000</b>	1.322 ± 0.154	<b>0.005</b>
LC-MS/MS (-)	TG(14:1(9Z)/14:1(9Z)/20:2n6)	0.997 ± 0.153	0.412 ± 0.065	<b>0.035</b>	1.875 ± 0.124	<b>0.003</b>	0.723 ± 0.102	0.321
LC-MS/MS (-)	TG(14:1(9Z)/15:0/18:2(9Z,12Z))	0.352 ± 0.018	0.541 ± 0.058	<b>0.000</b>	3.371 ± 0.326	<b>0.000</b>	1.032 ± 0.196	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	TG(14:1(9Z)/15:1(9Z)/16:1(9Z))[iso6]	1.684 ± 0.160	0.191 ± 0.038	<b>0.000</b>	0.463 ± 0.055	<b>0.000</b>	0.293 ± 0.057	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.292 ± 0.143	0.363 ± 0.118	<b>0.001</b>	1.162 ± 0.136	0.621	0.601 ± 0.100	<b>0.010</b>
LC-MS/MS (-)	TG(15:0/16:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	1.112 ± 0.159	0.345 ± 0.036	<b>0.008</b>	1.663 ± 0.127	0.060	0.656 ± 0.081	0.111
LC-MS/MS (-)	TG(15:0/16:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	0.342 ± 0.042	0.882 ± 0.137	<b>0.000</b>	2.759 ± 0.222	<b>0.000</b>	1.332 ± 0.218	<b>0.000</b>

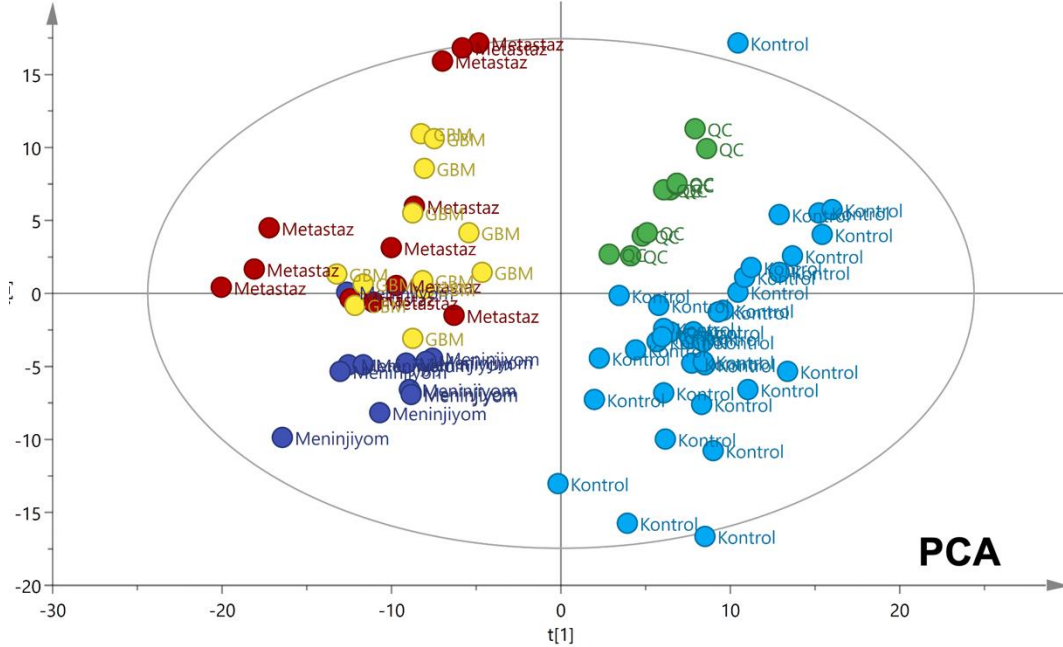
**Tablo 4.12. (Devam)** LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))	1.436 ± 0.208	0.226 ± 0.058	<b>0.002</b>	0.994 ± 0.156	0.241	0.473 ± 0.118	<b>0.012</b>
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	1.646 ± 0.188	0.141 ± 0.031	<b>0.000</b>	0.571 ± 0.084	<b>0.002</b>	0.351 ± 0.117	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(16:1(9Z)/16:1(9Z)/18:2(9Z,12Z))	1.780 ± 0.203	0.153 ± 0.034	<b>0.000</b>	0.13 ± 0.013	<b>0.000</b>	0.376 ± 0.126	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	TG(20:0/15:0/14:1(9Z))	0.560 ± 0.013	1.459 ± 0.209	<b>0.000</b>	0.584 ± 0.023	0.355	2.277 ± 0.424	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (+)	Vaccenic acid	1.022 ± 0.055	1.026 ± 0.035	0.972	0.865 ± 0.052	0.123	1.043 ± 0.037	0.831
LC-MS/MS (+)	Vitamin A	1.251 ± 0.092	0.624 ± 0.155	<b>0.001</b>	0.75 ± 0.271	<b>0.029</b>	0.874 ± 0.205	0.064

SH: Standart hata.  $p < 0,05$  (**koyu**) kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı lipidler.

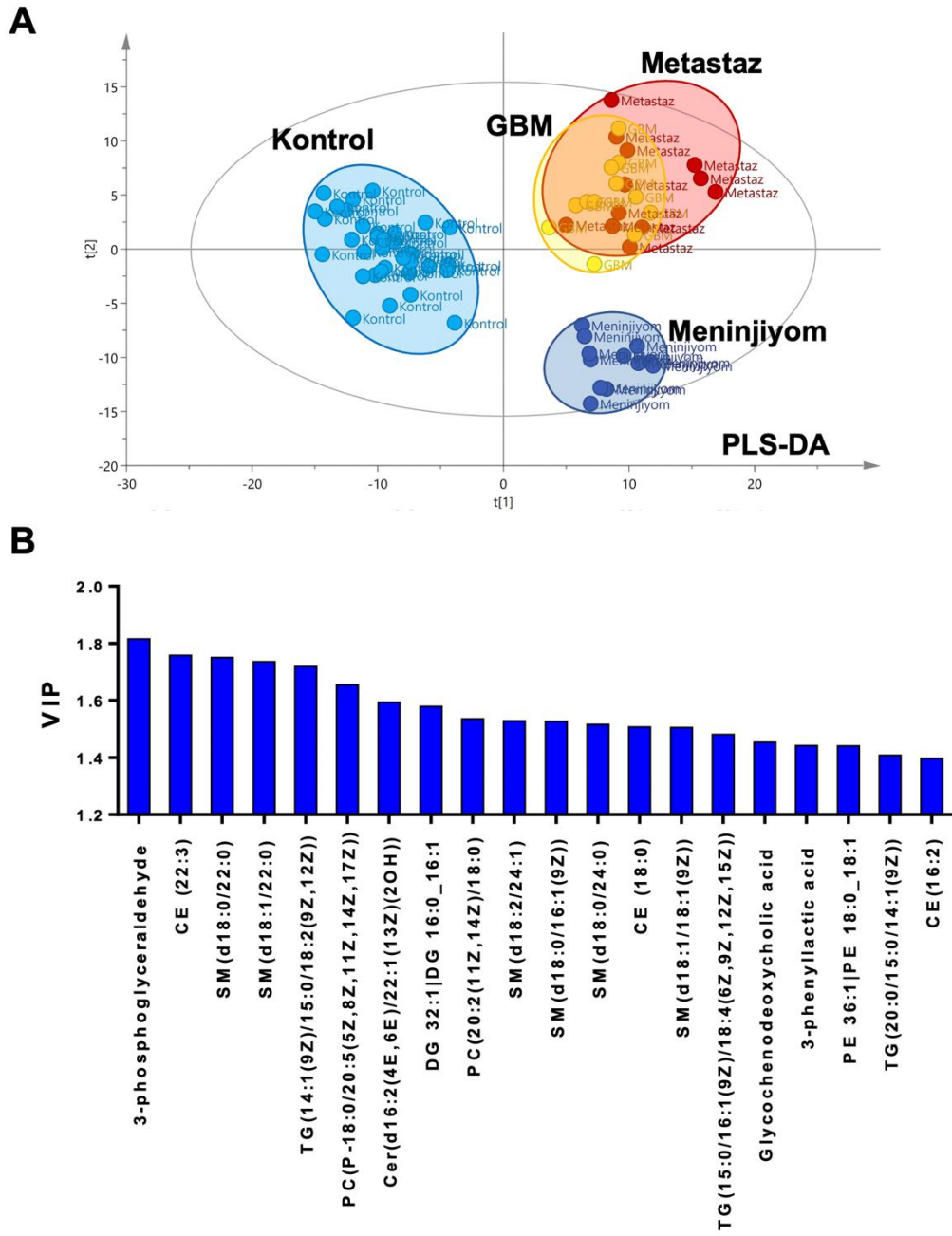
#### 4.1.7. Doku Örneklerine ait Çok Değişkenli Veri Analizleri

Doku örneklerinden gerçekleştirilen metabolomik ve lipidomik analizlerden elde edilen veriler birleştirilerek bütünlük omiks verisi oluşturulmuş ve bu veri matrisi çok değişkenli veri analizleri ile incelenmiştir. Öncelikle PCA grafikleri oluşturularak veri setinde herhangi bir aykırı değer ve sistemik hata olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.17.). Aykırı değerler veri setinden uzaklaştırıldıktan sonra tüm gruplar için gruplar arasındaki farklılaşmalar PLS-DA (Şekil 4.18.) grafiği ile kontrol grubuna karşı hasta gruplarının ikili karşılaştırmaları ise OPLS-DA grafikleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.19A., Şekil 4.20A., Şekil 4.21A.). OPLS-DA grafiklerinde grupların ayrılmasında etkili olan metabolitler ve lipitler VIP grafikleri ile (Şekil 4.19B., Şekil 4.20B., Şekil 4.21B.), gruplar arasında artan ve azalan metabolitler ile lipitler (Şekil 4.19C., Şekil 4.20C., Şekil 4.21C.) ise katsayı grafikleri ile belirlenmiştir. OPLS-DA modellerinin güvenilirliği sırasıyla model uyumu ve tahminini sağlayan  $R^2$  ve  $Q^2$  değerleri ile sınanmıştır.

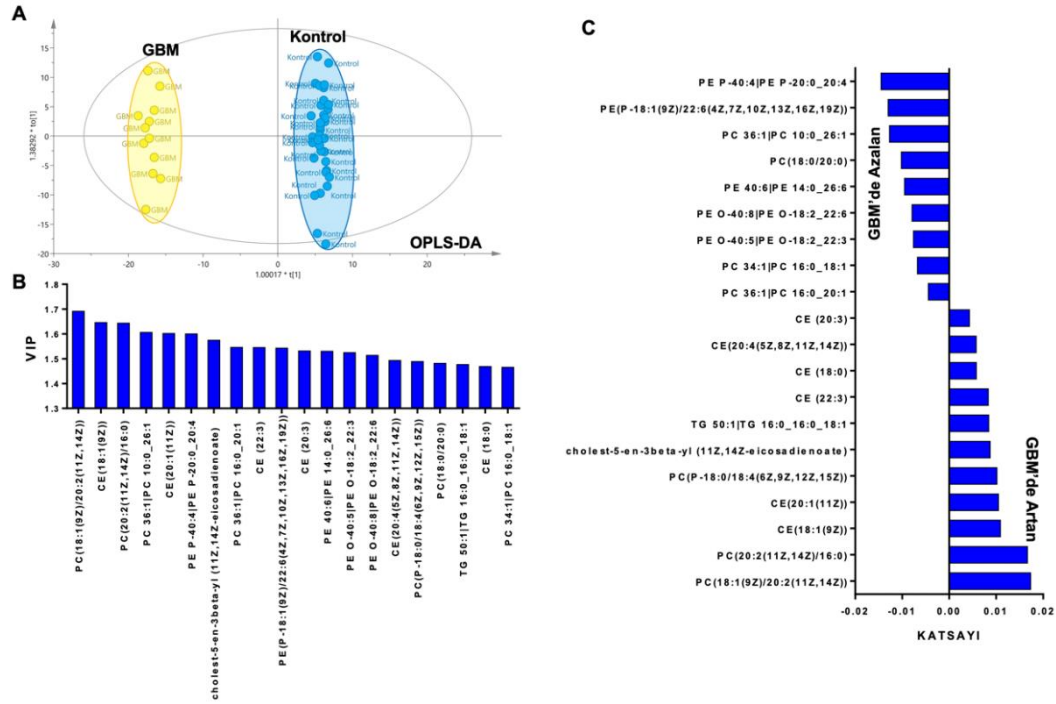


**Şekil 4.17.** Doku örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait PCA skor grafiği. Sarı noktalar → GBM, kırmızı noktalar → metastaz, mor noktalar → meningiyom, mavi noktalar → kontrol grubu, yeşil noktalar → QC.

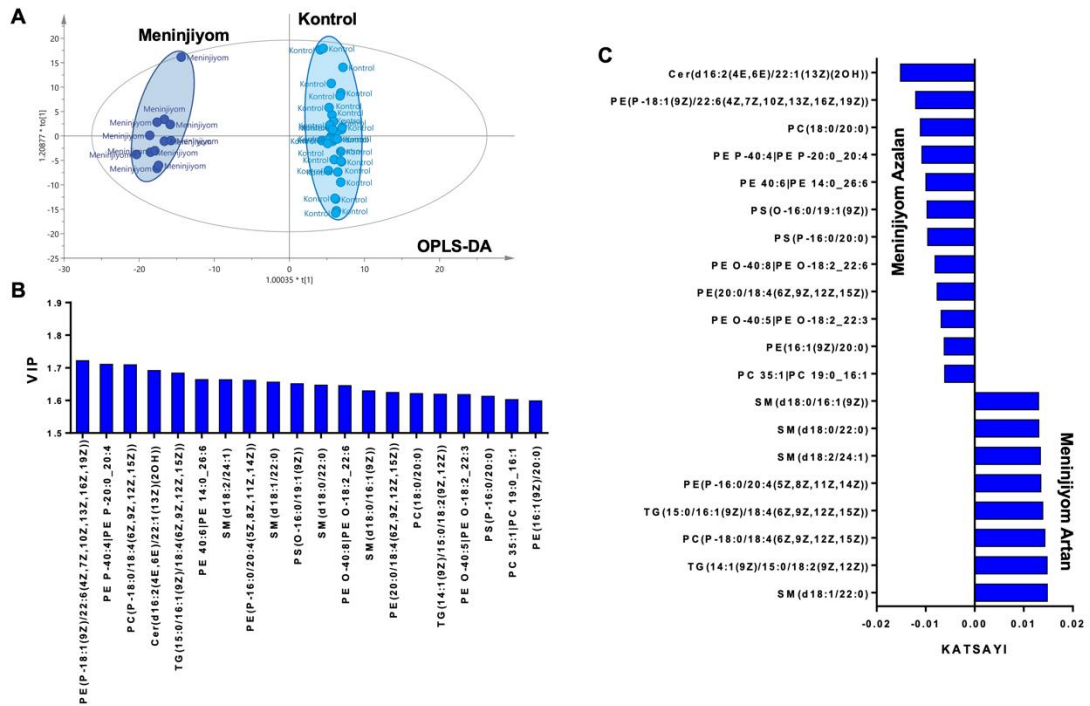




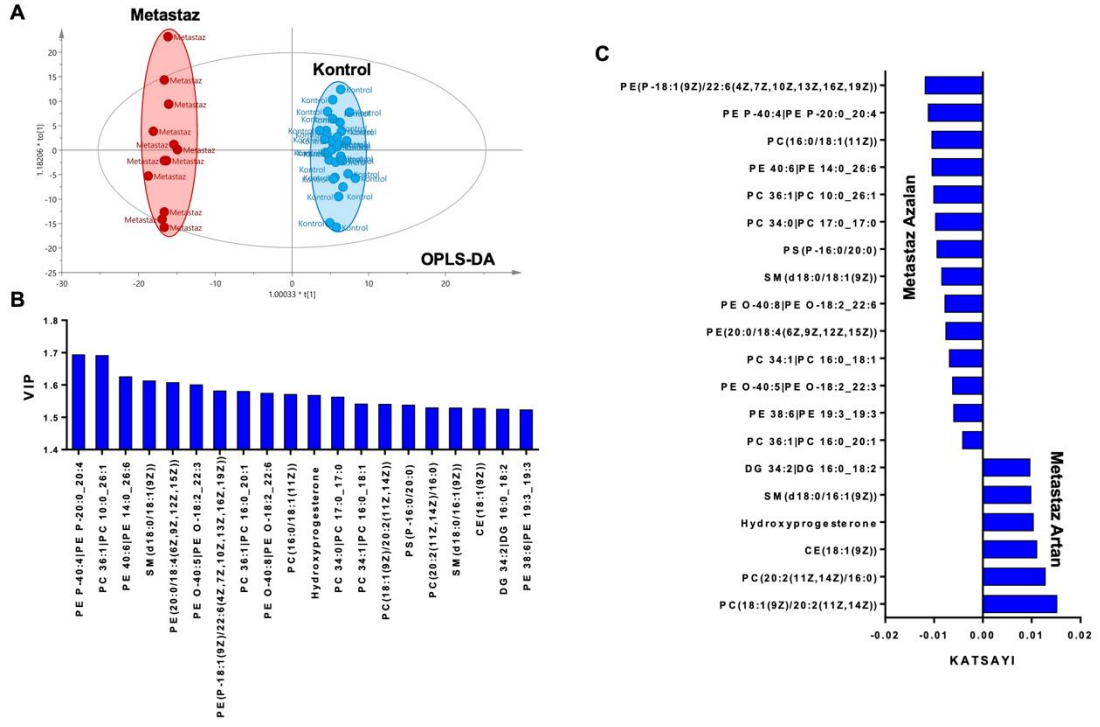
**Şekil 4.18.** Doku örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri. A) PLS-DA skor grafiği, B) VIP grafiği.



Şekil 4.19. Doku örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (GBM ve kontrol grubu). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0.995,  $Q^2$ :0.903), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.



Şekil 4.20. Doku örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (menenjiyom ve kontrol grubu). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0.990,  $Q^2$ :0.958), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.

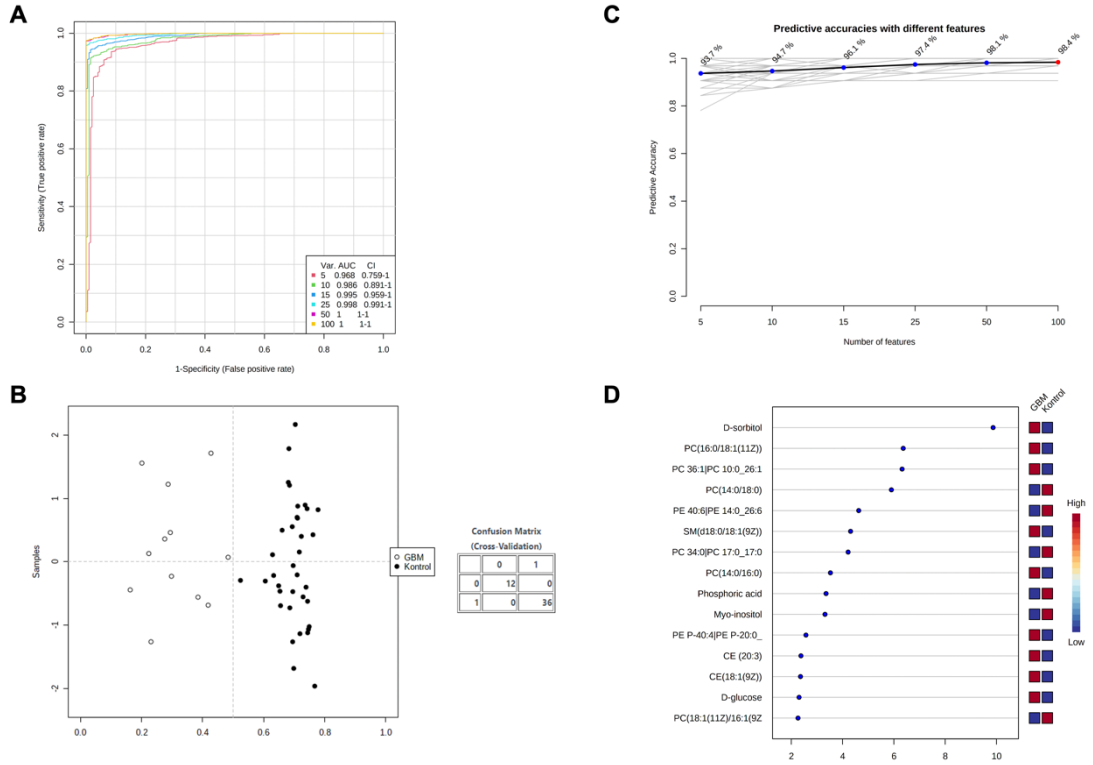


**Şekil 4.21.** Doku örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (metastaz ve kontrol grubu). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0.990,  $Q^2$ :0.923), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.

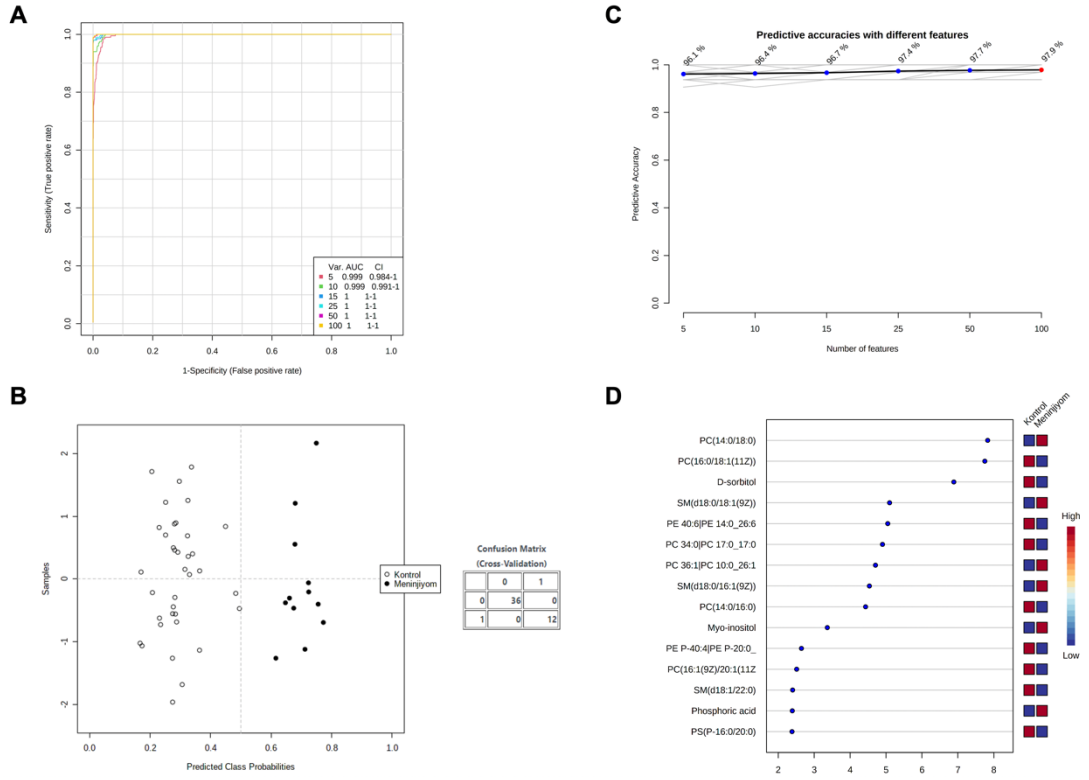
#### 4.1.8. Doku Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi

Doku örneklerine ait potansiyel biyobelirteçlerin kontrol grubuna karşı hasta grupları (GBM, menenjiyom ve metastaz) için ayırt edici gücü çok değişkenli ROC eğrisi analizleri ile doğrulanmıştır. Bu amaçla GBM, menenjiyom ve metastaz hastaları ile kontrol grubuna ait doku örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda LOESS algoritmasına göre normalize edilmiş bütünleşik omiks verisi MetaboAnalyst platformuna yüklenmiş ve biyobelirteç analizleri gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrileri platform tarafından Monte-Carlo çapraz validasyonu (MCCV) tarafından dengeli alt örnekleme kullanılarak oluşturulmakta ve her bir MCCV’de moleküler türlerin önemini değerlendirmek için örneklerin üçte ikisi kullanılmaktadır. Daha sonra belirlenen sayıda (ilk 5, 10, ... 100 gibi) önemli olan moleküler türler dışarıda kalan örneklerin üçte birinde valide edilerek sınıflandırma modeli oluşturmak için seçilmektedir. Doku örnekleri için PLS-DA yöntemi ile sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol grupları ROC eğrileri, en doğru tahmin gücüne

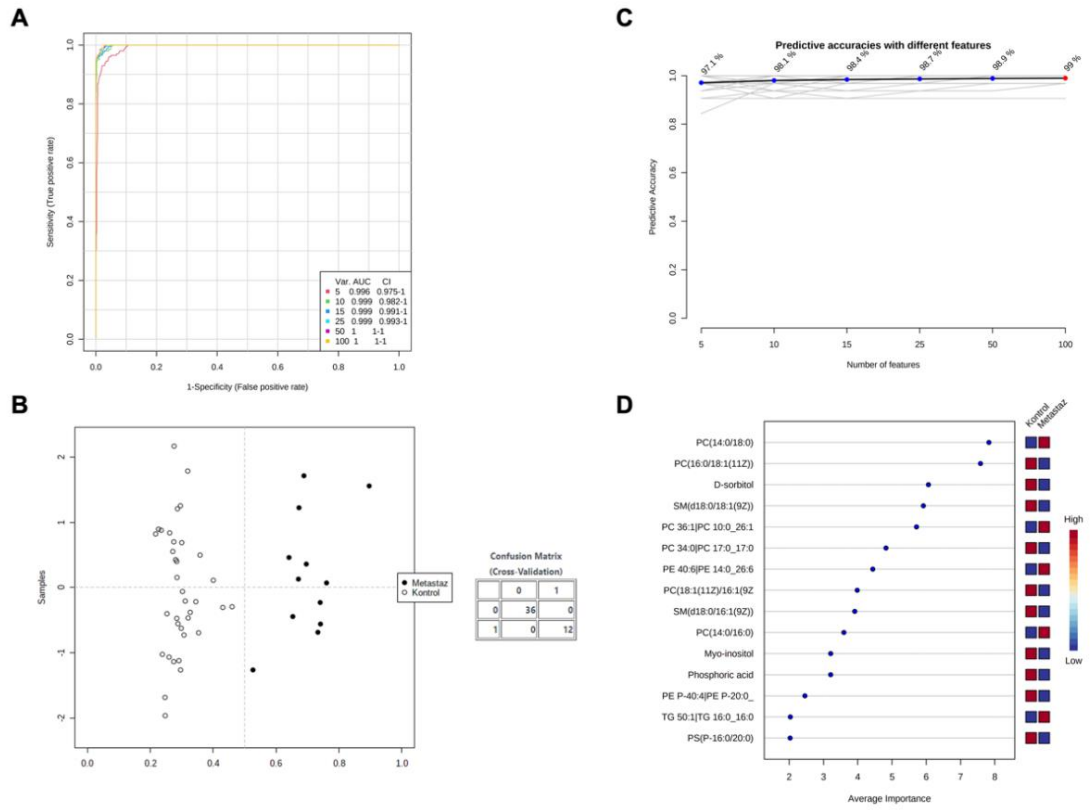
yani en yüksek AUC değerine sahip olan biyobelirteç modeli kullanılarak tüm örneklerin tahmini sınıf olasılıklarını gösteren dağılım grafiği, artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğunu gösteren eğri, önem sırasına göre biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekülü gösteren grafikler ile değerlendirilmiştir. GBM ile kontrol, menenjiyom ile kontrol ve metastaz ile kontrol grupları arasında yapılan çok tek değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri sırasıyla Şekil 4.22., Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'te verilmiştir. Her bir tümör grubu için ayrı ayrı oluşturulan ve gruplardaki tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçlarını, bir diğer deyişle yanlış grup sınıflandırma olasılıklarını gösteren grafikler Şekil 4.22B., Şekil 4.23B. ve Şekil 4.24B.'de sunulmuştur. Örneğin Şekil 4.22B'de yer alan grafikte 12 GBM hastasının kontrol grubunda yer alan 36 bireyden farklılaşarak sınıflandığı görülmektedir. Bu grafik oluşturulan biyobelirteç modeli ile GBM hastalarına doğru teşhis koyulabileceği ve bu hastaların sağlıklı bireylerden ayırt edilebileceğini göstermektedir. GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tümör grupları için Şekil 4.22C., Şekil 4.23C. ve Şekil 4.24C.'de yer alan ve biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğunu gösteren eğrilerde artan sayıda moleküler tür ile modellerin tahmin doğruluğu arasında ciddi farklar olmadığı görülmüş ve bu nedenle biyobelirteç modelleri en önemli 15 aday biyobelirteç için oluşturulmuştur. Önem sırasına göre her bir tümör grubu için en önemli 15 aday biyobelirteç Şekil 4.22D., Şekil 4.23D. ve Şekil 4.24D.'de verilmiştir.



**Şekil 4.22.** Doku örneklerinden GBM hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül.



**Şekil 4.23.** Doku örneklerinden menenjiyom hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül.



**Şekil 4.24.** Doku örneklerinden akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül.

## **4.2. Plazma Örneklerine ait Metabolomik ve Lipidomik Analiz Sonuçları**

GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar ile kontrol grubuna ait plazma örneklerinin metabolomik ve lipidomik analizleri için analitik yöntemler öncelikle optimize edilmiş ve ardından gerçek örneklere uygulanmıştır. Plazma örnekleri ile yapılan metabolomik ve lipidomik analizlerde Bölüm 4.1.'de doku örnekleri ile yapılan çalışmaya dahil edilen bireylerden toplanan plazma örnekleri kullanılmıştır. Plazma örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler için deneysel tasarımlar ile geliştirilen ve optimize edilen analitik yöntemler doku örnekleri (Bölüm 4.1.) için yapılan çalışmalara benzer şekilde yürütülmüş ve yorumlanmıştır.

### **4.2.1. Metabolitlerin ve Lipitlerin Tüketme Basamağının Optimizasyonu**

Plazma örneklerinden beş farklı çözücünün metabolitlerin tüketilmesine olan etkileri Bölüm 4.1.1.'deki gibi D-optimal karışımı tasarımı ile değerlendirilmiştir. Analizler hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS ile gerçekleştirmiş ve elde edilen pik alanları toplanarak cevap değişkeni olarak kullanılmıştır. Sistemik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.13.'te verilmiştir.



**Tablo 4.13.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Cevap
	A:Metanol	B:Asetonitril	C:Aseton	D:Etanol	E:Su	TPA
1 <sup>#</sup>	0.0	800.0	0.0	0.0	0.0	698329138
2	0.0	400.0	400.0	0.0	0.0	687583501
3 <sup>*</sup>	87.5	87.5	87.5	387.5	150.0	729173859
4	0.0	600.0	0.0	0.0	200.0	714568367
5 <sup>#</sup>	0.0	0.0	600.0	0.0	200.0	694901039
6 <sup>#</sup>	0.0	0.0	0.0	800.0	0.0	668008642
7 <sup>*</sup>	150.0	150.0	150.0	150.0	200.0	731688014
8 <sup>#</sup>	400.0	400.0	0.0	0.0	0.0	715785730
9	0.0	0.0	400.0	400.0	0.0	626093702
10	0.0	0.0	0.0	800.0	0.0	678128732
11	0.0	0.0	0.0	600.0	200.0	682711822
12	0.0	400.0	0.0	400.0	0.0	663927902
13	400.0	0.0	400.0	0.0	0.0	683530261
14	800.0	0.0	0.0	0.0	0.0	761651136
15	0.0	800.0	0.0	0.0	0.0	698810535
16 <sup>*</sup>	87.5	387.5	87.5	87.5	150.0	740992588
17	400.0	400.0	0.0	0.0	0.0	744690756
18 <sup>#</sup>	800.0	0.0	0.0	0.0	0.0	803234146
19	400.0	0.0	0.0	400.0	0.0	693337133
20	600.0	0.0	0.0	0.0	200.0	801767278
21 <sup>*</sup>	87.5	87.5	387.5	87.5	150.0	690154723
22	0.0	0.0	700.0	0.0	100.0	634309114
23 <sup>*</sup>	387.5	87.5	87.5	87.5	150.0	753027981
24	0.0	0.0	800.0	0.0	0.0	613000596
25 <sup>#</sup>	400.0	0.0	0.0	400.0	0.0	685999510

\* Uyum eksikliği noktası, #Tekrar noktası.

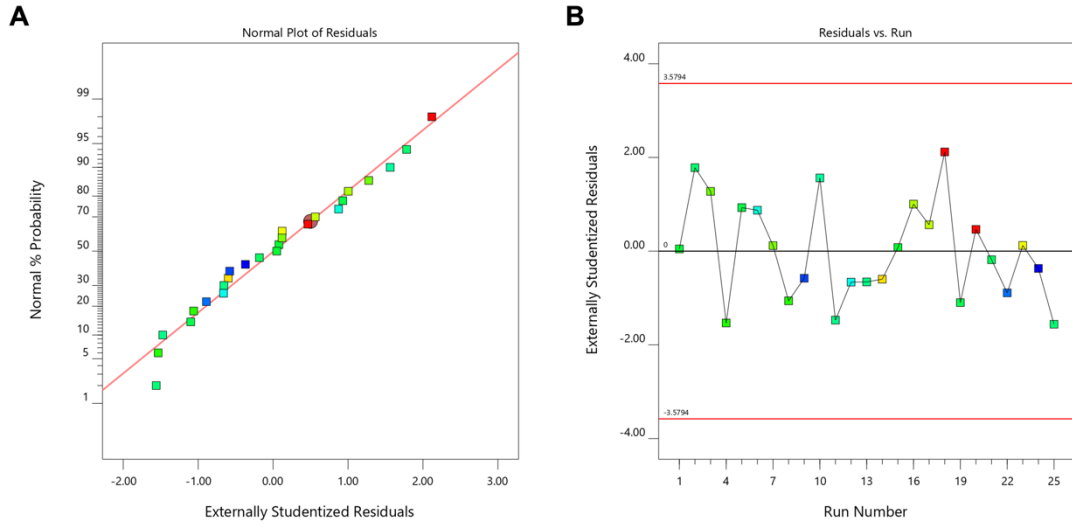
Yazılım tarafından deneysel tasarım için doğrusal bir model önerilmiştir. Önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.14.).

**Tablo 4.14.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

<b>ANOVA</b>				
<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>SD</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F/p-değeri</b>
<b>Model</b>	$4.731 \times 10^{16}$	4	$1.183 \times 10^{16}$	$32.89/1.6 \times 10^{-8}$
Doğrusal Karışım	$4.731 \times 10^{16}$	4	$1.183 \times 10^{16}$	$32.89/1.6 \times 10^{-8}$
<b>Artık</b>	$7.192 \times 10^{15}$	20	$3.596 \times 10^{14}$	
Uyum Eksikliği	$5.832 \times 10^{15}$	15	$3.888 \times 10^{14}$	1.43/0.3680
Saf Hata	$1.361 \times 10^{15}$	5	$2.721 \times 10^{14}$	
<b>DKT</b>	$5.450 \times 10^{16}$	24		
<b>Uyum İstatistikleri</b>				
<b>SS</b>	$1.896 \times 10^7$	<b>R<sup>2</sup></b>		0.8680
<b>Ortalama</b>	$7.038 \times 10^8$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>		0.8416/0.7888
<b>% BSS</b>	2.69	<b>Yeterli Hassasiyet</b>		20.6750

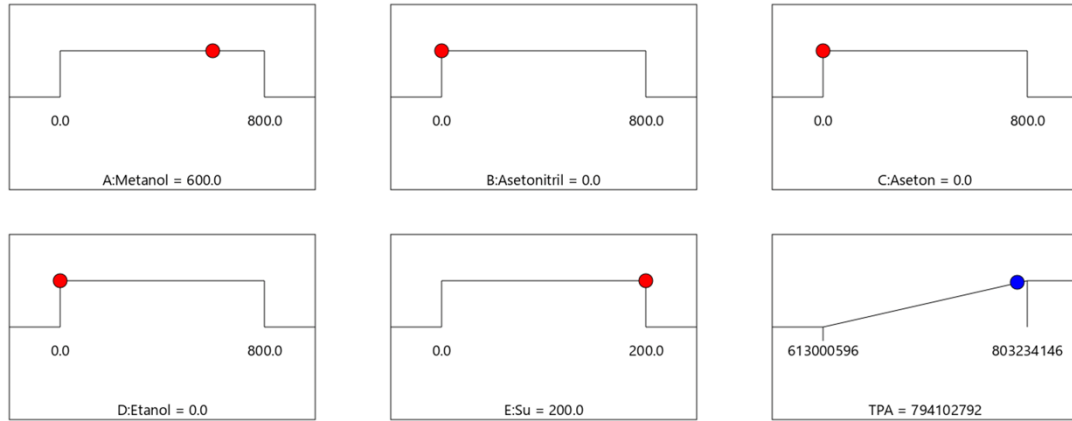
BSS: Bağıl standart sapma, DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi.

ANOVA ve uyum istatistik analiz sonuçlarına göre geçerli bulunan modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.25.).



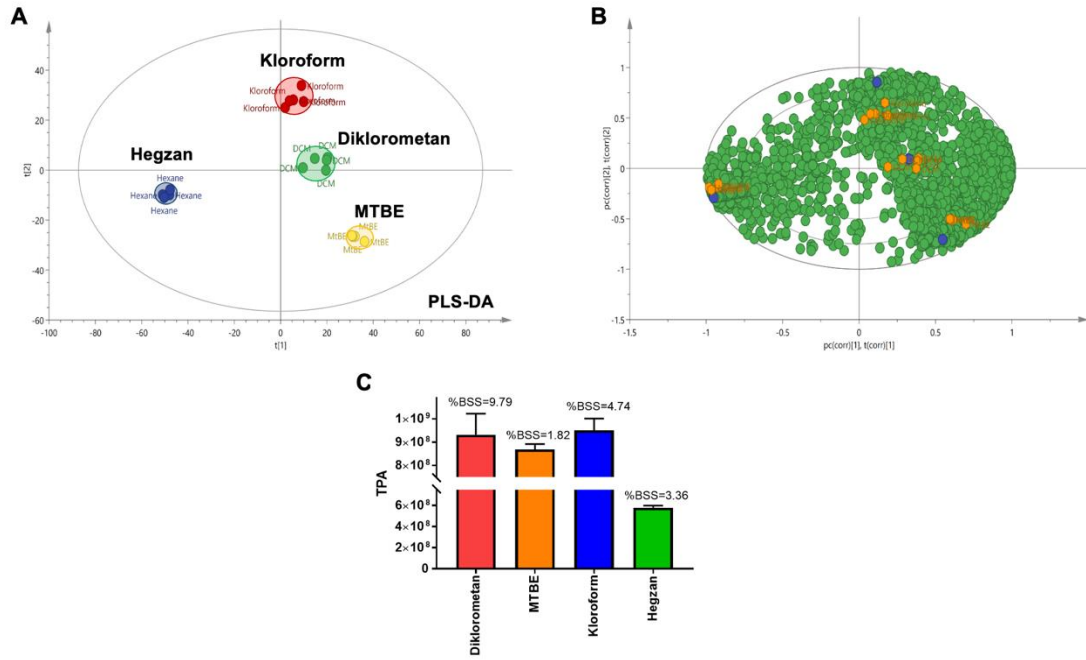
**Şekil 4.25.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için D-optimal karışım tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

En yüksek isteklilik değerine sahip öneri doku örneklerinden metabolitlerin tüketilmesinde optimum çözücü karışımı olarak belirlenmiştir. Buna göre en yüksek isteklilik değeri 0,952 bulunmuş ve elde edilen rampa grafiği Şekil 4.26.'da verilmiştir.



**Şekil 4.26.** Plazma örneklerinden metabolitlerin tüketilmesi için en yüksek isteklilik değerine sahip optimum çözücü karışımını gösteren rampa grafiği

Plazma örneklerinden diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin lipitleri tüketme verimlilikleri PLS-DA, Biplot ve her bir çözücüye ait toplam pik alanı değerleri kullanılarak çizilen bar grafikleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.27.).



**Şekil 4.27.** Diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin plazma örneklerinden lipitlerin tüketilmesine olan etkilerinin incelenmesi. A) PLS-DA grafiği, B) Biplot, C) Bar grafiği. MTBE'e ait aykırı bir değer veri setinden çıkartılmıştır.

#### 4.2.2. GC-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Türevlendirme Basamağının Optimizasyonu

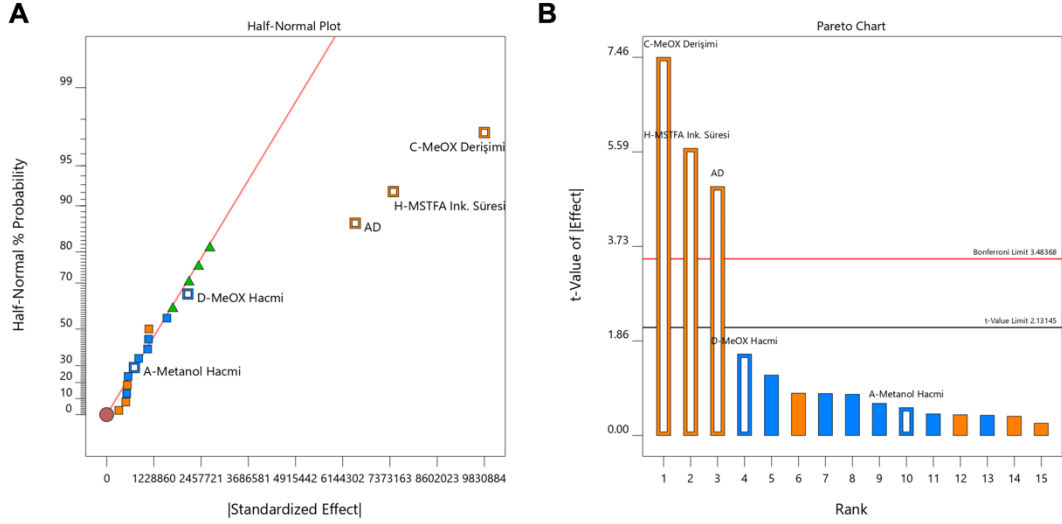
Plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağına ait optimum koşulları belirlemek için Bölüm 4.1.2.'de belirten metoksiaminasyon ve sililasyon reaksiyonlarını etkileyebilecek 8 faktörün etkisi iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir. Sistemik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.15.'te verilmiştir.

**Tablo 4.15.** Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Faktör 6	Faktör 7	Faktör 8	Cevap
	A:Metanol Hacmi	B:Tüketme Süresi	C:MeOX Derişimi	D:MeOX Hacmi	E:MeOX İnk.Sıcaklığı	F:MeOX İnk.Süresi	G:MSTFA İnk.Sıcaklığı	H:MSTFA İnk. Süresi	TPA
	$\mu\text{L}$	dak	mg/mL	$\mu\text{L}$	$^{\circ}\text{C}$	dak	$^{\circ}\text{C}$	dak	
1	600	1.5	30	20	30	30	70	120	82053957
2	700*	1	20	30	50	75	50	75	65257913
3	700*	1	20	30	50	75	50	75	63243446
4	600	0.5	10	20	30	30	30	30	64135914
5	600	1.5	30	40	30	120	30	30	63533200
6	600	0.5	10	40	30	120	70	120	62239306
7	800	0.5	10	40	70	120	30	30	60071642
8	700*	1	20	30	50	75	50	75	71650563
9	800	0.5	10	20	70	30	70	120	62390054
10	800	0.5	30	20	30	120	30	120	75373613
11	800	1.5	30	40	70	120	70	120	76259099
12	600	0.5	30	40	70	30	30	120	72661355
13	800	1.5	30	20	70	30	30	30	64075141
14	600	1.5	10	20	70	120	30	120	67900766
15	600	1.5	10	40	70	30	70	30	55398192
16	800	0.5	30	40	30	30	70	30	70401411
17	600	0.5	30	20	70	120	70	30	74083545
18	700*	1	20	30	50	75	50	75	71610452
19	800	1.5	10	20	30	120	70	30	57562492
20	800	1.5	10	40	30	30	30	120	70095886
21	700*	1	20	30	50	75	50	75	64571862

\* Merkez nokta, Ink: İnkübasyon.

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait model seçimi ve istatistiksel olarak anlamlı faktörler Şekil 4.28.'de verilen Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir.



**Şekil 4.28.** Plazma örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. A) Yarı-Normal grafik. Mavi kare → negatif etki, turuncu kare → pozitif etki, B) Faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisini gösteren Pareto grafiği. Kırmızı yatay çizgi → Bonferroni limiti, siyah yatay çizgi → t-değeri limiti.

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım için önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmış (Tablo 4.16.) ve modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.29.).

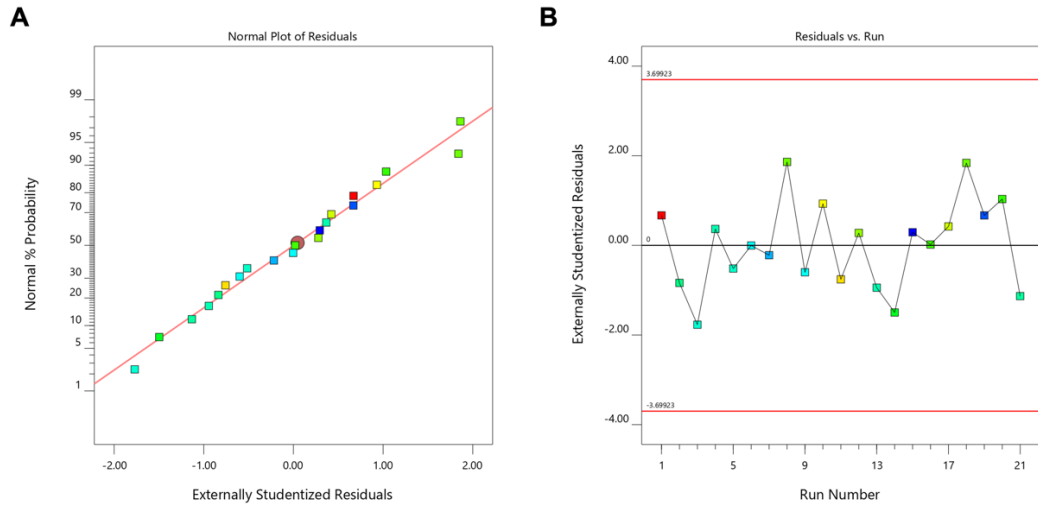
**Tablo 4.16.** Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

ANOVA				
Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Kareler Ortalaması	F/p-değeri
<b>Model</b>	$7.969 \times 10^{14}$	5	$1.594 \times 10^{14}$	$24.57/1 \times 10^{-6}$
A	$2.086 \times 10^{12}$	1	$2.086 \times 10^{12}$	0.3215/0.5791
C	$3.866 \times 10^{14}$	1	$3.866 \times 10^{14}$	$59.58/1.3 \times 10^{-6}$
D	$1.788 \times 10^{13}$	1	$1.788 \times 10^{13}$	2.76/0.1176
H	$2.228 \times 10^{14}$	1	$2.228 \times 10^{14}$	$34.35/3.1 \times 10^{-5}$
AD	$1.675 \times 10^{14}$	1	$1.675 \times 10^{14}$	25.82/0.0001
<b>Artık</b>	$9.732 \times 10^{13}$	15	$6.488 \times 10^{12}$	
Uyum Eksikliği	$3.175 \times 10^{13}$	11	$2.886 \times 10^{12}$	0.1761/0.9901
Saf Hata	$6.557 \times 10^{13}$	4	$1.639 \times 10^{13}$	
<b>DKT</b>	$8.942 \times 10^{14}$	20		

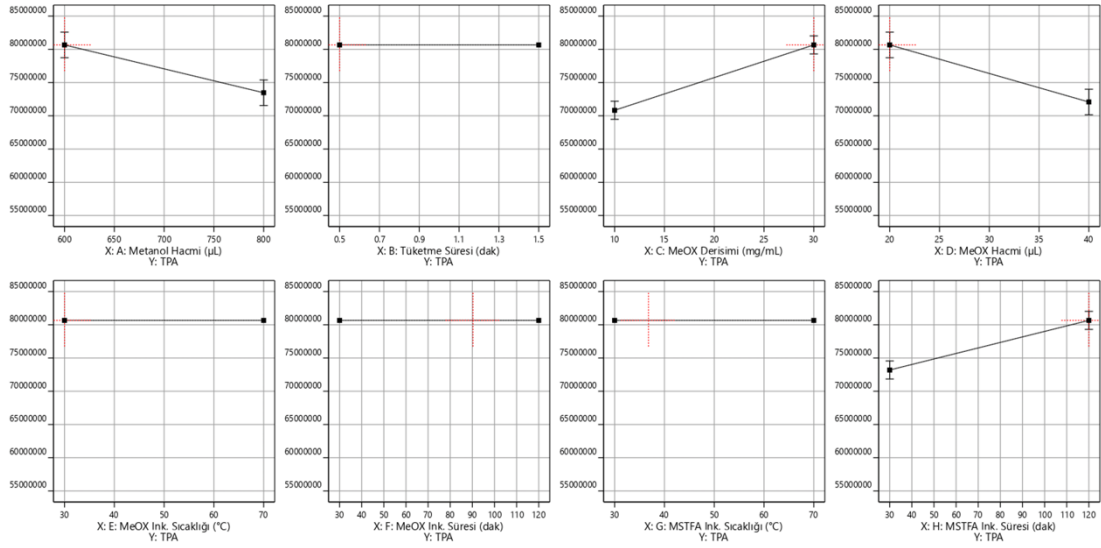
Uyum İstatistikleri			
<b>SS</b>	$2.547 \times 10^6$	<b>R<sup>2</sup></b>	0.8912
<b>Ortalama</b>	$6.736 \times 10^7$	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>	0.8549/0.8325
<b>% BSS</b>	3.78	<b>Yeterli Hassasiyet</b>	19.0087

A: Metanol hacmi, C: MeOX derişimi, D: MeOX hacmi, H: MSTFA + %1TMCS inkübasyon süresi, AD: Metanol hacmi-MeOX hacmi ikili etkileşimi. BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.29.** Plazma örneklerinin türevlendirilmesi için iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

Plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağına ait optimum koşulları gösteren model grafiğı Şekil 4.30.'da sunulmuştur.



**Şekil 4.30.** Plazma örneklerinden yapılan GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı.

### 4.2.3. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Örnek Hazırlama Basamağına Optimizasyonu

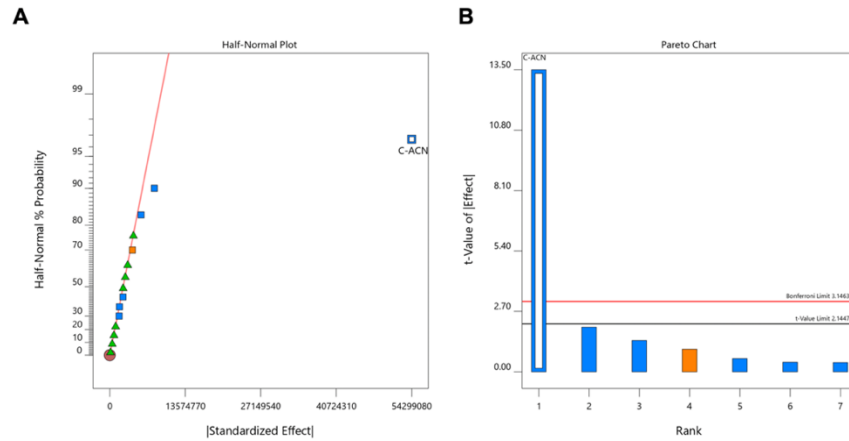
Bölüm 4.1.3'teki gibi metanol-su hacim oranı, tüketme süresi ve uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşiminin (%ACN) plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına olan etkileri iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir. Analizler sistematik hatayı engellemek için deneylerin rastgele sıralanması ile gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.17.'de verilmiştir.



**Tablo 4.17.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A:Metanol Hacmi	B:Tüketme Süresi	C:Asetonitril	TPA
	$\mu\text{L}$	dak	%	
1	800	0.5	50	308280855
2	600	1.5	100	275458915
3	600	0.5	50	322591141
4	800	1.5	50	323630978
5	600	0.5	50	304845586
6	600	1.5	100	266272919
7	600	0.5	100	267750220
8	800	1.5	50	324602387
9	600	1.5	50	316019782
10	600	1.5	50	311741692
11	800	0.5	50	314508833
12	600	0.5	100	251068874
13	800	0.5	100	258171720
14	800	1.5	100	251149141
15	800	1.5	100	256425812
16	800	0.5	100	265531010

İki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait model seçimi ve istatistiksel olarak anlamlı faktörler Şekil 4.31.'de verilen Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir.



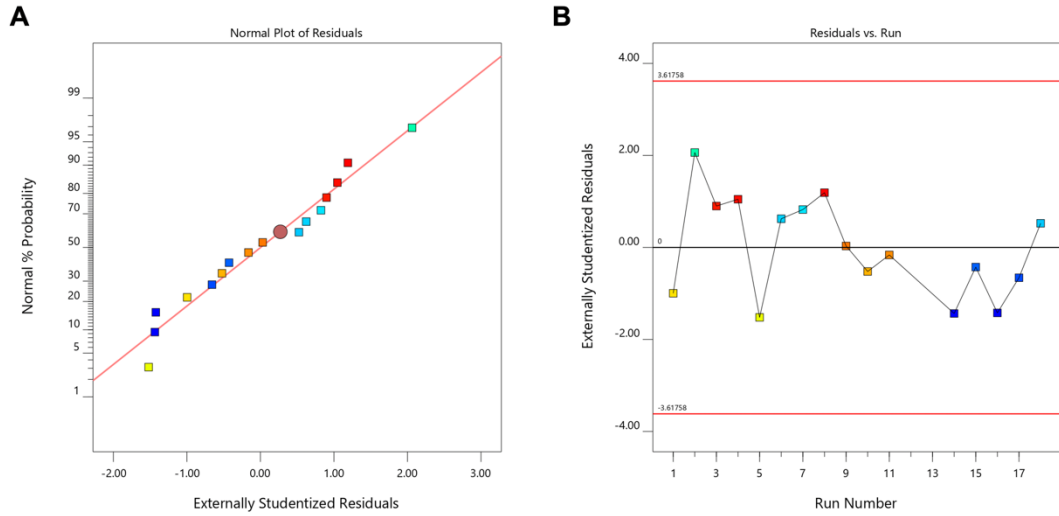
**Şekil 4.31.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler. A) Yarı-Normal grafik. Mavi kare → negatif etki, turuncu kare → pozitif etki, B) Faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisini gösteren Pareto grafiği. Kırmızı yatay çizgi → Bonferroni limiti, siyah yatay çizgi → t-değeri limiti.

Önerilen modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmış (Tablo 4.18.) ve modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.32.).

**Tablo 4.18.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait ANOVA ve uyum istatistiklerine ait sonuçlar.

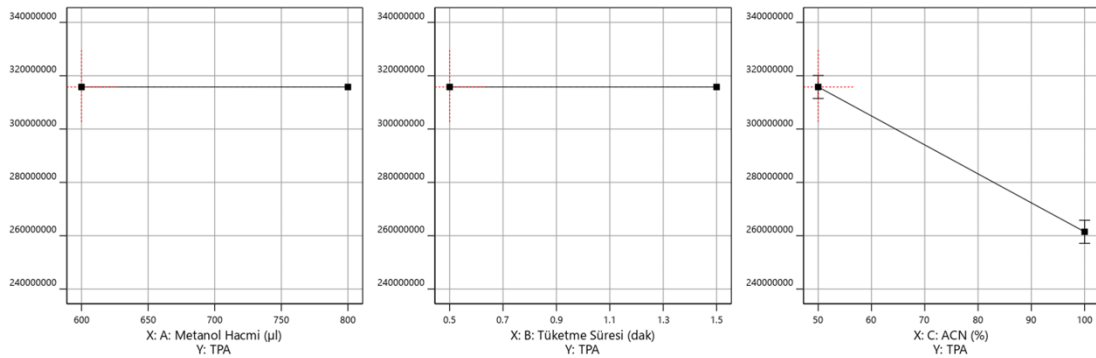
ANOVA				
Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Kareler Ortalaması	F/p-değeri
Model	$1.179 \times 10^{16}$	1	$1.179 \times 10^{16}$	$182.37/2 \times 10^{-9}$
C-%ACN	$1.179 \times 10^{16}$	1	$1.179 \times 10^{16}$	$182.37/2 \times 10^{-9}$
Artık	$9.054 \times 10^{14}$	14	$6.467 \times 10^{13}$	
Uyum Eksikliği	$4.966 \times 10^{14}$	6	$8.276 \times 10^{13}$	1.62/0.2578
Saf Hata	$4.088 \times 10^{14}$	8	$5.110 \times 10^{13}$	
DKT	$1.270 \times 10^{16}$	15		
Uyum İstatistikleri				
SS	$8.042 \times 10^6$	R <sup>2</sup>		0.9287
Ortalama	$2.886 \times 10^8$	Düzeltilmiş/Tahmini R <sup>2</sup>		0.9236/0.9069
% BSS	2.79	Yeterli Hassasiyet		19.0981

BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.32.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için iki seviyeli tam faktöriyel tasarıma ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiğı, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiğı.

Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağına ait optimum koşulları gösteren model grafiğı Şekil 4.33.'te sunulmuştur.



**Şekil 4.33.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiğı.

#### 4.2.4. LC-qTOF-MS Temelli Metabolomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu

Hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Bölüm 4.1.4'teki gibi Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. Sistemik hatayı

engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.19'da verilmiştir.

**Tablo 4.19.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A:FA	B:Akış Hızı	C:Kolon sıcaklığı	TPA
	%	mL/min	°C	
1*	0.1	0.3	45	257668319
2	0.05	0.25	45	199824620
3*	0.1	0.3	45	247236809
4	0.15	0.35	45	144658613
5	0.05	0.3	60	140638360
6	0.1	0.25	30	317180219
7	0.1	0.35	30	276090625
8	0.15	0.3	30	200377138
9	0.05	0.35	45	130722554
10	0.1	0.25	60	255544041
11	0.1	0.35	60	160215656
12*	0.1	0.3	45	257236809
13	0.05	0.3	30	198522093
14	0.15	0.3	60	142109634
15	0.15	0.25	45	200446603

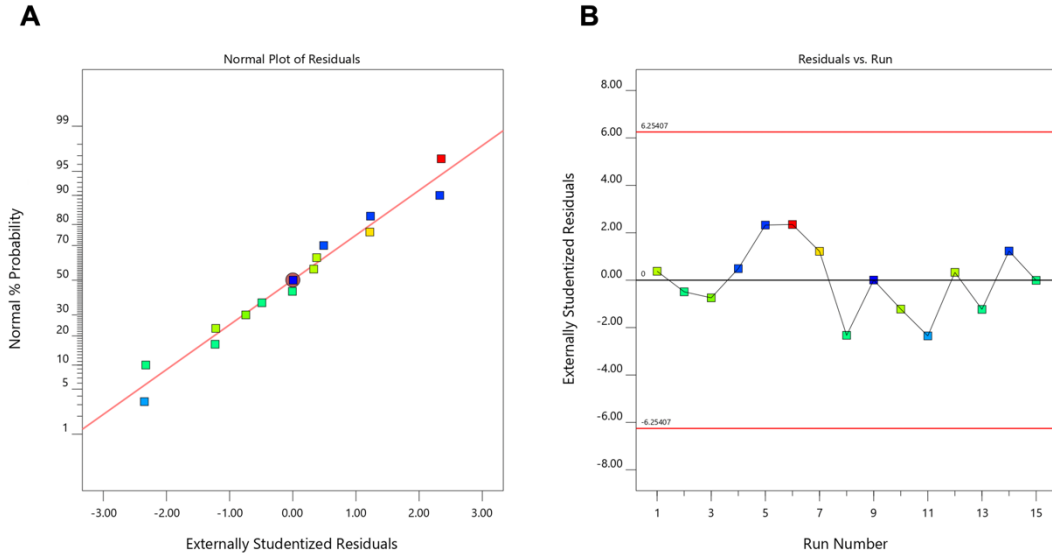
\* Merkez nokta.

DeneySEL tasarım için kuadratik bir model önerilmiş ve modelin gerçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmıştır (Tablo 4.20.). Modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.34.).

**Tablo 4.20.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

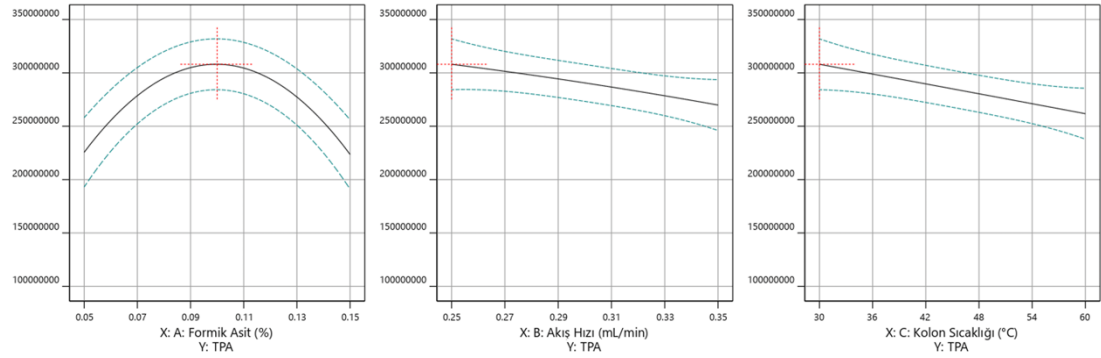
ANOVA				
Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Kareler Ortalaması	F/p-değeri
<b>Model</b>	4.609 x 10 <sup>16</sup>	9	5.121 x 10 <sup>15</sup>	44.71/0.0003
A	3.998 x 10 <sup>13</sup>	1	3.998 x 10 <sup>13</sup>	0.3491/0.5803
B	8.535 x 10 <sup>15</sup>	1	8.535 x 10 <sup>15</sup>	74.52/0.0003
C	1.078 x 10 <sup>16</sup>	1	1.078 x 10 <sup>16</sup>	94.12/0.0002
AB	4.432 x 10 <sup>13</sup>	1	4.432 x 10 <sup>13</sup>	0.3869/0.5612
AC	3.682 x 10 <sup>10</sup>	1	3.682 x 10 <sup>10</sup>	0.0003/0.9864
BC	7.355 x 10 <sup>14</sup>	1	7.355 x 10 <sup>14</sup>	6.42/0.0523
A <sup>2</sup>	2.574 x 10 <sup>16</sup>	1	2.574 x 10 <sup>16</sup>	224.7/2.4x10 <sup>-5</sup>
B <sup>2</sup>	9.982 x 10 <sup>12</sup>	1	9.982 x 10 <sup>12</sup>	0.0871/0.7797
C <sup>2</sup>	7.815 x 10 <sup>10</sup>	1	7.815 x 10 <sup>10</sup>	0.0007/0.9802
<b>Artık</b>	5.727 x 10 <sup>14</sup>	5	1.145 x 10 <sup>14</sup>	
Uyum Eksikliği	5.030 x 10 <sup>14</sup>	3	1.677 x 10 <sup>14</sup>	4.81/0.1768
Saf Hata	6.967 x 10 <sup>13</sup>	2	3.483 x 10 <sup>13</sup>	
<b>DKT</b>	4.666 x 10 <sup>16</sup>	14		
Uyum İstatistikleri				
<b>SS</b>	1.070 x 10 <sup>7</sup>	<b>R<sup>2</sup></b>		0.9877
<b>Ortalama</b>	2.086 x 10 <sup>8</sup>	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>		0.9656/0.8242
<b>% BSS</b>	5.13	<b>Yeterli Hassasiyet</b>		20.2997

A: Formik asit (%), B: Akış hızı, C: Kolon sıcaklığı. BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma



**Şekil 4.34.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik ayırım parametrelerine ait optimum koşulları gösteren model grafiği Şekil 4.35.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.35.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiği.

#### 4.2.5. LC-qTOF-MS Temelli Lipidomik Analizlerin Kromatografik Koşullarının Optimizasyonu

LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizler için de hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi Bölüm 4.2.4'e benzer şekilde Box-Behnken

tasarımı ile optimize edilmiş ve analizler sistematik hatayı engellemek için rastgele gerçekleştirilmiştir. Faktörlere ait seviye değerleri ve cevaplar Tablo 4.21.'de verilmiştir.

**Tablo 4.21.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait faktörler, seviyeler ve cevaplar.

Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap
	A:FA	B:Akış Hızı	C:Kolon Sıcaklığı	TPA
	%	mL/min	°C	
1*	0.1	0.3	45	1355348679
2	0.05	0.25	45	1593641303
3*	0.1	0.3	45	1329835910
4	0.15	0.35	45	1025631687
5	0.05	0.3	60	1828733704
6	0.1	0.25	30	1084091208
7	0.1	0.35	30	1045728582
8	0.15	0.3	30	1102953564
9	0.05	0.35	45	1176676633
10	0.1	0.25	60	1821864309
11	0.1	0.35	60	1407719226
12*	0.1	0.3	45	1313815894
13	0.05	0.3	30	1090209119
14	0.15	0.3	60	1410149313
15	0.15	0.25	45	1149912044

\* Merkez nokta

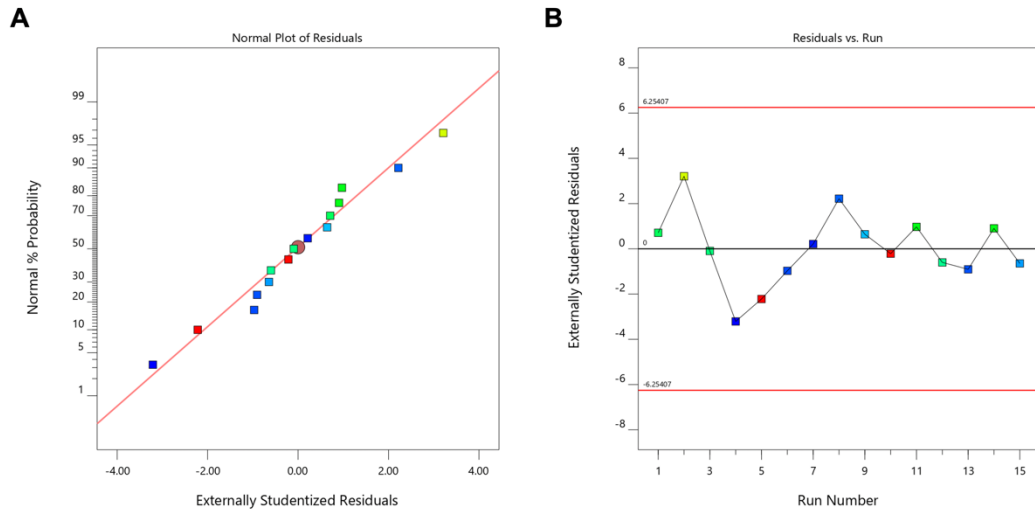
Deneysel tasarım için önerilen kuadratik modelin geçerliliği ANOVA ve uyum istatistikleri ile doğrulanmıştır (Tablo 4.22.). Modele ait elde edilen cevapların aykırı değer ve normallik varsayımı kontrolü tanı araçları ile sağlanmıştır (Şekil 4.36.).

**Tablo 4.22.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait ANOVA ve uyum istatistikleri sonuçları.

<b>ANOVA</b>				
<b>Kaynak</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>SD</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>F/p-değeri</b>
<b>Model</b>	9.627 x 10 <sup>17</sup>	9	1.070 x 10 <sup>17</sup>	79.96/7.2x10 <sup>-5</sup>
A	1.252 x 10 <sup>17</sup>	1	1.252 x 10 <sup>17</sup>	93.55/0.0002
B	1.234 x 10 <sup>17</sup>	1	1.234 x 10 <sup>17</sup>	92.27/0.0002
C	5.754 x 10 <sup>17</sup>	1	5.754 x 10 <sup>17</sup>	430.1/4.8x10 <sup>-6</sup>
AB	2.142 x 10 <sup>16</sup>	1	2.142 x 10 <sup>16</sup>	16.01/0.103
AC	4.651 x 10 <sup>16</sup>	1	4.651 x 10 <sup>16</sup>	34.77/0.0020
BC	3.530 x 10 <sup>16</sup>	1	3.530 x 10 <sup>16</sup>	26.39/0.0037
A <sup>2</sup>	5.670 x 10 <sup>15</sup>	1	5.670 x 10 <sup>15</sup>	4.24/0.0946
B <sup>2</sup>	1.214 x 10 <sup>16</sup>	1	1.214 x 10 <sup>16</sup>	9.08/0.0297
C <sup>2</sup>	1.522 x 10 <sup>16</sup>	1	1.522 x 10 <sup>16</sup>	11.38/0.0198
<b>Artık</b>	6.689 x 10 <sup>15</sup>	5	1.338 x 10 <sup>15</sup>	
Uyum Eksikliği	5.811 x 10 <sup>15</sup>	3	1.937 x 10 <sup>15</sup>	4.42/0.1902
Saf Hata	8.775 x 10 <sup>14</sup>	2	4.388 x 10 <sup>14</sup>	
<b>DKT</b>	9.694 x 10 <sup>17</sup>	14		
<b>Uyum İstatistikleri</b>				
<b>SS</b>	3.658 x 10 <sup>7</sup>	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9931	
<b>Ortalama</b>	1.316 x 10 <sup>9</sup>	<b>Düzeltilmiş/Tahmini R<sup>2</sup></b>	0.9807/0.9020	
<b>% BSS</b>	2.78	<b>Yeterli Hassasiyet</b>	27.3813	

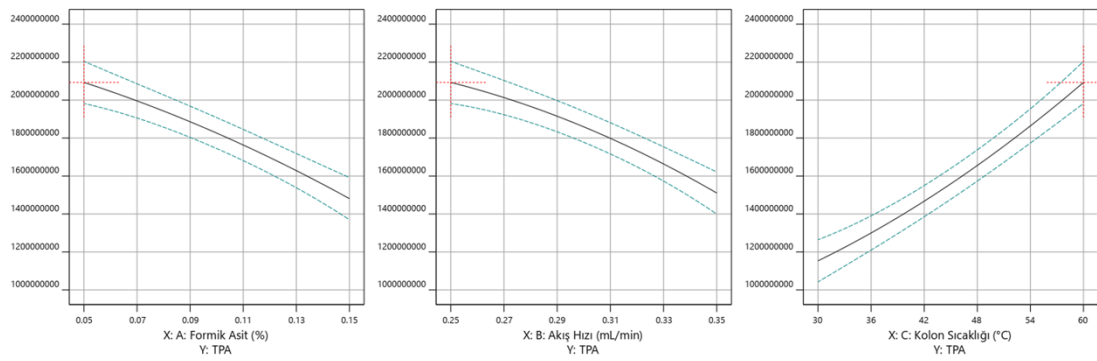
A: Formik asit (%), B: Akış hızı, C: Kolon sıcaklığı. BSS: Bağlı standart sapma DKT: Düzeltilmiş Kareler Toplamı, SD: Serbestlik Derecesi, SS: Standart sapma





**Şekil 4. 36.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler için Box-Behnken tasarımına ait aykırı değerlerin belirlenmesi ve normallik varsayımı kontrolü. A) Artıkların normal grafiği, B) Analiz sırasına göre artıkların grafiği.

Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik ayırım parametrelerine ait optimum koşulları gösteren model grafiği Şekil 4.37.'de sunulmuştur.

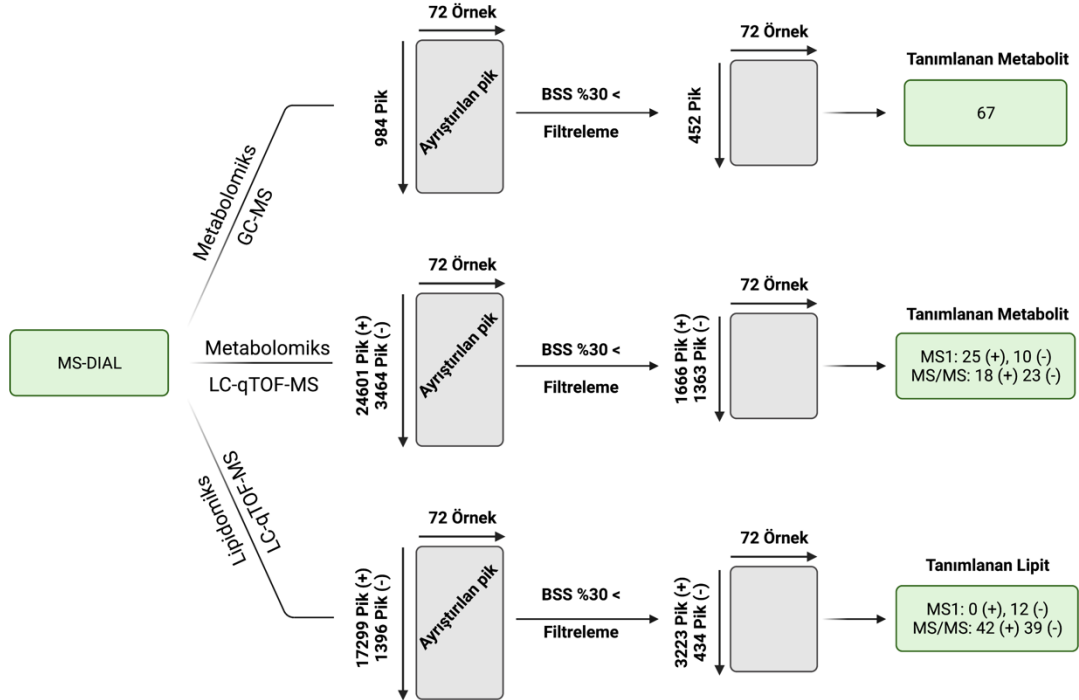


**Şekil 4.37.** Plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimize edilmiş koşulları gösteren model grafiği.

#### 4.2.6. Plazma Örneklerine ait Tanımlanan Metabolitler, Lipitler ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

Doku örneklerinden yapılan (Bölüm 4.1.6.) metabolomik ve lipidomik çalışmalarda yer alan bireylerden toplanan plazma örneklerinden (n=72) gerçekleştirilen metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham

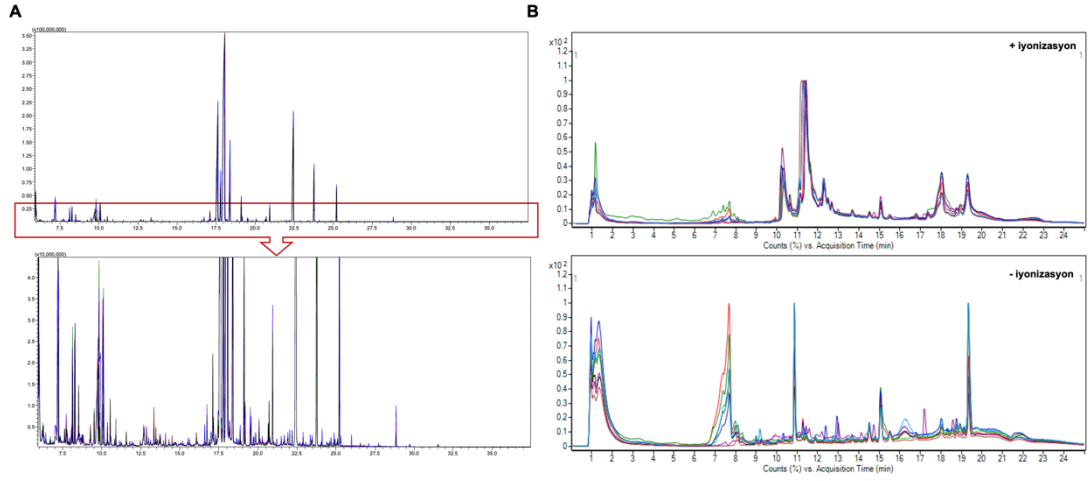
verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipid sayıları Şekil 4.38.'te verilmiştir.



**Şekil 4.38.** Plazma örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda elde edilen ham verilerin işlenmesinin ardından tanımlanan metabolit ve lipid sayıları.

### Metabolomik Analiz Sonuçları

Plazma örnekleri ile gerçekleştirilen GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait kromatogramlar Şekil 4.39.'da tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 4.23.'te verilmiştir. Toplamda 143 metabolit tanımlanmıştır. Kontrol grubu ile GBM hastaları arasında GC-MS, LC-qTOF-MS pozitif, LC-qTOF-MS negatif iyonizasyon modunda tanımlanan metabolitlerden sırasıyla 5, 3 ve 5 metabolit, kontrol grubu ile menenjiyom hastaları arasında 6, 2 ve 4 metabolit ve kontrol grubu ile akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar arasında ise 6, 2 ve 7 metabolit istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur.



**Şekil 4.39.** Plazma örneklerinden metabolomik analizlere ait örnek kromatogramlar. A) GC-MS, B) LC-qTOF-MS pozitif ve negatif iyonizasyon.

**Tablo 4.23.** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	3-indoleacetic acid	0.827 ± 0.095	1.113 ± 0.321	0.251	0.781 ± 0.116	0.799	1.624 ± 0.514	<b>0.021</b>
LC-MS (+)	(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid	1.063 ± 0.096	0.972 ± 0.114	0.614	0.994 ± 0.106	0.701	0.844 ± 0.116	0.230
LC-MS/MS (+)	10,20-Dihydroxyeicosanoic acid	0.996 ± 0.056	1.019 ± 0.084	0.830	0.949 ± 0.083	0.666	1.043 ± 0.087	0.668
LC-MS (+)	11A-Acetoxyprogesterone	1.053 ± 0.033	0.971 ± 0.06	0.221	0.916 ± 0.075	0.060	0.954 ± 0.070	0.159
LC-MS/MS (+)	1-Acetoxy-2-hydroxy-16-heptadecyn-4-one	1.055 ± 0.062	0.991 ± 0.054	0.573	0.888 ± 0.062	0.146	0.956 ± 0.109	0.428
LC-MS/MS (-)	1-Phenyl-2-pentanol	0.942 ± 0.091	1.240 ± 0.205	0.136	1.011 ± 0.135	0.697	0.925 ± 0.190	0.931
GC-MS	2,3-dimethylsuccinic acid	1.148 ± 0.126	0.921 ± 0.102	0.323	0.732 ± 0.076	0.070	0.904 ± 0.110	0.292
GC-MS	2-hydroxybutyric acid	1.095 ± 0.109	1.009 ± 0.104	0.666	0.804 ± 0.044	0.135	0.901 ± 0.129	0.345
LC-MS (+)	2-Myristoylglycerol	1.017 ± 0.033	0.988 ± 0.031	0.634	0.968 ± 0.044	0.437	0.992 ± 0.084	0.741
LC-MS (+)	3,5-diiodo-L-thyronine	0.972 ± 0.034	1.079 ± 0.055	0.118	0.929 ± 0.060	0.528	1.076 ± 0.068	0.149
LC-MS (+)	3-aminoisobutanoate	1.008 ± 0.036	0.966 ± 0.03	0.517	1.004 ± 0.029	0.950	1.007 ± 0.034	0.986
LC-MS/MS (-)	3b,12a-Dihydroxy-5a-cholanoic acid	0.684 ± 0.257	1.047 ± 0.304	0.453	1.461 ± 0.934	0.267	1.438 ± 0.659	0.202
LC-MS/MS (-)	3-carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid	1.094 ± 0.166	0.868 ± 0.137	0.455	1.027 ± 0.175	0.829	0.823 ± 0.142	0.373
LC-MS (-)	3-hydroxybutanoic acid	0.991 ± 0.061	1.082 ± 0.043	0.408	0.904 ± 0.069	0.443	1.042 ± 0.044	0.640
GC-MS	3-indolelactic acid	1.092 ± 0.089	0.927 ± 0.119	0.337	0.813 ± 0.140	0.118	0.984 ± 0.218	0.590
LC-MS/MS (-)	3-Indolepropionic acid	0.602 ± 0.133	1.177 ± 0.424	0.092	1.850 ± 0.202	<b>0.000</b>	1.167 ± 0.366	0.075
LC-MS (-)	3-Methylcrotonylglycine	0.962 ± 0.069	1.075 ± 0.172	0.468	1.024 ± 0.115	0.652	1.015 ± 0.083	0.683
LC-MS(-)	3-Methylindole	0.779 ± 0.101	1.306 ± 0.414	0.078	0.765 ± 0.142	0.942	1.594 ± 0.504	<b>0.019</b>
LC-MS/MS (-)	3-Oxo-octadecanoic acid	1.049 ± 0.153	0.818 ± 0.135	0.409	1.420 ± 0.301	0.247	0.615 ± 0.070	0.114
GC-MS	3-phenyllactic acid	1.013 ± 0.101	1.042 ± 0.103	0.878	1.007 ± 0.081	0.973	0.911 ± 0.101	0.584
GC-MS	5-hydroxy-l-tryptophan	1.057 ± 0.081	0.95 ± 0.026	0.457	0.931 ± 0.020	0.381	0.950 ± 0.028	0.456
GC-MS	6-deoxy-d-glucose	0.994 ± 0.092	1.073 ± 0.185	0.680	0.890 ± 0.111	0.550	1.056 ± 0.132	0.728
LC-MS/MS (-)	6-Hexyl-1,4-dioxan-2-one	0.987 ± 0.094	0.904 ± 0.139	0.651	1.057 ± 0.088	0.687	1.079 ± 0.131	0.611
LC-MS/MS (-)	7-Hydroxyoctadecanoic acid	0.989 ± 0.064	1.029 ± 0.153	0.777	1.112 ± 0.166	0.404	0.893 ± 0.059	0.420

**Tablo 4.23. (Devam)** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (-)	9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid	1.061 ± 0.238	0.642 ± 0.129	0.325	0.626 ± 0.153	0.310	1.547 ± 0.645	0.383
LC-MS (+)	Acetoacetate	1.763 ± 0.503	0.216 ± 0.034	0.085	0.229 ± 0.023	0.087	0.266 ± 0.043	0.095
LC-MS (+)	Adenine	1.235 ± 0.427	0.833 ± 0.138	0.595	0.640 ± 0.102	0.431	0.823 ± 0.167	0.586
GC-MS	Alpha ketoglutaric acid	0.891 ± 0.068	1.005 ± 0.152	0.444	1.056 ± 0.186	0.305	1.266 ± 0.270	0.059
LC-MS/MS (-)	Androsterone sulfat	0.956 ± 0.164	1.026 ± 0.276	0.830	1.569 ± 0.610	0.177	0.538 ± 0.082	0.157
GC-MS	Arabitol	0.962 ± 0.069	0.982 ± 0.125	0.886	0.903 ± 0.078	0.647	1.228 ± 0.218	0.129
GC-MS	Asparagine	0.982 ± 0.076	1.090 ± 0.106	0.464	1.206 ± 0.184	0.190	0.757 ± 0.067	0.108
GC-MS	Aspartic acid	1.041 ± 0.087	1.106 ± 0.158	0.714	0.785 ± 0.097	0.122	0.987 ± 0.119	0.748
LC-MS/MS (+)	C17_Sphingosine	0.953 ± 0.039	1.003 ± 0.067	0.526	0.992 ± 0.048	0.594	1.146 ± 0.094	<b>0.030</b>
GC-MS	Capric acid	0.947 ± 0.058	0.951 ± 0.127	0.974	1.081 ± 0.078	0.228	1.128 ± 0.180	0.210
GC-MS	Cholesterol	0.984 ± 0.093	0.765 ± 0.062	0.194	1.257 ± 0.084	0.114	1.027 ± 0.127	0.810
LC-MS/MS (-)	Cholic Acid	0.484 ± 0.379	1.022 ± 0.649	0.481	2.423 ± 2.093	0.159	1.103 ± 0.740	0.433
GC-MS	Cis-aconitic acid	0.961 ± 0.035	1.117 ± 0.119	0.096	1.020 ± 0.027	0.363	0.980 ± 0.035	0.776
GC-MS	Citric acid	0.954 ± 0.098	1.083 ± 0.155	0.506	1.042 ± 0.089	0.621	1.014 ± 0.145	0.750
GC-MS	Citrulline	0.927 ± 0.096	1.264 ± 0.168	0.088	1.022 ± 0.182	0.632	0.931 ± 0.148	0.983
GC-MS	Creatinine	0.931 ± 0.061	0.958 ± 0.08	0.818	1.094 ± 0.118	0.198	1.155 ± 0.191	0.144
LC-MS (+)	Cycloserine	0.900 ± 0.174	1.437 ± 0.326	0.138	0.775 ± 0.093	0.687	1.087 ± 0.220	0.574
GC-MS	Cytidine	0.839 ± 0.066	1.156 ± 0.166	<b>0.038</b>	1.209 ± 0.080	<b>0.004</b>	1.118 ± 0.155	0.060
LC-MS (-)	Cytidine 3'-monophosphate	0.946 ± 0.104	1.116 ± 0.191	0.424	1.182 ± 0.181	0.263	0.863 ± 0.197	0.697
GC-MS	Dehydroascorbic acid	0.716 ± 0.040	1.276 ± 0.086	<b>0.000</b>	1.204 ± 0.116	<b>0.000</b>	1.371 ± 0.161	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	Dehydroepiandrosterone sulfat	1.283 ± 0.202	0.445 ± 0.088	<b>0.023</b>	1.187 ± 0.326	0.811	0.521 ± 0.093	<b>0.038</b>
LC-MS/MS (+)	Dehydrophytosphingosine	0.985 ± 0.052	0.994 ± 0.042	0.925	0.923 ± 0.052	0.519	1.127 ± 0.110	0.206
LC-MS/MS (+)	DG(18:2n6/0:0/22:4n6)	0.989 ± 0.047	1.010 ± 0.064	0.821	0.898 ± 0.047	0.297	1.125 ± 0.102	0.184
LC-MS/MS (+)	DG(24:1(15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	1.010 ± 0.041	0.988 ± 0.062	0.789	0.859 ± 0.064	0.065	1.123 ± 0.153	0.316

**Tablo 4.23. (Devam)** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	D-glucosaminic acid	1.080 ± 0.104	1.026 ± 0.286	0.827	0.923 ± 0.163	0.443	0.813 ± 0.213	0.225
GC-MS	D-glucose	1.052 ± 0.062	0.884 ± 0.077	0.155	0.972 ± 0.050	0.479	0.987 ± 0.087	0.587
GC-MS	DL-3-aminoisobutyric acid	0.992 ± 0.026	0.991 ± 0.032	0.996	0.948 ± 0.046	0.412	1.086 ± 0.105	0.212
GC-MS	DL-glyceraldehyde	0.990 ± 0.082	1.127 ± 0.100	0.380	0.959 ± 0.149	0.855	0.944 ± 0.095	0.765
GC-MS	DL-isoleucine	1.080 ± 0.104	0.985 ± 0.067	0.607	0.920 ± 0.064	0.389	0.855 ± 0.061	0.226
LC-MS (+)	DL-Palmitoylcarnitine	0.915 ± 0.092	1.038 ± 0.140	0.496	1.045 ± 0.186	0.501	1.174 ± 0.175	0.176
GC-MS	D-malic acid	0.905 ± 0.049	0.897 ± 0.180	0.953	1.383 ± 0.286	<b>0.012</b>	1.004 ± 0.153	0.420
GC-MS	D-sorbitol	1.024 ± 0.064	0.973 ± 0.063	0.666	1.025 ± 0.063	0.994	0.930 ± 0.075	0.436
GC-MS	D-threitol	1.000 ± 0.081	1.053 ± 0.112	0.735	0.781 ± 0.053	0.138	1.165 ± 0.166	0.337
LC-MS/MS (-)	Gamma-Linolenic acid	0.896 ± 0.126	1.015 ± 0.246	0.648	1.152 ± 0.226	0.319	1.145 ± 0.335	0.394
GC-MS	Glucosamine-1P	0.800 ± 0.088	0.998 ± 0.219	0.322	1.347 ± 0.275	<b>0.016</b>	1.256 ± 0.236	<b>0.030</b>
GC-MS	Glucose 6-phosphate	0.815 ± 0.112	1.491 ± 0.305	<b>0.012</b>	0.985 ± 0.125	0.414	1.079 ± 0.319	0.324
GC-MS	Glutamic acid	0.937 ± 0.122	1.131 ± 0.264	0.459	0.917 ± 0.200	0.934	1.140 ± 0.215	0.412
LC-MS (-)	Glutamine	0.847 ± 0.132	0.961 ± 0.187	0.654	0.808 ± 0.186	0.878	1.690 ± 0.431	<b>0.015</b>
GC-MS	Glyceric acid	0.787 ± 0.050	1.145 ± 0.165	<b>0.007</b>	1.323 ± 0.133	<b>0.000</b>	1.170 ± 0.182	<b>0.007</b>
GC-MS	Glycerol	1.033 ± 0.078	0.897 ± 0.064	0.338	1.025 ± 0.086	0.956	0.978 ± 0.078	0.701
GC-MS	Glycerol 1-phosphate	1.086 ± 0.106	1.048 ± 0.164	0.856	0.818 ± 0.065	0.162	0.877 ± 0.088	0.280
GC-MS	Glycine	0.958 ± 0.072	1.102 ± 0.080	0.285	0.993 ± 0.105	0.800	1.031 ± 0.113	0.603
LC-MS/MS (-)	Glycochenodeoxycholic acid 3-glucuronide	0.639 ± 0.067	0.472 ± 0.091	0.198	1.878 ± 1.371	0.120	1.734 ± 0.768	<b>0.019</b>
LC-MS/MS (-)	Glycocholic acid	0.674 ± 0.109	1.374 ± 0.642	0.094	0.844 ± 0.216	0.458	1.759 ± 0.365	<b>0.000</b>
LC-MS (-)	Glycohyodeoxycholic acid	0.911 ± 0.193	1.023 ± 0.250	0.760	1.457 ± 0.997	0.409	0.786 ± 0.338	0.749
LC-MS (+)	Guanine	1.013 ± 0.031	0.987 ± 0.028	0.649	0.978 ± 0.023	0.535	0.995 ± 0.057	0.782
LC-MS (+)	Henicosanoic acid	1.032 ± 0.050	1.085 ± 0.091	0.599	0.925 ± 0.070	0.264	0.894 ± 0.053	0.138
GC-MS	Heptadecanoic acid	0.978 ± 0.057	0.989 ± 0.059	0.916	1.084 ± 0.056	0.315	0.995 ± 0.060	0.873

**Tablo 4.23. (Devam)** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (-)	Hippuric acid	0.716 ± 0.126	0.930 ± 0.217	0.400	1.196 ± 0.236	0.068	1.726 ± 0.882	0.070
LC-MS (-)	Hydroxyphenyllactic acid	0.880 ± 0.082	1.300 ± 0.188	<b>0.022</b>	1.025 ± 0.100	0.350	1.035 ± 0.214	0.413
LC-MS (-)	Inosine	0.949 ± 0.096	0.586 ± 0.228	0.093	1.178 ± 0.476	0.473	1.390 ± 0.658	0.285
GC-MS	Isoleucine	1.042 ± 0.106	1.057 ± 0.145	0.941	0.897 ± 0.155	0.482	0.921 ± 0.088	0.530
LC-MS (+)	Isopalmitic acid	1.052 ± 0.057	0.995 ± 0.067	0.600	0.869 ± 0.047	0.084	0.981 ± 0.083	0.525
GC-MS	Itaconic acid	0.952 ± 0.045	0.957 ± 0.071	0.954	0.998 ± 0.098	0.631	1.190 ± 0.139	<b>0.037</b>
LC-MS/MS (-)	Ketoleucine	1.008 ± 0.078	1.036 ± 0.105	0.847	0.862 ± 0.070	0.310	1.079 ± 0.128	0.645
GC-MS	L-(+) lactic acid	0.963 ± 0.084	1.106 ± 0.177	0.426	0.932 ± 0.119	0.851	1.074 ± 0.157	0.521
LC-MS (+)	L-Arginine	1.302 ± 0.394	0.722 ± 0.141	0.407	0.660 ± 0.152	0.359	0.712 ± 0.242	0.405
LC-MS (+)	Lauroylcarnitine	1.180 ± 0.131	0.693 ± 0.079	<b>0.042</b>	0.642 ± 0.103	<b>0.027</b>	1.125 ± 0.251	0.839
GC-MS	Leucine	1.053 ± 0.106	1.032 ± 0.162	0.921	0.902 ± 0.163	0.469	0.909 ± 0.102	0.462
GC-MS	L-glutamic acid	1.024 ± 0.087	0.923 ± 0.175	0.581	1.034 ± 0.146	0.953	0.969 ± 0.147	0.754
LC-MS (+)	Linoleoyl Ethanolamide	0.917 ± 0.104	1.209 ± 0.245	0.208	0.668 ± 0.112	0.200	1.371 ± 0.226	<b>0.047</b>
LC-MS (+)	Lithocholic Acid	1.044 ± 0.036	0.966 ± 0.027	0.226	0.878 ± 0.036	<b>0.014</b>	1.024 ± 0.067	0.776
GC-MS	L-methionine	1.058 ± 0.102	1.007 ± 0.072	0.783	0.953 ± 0.135	0.588	0.867 ± 0.079	0.302
LC-MS/MS (-)	LPC (18:2)	1.016 ± 0.091	0.946 ± 0.128	0.689	1.168 ± 0.126	0.386	0.839 ± 0.094	0.297
LC-MS (-)	LPE (18:1)	1.077 ± 0.136	0.872 ± 0.313	0.493	1.066 ± 0.174	0.966	0.830 ± 0.150	0.334
GC-MS	L-pyroglutamic acid	0.998 ± 0.054	1.007 ± 0.086	0.933	1.055 ± 0.071	0.583	0.942 ± 0.089	0.603
GC-MS	L-tryptophan	1.047 ± 0.124	1.109 ± 0.160	0.792	0.836 ± 0.173	0.377	0.912 ± 0.201	0.580
GC-MS	L-tyrosine	1.101 ± 0.087	0.975 ± 0.080	0.431	0.833 ± 0.105	0.108	0.888 ± 0.089	0.190
GC-MS	L-valine	0.958 ± 0.048	1.073 ± 0.031	0.186	1.029 ± 0.034	0.413	1.024 ± 0.031	0.448
LC-MS/MS (+)	LysoPC(16:0)	1.007 ± 0.057	0.968 ± 0.079	0.720	0.967 ± 0.083	0.713	1.044 ± 0.108	0.755
LC-MS/MS (+)	LysoPC(18:1)	0.992 ± 0.071	1.002 ± 0.222	0.952	1.072 ± 0.117	0.572	0.951 ± 0.120	0.775
LC-MS/MS (+)	LysoPC(18:3)	1.010 ± 0.036	0.987 ± 0.050	0.748	0.962 ± 0.052	0.505	1.021 ± 0.071	0.877

**Tablo 4.23. (Devam)** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
LC-MS/MS (-)	LysoPE(0:0/18:2(9Z,12Z))	0.831 ± 0.085	1.334 ± 0.224	<b>0.013</b>	1.191 ± 0.164	<b>0.044</b>	0.980 ± 0.151	0.386
GC-MS	Malonic acid	1.008 ± 0.086	1.068 ± 0.174	0.739	1.020 ± 0.052	0.935	0.890 ± 0.165	0.507
GC-MS	maltose	0.715 ± 0.222	1.895 ± 0.906	0.072	1.278 ± 0.815	0.354	0.681 ± 0.347	0.938
GC-MS	Methionine	1.057 ± 0.105	1.068 ± 0.185	0.959	0.813 ± 0.142	0.229	0.947 ± 0.105	0.571
GC-MS	Methyl stearate	0.997 ± 0.041	0.981 ± 0.033	0.822	1.021 ± 0.032	0.752	1.007 ± 0.032	0.893
GC-MS	Methyl-beta-D-galactopyranoside	1.143 ± 0.137	0.809 ± 0.237	0.228	0.716 ± 0.131	0.094	1.045 ± 0.442	0.777
LC-MS/MS (+)	MG(0:0/18:2(9Z,12Z)/0:0)	1.047 ± 0.034	0.908 ± 0.033	<b>0.030</b>	0.956 ± 0.051	0.172	0.996 ± 0.053	0.445
LC-MS/MS (+)	MG(0:0/18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)	1.004 ± 0.029	1.018 ± 0.029	0.792	0.994 ± 0.024	0.858	0.976 ± 0.044	0.627
LC-MS/MS (+)	MG(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0/0:0)	1.096 ± 0.086	0.860 ± 0.088	0.141	0.869 ± 0.091	0.159	0.983 ± 0.104	0.486
LC-MS/MS (+)	MG(i-14:0/0:0/0:0)	1.039 ± 0.068	1.057 ± 0.112	0.895	0.877 ± 0.059	0.199	0.949 ± 0.088	0.488
LC-MS/MS (+)	MG(i-16:0/0:0/0:0)	1.008 ± 0.036	1.022 ± 0.044	0.834	0.978 ± 0.035	0.651	0.978 ± 0.056	0.671
GC-MS	Myo-inositol	1.009 ± 0.118	1.178 ± 0.149	0.453	0.882 ± 0.085	0.553	0.912 ± 0.164	0.670
LC-MS (+)	Myristic acid	1.073 ± 0.076	0.866 ± 0.086	0.145	0.947 ± 0.091	0.377	0.967 ± 0.078	0.446
GC-MS	N-acetyl-5-hydroxytryptamine	1.097 ± 0.170	0.899 ± 0.125	0.519	1.019 ± 0.119	0.800	0.790 ± 0.088	0.314
LC-MS (-)	N-Acetyl-L-aspartic acid	0.943 ± 0.115	1.116 ± 0.201	0.457	1.202 ± 0.208	0.270	0.853 ± 0.201	0.695
GC-MS	N-acetyl-l-glutamic acid	1.090 ± 0.142	0.812 ± 0.122	0.286	1.191 ± 0.221	0.718	0.727 ± 0.096	0.160
LC-MS (+)	Nicotinic acid	0.949 ± 0.165	1.116 ± 0.255	0.607	1.270 ± 0.287	0.337	0.767 ± 0.244	0.572
GC-MS	N-methyl-DL-glutamic acid	0.975 ± 0.104	1.043 ± 0.122	0.728	1.111 ± 0.096	0.476	0.923 ± 0.088	0.783
LC-MS (+)	N-Methyl-L-proline	1.129 ± 0.265	0.838 ± 0.122	0.537	0.876 ± 0.076	0.589	0.899 ± 0.080	0.623
LC-MS/MS (-)	Nonate	1.190 ± 0.172	0.822 ± 0.337	0.305	0.891 ± 0.356	0.412	0.715 ± 0.238	0.155
LC-MS/MS (-)	N-Undecanoylglycine	1.167 ± 0.082	0.805 ± 0.07	<b>0.018</b>	0.767 ± 0.099	<b>0.012</b>	0.926 ± 0.180	0.175
LC-MS (+)	Palmitoleoyl Ethanolamide	1.301 ± 0.313	0.405 ± 0.155	0.112	0.710 ± 0.308	0.308	0.983 ± 0.318	0.583
LC-MS/MS (+)	PC(14:0/18:1(9Z))	0.856 ± 0.163	0.998 ± 0.202	0.644	1.038 ± 0.384	0.612	1.395 ± 0.342	0.123
LC-MS/MS (-)	Phenylacetylglutamine	0.866 ± 0.130	0.906 ± 0.165	0.872	0.821 ± 0.172	0.855	1.674 ± 0.482	<b>0.027</b>



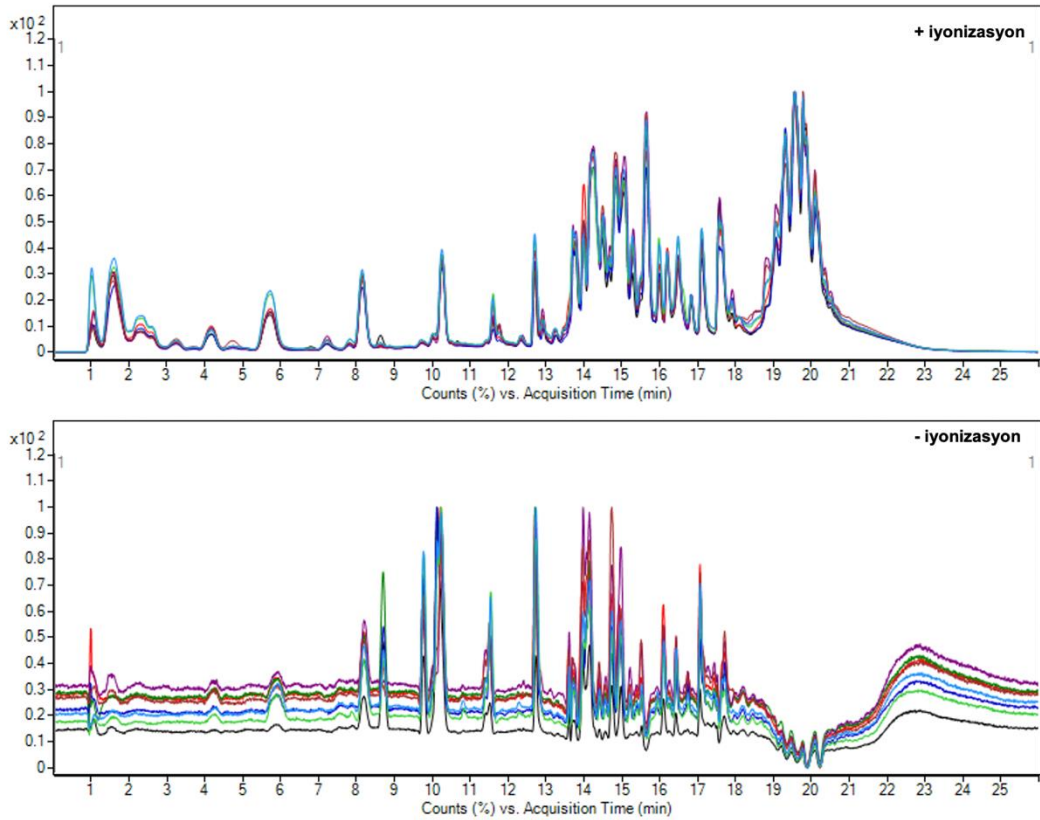
**Tablo 4.23. (Devam)** Plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS ile tanımlanan metabolitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p	Ortalama ± SH	p
GC-MS	Phenylalanine	1.006 ± 0.082	1.127 ± 0.107	0.442	0.890 ± 0.141	0.486	0.966 ± 0.080	0.796
LC-MS (+)	Phosphocholine	1.003 ± 0.057	0.979 ± 0.078	0.827	0.989 ± 0.074	0.896	1.024 ± 0.098	0.851
GC-MS	Phosphoric acid	0.990 ± 0.038	1.039 ± 0.042	0.487	1.008 ± 0.020	0.785	0.983 ± 0.049	0.933
LC-MS/MS (+)	Phytosphingosine	0.999 ± 0.099	0.934 ± 0.131	0.734	0.838 ± 0.117	0.390	1.232 ± 0.200	0.263
GC-MS	Pyrophosphate	0.994 ± 0.109	0.929 ± 0.134	0.752	0.988 ± 0.099	0.973	1.100 ± 0.168	0.623
GC-MS	Pyrrole -2-carboxylic acid	0.880 ± 0.069	1.234 ± 0.202	<b>0.038</b>	1.150 ± 0.119	0.056	0.976 ± 0.123	0.494
GC-MS	Ribonic acid-gamma-lactone	1.031 ± 0.096	1.026 ± 0.088	0.977	1.069 ± 0.159	0.845	0.811 ± 0.075	0.206
GC-MS	Ribose	0.979 ± 0.050	1.130 ± 0.084	0.132	0.959 ± 0.044	0.824	0.974 ± 0.066	0.961
GC-MS	Serine	0.990 ± 0.081	1.007 ± 0.073	0.905	1.087 ± 0.060	0.504	0.937 ± 0.092	0.730
LC-MS (+)	Sphinganine	1.038 ± 0.046	0.802 ± 0.051	<b>0.009</b>	0.948 ± 0.055	0.308	1.137 ± 0.099	0.317
LC-MS/MS (+)	S-Prenyl-L-cysteine	0.787 ± 0.209	1.097 ± 0.348	0.459	1.476 ± 0.147	0.072	1.066 ± 0.321	0.497
GC-MS	Sucrose	0.517 ± 0.054	0.834 ± 0.373	0.175	0.313 ± 0.033	<b>0.039</b>	3.302 ± 2.01	<b>0.018</b>
LC-MS (+)	Testosterone	1.193 ± 0.273	0.850 ± 0.221	0.490	0.572 ± 0.115	0.203	1.000 ± 0.328	0.707
LC-MS/MS (-)	Tetradecanedioic acid	0.446 ± 0.085	1.685 ± 0.585	<b>0.001</b>	1.808 ± 0.308	<b>0.000</b>	1.168 ± 0.348	<b>0.005</b>
GC-MS	Threonine	1.019 ± 0.095	0.939 ± 0.065	0.637	1.072 ± 0.110	0.768	0.932 ± 0.105	0.620
LC-MS (+)	Thymidine 5'-monophosphate	0.946 ± 0.175	1.329 ± 0.397	0.317	1.308 ± 0.310	0.310	0.525 ± 0.212	0.207
GC-MS	Trans-3-hexenedioic acid	0.995 ± 0.055	1.010 ± 0.086	0.888	1.053 ± 0.071	0.577	0.954 ± 0.092	0.709
LC-MS (+)	Tricosanoic acid	1.001 ± 0.029	0.988 ± 0.048	0.814	0.978 ± 0.046	0.682	1.031 ± 0.048	0.610
LC-MS/MS (+)	Tryptophan	1.229 ± 0.565	0.820 ± 0.077	0.680	0.671 ± 0.047	0.574	0.821 ± 0.083	0.681
GC-MS	Uracil	0.962 ± 0.104	1.080 ± 0.184	0.578	1.047 ± 0.101	0.658	0.986 ± 0.118	0.902
GC-MS	Valine	1.065 ± 0.096	1.014 ± 0.104	0.777	0.955 ± 0.082	0.529	0.835 ± 0.06	0.185
LC-MS/MS (-)	Vanillin 4-sulfate	1.150 ± 0.179	1.136 ± 0.432	0.972	0.586 ± 0.264	0.110	0.829 ± 0.339	0.386
GC-MS	Xylitol	1.109 ± 0.084	0.831 ± 0.125	0.094	0.854 ± 0.081	0.103	0.989 ± 0.082	0.438

SH: Standart hata. p<0,05 (**koyu**) kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı metabolitler.

### Lipidomik Analiz Sonuçları

Plazma örnekleri ile pozitif ve negatif iyonizasyon modunda gerçekleştirilen LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlere ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.40'ta verilmiştir. Pozitif ve negatif iyonizasyon modunda toplamda 93 lipit tanımlanmıştır. Tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.24'te verilmiştir. Kontrol grubu ile GBM hastaları arasında LC-qTOF-MS pozitif ve LC-qTOF-MS negatif iyonizasyon modunda tanımlanan lipitlerden sırasıyla 8 ve 4 lipit, kontrol grubu ile menenjiyom hastaları arasında 10 ve 4 metabolit ve kontrol grubu ile akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar arasında 5 ve 2 lipit istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



**Şekil 4.40.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS (pozitif ve negatif iyonizasyon) ile yapılan lipidomik analizlere ait örnek kromatogramlar

**Tablo 4.24.** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P
LC-MS/MS (+)	2-Oxo-4-methylthiobutanoic acid	1.140 ± 0.185	0.825 ± 0.184	0.358	0.767 ± 0.128	0.266	0.989 ± 0.278	0.677
LC-MS/MS (-)	Alpha-Linolenic acid	1.099 ± 0.177	0.809 ± 0.224	0.390	0.810 ± 0.174	0.378	1.083 ± 0.385	0.967
LC-MS/MS (-)	Bovinic acid	1.120 ± 0.161	0.830 ± 0.154	0.330	0.875 ± 0.204	0.425	0.936 ± 0.277	0.570
LC-MS/MS (-)	CE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.057 ± 0.045	0.904 ± 0.056	0.078	0.813 ± 0.027	<b>0.004</b>	1.113 ± 0.167	0.646
LC-MS/MS (+)	CE(DiMe(13,5))	0.448 ± 0.099	0.767 ± 0.196	0.128	2.094 ± 0.836	<b>0.002</b>	1.794 ± 0.980	<b>0.025</b>
LC-MS/MS (-)	Cholesterol sulfate	1.020 ± 0.086	0.947 ± 0.105	0.654	0.861 ± 0.119	0.340	1.130 ± 0.145	0.525
LC-MS/MS (+)	DG(19:0/20:2(11Z,14Z)/0:0)[iso2]	1.225 ± 0.131	0.701 ± 0.165	<b>0.039</b>	0.694 ± 0.112	<b>0.030</b>	0.930 ± 0.208	0.256
LC-MS/MS (+)	DG(19:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)[iso2]	1.058 ± 0.045	0.935 ± 0.076	0.176	0.952 ± 0.071	0.236	0.939 ± 0.074	0.186
LC-MS/MS (-)	Docosahexaenoic acid	1.162 ± 0.115	0.843 ± 0.150	0.150	0.697 ± 0.070	<b>0.027</b>	0.974 ± 0.146	0.388
LC-MS/MS (-)	Eicosadienoic acid	1.140 ± 0.149	0.868 ± 0.118	0.317	0.806 ± 0.149	0.228	0.907 ± 0.202	0.417
LC-MS/MS (-)	FAHFA(18:1(9Z)/11-O-18:0)	1.185 ± 0.174	0.679 ± 0.117	0.110	0.938 ± 0.188	0.446	0.829 ± 0.296	0.309
LC-MS (-)	Hexacosanoic acid	0.997 ± 0.018	0.990 ± 0.031	0.861	1.004 ± 0.045	0.867	1.015 ± 0.037	0.633
LC-MS/MS (+)	LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z))	1.107 ± 0.071	0.837 ± 0.096	0.052	0.949 ± 0.133	0.282	0.894 ± 0.119	0.139
LC-MS/MS (+)	LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))	1.044 ± 0.100	0.775 ± 0.074	0.139	1.142 ± 0.258	0.669	0.952 ± 0.186	0.651
LC-MS/MS (+)	MG (18:0)	1.021 ± 0.018	0.964 ± 0.009	0.085	0.977 ± 0.028	0.228	0.997 ± 0.016	0.468
LC-MS/MS (+)	MG (18:2)	1.132 ± 0.279	0.835 ± 0.364	0.577	0.546 ± 0.299	0.261	1.223 ± 0.540	0.875
LC-MS/MS (+)	MG(18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0/0:0)	1.032 ± 0.020	0.959 ± 0.017	0.051	0.952 ± 0.033	0.050	0.993 ± 0.014	0.280
LC-MS/MS (+)	N-(Heptadecanoyl)-ethanolamine	1.152 ± 0.038	0.747 ± 0.039	<b>0.000</b>	0.893 ± 0.055	<b>0.001</b>	0.903 ± 0.038	<b>0.001</b>
LC-MS/MS (+)	N-(Pentadecanoyl)-ethanolamine	1.157 ± 0.035	0.783 ± 0.042	<b>0.000</b>	0.859 ± 0.051	<b>0.000</b>	0.886 ± 0.029	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PA(20:2(11Z,14Z)/18:2(9Z,12Z))	0.947 ± 0.031	1.052 ± 0.050	0.090	1.007 ± 0.048	0.324	1.099 ± 0.065	<b>0.024</b>
LC-MS/MS (-)	PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/16:0)	0.915 ± 0.020	1.064 ± 0.036	<b>0.001</b>	1.046 ± 0.032	<b>0.002</b>	1.145 ± 0.053	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	Palmitic acid	1.031 ± 0.059	0.937 ± 0.059	0.391	0.943 ± 0.080	0.439	1.028 ± 0.076	0.979

**Tablo 4.24. (Devam)** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH	P	Ortalama $\pm$ SH	P	Ortalama $\pm$ SH	P
LC-MS/MS (+)	Palmitoleoylethanolamde	1.110 $\pm$ 0.13	0.856 $\pm$ 0.120	0.291	0.957 $\pm$ 0.166	0.536	0.857 $\pm$ 0.184	0.317
LC-MS (-)	PC O-14:0_17:1;1O	1.030 $\pm$ 0.061	0.825 $\pm$ 0.083	0.085	0.900 $\pm$ 0.089	0.275	1.185 $\pm$ 0.179	0.295
LC-MS (-)	PC O-14:0_17:2;1O	0.959 $\pm$ 0.112	1.103 $\pm$ 0.484	0.669	1.061 $\pm$ 0.204	0.655	0.959 $\pm$ 0.166	1.000
LC-MS (-)	PC O-14:0_18:2;1O	0.948 $\pm$ 0.084	1.153 $\pm$ 0.363	0.421	1.021 $\pm$ 0.170	0.682	0.982 $\pm$ 0.134	0.841
LC-MS (-)	PC O-15:0_18:1;1O	0.948 $\pm$ 0.061	0.947 $\pm$ 0.106	0.997	0.981 $\pm$ 0.120	0.794	1.227 $\pm$ 0.201	0.079
LC-MS (-)	PC O-15:0_22:5;1O	0.960 $\pm$ 0.064	0.947 $\pm$ 0.152	0.923	1.057 $\pm$ 0.122	0.466	1.115 $\pm$ 0.160	0.287
LC-MS (-)	PC O-15:1_20:5;1O	1.080 $\pm$ 0.101	0.774 $\pm$ 0.135	0.116	0.997 $\pm$ 0.157	0.674	0.988 $\pm$ 0.267	0.691
LC-MS (-)	PC O-16:0_18:2;1O	0.940 $\pm$ 0.070	1.156 $\pm$ 0.287	0.293	1.066 $\pm$ 0.201	0.454	0.957 $\pm$ 0.109	0.901
LC-MS (-)	PC O-17:0_22:5;1O	0.926 $\pm$ 0.069	0.925 $\pm$ 0.158	0.998	1.133 $\pm$ 0.207	0.223	1.165 $\pm$ 0.241	0.195
LC-MS (-)	PC O-17:1_22:6;1O	1.073 $\pm$ 0.105	0.970 $\pm$ 0.120	0.601	0.815 $\pm$ 0.091	0.183	0.996 $\pm$ 0.113	0.693
LC-MS/MS (+)	PC(18:0/18:0)	0.969 $\pm$ 0.037	1.084 $\pm$ 0.083	0.157	1.008 $\pm$ 0.095	0.649	1.001 $\pm$ 0.083	0.690
LC-MS/MS (+)	PC(O-16:0/19:0)	0.955 $\pm$ 0.054	0.906 $\pm$ 0.079	0.635	1.087 $\pm$ 0.123	0.265	1.141 $\pm$ 0.174	0.177
LC-MS/MS (+)	PC(O-16:1(9Z)/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	0.984 $\pm$ 0.125	1.156 $\pm$ 0.307	0.542	0.775 $\pm$ 0.197	0.397	1.116 $\pm$ 0.224	0.604
LC-MS/MS (+)	PC(P-18:0/17:2(9Z,12Z))	1.121 $\pm$ 0.099	0.874 $\pm$ 0.131	0.195	0.893 $\pm$ 0.086	0.210	0.870 $\pm$ 0.077	0.167
LC-MS/MS (+)	PC(P-20:0/17:1(9Z))	1.000 $\pm$ 0.035	1.077 $\pm$ 0.064	0.286	1.020 $\pm$ 0.040	0.765	0.903 $\pm$ 0.098	0.247
LC-MS/MS (+)	PC(P-20:0/17:2(9Z,12Z))	0.989 $\pm$ 0.044	0.974 $\pm$ 0.053	0.859	1.044 $\pm$ 0.071	0.522	1.014 $\pm$ 0.074	0.772
LC-MS/MS (-)	PE(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.042 $\pm$ 0.112	1.093 $\pm$ 0.252	0.832	0.716 $\pm$ 0.092	0.113	1.065 $\pm$ 0.186	0.917
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/22:1(13Z))	0.981 $\pm$ 0.070	1.014 $\pm$ 0.128	0.821	1.105 $\pm$ 0.136	0.396	0.938 $\pm$ 0.131	0.761
LC-MS/MS (+)	PE(20:0/22:2(13Z,16Z))	0.979 $\pm$ 0.060	0.921 $\pm$ 0.126	0.653	1.089 $\pm$ 0.111	0.375	1.054 $\pm$ 0.124	0.558
LC-MS/MS (+)	PE(22:2(13Z,16Z)/20:1(11Z))	1.065 $\pm$ 0.044	0.830 $\pm$ 0.069	<b>0.009</b>	1.024 $\pm$ 0.077	0.640	0.950 $\pm$ 0.072	0.188
LC-MS/MS (+)	PE(22:2(13Z,16Z)/22:2(13Z,16Z))	1.048 $\pm$ 0.060	0.987 $\pm$ 0.111	0.616	0.926 $\pm$ 0.111	0.321	0.943 $\pm$ 0.112	0.394
LC-MS/MS (+)	PE(O-20:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1.045 $\pm$ 0.074	0.996 $\pm$ 0.145	0.748	1.058 $\pm$ 0.108	0.930	0.810 $\pm$ 0.101	0.102

**Tablo 4.24. (Devam)** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama $\pm$ SH	Ortalama $\pm$ SH	P	Ortalama $\pm$ SH	P	Ortalama $\pm$ SH	P
LC-MS/MS (+)	PE(P-18:0/22:2(13Z,16Z))	1.035 $\pm$ 0.040	0.974 $\pm$ 0.090	0.477	1.029 $\pm$ 0.081	0.936	0.891 $\pm$ 0.106	0.120
LC-MS/MS (+)	PE(P-20:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	1.030 $\pm$ 0.048	0.890 $\pm$ 0.098	0.167	1.035 $\pm$ 0.079	0.965	0.984 $\pm$ 0.118	0.668
LC-MS/MS (+)	PE-Cer(d16:2(4E,6E)/16:0(2OH))	0.917 $\pm$ 0.019	1.055 $\pm$ 0.013	<b>0.000</b>	1.084 $\pm$ 0.019	<b>0.000</b>	1.109 $\pm$ 0.016	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PG(P-16:0/19:1(9Z))	1.071 $\pm$ 0.060	0.871 $\pm$ 0.075	0.083	0.884 $\pm$ 0.064	0.097	1.034 $\pm$ 0.111	0.765
LC-MS/MS (-)	PG(P-18:0/15:0)	1.073 $\pm$ 0.067	0.878 $\pm$ 0.076	0.126	0.905 $\pm$ 0.078	0.187	0.996 $\pm$ 0.130	0.581
LC-MS/MS (-)	PG(P-18:0/16:0)	1.084 $\pm$ 0.066	0.915 $\pm$ 0.075	0.176	0.863 $\pm$ 0.069	0.075	0.970 $\pm$ 0.123	0.401
LC-MS/MS (-)	PG(P-20:0/19:0)	1.049 $\pm$ 0.070	0.954 $\pm$ 0.08	0.472	0.83 $\pm$ 0.062	0.092	1.069 $\pm$ 0.125	0.886
LC-MS/MS (-)	PI(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/18:0)	0.974 $\pm$ 0.078	0.939 $\pm$ 0.164	0.832	0.812 $\pm$ 0.075	0.262	1.328 $\pm$ 0.457	0.231
LC-MS/MS (-)	PI(O-16:0/14:0)	1.106 $\pm$ 0.091	0.806 $\pm$ 0.125	0.092	0.996 $\pm$ 0.280	0.628	0.881 $\pm$ 0.067	0.176
LC-MS/MS (+)	PI(O-20:0/0:0)	1.179 $\pm$ 0.031	0.753 $\pm$ 0.030	<b>0.000</b>	0.841 $\pm$ 0.046	<b>0.000</b>	0.869 $\pm$ 0.021	<b>0.000</b>
LC-MS/MS (-)	PI(O-20:0/12:0)	1.145 $\pm$ 0.165	0.736 $\pm$ 0.141	0.178	1.127 $\pm$ 0.539	0.967	0.703 $\pm$ 0.047	0.133
LC-MS/MS (-)	PS(15:0/20:1(11Z))	0.940 $\pm$ 0.079	0.991 $\pm$ 0.125	0.746	1.050 $\pm$ 0.119	0.476	1.138 $\pm$ 0.200	0.272
LC-MS/MS (-)	PS(15:0/22:0)	1.013 $\pm$ 0.038	0.975 $\pm$ 0.105	0.669	0.962 $\pm$ 0.079	0.524	1.024 $\pm$ 0.078	0.884
LC-MS/MS (-)	PS(15:0/22:1(13Z))	1.009 $\pm$ 0.022	1.004 $\pm$ 0.045	0.925	0.953 $\pm$ 0.042	0.227	1.016 $\pm$ 0.047	0.876
LC-MS/MS (-)	PS(17:2(9Z,12Z)/22:1(11Z))	0.968 $\pm$ 0.037	1.012 $\pm$ 0.059	0.546	1.089 $\pm$ 0.091	0.144	0.996 $\pm$ 0.055	0.694
LC-MS/MS (-)	PS(20:2(11Z,14Z)/21:0)	0.961 $\pm$ 0.085	1.051 $\pm$ 0.173	0.615	1.096 $\pm$ 0.174	0.452	0.970 $\pm$ 0.180	0.961
LC-MS/MS (-)	PS(21:0/18:0)	0.901 $\pm$ 0.079	1.112 $\pm$ 0.241	0.283	1.136 $\pm$ 0.195	0.191	1.050 $\pm$ 0.144	0.358
LC-MS/MS (-)	PS(21:0/18:2(9Z,12Z))	1.013 $\pm$ 0.051	1.006 $\pm$ 0.138	0.959	0.990 $\pm$ 0.113	0.839	0.966 $\pm$ 0.120	0.676
LC-MS/MS (-)	PS(21:0/20:3(8Z,11Z,14Z))	1.065 $\pm$ 0.054	0.812 $\pm$ 0.087	<b>0.022</b>	0.968 $\pm$ 0.087	0.371	1.026 $\pm$ 0.144	0.755
LC-MS/MS (-)	PS(21:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.117 $\pm$ 0.091	0.892 $\pm$ 0.107	0.194	0.739 $\pm$ 0.069	<b>0.026</b>	1.019 $\pm$ 0.091	0.561
LC-MS/MS (-)	PS(22:2(13Z,16Z)/15:0)	1.119 $\pm$ 0.094	0.914 $\pm$ 0.133	0.265	0.843 $\pm$ 0.073	0.112	0.887 $\pm$ 0.083	0.183
LC-MS/MS (-)	PS(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/19:0)	1.082 $\pm$ 0.060	0.814 $\pm$ 0.088	<b>0.025</b>	0.970 $\pm$ 0.092	0.343	0.972 $\pm$ 0.102	0.363

**Tablo 4.24. (Devam)** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipitlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P
LC-MS/MS (-)	Stearic acid	1.017 ± 0.043	0.953 ± 0.057	0.434	0.968 ± 0.081	0.577	1.027 ± 0.052	0.907
LC-MS (-)	Tetracosanoic acid	1.022 ± 0.026	0.966 ± 0.054	0.314	0.979 ± 0.060	0.455	0.989 ± 0.047	0.537
LC-MS/MS (-)	TG(13:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]	1.074 ± 0.062	0.901 ± 0.068	0.141	0.862 ± 0.070	0.074	1.015 ± 0.113	0.646
LC-MS/MS (-)	TG(14:1(9Z)/18:2(9Z,12Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.062 ± 0.084	0.867 ± 0.077	0.208	0.886 ± 0.085	0.260	1.060 ± 0.154	0.987
LC-MS (-)	TG(14:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	1.072 ± 0.075	0.935 ± 0.078	0.325	0.911 ± 0.086	0.255	0.939 ± 0.113	0.365
LC-MS/MS (-)	TG(14:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	1.017 ± 0.064	0.893 ± 0.059	0.288	1.029 ± 0.103	0.928	1.026 ± 0.127	0.946
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/14:1(9Z)/o-18:0)	0.768 ± 0.135	0.911 ± 0.239	0.600	1.483 ± 0.357	<b>0.026</b>	1.301 ± 0.501	0.155
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:1(11Z)/o-18:0)	0.973 ± 0.062	0.987 ± 0.079	0.909	1.008 ± 0.135	0.795	1.085 ± 0.093	0.360
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:2(9Z,12Z)/20:0)	1.080 ± 0.101	1.042 ± 0.214	0.862	0.652 ± 0.153	<b>0.034</b>	1.066 ± 0.258	0.954
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:2(9Z,12Z)/o-18:0)	1.007 ± 0.048	0.999 ± 0.078	0.933	0.980 ± 0.083	0.782	1.002 ± 0.071	0.959
LC-MS/MS (-)	TG(15:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.072 ± 0.084	0.839 ± 0.092	0.143	0.863 ± 0.075	0.178	1.081 ± 0.152	0.958
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:3(9Z,12Z,15Z)/20:0)	0.886 ± 0.082	1.227 ± 0.229	0.083	0.913 ± 0.156	0.872	1.204 ± 0.231	0.107
LC-MS/MS (-)	TG(15:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	1.052 ± 0.074	0.895 ± 0.096	0.266	0.899 ± 0.082	0.271	1.050 ± 0.133	0.986
LC-MS/MS (-)	TG(15:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	1.060 ± 0.068	0.907 ± 0.075	0.231	0.852 ± 0.071	0.103	1.061 ± 0.165	0.994
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/o-18:0)	0.933 ± 0.087	1.250 ± 0.169	0.083	0.889 ± 0.135	0.795	1.061 ± 0.114	0.440
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/20:1(11Z)/o-18:0)	0.979 ± 0.068	1.095 ± 0.113	0.391	0.985 ± 0.151	0.965	0.984 ± 0.141	0.970
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/20:2n6/o-18:0)	1.036 ± 0.038	1.050 ± 0.074	0.861	0.857 ± 0.084	<b>0.033</b>	0.985 ± 0.080	0.523
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/o-18:0)	0.976 ± 0.034	1.127 ± 0.089	0.058	0.866 ± 0.084	0.153	1.080 ± 0.089	0.184
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/o-18:0)	0.955 ± 0.044	1.153 ± 0.097	<b>0.040</b>	0.864 ± 0.100	0.341	1.119 ± 0.087	0.078
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/o-18:0)	0.917 ± 0.080	1.276 ± 0.163	<b>0.037</b>	0.812 ± 0.164	0.533	1.159 ± 0.172	0.161

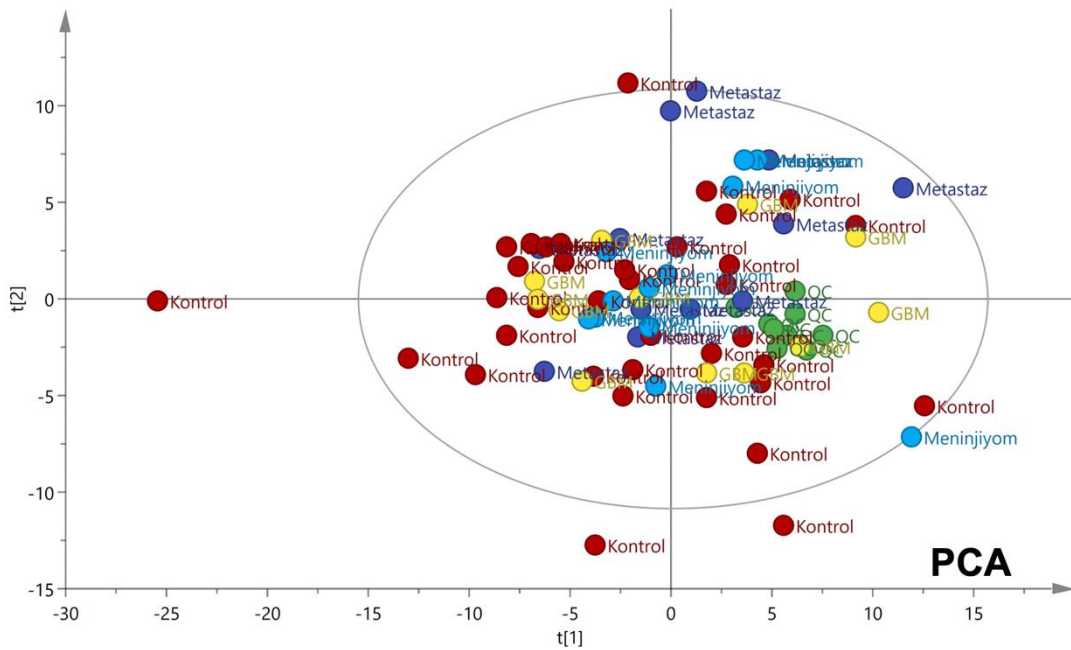
**Tablo 4.24. (Devam)** Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile tanımlanan lipidlerin listesi ve istatistiksel analiz sonuçları.

Enstrümental Yöntem	Metabolit	Kontrol	GBM		Menenjiyom		Metastaz	
		Ortalama ± SH	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P	Ortalama ± SH	P
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/o-18:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	1.010 ± 0.057	1.065 ± 0.095	0.632	0.929 ± 0.082	0.466	0.974 ± 0.075	0.742
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/o-18:0/20:3(5Z,8Z,11Z))	1.021 ± 0.023	1.047 ± 0.052	0.602	0.890 ± 0.066	<b>0.021</b>	1.001 ± 0.039	0.674
LC-MS/MS (+)	TG(15:0/o-18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	1.011 ± 0.038	1.101 ± 0.080	0.270	0.854 ± 0.076	0.055	1.012 ± 0.046	0.983
LC-MS/MS (-)	TG(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	0.976 ± 0.106	1.359 ± 0.247	0.106	0.637 ± 0.127	0.095	1.076 ± 0.133	0.621
LC-MS/MS (+)	TG(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/15:0/o-18:0)	1.016 ± 0.079	1.210 ± 0.175	0.259	0.77 ± 0.128	0.123	0.974 ± 0.127	0.790
LC-MS/MS (-)	Trans-Hexa-dec-2-enoic acid	1.270 ± 0.203	0.535 ± 0.080	<b>0.045</b>	0.928 ± 0.215	0.366	0.727 ± 0.139	0.141
LC-MS/MS (-)	Vaccenic acid	1.109 ± 0.105	0.829 ± 0.108	0.153	0.994 ± 0.137	0.564	0.849 ± 0.175	0.217

SH: Standart hata. p<0,05 (**koyu**) kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı lipidler

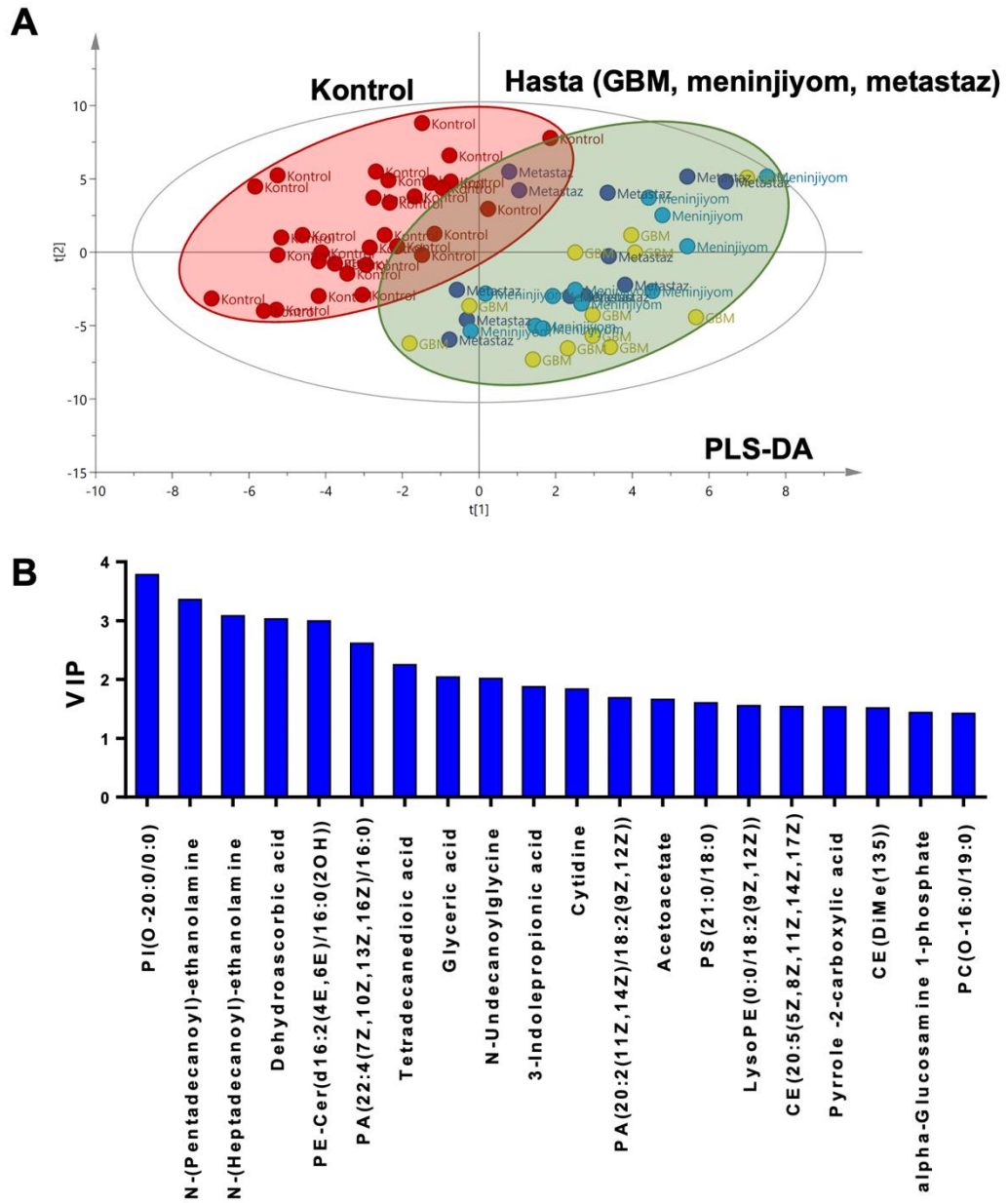
#### 4.2.7. Plazma Örneklerine ait Çok Değişkenli Veri Analizleri

Plazma örneklerinden gerçekleştirilen metabolomik ve lipidomik analizlerden elde edilen veriler birleştirilerek bütünlük omiks verisi oluşturulmuş ve bu veri matrisi Bölüm 4.1.7'deki gibi değerlendirilmiştir. PCA grafiği Şekil 4.41.'de, PLS-DA grafiği 4.42'de, OPLS-DA grafikleri Şekil 4.43A., Şekil 4.44A. ve Şekil 4.45A.'da sunulmuştur. VIP grafikleri ve katsayı grafikleri ise sırasıyla Şekil 4.43B., Şekil 4.44B. ve Şekil 4.45B ile Şekil 4.43C., Şekil 4.44C. ve Şekil 4.45C'de verilmiştir.

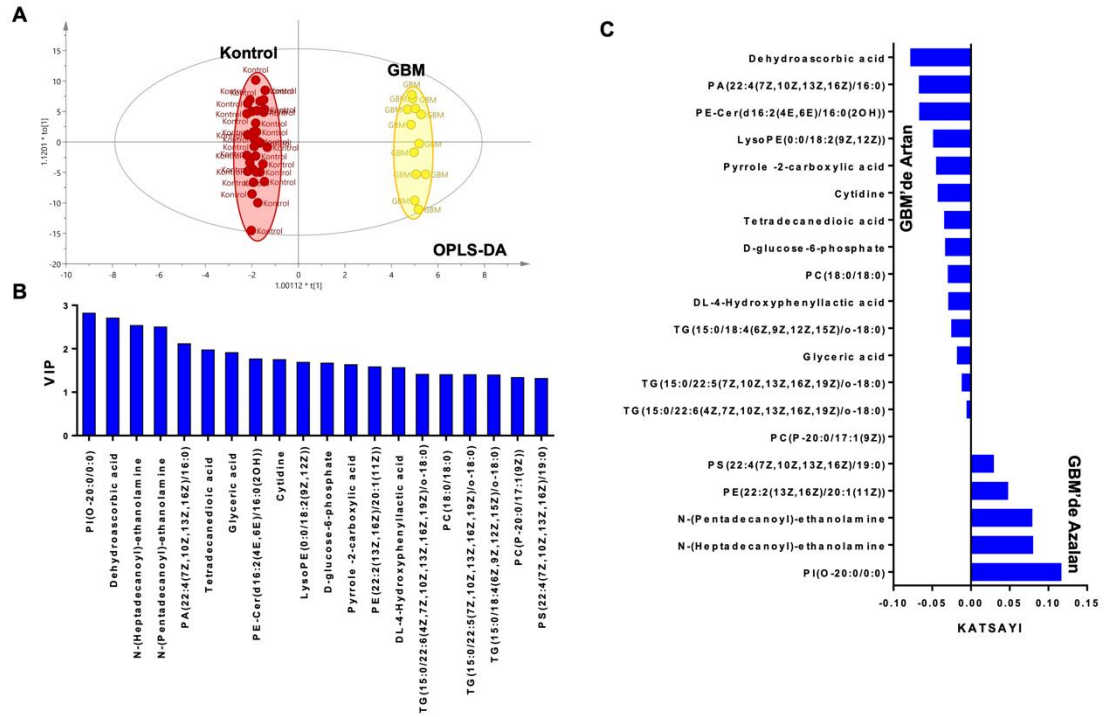


**Şekil 4.41.** Plazma örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait PCA skor grafiği. Sarı noktalar → GBM, kırmızı noktalar → kontrol grubu, mor noktalar → metastaz, mavi noktalar → meninjiyom, yeşil noktalar → QC.

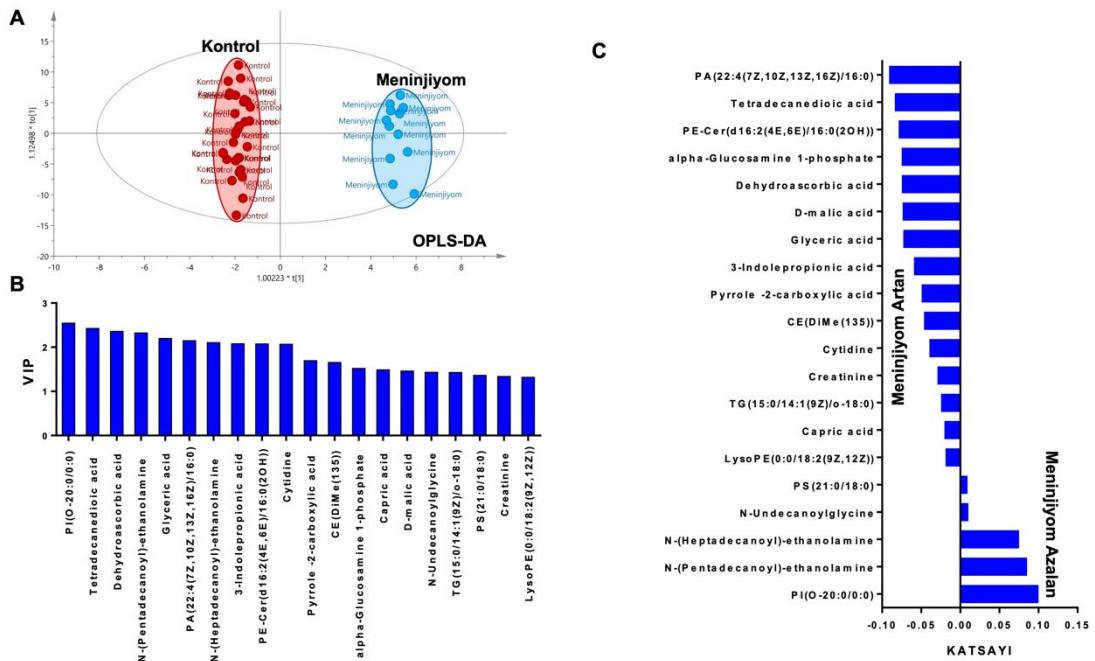




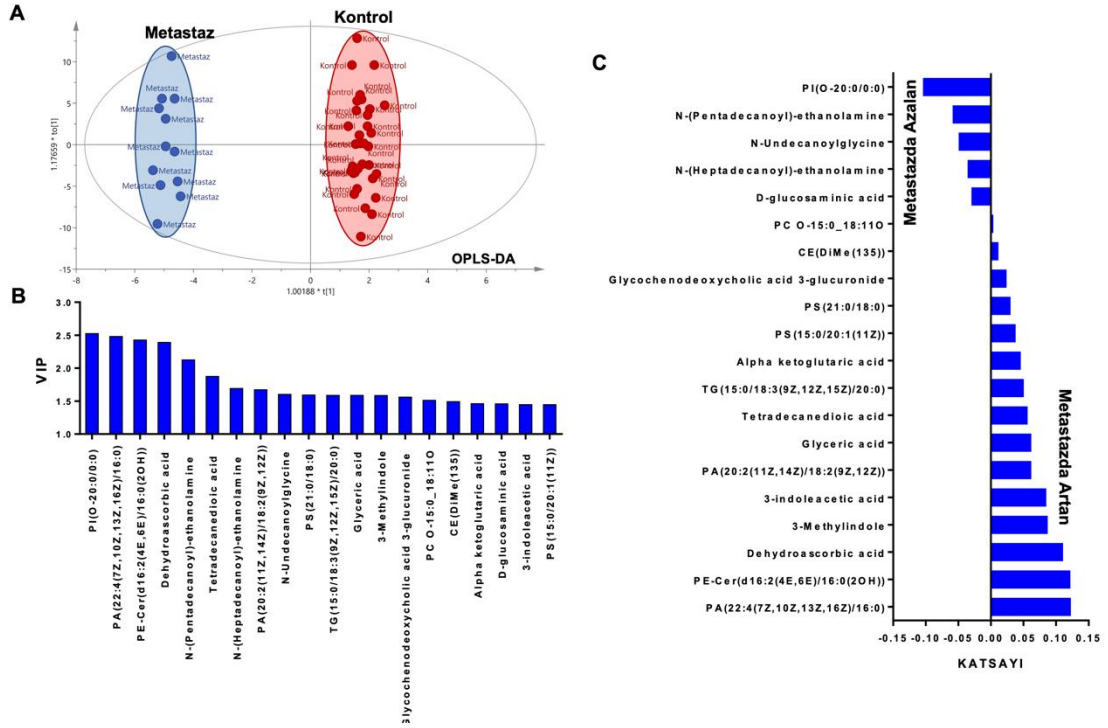
**Şekil 4.42.** Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilere ait çok değişkenli veri analizleri. A) PLS-DA skor grafiği, B) VIP grafiği.



**Şekil 4.43.** Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (GBM ve kontrol grubunun karşılaştırması). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2: 0.994$ ,  $Q^2:0.673$ ), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.



**Şekil 4.44.** Plazma örneklerinden bütünleşik omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (menenjiyom ve kontrol grubunun karşılaştırması). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2: 0.989$ ,  $Q^2:0.681$ ), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.

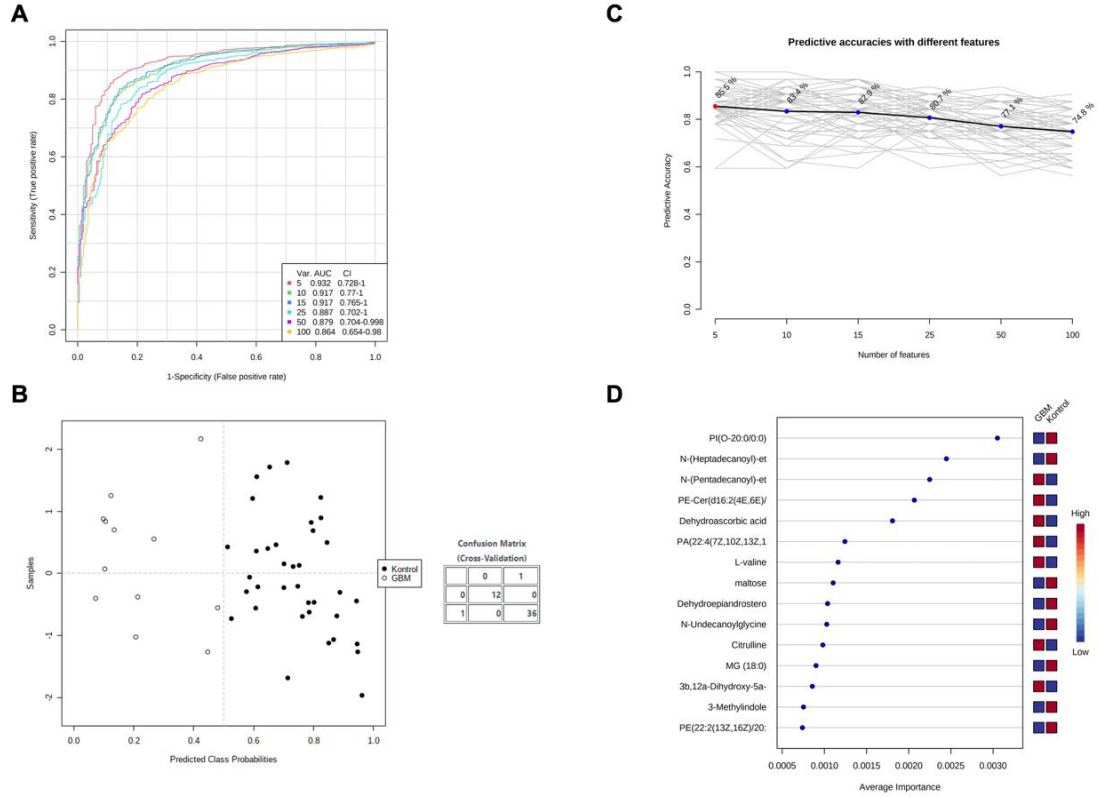


**Şekil 4.45.** Plazma örneklerinden bütünlük omiks verilerine ait çok değişkenli veri analizleri (metastaz ve kontrol grubunun karşılaştırması). A) OPLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0.990,  $Q^2$ :0.607), B) VIP grafiği, C) Katsayı grafiği.

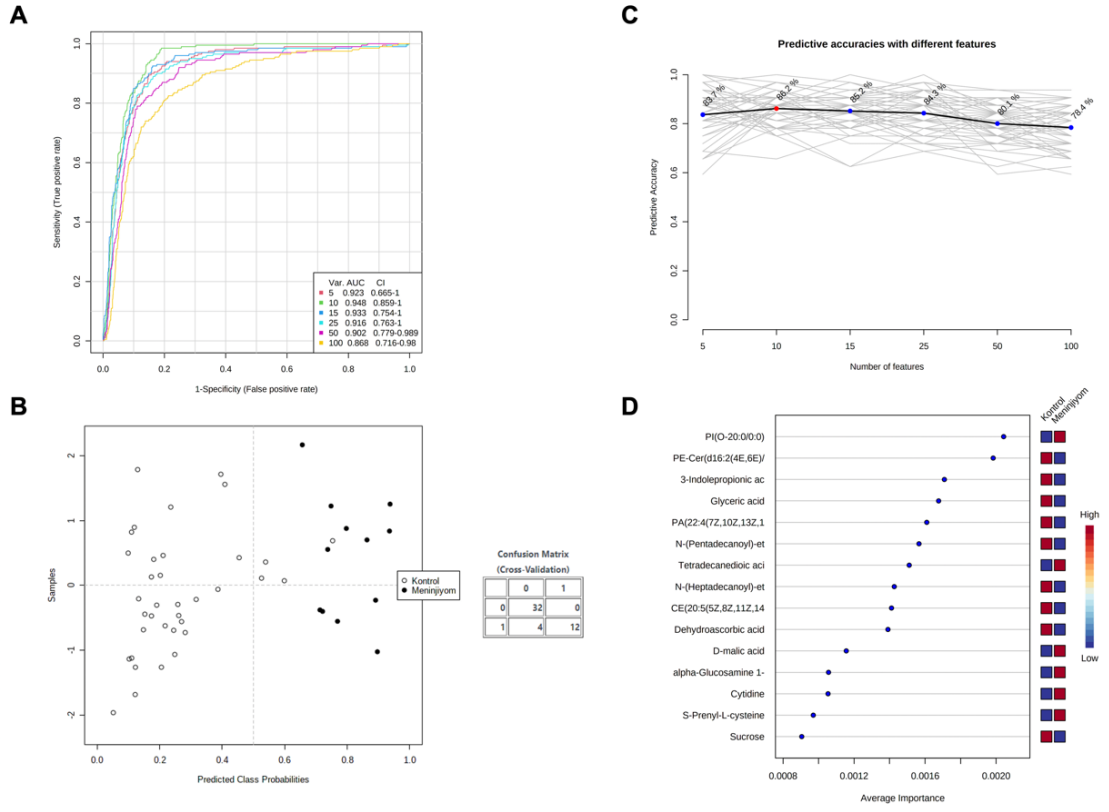
#### 4.2.8. Plazma Örneklerine ait Biyobelirteç Analizi

Plazma örneklerine ait potansiyel biyobelirteçlerin kontrol grubuna karşı hasta grupları (GBM, menenjiyom ve metastaz) için ayırt edici gücü Bölüm 4.1.8.'deki gibi çok değişkenli ROC eğrisi analizleri ile değerlendirilmiştir. Plazma örnekleri için destekli vektör makinesi (SVM) yöntemi ile sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. GBM ile kontrol, menenjiyom ile kontrol ve metastaz ile kontrol grupları arasında yapılan çok tek değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri sırasıyla Şekil 4.46., Şekil 4.47. ve Şekil 4.48.'de verilmiştir. Her bir tümör grubu için ayrı ayrı oluşturulan ve gruplardaki tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçları Şekil 4.46B., Şekil 4.47B. ve Şekil 4.48B.'deki grafikler ile görselleştirilmiştir. GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tümör grupları için Şekil 4.46C., Şekil 4.47C. ve Şekil 4.48C.'de yer alan ve biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğunu gösteren eğrilerde artan veya azalan sayıda moleküler tür ile modellerin tahmin doğruluğu arasında ciddi farklar olmadığı görülmüş ve bu nedenle biyobelirteç modelleri en önemli 15 aday biyobelirteç için

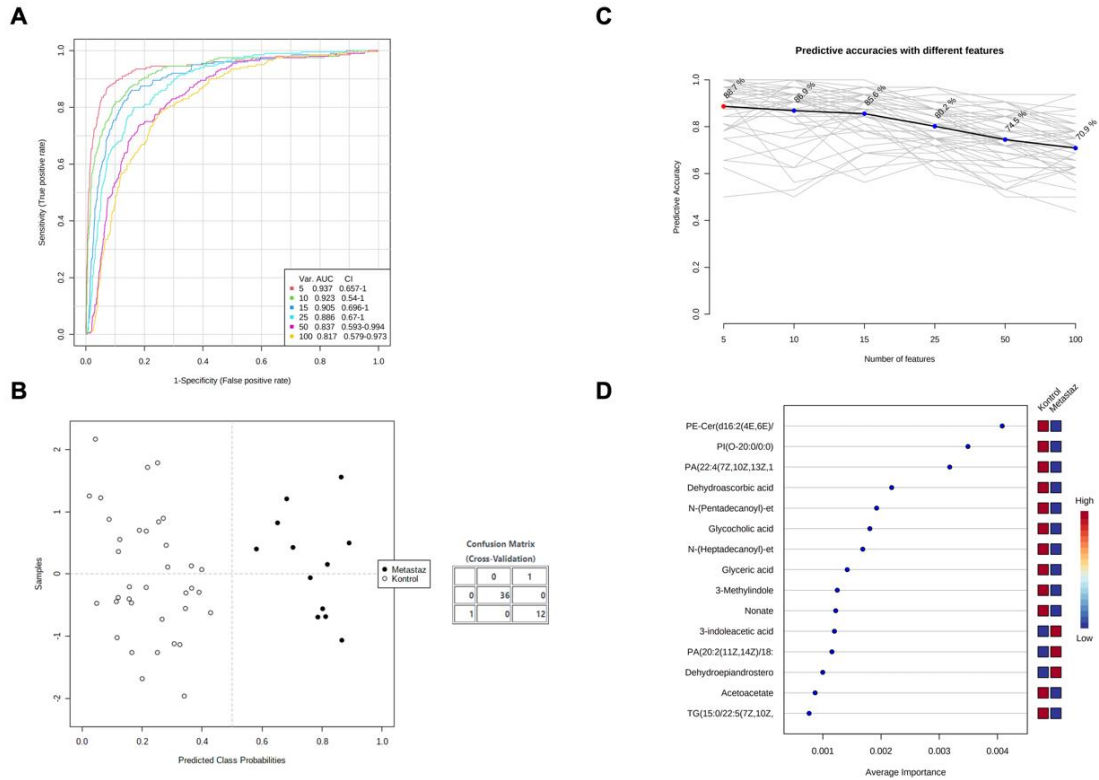
oluşturulmuştur. Önem sırasına göre her bir tümör grubu için en önemli 15 aday biyobelirteç Şekil 4.46D., Şekil 4.47D. ve Şekil 4.48D.'de verilmiştir.



**Şekil 4.46.** Plazma örneklerinden GBM hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül.



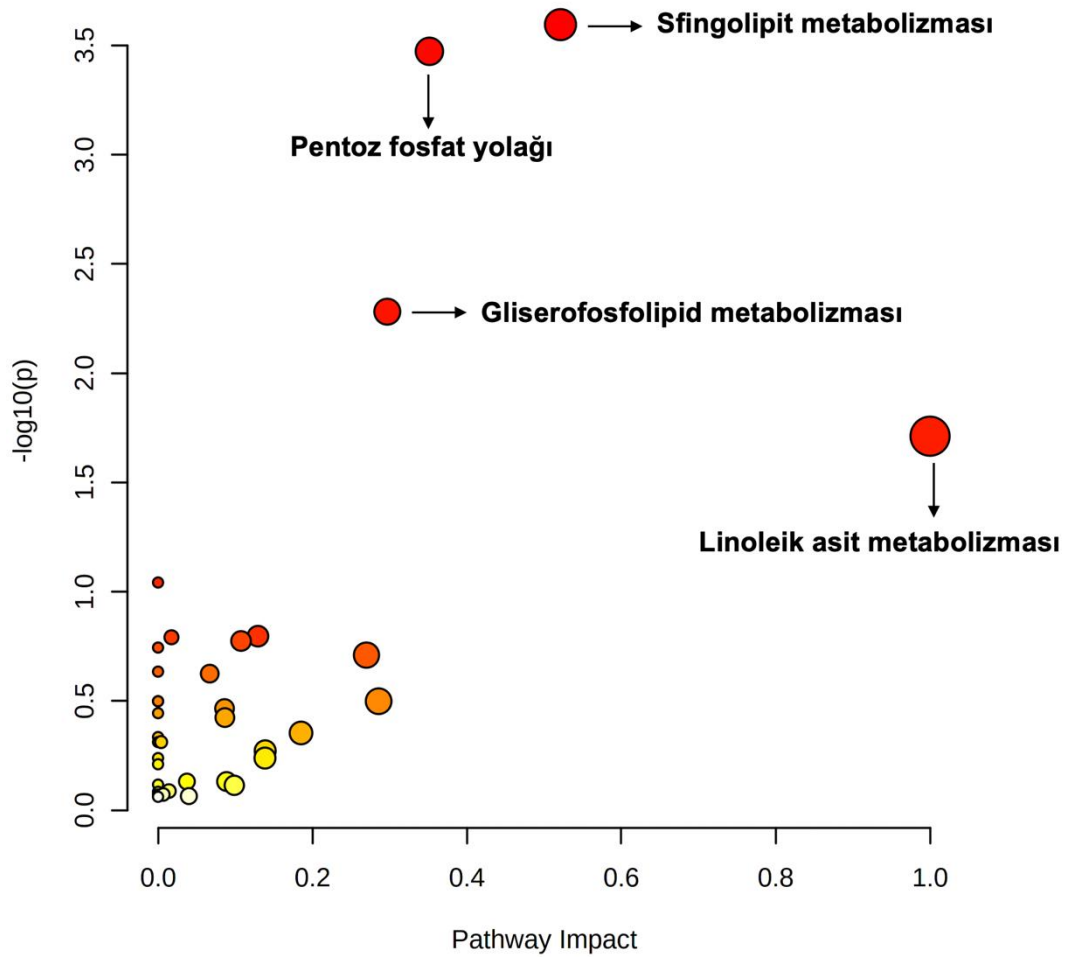
**Şekil 4.47.** Plazma örneklerinden menenjiyom hastaları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül.



**Şekil 4.48.** Plazma örneklerinden akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalar ile kontrol grubunun karşılaştırılmasına ait çok değişkenli ROC eğrisi tabanlı keşif analizi eğrileri. A) ROC eğrileri grafiği, B) Örneklerin tahmini sınıf olasılıkları, C) Artan sayıda moleküler tür ile biyobelirteç modellerinin tahmin doğruluğu, D) Biyobelirteç modeline ait en önemli 15 molekül

### 4.3. Plazma ve Doku Örneklerine ait Yolak Analizleri

Metabolomik ve lipidomik analizler sonucunda anlamlı değişim gösteren aday biyobelirteçlere ait ortak yolak analizleri Metaboanalyst platformu aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Farklı analitik teknikler kullanılarak kapsamlı ve bütünlük bir şekilde analizleri gerçekleştirilen plazma ve doku örneklerinde tanımlanan ve p değeri 0,05'ten küçük istatistiksel olarak anlamlı aday biyobelirteçler Metaboanalyst programına aktarılmış ve yolak analizi etki (*pathway impact*) grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.49., Şekil 4.50., Şekil 4.51.). Böylece farklı biyolojik örneklerin ortak etkilerinin hesaba katılmasıyla GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalara ait ortak yollar kapsamlı şekilde belirlenmiştir (Tablo 4.25., Tablo 4.26., Tablo 4.27.).



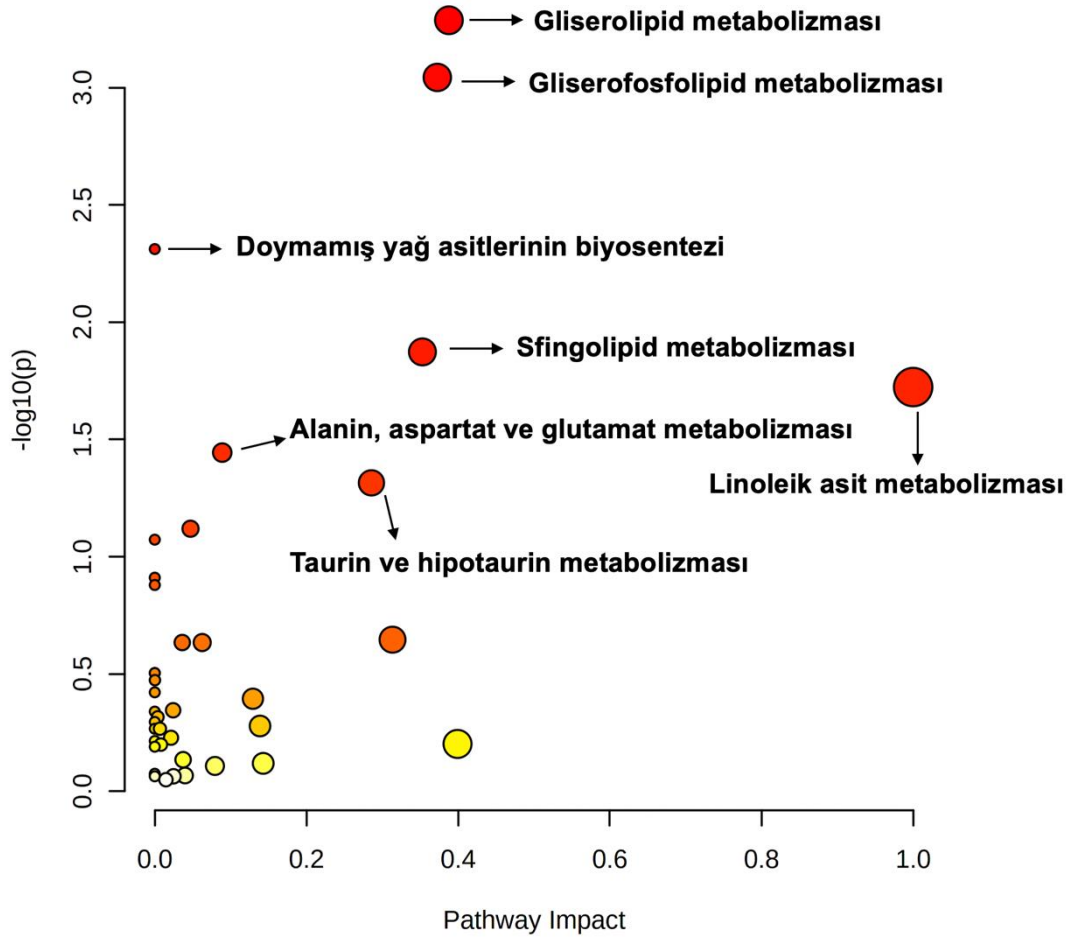
**Şekil 4.49.** Kontrol grubuna karşı GBM hastalarına ait yolak analizi etki grafiği.

**Tablo 4.25.** GBM hastalarında istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipitlerin yer aldığı yolaklar.

Yolak	Eşleşme*	p	FDR	Etki
Sfingolipit metabolizması	6/21	$2.54 \times 10^{-4}$	0.014	0.521
Pentoz fosfat yolağı	6/22	$3.37 \times 10^{-4}$	0.014	0.351
Gliserofosfolipid metabolizması	6/36	0.005	0.147	0.297
Linoleik asit metabolizması	2/5	0.019	0.408	1

\*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı. FDR: Yanlış keşif oranı.





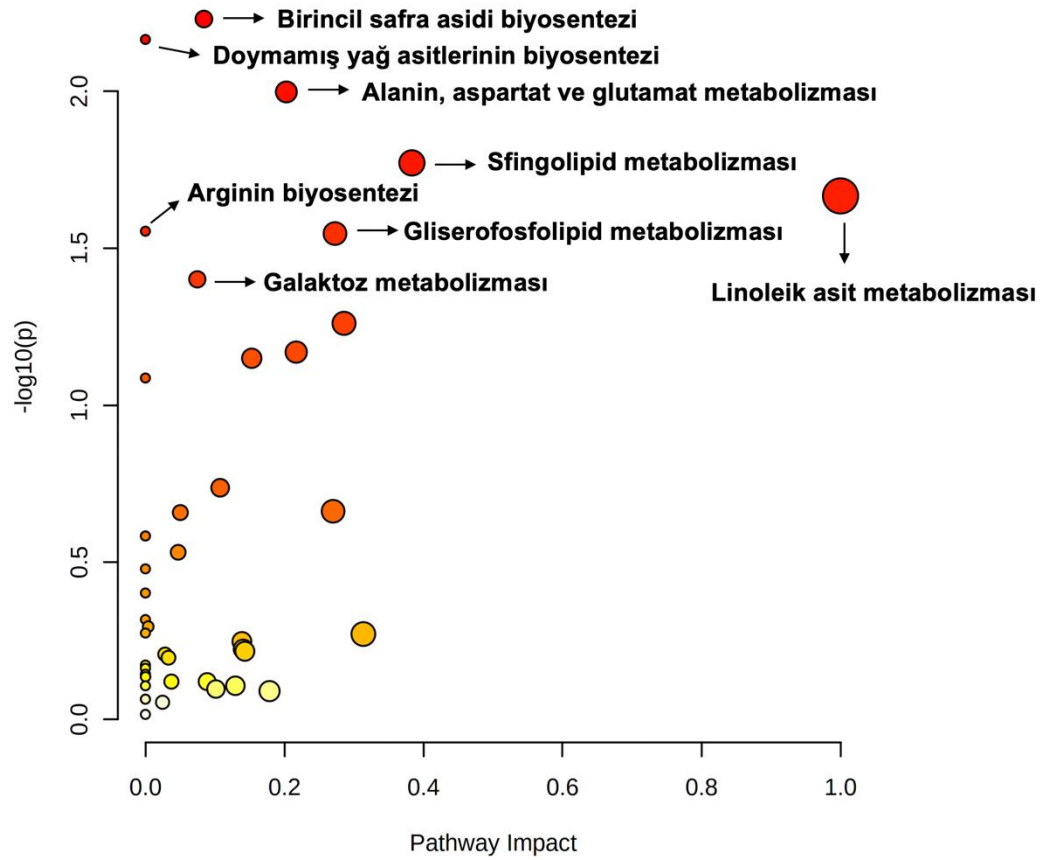
**Şekil 4.50.** Kontrol grubuna karşı menenjiyom hastalarına ait yolak analizi etki grafiği.

**Tablo 4.26.** Menenjiyom hastalarında istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipidlerin yer aldığı yolaklar.

Yolak	Eşleşme*	p	FDR	Etki
Gliserolipid metabolizması	5/16	5.16x10 <sup>-4</sup>	0.038	0.388
Gliserofosfolipid metabolizması	7/36	9.04x10 <sup>-4</sup>	0.038	0.373
Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	6/36	0.005	0.137	0.000
Sfingolipid metabolizması	4/21	0.013	0.281	0.353
Linoleik asit metabolizması	2/5	0.019	0.318	1
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	4/28	0.036	0.503	0.089
Taurin ve hipotaurin metabolizması	2/8	0.048	0.581	0.286

\*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı. FDR: Yanlış keşif oranı.





**Şekil 4.51.** Kontrol grubuna karşı akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalara ait yolak analizi etki grafiği.

**Tablo 4.27.** Akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastalarda istatistiksel olarak önemli değişim gösteren metabolit ve lipidlerin yer aldığı yolaklar.

Yolak	Eşleşme*	p	FDR	Etki
Birincil safra asidi biyosentezi	7/46	0.006	0.281	0.084
Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	6/36	0.007	0.281	0.000
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	5/28	0.010	0.281	0.203
Sfingolipid metabolizması	4/21	0.017	0.341	0.383
Linoleik asit metabolizması	2/5	0.022	0.341	1.000
Arginin biyosentezi	3/14	0.028	0.341	0.000
Gliserofosfolipid metabolizması	5/36	0.028	0.341	0.273
Galaktoz metabolizması	4/27	0.040	0.417	0.075

\*Gruplar arasında anlamlı bulunan metabolit sayısının yolaktaki toplam metabolit sayısına oranı. FDR: Yanlış keşif oranı.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında metabolomik ve lipidomik analizlerin performansını arttırmak ve bu analizlerden daha kapsamlı ve güvenilir sonuçlar elde etmek için deneysel tasarım stratejisine dayalı analitik yöntemler geliştirilmiştir. GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli bütünlük (metabolomik ve lipidomik) analizler için geliştirilen analitik yöntemlere etkisi olabilecek çok sayıda faktör eş zamanlı olarak deneysel tasarım yaklaşımları ile az sayıda deney yapılarak geleneksel yöntemlerden daha bütüncül şekilde değerlendirilmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir. Böylelikle metabolomik ve lipidomik analizlerden elde edilen verim artırılıp zaman ve maddeden tasarruf sağlanırken yeşil kimyanın ilkeleri gereği çevreye verilen zarar, harcanan zaman ve enerji asgariye indirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemlerin geçerlilikleri istatistiksel testlerle doğrulandıktan sonra GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü bireylerden toplanan tümör dokusu ve plazma örneklerine uygulanmış ve bu tümörlere ait fenotipler kapsamlı şekilde çok değişkenli istatistiksel analizler, yolak analizleri ve biyobelirteç analizleri ile değerlendirilmiştir. Biyolojik örneklerde farklı fizikokimyasal özelliklere sahip çok sayıda metabolit grubunun bulunması nedeniyle doku ve plazma örneklerinden yapılan metabolomik çalışmada analiz edilen metabolit kapsamını arttırmak için analizler hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiştir. Lipidomik analizler ise lipidlerin analizinde sıklıkla kullanılan global enstrümental teknik olan LC-qTOF-MS ile yürütülmüştür.

### 5.1. Metabolomik ve Lipidomik Analizlerin Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları metabolitlerin ve lipidlerin tüketilmesinden örnek hazırlama ve kromatografik ayırma kadar birçok parametrenin bütüncül şekilde değerlendirilmesi ile yürütülmüştür. Metabolomik ve lipidomik analizlerin optimizasyonu doku ve plazma örnekleri için ayrı ayrı olmak üzere benzer deneysel tasarımlarla gerçekleştirilmiştir. Tüm optimizasyon çalışmalarında verimliliği ve performansı iyileştirmek için enstrümental analizler sonucu elde edilen toplam pik alanı değerleri cevap değişkeni olarak kullanılmıştır. Deneysel tasarım planlarında sistematik hatayı engellemek için deneyler rastgele sıralanarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Tasarım planları Design Expert yazılımı ile oluşturulmuş, modellerin geçerlilikleri ANOVA testi ile ispatlanmış ve önemli faktörler t-testi ( $p < 0,05$ ) ile belirlenmiştir. Ayrıca modellerin geçerliliği tanımlayıcı istatistikler ile ikinci kez sınanarak doğrulanmıştır. Bu bağlamda yazılım tarafından sağlanan ve bir tür sinyal-gürültü oranı olarak tanımlanan yeterli hassasiyet değerinin 4'ten büyük ve tahmini  $R^2$  ile düzeltilmiş  $R^2$  değerleri arasındaki farkın 0,2'den küçük olması modelin doğrulanmasında önemli kriterler olarak belirlenmiştir. Modellere ait cevap değişkenlerinin sistematik hata kontrolü yani normallik varsayımı kontrolü tanı araçları (artıkların normal grafiği ve analiz sırasına göre artıkların grafiği) ile sağlanmıştır. Analiz sırasına göre artıkların grafiği cevap değişkenini etkilemiş olabilecek gizlenen değişkenlerin kontrolü için artıkların normal dağılım grafiği ise hesaplanan artık değerlerin normal bir dağılım gösterip göstermediğinin kontrolü için kullanılmıştır.

Doku ve plazma örneklerinden deneysel tasarımlar ile gerçekleştirilen tüm optimizasyon çalışmalarında önerilen modeller için elde edilen p değerlerinin 0,05'ten küçük ( $p < 0,05$ ), uyum eksikliğine ait p-değerlerinin 0,05'ten büyük ( $p > 0,05$ ) ve hesaplanan F değerlerinin ise kritik F değerlerinden ( $f_{\text{hesaplanan}} > f_{\text{kritik}}$ ) büyük olduğu tespit edilmiş ve böylelikle modellerin geçerliliği ispatlanmıştır (Bkz. Tablo 4.2., Tablo 4.4., Tablo 4.6., Tablo 4.8., Tablo 4.10., Tablo 4.14., Tablo 4.16., Tablo 4.18., Tablo 4.20., Tablo 4.22.). Uyum eksikliği değerinin istatistiksel olarak anlamsız bulunması uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını diğer bir deyişle modelin geçerli olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca önerilen modellerin yeterli hassasiyet değerlerinin 4'ten büyük ve tahmini  $R^2$  ile düzeltilmiş  $R^2$  değerleri arasındaki farkın 0,2'den küçük bulunması ile modellerin geçerliliği ikinci kez ispatlanmıştır. Son olarak istatistikler olarak geçerli bulunan modellere ait tanı grafikleri verilerin normallik varsayımını sağladığını göstermiştir (Bkz. Şekil 4.1., Şekil 4.5., Şekil 4.8., Şekil 4.10., Şekil 4.12., Şekil 4.25., Şekil 4.29., Şekil 4.32., Şekil 4.34., Şekil 4.36.).

### 5.1.1. Doku Örneklerinden Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

İlk olarak D-optimal karışım tasarımı ile doku örneklerinden aseton, asetonitril, etanol, metanol ve su çözücülerinin metabolitleri tüketme verimlilikleri incelenmiş ve optimize koşullar isteklilik fonksiyonuna dayalı bir kriter ile belirlenmiştir. Design

Expert yazılımı tarafından sağlanan modül ile isteklilik fonksiyonuna cevap değişkenini maksimize etmek, minimize etmek, hedef bir değer atamak veya bir değer aralığında cevap değişkenini sabit tutmak gibi bir hedef atanabilmektedir. Çalışmada cevap değişkeni olarak belirlenen toplam pik alanının maksimize edilmesi yüksek verimlilikte analizlerin gerçekleştirilmesi anlamına geldiği için isteklilik fonksiyonuna cevap değişkeninin maksimize edilmesine yönelik hedef atanmıştır. Bu bağlamda yanıt değişkenini maksimize etmek için en yüksek istekliliğe sahip öneri optimum koşul olarak belirlenmiştir. Analizler sonucunda en yüksek isteklilik değerine sahip öneri 0,917 bulunmuş ve buna göre  $10 \pm 0,1$  mg doku örneğinden metabolitlerin yüksek verimde tüketilmesi için 400  $\mu$ L metanol ve 200  $\mu$ L su (2:1, h/h) optimum çözücü karışımı olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2.).

Diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin doku örneklerinden lipitleri tüketme verimlilikleri OVAT yaklaşımı ile incelenmiş ve sonuçlar çok değişkenli veri analizi ile değerlendirilmiştir. Buna göre PLS-DA skor grafiği MTBE ve diklorometanın benzer hegzan ve kloroformun ise farklı tüketme karakteristiğine sahip olduğunu ve doku örneklerinden hegzan ile tüketme işleminin diğer çözücülere göre daha tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.3A.). Biplot grafiği ise farklı moleküler türlerin farklı çözücülerle tüketildiğini yani lipitlerin tüketilmesinde kloroform, diklorometan, MTBE ve hegzanın farklı moleküler türleri tüketme davranışı sergilediklerini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.3B.). Buna göre sağ üst çeyrekte yer alan diklorometanın daha fazla moleküler tür ile çevrelendiği ve diğer çözücülere göre tüketme verimliliğinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Bu bulgular Şekil 4.3C.'deki çubuk grafiği ile desteklenmiş ve doku örneklerinden lipitlerin tüketilmesinde en düşük %BSS sapma değerine sahip hegzanın (%BSS=6.61) en tekrarlanabilir olduğu, en verimli çözücünün ise en yüksek toplam pik alanına sahip olan diklorometan olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak  $10 \pm 0,1$  mg doku örneğinden 400  $\mu$ L metanol, 200  $\mu$ L su ve 600  $\mu$ L diklorometan (2:1:3, h/h/h) eş zamanlı olarak metabolitlerin ve lipitlerin tek basamakta ve yüksek verimlilikte tüketilmesi için optimum çözücü karışımı olarak belirlenmiştir.

GC-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı ve türevlendirme basamağı için literatür verilerine dayanarak belirlenen 8 kritik faktör 21

deneyden oluşan iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile incelenmiştir. Metabolitlerin tüketme basamağının optimizasyonunda hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS'ten elde edilen pik alan değerlerinin toplamı cevap değişkeni olarak kullanıldığı için metabolitlerin tüketilmesinde optimum koşul olarak belirlenen metanol:su (2:1, h/h) hacmine yeni seviye değerleri atanmış ve tüketme süresi ile birlikte deneysel tasarıma dahil edilmiştir (Bkz. Tablo 4.3.). Böylelikle metabolomik analizlerin tüketme basamağı için optimum koşul olarak belirlenen metanol:su (2:1, h/h) karışımının sadece GC-MS temelli metabolomik analizler içinde benzer sonuç verip vermediği araştırılmıştır.

Önemli olan faktörler Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.4.). Yarı-Normal grafikte MeOX derişimi, metanol hacmi, türevlendirmede kullanılan MSTFA + %1 TMCS reaktifinin inkübasyon sıcaklığı ile süresi ve metanol hacmi-MeOX derişimi ikili etkileşiminin cevap değişkenini etkileyen önemli faktörler olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.4A.). Pareto grafiği ile bu faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu doğrulanmıştır (Bkz. Şekil 4.4B.). Pareto grafiğinde siyah çizgi ile gösterilen t-değeri limitinin altında kalan faktörler istatistiksel olarak önemsiz, t-değeri limitinin ve kırmızı çizgi ile gösterilen Bonferroni limitinin üstünde kalan faktörler ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna göre faktörlerin önem sırası; MSTFA + %1 TMCS inkübasyon süresi (H) > MSTFA + %1 TMCS inkübasyon sıcaklığı (G) > metanol hacmi-MeOX derişimi ikili etkileşimi (AC) > MeOX derişimi (C) > metanol hacmi (A)'dir. Optimum koşullar tüm faktörlerin seviye değerlerine karşı çizilen ve faktörlerin etkileşimlerini gösteren model grafikleri ile belirlenmiştir. İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım için önerilen modelde istatistiksel olarak anlamsız bulunan faktörlere (düz çizgi) önceki çalışma koşullarına veya analiz süresini kısaltmaya yönelik değerler, istatistiksel olarak anlamlı bulunan faktörlere ise cevap değişkenini maksimum yapan seviye değerleri atanmıştır (Bkz. Şekil 4.6.).

Bu bulgular varlığında doku örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimum koşullar;  $10 \pm 0,1$  mg doku örneğine 400  $\mu$ L metanol ve 200  $\mu$ L su eklenmesinin ardından örneklerin 10 dak tüketilmesi, santrifüjden sonra elde süpernatantın uçurulup 20  $\mu$ L MeOX (10 mg/mL piridin içerisinde) ilave edilerek 30 °C'de 90 dak inkübasyona bırakılması ve örneklere 80  $\mu$ L MSTFA + %1 TMCS eklenerek 70 °C'de 120 dak inkübe edilmesidir.

LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için belirlen 3 kritik faktör (metanol-su hacim oranı, tüketme süresi ve uçurulan örneklerin yeniden çözündürülmesinde kullanılan hareketli faz bileşimi) 16 deneyden oluşan iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile incelenmiştir. Metabolitleri tüketme basamağında analizlerin hem GC-MS hem de LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmesine bağlı olarak tasarım matrisine metanol-su hacim oranı da eklenmiş ve optimize edilmiş tüketme yönteminin sadece LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizler içinde geçerli olup olmadığı değerlendirilmiştir. Uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşiminin (C, %ACN) doku örneklerinden gerçekleştirilen LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak anlamlı tek faktör olduğu Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7.).

Model grafiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan, uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşimindeki asetonitrile oranına ait seviye değerinin %100 olduğunda cevap değişkeninin maksimum olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.9.). Bu veriler ışığında LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimum koşullar;  $10 \pm 0,1$  mg doku örneğine 400  $\mu$ L metanol ve 200  $\mu$ L su eklenmesinin ardından örneklerin 10 dak tüketilmesi ve elde edilen süpernatantın uçurularak 200  $\mu$ L (%100) hacimde %0,1 FA içeren asetonitril ile yeniden çözülmesidir.

Doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin kromatografik ayırımında etkili olduğu bilinen hareketli faz akış hızı, kolon sıcaklığı ve hareketli fazdaki FA yüzdesi ise Box Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir. Cevap değişkenini maksimum yapan üç faktör model grafikleri ile eş zamanlı olarak değerlendirilerek doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin kromatografik ayırım parametrelerine ait optimum koşullar belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.11., Bkz. Şekil 4.13.). Bu verilere göre LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait optimum kromatografik koşullar; %0,1 FA içeren su (A) ve %0,1 FA içeren asetonitril (B) hareketli fazları ile 0,25 mL/dak akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığıdır. LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlere ait optimum kromatografik koşullar; (A) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren

su:asetonitril (6:4, v/v):(B) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren içeren IPA:asetonitril (9:1, v/v) hareketli fazları ile 0,25 mL/dak akış hızı ve 60 °C kolon sıcaklığıdır.

### 5.1.2. Plazma Örneklerinden Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Plazma örneklerinden metabolomik ve lipidomik analizler için yapılan deneysel tasarımlara dayalı optimizasyon çalışmalarının tamamı doku örnekleri için yapılan çalışmalara benzer şekilde yürütülmüş ve sonuçlar benzer şekilde yorumlanmıştır.

D-optimal karışım tasarımı ile plazma örneklerinden metabolitlerin yüksek verimde tüketilmesine yönelik yapılan çalışmada en yüksek isteklilik değeri 0,952 bulunmuş ve buna göre 200 µL plazma örneğinden 600 µL metanol ve 200 µL su (3:1, h/h) metabolitlerin tüketilmesi için optimum çözücü karışımı olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.26.).

Plazma örneklerinden diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE çözücülerinin lipitleri tüketme verimlilikleri çok değişkenli veri analizi ile incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.27.). PLS-DA grafiğinin sağ üst çeyreklik diliminde yer alan diklorometan ve kloroformun plazma örneklerinden lipitlerin tüketilmesinde kısmen benzer, hegzan ve MTBE'in ise farklı davranış gösterdiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.27A.). Biplot grafiğinde ise kloroform ve diklorometanın hegzan ve MTBE'e göre daha fazla moleküler tür ile çevrelendiği buna bağlı olarak diklorometan ve kloroformun plazmadan lipitlerin tüketilmesinde daha verimli olduğu sonucu çıkarılmıştır (Bkz. Şekil 4.27B.). Bu bulgular Şekil 4.27C.'deki çubuk grafiği ile desteklenmiş ve buna göre kısmen de olsa kloroformun (%BSS: 4.74) diklorometana (%BSS: 9.79) göre cevap değişkeni değerini arttırarak daha tekrarlanabilir sonuçlar verdiği görülmüştür. Buna bağlı olarak kloroform plazma örneklerinden lipitlerin tüketilmesinde optimum çözücü olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 200 µL plazma örneğinden metabolitlerin ve lipitlerin eş zamanlı olarak tek basamakta ve yüksek verimlilikte tüketilmesi için optimum çözücü karışımı 600 µL metanol, 200 µL su ve 600 µL kloroform (3:1:3, h/h/h) olarak belirlenmiştir.

Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile MeOX derişimi (C), MTFA + %1 TMCS inkübasyon süresi (H) ve metanol hacmi-MeOX hacmi ikili etkileşiminin (AD) plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek

hazırlama basamağını etkileyen istatistiksel olarak önemli faktörler olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.28.). Buna göre faktörlerin önem sırası C>H>AD'dir. Bu bulgular varlığında oluşturulan model grafiği ile plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme ve örnek hazırlama basamağı için optimum koşullar: 200 µL plazma örneğine 600 µL metanol ve 200 µL su eklenmesinin ardından örneklerin 30 sn tüketilmesi, santrifüjden sonra elde süpernatantın uçararak 20 µL MeOX (piridin içerisinde 30 mg/mL) ilave edilerek 30 °C'de 90 dak inkübasyona bırakılması ve örnekler 80 µL MSTFA + %1 TMCS eklenerek 37 °C'de 120 dak inkübe edilmesidir (Şekil 4.30.).

Yarı-Normal ve Pareto grafikleri ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenen uçurulan örneklerin yeniden çözünmesinde kullanılan hareketli faz bileşimindeki %asetonitrile ait seviye değerinin %50 olduğunda cevap değişkeninin maksimum olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.33.). Buna göre, plazma örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimum koşullar; 200 µL plazma örneğine 600 µL metanol ve 200 µL su eklenmesinin ardından örneklerin 30 sn tüketilmesi ve elde edilen süpernatantın uçurularak 200 µL hacimde %0,1 FA içeren su:%0,1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) karışımı ile yeniden çözülmesidir.

Plazma örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait optimum kromatografik koşulların doku örneklerine benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.35., Şekil 4.37.). Bu verilere göre LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait optimum kromatografik koşullar; %0,1 FA içeren su (A) ve %0,1 FA içeren asetonitril (B) hareketli fazları ile 0,25 mL/dak akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığıdır. LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizlere ait optimum kromatografik koşullar ise; (A) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren su:asetonitril (6:4, v/v):(B) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren içeren IPA:asetonitril (9:1, v/v) hareketli fazları ile 0,25 mL/dak akış hızı ve 60 °C kolon sıcaklığıdır.

### 5.1.3. Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerin birincil amacı biyolojik bir örnekten mümkün olduğunca çok sayıda metabolit ve lipiti analiz etmektir. Plazma ve doku örneklerinde benzersiz kimyasal yapıya, fizikokimyasal özelliklere sahip



binlerce metabolit ve lipit bulunur ve bunların derişimleri genetik altyapıya, çevresel faktörlere, diyete ve fiziksel aktiviteye bağılı olarak değişir. Ne yazık ki tüm metabolitlerin ve lipidlerin tam kapsamlı analizi gerçekleştiren tek bir analitik teknik yoktur. Bu bileşiklerin kapsamlı analizleri verimliliği yüksek tüketme yöntemleri, optimize edilmiş örnek hazırlama basamakları ve analitik yöntemler ile çoklu enstrümantal tekniklerin kullanımına bağılı olarak yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikle gerçekleştirilebilir. Bu nedenle son yıllarda hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizlerde ana odak, çeşitli moleköl sınıflarının analizini kapsamlı, hızlı, kolay ve düşük maliyet ile gerçekleştirecek analitik yöntemler üzerinedir. Bu bağlamda doku ve plazma örneklerinden hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizler için tüketme, örnek hazırlama ve kromatografik yöntemlere etki eden faktörleri deneysel tasarım yaklaşımları ile sistematik olarak araştırmak ve bu faktörleri optimize ederek basit, hızlı ve güvenilir analitik teknikler geliştirmek tez çalışmasının öncül hedefini oluşturmuştur.

Tez çalışması kapsamında sırasıyla 2:1 (h/h) ve 3:1 (h/h) oranında metanol ve su karışımı ile doku ve plazma örneklerinden metabolitlerin en yüksek verimle tüketildiği belirlenmiştir. Büyük olasılıkla doku ve plazma örnekleri için tüketme basamağında su kullanılmasının polar metabolitlerin tüketilmesi üzerinde pozitif etkisi olmuş ve buna bağılı olarak da daha yüksek pik alanları elde edilmiştir. Plazma ve doku örnekleri için optimum tüketme koşullarının farklı metanol ve su karışım oranlarında belirlenmiş olması ise doku ve plazma örneklerindeki moleköl türlerin farklı derişim aralıklarında olması ve farklı fizikokimyasal çeşitliliğe sahip olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgulara benzer şekilde, Jiye ve arkadaşları (155) plazmadan metabolitlerin yüksek verimde tüketilmesine yönelik deneysel tasarım yaklaşımı ile GC-MS kullanarak çeşitli çözücülerin etkilerini inceledikleri çalışmada, metabolitlerin tüketilmesinde 8:1 (h/h) oranında metanol ve su karışımınının diğer çözücülere ve çözücü kombinasyonlarına göre daha verimli olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırma grubunun idrar örneklerinden yaptıkları diğer bir çalışmada yine metanol ve su (3:1, h/h) karışımı metabolitlerin tüketilmesinde en yüksek verime sahip çözücü karışımı olarak bulunmuştur (235). Yetişkin pandaların gaita metabolomunu incelemek için yapılan bir diğer çalışmada ise çeşitli çözücü ve çözücü kombinasyonlarından IPA:asetonitril:su (3:2:2, h/h/h) karışımının optimum tüketme yöntemi olduğu

bildirilmiştir (249). LC-TOF-MS kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, DoE yaklaşımı ile insan plazma örneklerinden metabolitleri tüketme verimlilikleri incelenen çeşitli çözücülerden metanol:etanol (1:1, h/h) ile metanol:asetonitril:aseton (1:1:1, h/h/h) karışımlarının optimum olduğu belirtilmiştir (250).

Lipitlerin tüketilmesinde diklorometan daha az toksik olması, MTBE ise düşük yoğunluğuna bağlı olarak organik fazın pipetlenmesini kolaylaştırması nedeniyle kloroforma alternatif yöntemler olarak kullanılmaktadır (251). Plazma ve doku örneklerinin içerdiği kimyasal sınıfların çeşitliliğine bağlı olarak farklı polariteye sahip bu çözücülerin değişken davranış göstermesi beklenen bir durumdur. Tez çalışması kapsamında plazma örnekleri için kloroform ve diklorometanın yakın tüketme verimliliğine sahip olduğu bulunsa da kloroform ile daha tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir. Diklorometanın ise doku örneklerinden lipitlerin tüketilmesinde diğer çözücülere göre üstün olduğu belirlenmiştir. Sarafyan ve ark. (252)'nin plazma lipitleri için diklorometanın tüketme etkinliğinin kloroform ile karşılaştırılabilir olduğunu bildirdiği çalışma bu bulguları destekleyici niteliktedir. BOS sıvısından yapılan bir çalışmada lipitlerin tüketilmesinde kloroformun optimum tüketme çözücüsü olduğu bildirilmiştir (253). Plazma örneklerinden yapılan bir diğer çalışmada ise MTBE ve kloroformun lipitlerin tüketilmesinde eşit derecede geçerli ve sağlam olduğu bildirilmiştir (254).

Literatür verileri ile desteklenen tez çalışmasına ait bu sonuçlar tüketme çözücüsü veya çözücülerinin örnek tipine bağlı olarak metabolom ve lipidom kapsamı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Ne yazık ki tek bir çözücü veya çözücü kombinasyonu biyolojik matrislerden bütün metabolit ve lipid sınıflarını tüketme davranışına sahip değildir. Bu bağlamda geniş kapsamlı metabolomik ve lipidomik veri setleri elde etmek için çok iyi bilinen fenomenler dışında tüketme verimliliğinin ve tekrarlanabilirliğinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar yapılması önem arz etmektedir.

Metabolom oldukça farklı derişimlere sahip metabolitleri içerir. Bu nedenle GC-MS ile çalışılan örneklerde düşük derişimde bulunan metabolitler için kabul edilebilir ve saptanabilir bir cevap elde edilmesi ile yüksek derişimde bulunan metabolitler için türevlendirme işleminin makul bir sürede tamamlanması arasında hassas bir denge kurulmalıdır. Türevlendirme basamağının optimizasyonunda ikili

etkileşimler haricinde doku örnekleri için MSTFA + %1 TMCS inkübasyon süresi ve sıcaklığı ile MeOX derişimi, plazma örnekleri içinse MSTFA + %1 TMCS inkübasyon süresi ve MeOX derişimi istatistiksel olarak önemli faktörler olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar türevlendirme ajanı ile yavaş reaksiyona giren plazma ve doku metabolitlerinin yeterli şekilde türevlenmesini sağlamak için uzun sililasyon (>30 dak) sürelerinin gerekli olduğunu göstermiştir. MeOX reaktifinin içinde çözündüğü piridinin sililasyon reaksiyonunu katalize ettiği ve ayrıca metaoksiaminasyon reaksiyonunun tamamlanma derecesinin reaktif hacmi ve derişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Öte yandan MSTFA+ %1 TMCS hacmi, inkübasyon süresi ve sıcaklığı sililasyon reaksiyonunun tamamlanma derecesi ile ilişkilidir (255, 256). Bu bilgiler tez sonuçlarını destekleyici niteliktedir. Ayrıca Danielson ve ark. (156) türevlendirmenin tamamlanması için uzun inkübasyon sürelerinin tercih edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Türevlendirme reaksiyonu tamamlanmadığı takdirde enjeksiyon sırasına bağlı olarak örnekler oto örnekleyicide 1-24 saat aralığında bekleyebilmekte ve bu sürede türevlendirme oranı örnekten örneğe değişebilmektedir. Bu nedenle GC-MS temelli metabolomik analizlerde türevlendirme basamağının optimizasyonu sonuçların kalitesi ve güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. Ayrıca çalışmalarda deneysel varyasyonlar QC örnekleri ve ağır izotop etiketli standartların kullanımı ile kontrol edilmiştir.

Verilerdeki sistematik sapmaları en aza indirmek için örneğe eklenen iç standartları kullanarak veri matrisini normalize etmek olağan bir uygulamadır. Ancak çalışma kapsamında farklı deney koşullarının etkisi araştırılmış olup, tüketme, örnek hazırlama ve kromatografik parametrelerin optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu nedenle farklı çözücülerin ve analiz koşullarının iç standart yanıtlarını etkilediği, ortaya hatalı veya yanlış sonuçlar çıktığı gözlenmiştir. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarında veri matrisleri iç standarda veya toplam alan değerlerine göre normalize edilmemiştir. Örneklere ilave edilen iç standartlar cihaz kaynaklı sistematik hataların kontrolü için kullanılmıştır.

Doku ve plazma örneklerinden yapılan LC-qTOF-MS temelli metabolomik analiz sonuçlarının uçurulan örneklerin yeniden çözündürülmesinde kullanılan hareketli faz bileşiminden etkilendiği görülmüştür. Uçurulan doku örneklerinin 200 µL %0,1 FA içeren asetonitril ve plazma örneklerinin ise 200 µL %0,1 FA içeren su

ve %0.1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) ile çözülmesinin analiz sonuçlarını pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu bulguları destekleyici nitelikte bir çalışma Lindahl ve ark. (257) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada uçurulan örneklerin yeniden çözündürülmesinde kullanılan hareketli faz bileşiminin analiz edilen metabolom kapsamını ve analiz sonuçlarını etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, örneklerin %100 su ile çözülmesinin analiz edilen metabolom kapsamı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca çözüldüğü metanol oranındaki artışın log P değeri 5'ten küçük olan bileşiklerin pik cevaplarını azalttığı belirtilmiştir. Tez çalışmasında ise %50'den düşük asetonitril kullanımının uçurulan örnekleri tam çözmediği ve santrifüj tüpünde kalıntı bıraktığı gözlenmiştir. Tez çalışması ile bu çalışma bulguları arasında gözlenen farklılık, plazma ve doku örneklerindeki metabolom miktarındaki değişiklikler, çözücü türüne göre tüketilen metabolit sınıfları ve kullanılan kromatografik analiz parametreleri ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan bu farklılık örneklerin yeniden çözülmesinde kullanılan çözücü bileşiminin analiz sonuçlarını etkilediği ve bu nedenle optimize edilmesi gerektiği sonucunu değiştirmemektedir.

Son olarak tez çalışmasında kromatografik koşulların optimize edilerek iyi bir kromatografik ayırım sağlanması ile analiz edilen metabolit ve lipidlerin kapsamının artırılması ve pik kapasitelerinin en üst düzeye çıkarılması hedeflenmiştir. Doku ve plazma örneklerinden yapılan metabolomik ve lipidomik analizler C18 kolon (2,1 x 100 mm, 2,7 µm) ile gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu noktada hem doku hem de plazma örnekleri için yapılan çalışmaların aynı C18 kolon ile gerçekleştirilmesi optimize kromatografik koşulların benzer çıkması açısından şaşırtıcı değildir. Doku ve plazma örneklerinden LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik çalışmalarda C18 kolona göre daha polar sabit fazlara sahip olan ve polar moleküllerin analizinde tercih edilen C8 ve HILIC kolonları, çalışmada LC-qTOF-MS ile eş zamanlı olarak polar moleküllerin analizlerine olanak sağlayan GC-MS cihazının kullanımını nedeniyle tercih edilmemiştir. Birçok polar metabolitin (organik asitler, aminoasitler gibi) analizi GC-MS ile gerçekleştirilebilmektedir ve bu nedenle çalışmada polarlığı düşük sınıfta yer alan metabolitlerin de analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için C18 kolon kullanımı tercih edilmiştir. LC-qTOF-MS ile yapılan lipidomik analizler de ise doku ve plazma örneklerinde var olan çoğu lipitin

polar sınıfta yer almaması nedeniyle lipidomik çalışmalarda da C18 kolon kullanılmıştır.

Hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik analizler için optimum akış hızının 0,25 mL/dak olduğu belirlenmiştir. Metabolomik analizler için düşük (30 °C), lipidomik analizler içinse yüksek kolon sıcaklığının (60 °C) cevap değişkeni üzerinden pozitif etkisi olduğu saptanmıştır. Çeşitli metabolit ve lipit sınıfları göz önüne alındığında hedeflenmemiş metabolomik analizlerde kullanılan sabit faz, hareketli faz bileşimi, kolon sıcaklığı gibi çeşitli parametrelerin kaçınılmaz olarak bazı bileşik sınıflarına karşı pozitif bazılarına ise negatif etkisi olacaktır. Literatürde Dejaegher ve ark. (258), Zhou ve ark. (259) ve Hamimi ve ark. (241) kromatografik koşulların deneysel tasarım stratejileriyle optimize edilmesinin önemini vurgulayan çalışmalar sunmuşlardır. Lipidomik analizlerde hareketli faz bileşimine bağlı olarak yüksek kolon sıcaklığının cevap değişkeni üzerinde pozitif etkiye neden olması düşük geri basınç ile ilişkili olabilir. Ayrıca, matris kaynaklı iyon baskılanması iyi bir kromatografik ayırım ile azaltılarak analiz edilen moleküllerin sayısında önemli bir artış sağlanabilir. Sonuç olarak hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik çalışmalarda kromatografik parametrelerin çalışan matris, kolon ve hareketli faza bağlı olarak optimize edilmesi ile analiz sonuçlarının veriminin ve kalitesinin arttırılabileceği gösterilmiştir.

Biyolojik matris tipine, tüketme yöntemine ve aletli analiz yöntemine bağlı olarak tanımlanan metabolit ve lipit sayılarının farklı çalışmalarda düşük veya yüksek olması beklenen bir durumdur (Tablo 2.1.). Çalışma kapsamında DoE ile geliştirilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen gerçek numunelerin analizinde farklı filtreler uygulanmış ve buna bağlı olarak daha doğru tanımlamaların yapılması sağlanmıştır (Bkz. Şekil 4.14., Şekil 4.38.). Tez çalışması Tablo 2.1.'deki çalışmalara göre daha farklı örnekler, örnek hazırlama basamakları ve aletli analiz yöntemleri ile gerçekleştirilse de tez kapsamında analiz basamaklarının bütüncül şekilde optimize edilmesi sonucunda plazma ve doku örneklerinden ayrıştırılan pik ve tanımlanan molekül sayılarında ciddi artışlar meydana geldiği gözlenmiştir.

Bu tez çalışması doku ve plazma örneklerinden GC-MS ve LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin performansı arttırmak için DoE yaklaşımları ile çok sayıda faktörün bütüncül şekilde eş zamanlı olarak

değerlendirildiği ilk analitik çalışmadır. Ayrıca bu çalışma kapsamında metabolomik ve lipidomik analizlerin optimizasyonu için sunulan iş akışı sonraki omiks çalışmalardan elde edilen bilginin arttırılması açısından örnek olma niteliği taşımaktadır. Literatürde metabolomik ve lipidomik analizlerin optimizasyonuna yönelik DoE ile yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu ve bu çalışmaların tüketme basamağı veya türevlendirme basamağı gibi sadece tek bir analiz basamağına odaklanıldığı görülmektedir (18, 235, 238, 260). Bu bağlamda çalışma kapsamında tüketme basamağından analizlerin gerçekleştirilmesine kadar deneysel süreçlerin bütüncül şekilde optimize edilmesi ile elde edilen güvenilir pik sayısında (BSS<%30) ciddi bir artışın meydana geldiği ilk çalışmadır (Bkz. Şekil 4.14. ve Şekil 4.38.). Girişim yapan türlerin uzaklaştırılarak iyi bir kromatografik ayırım ile analizlerin gerçekleştirilmesi sonucu özellikle MS/MS verileri ile güvenilir şekilde tanımlanan metabolit ve lipit sayısındaki artış dikkat çekici niteliktedir. Ayrıca DoE yaklaşımları ile omiks analizler için analitik yöntemlerin optimize edilmesi sonucu karmaşık biyolojik numunelerden daha kapsamlı veriler elde edilebileceği gösterilmiştir. Ek olarak bu çalışmada geliştirilen analitik yöntemler basit, hızlı ve tekrarlanabilir (Bkz. ANOVA-uyum istatistikleri sonuçları ve tanı araçları). Yöntemin hastalık biyobelirteçlerini belirlemek için farklı türde numunelerle yapılan araştırmalarda da uygulanabileceği öngörülmektedir. Bununla birlikte büyük bir örneklem grubunu içeren veya farklı bir matristen yapılan araştırmalar için çeşitli yöntem parametreleri kesinlikle optimize edilmelidir. Ayrıca doku ve plazma örnekleri için tek basamakta metabolitlerin, lipitlerin ve hatta proteinlerin tüketilmesi için geliştirilen protokoller çeşitli oranlarda ölçeklenebilir ve numune toplamanın zor olduğu, küçük hacimli numunelerin toplanabileceği veya küçük deney hayvanları ile yapılan çalışmalara uyarlanabilir.

## **5.2. Optimize Yöntemlerin Gerçek Örneklerle Uygulanması**

Beyin kanserleri, beyinde başlayan ve vücudun diğer bölgelerine neredeyse hiç yayılmayan birincil beyin tümörlerini ve vücudun başka bir bölgesinde başlayan kanserlerin neden olduğu ikincil beyin tümörlerini yani metastazları içerir. Ulusal Beyin Tümörü Derneği'nin 2022 verilerine göre kötü huylu beyin tümörlerinin ortalama beş yıllık göreceli sağ kalım oranı %35,6'dır. CBTRUS'a göre

menenjiyomlar en sık görülen beyin tümörü olup birincil beyin tümörlerinin %39'unu, korkunç bir prognoza sahip olan GBM ise bir yıldan daha uzun bir ortalama sağ kalım oranı ile kötü huylu beyin tümörlerinin %49,1'ini oluşturmaktadır. Metastatik beyin tümörlerinin birincil beyin tümörlerinden 10 kat daha yaygın olduğu tahmin edilmekte ve en sık akciğer (%39-56) kaynaklı meydana geldiği bilinmektedir (2, 3).

Düşük sağ kalım oranları nedeniyle beyin tümörlerinin erken teşhisi zorlu ancak karşılanması gereken bir ihtiyaçtır. Beyin tümörlerinin semptomları baş ağrısı veya baş dönmesi gibi spesifik olmayabilir (261). Pratisyen hekimler genel semptomlarla başvuran herkesi pahalı beyin görüntüleme tekniklerine (MRI, CT) sevk edemeyeceğinden beyin tümörlerinin tanısı samanlıkta iğne aramaya benzetilebilir (262). Ayrıca beyin taraması ve vakaların büyük çoğunluğunda histolojik tanı olmadan herhangi bir beyin tümörünü güvenilir bir şekilde teşhis etmek mümkün değildir. Hatta kimi zaman benzer özellikler gösterip farklı davranan beyin tümörleri aynı histolojik sınıflandırma grubunda yer alabilmektedir.

Genel olarak tanısız görüntülemeye daha şiddetli nörolojik semptomlarla başvuru yapan hastalar hızla yönlendirilip beyin tümörleri erken teşhis edilirken, hastaların çoğunda tümör dışı bir tanı ile daha fazla ilişkili olan veya tanısız olarak zorlayıcı spesifik olmayan semptomlara bağlı olarak birkaç haftalık tanı gecikmesi görülür (263). Beyin tümörlü hastalar için teşhise kadar geçen süre kimi zaman daha da uzun olabilmektedir. Tanıdaki gecikmelerin yaşam kalitesi ve sağ kalım üzerindeki negatif etkilerinin yanı sıra tedaviye zamanında erişim sağlanamaz. Bu nedenle beyin tümörlerinde erken teşhis hastanın yaşam kalitesi ve hayatta kalması süresi üzerinde pozitif etkiye sahip erken tedavi anlamına gelir. Kısaca beyin tümörlerinin teşhisine kadar geçen sürenin kısaltılması;

- ⇒ Tümörün ilerlemesine daha erken müdahale edilerek tümörle ilişkili beyin hasarı riskinin azaltılmasını,
- ⇒ Artan mortalite ve morbidite riskleri ile birlikte ciddi şekilde artan kafa içi basınç nedeniyle acil olarak gerçekleştirilen operasyonların sayılarının azaltılmasını,
- ⇒ Hasta, aile, doktor veya sağlık sistemi gecikmelerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığına bakılmaksızın yaşam sürelerinin uzatılıp, aile ve hasta endişelerinin asgari seviyeye indirilmesini sağlayabilir.

Beyin tümörleri kemoterapi, stereotaktik radyocerrahi, tüm beyin radyoterapisi ve cerrahi müdahale ile tedavi edilebilmektedir. Sunulan tedaviler hastanın klinik durumuna, metastazların kökenine, tümör tipi, boyutu ve derecesi ile lezyonların sayısı, derinliği ve kütesine bağlıdır. Bu nedenle tümör tipine bağlı olarak tedavinin her hasta için kişiselleştirilmesi ve hastanın tıbbi durumu göz önünde bulundurularak farklı yaklaşımlar ile stratejiler geliştirilmesi nörolojik olarak geri dönüşümsüz kayıpların önlenmesi ve uzun yaşam sürelerinin saptanması açısından oldukça önem arz etmektedir. Bunun için uygulaması kolay, duyarlılığı ve seçiciliği yüksek ve aynı zamanda da ucuz olan yöntemlere ihtiyaç vardır ki şu anda böyle bir yöntem mevcut değildir (262). Ayrıca spesifik olmayan semptomları olan hastaların daha erken bir aşamada beyin tümörüne sahip olma olasılığının yüksek olduğunu belirlemeye yardımcı olacak testler tanısal görüntüleme olanaklarına olan talebi önceliklendirip hastaların yaşam sürelerini de önemli ölçüde etkileyecektir. Tüm bu nedenlerle geri dönüşsüz nörolojik bozukluklar gelişmeden veya acil müdahale gerekmeden önce beyin tümörlerinin erken tanı ve tedavinin etkinlik ve yeterliliğinin izlenmesinde her yerde kolaylıkla ulaşılabilecek ve düzeyleri belirlenebilecek yeni biyobelirteçlerin belirlenmesine mutlak surette ihtiyaç vardır. Kuşkusuz ki bütünleşik omiks analizler bunu sağlayacak en önemli fenomen olup fenotipi en iyi yansıttığı bilenen ve genotip-fenotip arasında bir köprü görevi gören metabolomik ve lipidomik analizler bu noktada kilit rol oynamaktadır.

Omiks çalışmalarda doğrudan tümörü çevreleyen dokunun kan örneğinden daha yüksek seviyelerde potansiyel biyobelirteçler içerdiği ve optimal tedaviye karar vermede potansiyel yol gösterici oldukları düşünülmektedir (133). Kan plazması ise minimal invaziv toplanması ve daha kolay erişilebilirliği nedeniyle omiks çalışmalarda ve klinik uygulamalarda en yaygın kullanılan biyoakışkandır (131, 132). Bu nedenle hastalardan toplanan tümör dokusu ile plazma örneklerinden yapılan eş zamanlı analizler sonucu tanımlanan potansiyel biyobelirteçlerin her iki örnek türü için değerlendirilmesi ve biyobelirteç bağlamında aralarındaki benzerlik ve farklılıkların açığa çıkarılması, hastalıkların erken teşhisi için elde edilen bilginin kapsamının ve güvenilirliğinin geliştirilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir. Tez çalışması kapsamında tümör ve plazma örnekleri arasındaki ilişkinin incelenmesi beyin tümör tipleri (veya diğerleri) hakkında bir dizi bilginin keşfedilmesini sağlayan cerrahi



biyopsilere basit bir alternatif olan sıvı biyopsilerin doğruluğu ile güvenilirliğini arttıracak ve hastaların tedavi etkinliğinin izlenmesi açısından daha sağlam ipuçları sağlayacaktır. Bu nedenle kontrol grubu ile GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar arasında doku ve plazma düzeyleri değişen aday biyobelirteçlerin yani metabolitlerin ve lipitlerin saptanması bu çalışmanın ardışık hedefini oluşturmaktadır.

Söz konusu plazma ve doku örneklerindeki metabolitler ve lipitler tartışılırken önem dereceleri ile tümör tipi temelinde dahil olabilecekleri olası metabolik yollar ve literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur. Omiks çalışmalarda elde edilen kütle spektrumları veri bankalarında yer alan spektrumlarla örtüştürülerek isimlendirilmektedir. Bu nedenle bazı metabolitler insan metabolizmasında yer alan yollarda görevli ara ürünler değildir veya etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle bu metabolitlere tartışmada yer verilmemiştir. Analiz sonuçları tümör tipleri açısından doku ve plazma örnekleri için karşılaştırılmış ve bütüncül olarak tartışılmıştır.

### 5.2.1. Doku Örnekleri

Biyobelirteç çalışmalarında amaç hedeflenen hastalık grubunun sağlıklı gruptan ayrılabilmesini sağlayacak öncelikle aday sonrasında ise valide edilmiş biyomoleküllerin (metabolitler, lipitler, proteinler v.b.) tespit edilmesini sağlamaktır (264). PLS-DA ve OPLS-DA skor grafikleri çalışmaya dahil edilen grupların birbirlerinden ne derecede farklılaştığını gösteren çok değişkenli analiz yöntemleridir. Bu grafiklerde grupların olabildiğince ayırık kümelenme göstermeleri istenir. Ancak omik temelli klinik araştırmalarda bu her zaman mümkün olmamaktadır (265). Tez çalışması kapsamında öncelikle GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastaların doku örneklerinde tanımlanan metabolit ve lipitler ile tüm grupların eş zamanlı incelenmesi için PLS-DA skor grafiği oluşturulmuştur. Bu grafiğe göre kontrol ile menenjiyom gruplarının GBM ile akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarından net bir şekilde farklı kümeler halinde ayrıldığı ancak GBM ve metastaz gruplarının birbirinden net bir şekilde ayrılmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.18.). PLS-DA skor grafiğinde GBM ve metastaz gruplarının yakın kümeler halinde toplanması her iki tümör grubunun da

kötü huylu olması ve bu doku örneklerinin iyi huylu olarak atfedilen menenjiyom ve kontrol grubundan farklı profil göstermesi ile ilişkilendirilmiştir. Sonrasında ikili grupların karşılaştırılmasında sıklıkla tercih edilen çok değişkenli analiz yöntemi olan OPLS-DA grafikleri oluşturulmuş ve menenjiyom, GBM ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarının kontrol grubundan net bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.19A., Şekil 4.20A., Şekil 4.21A.). OPLS-DA kullanılan algoritma gereği zorlanmış bir analiz yöntemidir ve bu nedenle doğruluğunun gösterilmesi gerekmektedir. Bu nedenle OPLS-DA modellerinin güvenilirliği sırasıyla model uyumu ve tahminini sağlayan  $R^2$  ve  $Q^2$  değerleri ile sınanmıştır. OPLS-DA grafiklerine ait elde edilen  $R^2$  ve  $Q^2$  değerlerinin 0,3'ten büyük olması yöntemlerin geçerli olduğunu göstermekte kullanılan kriterlerdir. Tez kapsamında kontrol ile tümör gruplarının ikili karşılaştırması için hesaplanan  $R^2$  ve  $Q^2$  değerlerinin 0,9'dan büyük olması oluşturulan modellerin oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir. Son olarak doku örneklerinde kontrol-GBM, kontrol-menenjiyom ve kontrol-akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarında saptanan metabolitler ve lipitler ile VIP ve ROC eğrileri oluşturulmuş ve bir grubu diğer gruptan ayıran aday biyobelirteçler belirlenmiştir. Katsayı grafikleri ile de grupların farklılaşmasında rol aldığı belirlenen metabolitlerin ve lipitlerin kontrol ve hasta gruplarındaki düzeyleri belirlenmiştir.

Doku örneklerinden yapılan metabolomik analizler sonucunda kontrol ile GBM gruplarının ayırımının genel olarak lipitler ile sağlandığı tespit edilmiştir. Gliserofosfolipit sınıfında yer alan çeşitli uzun zincirli PC ve PE (fosfatidiletanolamin)'lerin GBM grubunda azaldığı, çift bağ geometrisine sahip PC'lerin ise GBM grubunda arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sterol lipit sınıfında yer alan farklı zincir uzunluklarındaki kolesteril esterlerin (CE) GBM grubunda arttığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.19C.).

GBM grubuna benzer şekilde menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarında gliserofosfolipit sınıfında yer alan PC, PE ve PS türlerinin düzeylerinde azalma ve genel olarak çift bağ geometresine sahip PC'ler ile sfingolipit sınıfında yer alan sfingomiyelin (SM) düzeylerinde artış gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.20C., Şekil 4.21C.). Ayrıca menenjiyom grubunda bir PE ile gliserolipit sınıfında yer alan triaçilgliserollerin (TG), metastaz grubunda ise sterol

lipit sınıfında yer alan hidroksiprogesteron ve CE ile gliserolipit sınıfında yer alan diaçilgliserol (DG) gibi farklı lipit türlerinin düzeylerinde artış gözlemlenmiştir.

Gliserofosfolipitlerin ana işlevlerinden biri hücre zarlarında yapısal bileşen olarak hizmet etmek ve bunlara kararlılık, akışkanlık ve geçirgenlik sağlamaktır (266). Gliserofosfolipid terimi, gliserol parçasına bağlı en az bir O-açıl veya O-alkil veya O-alk-1'-enil kalıntısı içeren herhangi bir gliserofosforik asit türevi anlamına gelir. Her gliserofosfolipit molekülü küçük bir polar baş grubu ve iki uzun hidrofobik zincirden oluşur. Hücre zarında yer alan iki fosfolipit tabakasından ilki yağlı ve hidrofobik bir merkez oluşturur ve iyonik baş gruplar hücre zarının iç ve dış yüzeylerine yerleştirilir. Oluşan bu yapı kararludur çünkü iyonik hidrofilik baş gruplar hücrenin içindeki ve dışındaki sulu ortam ile etkileşirken hidrofobik kuyruklar birbirleriyle etkileşimlerini arttırır ve sulu ortamlardan uzak tutulur. Oluşan bu yapı sonucunda hücrenin içi ve çevresi arasında yağlı bir bariyer oluşur. Gliserofosfolipitler hücre zarlarındaki işlevlerinin yanı sıra sinyal iletimi ve taşınması gibi önemli hücresel süreçlerde de rol alırlar. PC ve PE tüm memeli hücre zarlarında en bol bulunan gliserofosfolipitlerdir ve lipit çift tabakasının anahtar bileşenleridir ayrıca bunlar metabolizma ve sinyal iletimi gibi diğer hücresel süreçlerde de görev alırlar (267).

Gliserofosfolipitler genellikle farklı ara ürünlerle birkaç aşamada metabolize edilir. Bu metabolizmadaki ilk adım lizofosfatidik asidi (LPA) oluşturmak için yağ asidi zincirlerinin gliserol omurgasına eklenmesini veya transferini içerir. LPA daha sonra bir sonraki ara ürün olan fosfatidik asidi (PA) oluşturmak üzere açillenir. PA defosforile edilerek PC sentezinde gerekli olan diaçilgliserolü oluşturur. PC birçok gliserofosfolipit türünden sadece biridir. Kennedy yolağı adı verilen bir yolda kolin, PC CDP-Kolin'e dönüştürülür (268). Ardından PC, PS ve PE gibi diğer gliserofosfolipit türlerine dönüştürülebilir (269). Bu bağlamda, GBM hastalarından alınan doku örnekleri ile yapılan analizler sonucunda metabolizmaya bağlı olarak çeşitli lipit türlerinin kontrol grubuna göre değişim gösterdiğinin belirlenmesi önemlidir.

Shakya ve ark. (270)'nin yaptığı hedeflenmiş ve Wang ve ark. (60)'nin yaptığı hedeflenmemiş lipidomik analizlerde çeşitli gliserofosfolipitlerin GBM tümörlerinde önemli değişim gösterdiğini bildirilmiş ve bu çalışmalar tez kapsamında elde edilen bulgular ile ilişkilendirilmiştir.

Kolesterol hücre zarlarının önemli bir bileşenidir (271). Kolesterolün uzun zincirli yağ asitleri ile esterleştirilmesiyle oluşan kolesteril esterler, bir yandan kolesterolün kan yoluyla lipoproteinler aracılığıyla taşınmasını sağlarken diğer yandan da kolesterolün hücrelerde birikmesini sağlarlar (272). NMR ile yapılan bir çalışmada CE'lerin yüksek dereceli glioma dokularında normal dokulara göre yüksek seviyelerde saptandığı belirtilmiştir (273). Bir başka çalışmada GBM hasta dokularında lipoprotein reseptörünün (LDLR) ekspresyonunda artış gözlemlenmiş ve bu artış GBM hücrelerinde yüksek seviyelerde var olan kolesterol esterleri ile ilişkilendirilmiştir (274). LDLR'nin işlevi kan dolaşımında bol miktarda bulunan ana kolesterol olan düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) bağlamak ve daha sonra LDL'yi hücrelere getirmek ve hücre kullanımı için kolesterol sağlamaktır (275). Bu bulgular GBM grubunda kolesterol esterlerinin artışı kısmen açıklamakta ve tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçları desteklemektedir.

GBM hastalarının doku örneklerinde anormal derecede yüksek ve düşük hücresel PC, PE ve PS düzeyleri ile yüksek CE seviyeleri GBM tümörlerinin ilerlemesiyle bağlantılı olabilir. Lipit düzeylerindeki bu farklılıklar membran akışkanlığında ve geçirgenliğinde değişikliklere neden olabilir. Bu bağlamda GBM tümörlerinin etki mekanizmasının daha net bir şekilde aydınlatılması için lipit metabolizmasının sonraki araştırmalarda hücresel ve moleküler seviyelerde incelenmesi önemlidir. Ayrıca tez çalışması kapsamında GBM ve normal beyin dokularında belirlenen lipidomik ve metabolik farklılıklar nöronal fenotipler ve IDH durumu ile ilişkili olabilecek ortak özelliklerin ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sfingomyelin hücrede önemli yapısal ve fonksiyonel rollere sahiptir. Bir plazma zarı bileşenidir, birçok sinyal yolağında görev alır ve hücrede önemli rol oynayan birçok ürün oluşturur (276). Sfingomyelin hidrolizinin yolağın başlangıcına yakın bir noktada meydana gelmesinin seramid üretimini ve ya hücre ölümünün hızını ve biçimini etkilediği gösterilmiştir (277). Menenjiyom grubunun kontrol grubundan farklılaşmasında rol aldığı belirlenen Cer(d16:2(4E,6E)/22:1(13Z)(2OH)) bu sonuçları destekleyici nitelikte olmakla birlikte menenjiyom tümörlerinin hücre apoptozunda seramid ve sfingomyelin lipit türlerinin etkili olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Ayrıca sfingomyelin hidrolizinin ardından meydana gelen seramidin

menenjiyom grubunda azalması seramidlerin diğer hücrel süreçlerde rol aldığına veya sfingomiyolin hidrolizinin yeteri kadar gerçekleşmediğine işaret etmektedir.

On dört intrakraniyal menenjiyom hastası ile <sup>31</sup>P-NMR ile yapılan çalışmada gliserofosfolipit düzeylerinde değişim gözlemlenmiş ve spesifik olarak derece 1 menenjiyom hastalarının PE seviyelerinde önemli derecede düşüş tespit edildiği bildirilmiştir (278). Bir diğer çalışmada ise PLA<sub>2</sub> transkriptlerinin menenjiyom türlerinde eksprese edildiği ve bu ekspresyonun tümör büyümesi üzerinde fosfolipitler ve sitokin ağları ilişkili olabileceği bildirilmiştir (279). Literatürdeki bu bulgular tez çalışması kapsamında değişimleri belirlenen fosfolipit düzeylerindeki değişimleri doğrular niteliktedir. Ayrıca Lehnhardt ve ark. (280)'nin yüksek düzeyde SM türleri ile menenjiyomları glioblastomlardan ayırt ettiği çalışma, tez kapsamında menenjiyom hastalarındaki SM düzeylerinin artışına dair bulguları doğrular niteliktedir.

Bu bilgiler ışığında sfingomiyelin, seramid, PC, PE, PS gibi gliserofosfolipit türleri ile triaçil gliserol düzeyleri menenjiyom oluşumu ve gelişimiyle bağlantılı olabilir. Bu nedenle patolojik, hücrel ve moleküler seviyelerde bu lipitler ve lipit sınıflarının dikkate alınması menenjiyom hastaları için tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından araştırılmalıdır.

Kan-beyin bariyeri beyin içine ve dışına taşınan moleküllerin yeterli kontrolünü sağlamak için kan kılcal damarları ve nöronal ağ arasındaki dinamik etkileşimlere olanak sağlayan yarı geçirgen bir endotel hücre sınırır. Endotel hücre zarlarının lipit bileşeninde yüksek çözünürlüğe sahip olan maddelerin kılcal damardan daha iyi geçebildiği ve bu nedenle bir maddenin kandan beyne penetrasyon hızının lipit çözünürlüğü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (281). Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgulara göre akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarındaki lipit seviyelerinin bütüncül olarak etkilendiğinin belirlenmesi şaşırtıcı değildir. Doku örneklerinden elde edilen bu bulgulara göre anormal derecede yüksek ve düşük çeşitli lipit sınıflarının akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar için çözünürlüklerinin ve göç hızlarının değerlendirilmesi ve sonraki çalışmalarda bunların hedeflenmiş analizlerle düzeylerinin belirlenmesi bu tümörler ile birincil beyin tümörleri arasındaki benzerlik ve farklılıkların net bir şekilde ayırt edilmesini, erken teşhis ve tedaviye verilen yanıtın izlenmesini sağlayabilir.

Doku örnekleri için kontrol gruplarına karşı tümör gruplarının biyobelirteç analizleri incelendiğinde çok yüksek tahmin gücüne sahip AUC değerlerinin (>0,95) elde edildiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.22A., Şekil 4.23A., Şekil 4.24A.). Ayrıca tahmini sınıf olasılıklarını gösteren dağılım grafiklerinde grupların net bir şekilde birbirinden ayrıldığı ve örneklerin yanlış bir sınıflandırma grubunda yer almadığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.22B., Şekil 4.23B., Şekil 4.24B.). GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümör gruplarının kontrol grubundan farklılaşmasında D-sorbitol, fosforik asit ve myo-inositol metabolitlerinin ve PC(16:0/18:1(11Z)), PC(14:0/18:0), SM(d18:0/18:1(9Z)), PC(14:0/16:0) lipitlerinin farklı önem derecesine sahip ortak aday biyobelirteçler olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.22D., Şekil 4.23D., Şekil 4.24D.). VIP ve katsayı grafikleri ile GBM ve kontrol gruplarının ayırımında önemli olduğu belirlenen PC, PE ve CE lipit türleri ile menenjiyom-kontrol ve metastaz-kontrol grupların farklılaşmasında önemli olduğu belirlenen PC, PE, PS ve SM gibi lipit türlerinin biyobelirteç analizleri sonucunda da önemli bulunması VIP ve katsayı grafiklerinden elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak çok sayıda istatistiksel test ve literatür verilerine bağlı olarak doku örneklerinin analizleri sonucunda tanımlanan bu metabolitler ve lipitler GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastaların tanısında kullanılabilir önemli aday biyobelirteçlerdir. Geniş örneklem grubu ile yapılan sonraki hedeflenmiş biyobelirteç çalışmalarında bu moleküllerin valide edilerek biyobelirteç olma niteliklerinin değerlendirilmesi bu beyin tümörlerinin erken teşhisi açısından önem arz gerekmektedir.

### 5.2.2. Plazma Örnekleri

Doku örnekleri çalışmasına benzer şekilde plazma örneklerinde de tanımlanan metabolit ve lipitler ile oluşturulan PLS-DA skor grafiğinde kontrol grubunun net bir şekilde menenjiyom, GBM ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hasta gruplarından ayrıldığı görülmüş ancak tümör gruplarının kendi içinde farklılaşmadığı saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.42.). Ardından kontrol grubuna karşı tümör grupları doku örneklerinde olduğu gibi (Bölüm 5.2.1.) ayrı ayrı OPLS-DA grafikleri ile karşılaştırılmış ve bu grafiklerde menenjiyom, GBM ile akciğer kanseri beyin

metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta gruplarının kontrol grubundan net bir şekilde farklılaştığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.43A., Şekil 4.44A., Şekil 4.45A.). OPLS-DA grafiklerinde model uyumu ve tahmini  $R^2$  ve  $Q^2$  değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiş ve bu değerlerin 0,3'ten büyük olması yöntemlerin geçerli olduğunu göstermiştir. Plazma örnekleri için hesaplanan  $Q^2$  değerleri doku örneklerinden daha düşük olsa da plazma örnekleri için oluşturulan OPLS-DA modellerinin tahmin gücünün ( $>0,65$ ) kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu belirlenmiştir.

Plazma örneklerinin analizinde doku örneklerinden farklı olarak kontrol ile tümör gruplarının ayırımında hem çeşitli lipitlerin hem de metabolitlerin etkili olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna karşı tümör gruplarının farklılaşmasında PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/16:0), dehidroaskorbik asit, gliserik asit, N-(Heptadekanoil)-etanolamin, N-(Pentadekanoil)-etanolamin, PE-Cer(d16:2(4E,6E)/16:0(2OH)), PI(O-20:0/0:0) ve tetradekandioik asit'in ortak değişim gösteren aday biyobelirteçler olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.43B., Şekil 4.44B., Şekil 4.45B.).

Plazma örneklerinin analizleri sonucunda kontrol grubuna göre GBM grubunda gliserofosfolipit (PA, PC, LysoPE), sfingolipit (PE-Cer), gliserolipit (TG) ve yağ asiti sınıfında (tetradekandioik asit) yer alan bazı lipit türleri ile dehidroaskorbik asit, D-glukoz-6-fosfat, sitidin, pirol-2-karboksilik asit, gliserik asit, DL-4-Hidroksifenillaktik asit metabolitlerinin düzeylerinde artış, bazı gliserofosfolipitler (PC, PS, PE, PI) ile yağ asitleri türlerinin (N-(Heptadekanoil)-etanolamin, N-(Pentadekanoil)-etanolamin) düzeylerinde ise azalma gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.43C.). Plazma örneklerinden elde edilen bu bulgulara göre lipit türlerindeki değişimin doku örneklerinden elde edilen sonuçlarla paralel olduğu görülmüştür. Yine de doku ve plazma örneklerinde elde edilen bulgularda bazı benzer lipit gruplarında yer alan kimi lipitlerin düzeyinde artma kimisinde ise azalma görülmesi değişimlerin lipit sınıflarından ziyade doğrudan lipit yapısına bağlı olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür. Bu nedenle tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların geliştirilmesi için bir sonraki adım olarak hedeflenmiş çalışmalarla bir lipit sınıfında yer alan farklı zincir ve yan zincir uzunluğu, baş yapısı, yan zincir sayısı, toplam karbon sayısı ile çift bağ sayısı ve geometrisi gibi lipitlerin davranışını belirleyen önemli parametrelerin göz önüne alınarak sonuçların

değerlendirilmesi beyin tümörlerinin oluşum ve gelişiminde lipit metabolizması ile ilgili olarak daha kesin yargılara varılması açısından değerli olacaktır.

Dehidroaskorbik asit (DHA), askorbik asidin (C vitamini) oksitlenmiş bir formudur. DHA'nın hücrelere aktif taşınması yoluyla askorbatın geri dönüştürülmesi ve ardından indirgenerek yeniden kullanılması, insanların onu glikozdan sentezleme kabiliyetini artırır (282). Beyin en yüksek C vitamini derişimine sahip organlardan biri olmakla birlikte C vitamini kan dolaşımından beyne geçemez. Bunun yerine DHA, GLUT1 taşıyıcıları aracılığıyla kan-beyin bariyerinden taşınır ve daha sonra tekrar askorbata dönüştürülür (283, 284). Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında GBM hastalarında tespit edilen dehidroaskorbik asit artışı GLUT1 taşıyıcılarının fonksiyonlarındaki bir bozuklukla ilişkili olabilir. Ramirez ve ark (285)'nin GBM tümörlerinin metabolizmalarını değiştirerek, C vitamininin oksitlenmiş formu olan DHA içeren glikoz taşıyıcıları GLUT'lerin ekspresyonunu arttırdıklarını bildirdikleri çalışma tez kapsamında elde edilen bu bulguyu doğrulamaktadır.

Sitidin nükleik asitlere dahil olmanın ve diğer fonksiyonlarının yanı sıra PC ve PE biyosentetik yollarında ihtiyaç duyulan sitidin trifosfatın (CTP) bir öncüsüdür. Sitidinin beyin hücre dışı sıvısına ve daha sonra nöronlara ve gliaya taşınması, beyinde kullanılması için gerekli ön koşullardır. Dolaşımdaki sitidinin beyin alımına aracılık eden etkili bir mekanizma henüz gösterilmemiştir. Ancak beyinde en bol bulunan gliserofosfolipit olan PC'nin Kennedy yolağıyla biyosentezinin hız sınırlayıcı adımında yer alan bir sitidin nükleotidi olan fosfokolin ve sitidin trifosfat (CTP) gerektirdiği bilinmektedir (286). Bu bağlamda plazma örnekleri ile yapılan analizler sonucunda GBM grubunda sitidin seviyelerinde belirlenen artış GBM'li hastaların doku örneklerinin analiz bulguları sonucunda belirlenen çift bağ geometrisine sahip PC lipit düzeylerindeki artışla ilişkilendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında sitidin düzeyindeki artış sıvı biyopsi ile GBM hastalarının erken teşhisinde ve tedaviye verdikleri yanıtın izlenmesinde kullanılabilir imza niteliğine sahip potansiyel bir metabolit olabilir.

İnsan kaynaklı beyin tümörü başlatan hücrelerin glukoz-6-fosfataz (G6PC/G6Pase) enzimini, 2-deoksi-d-glukoz (2DG) tarafından indüklenen glikolitik inhibisyona karşı koymak ve malign ilerlemeyi sürdürmek için kullandığı bildirilmiştir. G6PC'deki azalma, insan kaynaklı beyin tümörü başlatan hücrelerin



çoğunu glikolitik inhibisyonda hayatta kalamaz hale getirir ve glikojen sentazın (GYS1) aktivasyonu ile glikojen fosforilazın (PYGL) inhibisyonu yoluyla glikojen birikimini destekler. G6PC yıkımından kurtulan beyin tümörü başlatan hücrelerin daha az agresif olduğu ve GBM'de glukoz-6-fosfataz (G6PC/G6Pase) ekspresyonunun normal beyine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (287). Buna göre tez çalışması kapsamında GBM grubunda glukoz-6-fosfat düzeyinde belirlenen artış Abbadi ve ark. (287)'nin GBM'li hastalardaki glukoz-6-fosfataz enzim düzeylerindeki artışı bildiren çalışmayı destekleyici niteliktedir. Bu nedenle glukoz-6-fosfat ve glukoz-6-fosfataz enzimin görev aldığı glikoliziz yolağı GBM'li hastaların yaşam sürelerini uzatmak açısından önemli olabilir.

Yeterince yüksek seviyelerde gliserik asit bir asidojen ve bir metabotoksin olarak hareket edebilir. Bir asidojen birçok organ sistemi üzerinde birden fazla olumsuz etkiye sahip olan asidoza neden olan asidik bir bileşiktir. Metabotoksin ise kronik olarak yüksek seviyelerde olumsuz sağlık etkilerine neden olan endojen olarak üretilen bir metabolittir. Gliserik asit gibi organik asitlerin seviyelerinin beyinde ve diğer dokularda anormal derecede yüksek olması genel metabolik asidoza yol açar (119). Hu ve arkadaşları (288) asidozun gliomadaki tümör mikro çevresinin önemli bir özelliği olduğunu ve bunun kanser kök hücrelerinin çoklu biyolojik fonksiyonlarıyla yakından ilişkili olduğunu bildirilmiştir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında GBM grubunda belirlenen gliserik asit düzeyindeki artış asidoz ile ilişkilendirilmiştir.

Plazma örneklerinden yapılan analizler sonucunda kontrol ile menenjiyom gruplarının ayırımında GBM grubu ile ortak olarak PI(O-20:0/0:0), N-(pentadekanoil)-etanolamin ve N-(heptadekanoil)-etanolamin lipitlerinin düzeylerinde azalma, LysoPE(0:0/18:2(9Z,12Z)), sitidin, pirol-2-karboksilik asit, gliserik asit, dehidroaskorbik asit, PE-Cer(d16:2(4E,6E)/16:0(2OH)), tetradekandioik asit, PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/16:0) düzeylerinde ise artış gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.43C., Şekil 4.44C.). Bunların dışında plazma örneklerinden menenjiyom ile kontrol gruplarının ayırımında etkili olan diğer lipitlerde doku örneklerine benzer şekilde artış ve azalışlar, N-undekanoilglisin düzeyinde azalma, kaprik asit, kreatinin, 3-indolpropiyonik asit, D-malik asit ve alfa-Glukosamin 1-fosfat düzeylerinde ise artış gözlemlenmiştir. Tüm bu aday biyobelirteçlerden sitidin, gliserik asit, dehidroaskorbik asidin tümör oluşum mekanizmasına katkısı GBM grubu için yapılan açıklamalarla

bağdaştırılabilir. Bu nedenle her iki grupta da ortak olarak belirlenen ve önceki çalışmalarla desteklenen bu aday biyobelirteçlerin sonraki çalışmalarda hedeflenmiş analizlerle valide edilerek geniş bir örneklem grubunda test edilmesi ve düzeylerinin belirlenmesi, bu aday biyobelirteçlerin hem GBM hem de menenjiyom tümörlerinin sıvı biyopsi ile erken teşhisinde ve geliştirilen tedavilerin etkinliklerinin incelenmesinde biyobelirteç olarak kullanımları açısından önem arz etmektedir.

N-undekanoilglisin N-asiltransferaz enzimi ile asetil-CoA + glisin  $\leftrightarrow$  CoA + N-açilglisin reaksiyonu sonucunda üretilir (119). Hücrede meydana gelen bu tersinir reaksiyonda N-undekanoilglisinin asetil-CoA üretiminde kullanılması menenjiyom grubundaki N-undekanoilglisin düzeyindeki düşüşle ilişkili olabilir. Öte yandan N-undekanoilglisin düzeyindeki azalmaya bağlı olarak tersinir reaksiyonda oluşan fazla miktarda Asetil-CoA menenjiyom grubunda Krebs döngüsü metabolitlerinden malik asidin düzeyindeki artışla ilişkili olabilir.

Özellikle hem doku hem de plazma örnekleri ile yapılan analizler sonucunda menenjiyom grubunda gliserolipit sınıfında yer alan TG'lerin artışı dikkat çekicidir. Ayrıca tez çalışması kapsamında doku örneklerine paralel olarak plazma örneklerinde de birçok lipit sınıfının düzeyinde belirlenen değişimler menenjiyomlu hastalardaki lipit davranışlarının lipit sınıfı ve yapısı düzeyinde hedeflenmiş analizlerle bütüncül olarak incelenmesine işaret etmektedir ve kuşkusuz ki bu yaklaşım menenjiyom tümörlerinin oluşum ve gelişimlerine ait önemli ve eşsiz bilgiler sağlayıp tedavi etkinliğinin izlenmesi açısından faydalı olacaktır.

Akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümör grubu ile menenjiyom grubu arasında ortak olarak N-undekanoilglisin düzeyinde azalma, CE(DiMe(135)) düzeyinde ise artış gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.44C., Şekil 4.45C.). Ayrıca gliserofosfolipit sınıfında yer alan PS(21:0/18:0) düzeyinin menenjiyom grubunda azaldığı metastaz grubunda ise arttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla menenjiyom grubunda PS(21:0/18:0) düzeyindeki azalma doku örneklerine paralel olarak plazma örneklerinden elde edilen bulguların da PLA<sub>2</sub> transkriptlerinin ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini doğrulayan bir veri olarak yorumlanmış ve PS(21:0/18:0) lipitinin menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hastaların klinik değerlendirilmelerinde önemli bir molekül olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca PS(21:0/18:0) ile gliserofosfolipit ve

gliserolipit (TG) sınıfında yer alan diğer lipitlerin doku örneklerine paralel şekilde plazma örneklerinde de metastaz ve menenjiyom gruplarında değişim göstermesi tespit edilen bu farklılıkların her iki tümör tipi içinde lipit grupları düzeyinde araştırmaya değer aday biyobelirteçler olduğunu göstermektedir.

Menenjiyom grubuna benzer şekilde akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta grubunda da N-undekanoilglisin düzeyindeki azalma, tersinir reaksiyonda oluşan fazla miktardaki Asetil-CoA'ya bağlı olarak Krebs döngüsü metabolitlerden  $\alpha$ -ketoglutarik asitin düzeyindeki artışla ilişkili olabilir.

3-metilindol sigara şirketleri tarafından yayınlanan 1994 tarihli bir raporda sigaralara eklenen 599 katkı maddesinden biri olarak listelenmiştir (289). Buna göre akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta grubunda bu metabolitin artışı şaşırtıcı değildir ve sigara kullanımı veya maruziyetinin akciğer kanserine neden olduğuna işaret etmektedir. 3-indolasetik asit triptofan metabolizmasının bir parçalanma ürünüdür ve sıklıkla memeli bağırsağında bakterilerin etkisiyle üretilir (290). Bu bağlamda akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastaların yer aldığı grupta gözlenen 3-indolasetik asit düzeyindeki artış mikrobiyota ve triptofan metabolizmasındaki bir bozukluk ile ilişkili olabilir.

Kan beyin bariyeri moleküllerin beyne geçişini sıkı bir şekilde düzenler. Safra asitlerinin kan beyin bariyeri geçirgenliğini arttırdığını gösteren çalışmalar tez kapsamında akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta grubunda bir safra asidi türü olan glikosenodeoksikolik asit 3-glukuronid düzeyindeki artışı açıklamaktadır (291, 292).

Plazma örneklerinde kontrol gruplarına karşı tümör gruplarının biyobelirteç analizlerinin doku örneklerine göre daha düşük bir tahmin gücüne sahip olduğu görülse de kabul kriterlerinin hayli üstünde AUC değerleri (>0,925) elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.46A., Şekil 4.47A. ve Şekil 4.48A.). Ayrıca doku örneklerinde olduğu gibi plazma örneklerinde de tahmini sınıf olasılıklarını gösteren dağılım grafiklerinde grupların net bir şekilde birbirinden ayrıldığı ve örneklerin yanlış bir sınıflandırma grubunda yer almadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.46B., Şekil 4.47B., Şekil 4.48B.). Örneğin Şekil 4.48B'de yer alan grafikte 12 akciğer kanseri beyin metastaz hastasının kontrol grubunda yer alan 36 bireyden farklılaşarak her bir hastanın kendi grubunda

sınıflandığı görülmektedir. Buna göre oluşturulan biyobelirteç modeli ile akciğer kanseri beyin metastaz hastalarına doğru teşhis koyulabileceği ve bu hastaların sağlıklı bireylerden ayırt edilebileceği sonucu çıkarılabilir. VIP grafikleri ile grupların ayırımında etkili olduğu belirlenen aday biyobelirteçlerin birçoğunun biyobelirteç analizlerinde de önemli olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.46D., Şekil 4.47D., Şekil 4.48D.). Buna göre doku örneklerine paralel olarak plazma örneklerinde de GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hasta gruplarının kontrol grubundan farklılaşmasında çeşitli lipidlerin etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kontrol ile GBM gruplarının farklılaşmasında dehidroaskorbik asit, L-valin, maltoz, dehidroepiandrosteron, N-undodecaonlyglisin, sitrülün; kontrol ile menenjiyom gruplarının farklılaşmasında 3-indolpropiyonik asit, gliserik asit, dehidroaskorbik asit, D-malik asit, alfa-glukozamin 1-fosfat, sitidin ve S-prenil-L-sistein ve sakaroz; kontrol ve metastaz gruplarının farklılaşmasında ise dehidroaskorbik asit, glikolik asit, gliserik asit, 3-metil indol, 3-indolasetik asit gibi metabolitlerin önemli aday biyobelirteçler olduğu belirlenmiştir.

Hem doku hem de plazma örnekleri ile yapılan analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitler ve lipidler (Bkz. Tablo 4.11., Tablo 4.12., Tablo 4.23., Tablo 4.24.) ile gerçekleştirilen yolak analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren ve tümör oluşum ve gelişimiyle ilişkili olan yolakların sırasıyla GBM grubu için; sfingolipit metabolizması, pentoz fosfat yolağı, gliserofosfolipit metabolizması ve linoleik asit metabolizması, menenjiyom grubu için; gliserolipit ve gliserofosfolipit metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi, sfingolipit metabolizması, linoleik asit metabolizması alanin, aspartat ve glutamat metabolizması ile taurin ve hipotaurin metabolizması, akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümürlü hasta grubu için; birincil safra asidi biyosentezi, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi, alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, sfingolipit metabolizması, linoleik asit metabolizması, arjinin biyosentezi, gliserofosfolipit metabolizması ve galaktoz metabolizması olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.49., Şekil 4.50., Şekil 4.51.). Gliserofosfolipit, sfingolipit ve linoleik asit metabolizmalarının her üç tümör tipi içinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.25., Tablo 4.26., Tablo 4.27.). Bu sonuçlar ortak olarak değişen bu yolakların genel olarak beyin tümörlerinin oluşumları ve gelişimlerinde

etkili olabileceğini düşündürmüştür. Tanımlanan 6 aday biyobelirtecin yer aldığı pentoz fosfat yolağı GBM tümörlerine ait enerji tüketim mekanizmasındaki değişimlerin önemli olduğuna işaret etmektedir. Yalnızca menenjiyom grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan gliserolipit ile taurin ve hipotaurin metabolizması menenjiyom tümörlerine ait tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli yollar olabilir. Diğer tümör gruplarından farklı olarak akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hasta grubunda spesifik olarak değişim gösteren birincil safra asidi biyosentezi, arjinin biyosentezi ve galaktoz metabolizması bu tümör grubuna ait tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve ilaç dirençlerinin araştırılmasında önemli ve dikkate alınması gereken yollarlardır.

Tez çalışması kapsamındaki beyin tümörleri için plazma ve doku örneklerinin metabolomik ve lipidomik analiz sonuçlarının paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda MRI gibi pahalı tekniklere veya cerrahi operasyonlara ihtiyaç duymadan GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastaların erken teşhisinde ve tedavi etkinliklerinin incelenmesinde, daha kolay erişilebilirliği ve toplanması nedeniyle plazma örneklerinden tanımlanan aday biyobelirteçlerin sıvı biyopside kullanım potansiyeli olduğu söylenebilir, çalışma kapsamında doku ve plazma örneklerinden elde edilen bulgular bu bağlamda umut vericidir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Metabolom ve lipidom çok farklı fizikokimyasal karaktere sahip metabolitler ve lipitlerin karışımından oluşur. Bu nedenle geleneksel OVAT yaklaşımları ile metabolomik ve lipidomik analizler için optimum deneysel koşulları belirlemek son derece zordur. Ayrıca optimize edilmiş süreçlerin çoğu birkaç faktörden eş zamanlı olarak etkilendiğinden OVAT yaklaşımının çoğu zaman yetersiz olduğunu ve çevre açısından önemli olan yeşil kimya talepleriyle çeliştiği unutulmamalıdır.

Bu tez çalışmasında ilk kez DoE yaklaşımları ile metabolomik ve lipidomik analiz basamaklarını etkileyen çok sayıda faktör deneysel akış sırasına göre bütüncül olarak değerlendirilerek doku ve plazma örnekleri için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Metabolomik analizler eş zamanlı olarak GC-MS ve LC-qTOF-MS ile, lipidomik analizler ise LC-qTOF-MS ile gerçekleştirilmiştir.

Metabolitlerin yüksek verimde tüketilmesi için aseton, asetonitril, etanol, metanol ve su olmak üzere çeşitli polaritelerde 5 farklı çözücünün etkisi D-optimal karışım tasarım ile değerlendirilmiştir. Lipitlerin metabolitlerle birlikte eş zamanlı olarak yüksek verimde tüketilmesi içinse diklorometan, hegzan, kloroform ve MTBE olmak üzere çeşitli polaritelerde 4 farklı çözücünün etkisi, deneysel tasarımlarla polarite farkı oluşturulmadığı için OVAT yaklaşımı ile test edilmiştir. GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağında rol alan 8 faktör iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile, LCqTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağında etkili olabilecek 3 faktör ise iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile değerlendirilerek optimum deneysel koşullar belirlenmiştir. LC-qTOF-MS temelli metabolomik ve lipidomik analizlerin kromatografik ayırımında etkili olduğu bilinen 3 faktör ise Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiştir.

Metabolomik ve lipidomik analizler için yüksek verimli analitik yöntemler geliştirmek amacıyla optimizasyon çalışmalarında toplam pik alanı değeri cevap değişkeni olarak kullanılmıştır. Deneysel tasarımlardaki varyasyon sistematik bir şekilde regresyon analizleri ile kontrol edilip, önerilen modellerin güvenilirliği çok sayıda istatistiksel testler ve tanı araçları ile desteklenmiştir. Deneysel tasarımlar için önerilen modellere ait istatistiksel analiz sonuçlarının kabul sınırları içerisinde olduğu belirlenmiş ve güvenilirlikleri kanıtlanmıştır.

Metabolitler ve lipitlerin doku örneklerinden metanol:su:diklorometan (2:1:3, h/h/h) karışımı ile, plazma örneklerinden ise metanol:su:kloroform (3:1:3, h/h/h) karışımı ile eş zamanlı olarak tek basamakta ve yüksek verimde tüketildiği belirlenmiştir. Doku örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basmağı için optimum koşullar: 20 µL MeOX (piridin içerisinde 10 mg/mL) ile 30 °C'de 90 dak metoksiaminleme, 80 µL MSTFA + %1 TMCS ile 70 °C'de 120 dak silillemedir. Plazma örneklerinden GC-MS temelli metabolomik analizlerin türevlendirme basamağı için optimum koşullar: 20 µL MeOX (piridin içerisinde 30 mg/mL) ile 30 °C'de 90 dak metoksiaminleme, 80 µL MSTFA + %1 TMCS ile 37 °C'de 120 dak silillemedir. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlerin örnek hazırlama basamağı için optimum koşullar; uçurulan doku örneklerinin 200 µL %0,1 FA içeren asetonitril ile, uçurulan plazma örneklerinin ise 200 µL %0,1 FA içeren su:%0,1 FA içeren asetonitril (1:1, h/h) karışımı ile yeniden çözülmesidir.

Plazma ve doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizler için optimum koşullar; (A) %0,1 FA içeren su ve (B) %0,1 FA içeren asetonitril hareketli fazları, 0,25 mL/dak akış hızı ve 30 °C kolon sıcaklığıdır. Plazma ve doku örneklerinden LC-qTOF-MS temelli lipidomik analizler için optimum koşullar; (A) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren su:asetonitril (6:4, h/h) ve (B) %0,05 FA ve 10 mM AF içeren içeren IPA:asetonitril (9:1, h/h) hareketli fazları, 0,25 mL/dak akış hızı ve 60 °C kolon sıcaklığıdır.

Birçok araştırma alanında DoE yaklaşımı uygulanıyor olsa da omiks çalışmalarda kullanımı hala çok sınırlıdır ve potansiyeli tam olarak anlaşılamamıştır. Omiks analizlerde çeşitli örnek hazırlama, yöntem geliştirme, veri işleme ve hatta hayvan çalışmalarındaki çeşitli protokollerin optimizasyonunda uygun deneysel tasarım modellerinin seçimi ile DoE'den büyük ölçüde yararlanılabilir. Ancak DoE uygulamalarından yararlanırken unutulmaması gereken birkaç önemli parametre vardır. Bunlardan ilki en iyi deneysel tasarım planının basitçe mevcut olmadığı gerçeğidir. Uygun deneysel tasarımın seçimi çoğunlukla çalışmanın amacına bağlıdır. Çalışmanın amacı açıkça tanımlandıktan sonra faktörlerin sayısı, türü, faktörler arasındaki etkileşimlerin olasılığı ve mevcut kaynaklar belirlenmelidir. Bu bağlamda, gelecekte kuşkusuz ki DoE omiks analiz protokollerini optimize etmek için altın bir

standart haline gelecektir ve yalnızca elde edilen sonuçların iyileştirilmesine değil, aynı zamanda deneylere harcanan maliyet ve zamanın düşürülmesine dolayısıyla yeşil analitik kimya uygulamalarına da katkıda bulunacaktır. Sonuç olarak bu tez çalışmasında metabolomik ve lipidomik analizler için uygulanan deneysel tasarım yaklaşımları ile sunulan iş akışının sonraki omiks çalışmalarda araştırmacıları teşvik etmesi ve buna bağlı olarak yüksek verimli analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ile klinik alanda daha kapsamlı ve tekrarlanabilir veriler elde edilmesi beklenmektedir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde metabolomik ve lipidomik analizler için geliştirilen analitik yöntemler GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalardan toplanan doku ve plazma örneklerine uygulanmıştır. Tez kapsamında en sık görülen GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalara ait fenotipler ilk kez doku ve plazma örneklerinden eş zamanlı olarak bütünlük omiks analizler ile kapsamlı şekilde hem GC-MS hemde LC-qTOF-MS kullanılarak incelenmiştir. QC örnekleri ve MS/MS verileri kullanılarak metabolitler ve lipitler yüksek güvenilirlikle tanımlanmıştır. Analiz sonuçları çok değişkenli istatistiksel analizler, biyobelirteç analizleri (ROC eğrileri) ve yolak analizleri ile bütüncül olarak değerlendirilmiş ve klinik açıdan yorumlanmıştır. GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalara ait fenotipler belirlenmiş ve hastalığa ait moleküler imzaların ortaya konması ile yeni aday biyobelirteçler belirlenmiştir. GBM, menenjiyom ve akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalarda gliserofosfolipit, sfingolipit ve linoleik asit metabolizmalarının dikkat çekici şekilde ortak değişim gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca GBM tümörü için pentoz fosfat yolağı, derece 1 menenjiyom tümörü için gliserolipit metabolizması ile taurin ve hipotaurin metabolizması, akciğer kanseri beyin metastazı tanısı konulan beyin tümörlü hastalar içinse birincil safra asidi biyosentezi, arjinin biyosentezi ve galaktoz metabolizmasının spesifik olarak erken teşhis, hayatta kalma süreleri, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, tedavi etkinliklerinin incelenmesi ve ilaç dirençlerinin araştırılması açısından önemli olabileceği belirlenmiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında bütünlük omiks analizler ile kapsamlı moleküler verilerin elde edilmesinin klinik alandaki mekanistik çalışmalarda etkili olan yolakların belirlenmesi açısından yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.



Belirlenen potansiyel biyobelirteçlerin tümör tipi özelinde daha sonra yürütülecek olan klinik çalışmalar ile valide edilmesini takiben erken teşhiste ve klinik alanda kullanımları mümkün olacaktır. Bütünleşik omik analizlerle moleküler düzeyde tümör tiplerine bağlı olarak değişen yolakların ve/veya metabolitlerin ve lipidlerin belirlenmesine yönelik bu iş akışı diğer tümör tipleri içinde tanı, izlem ve potansiyel tedavi seçeneklerinin bulunmasına ışık tutacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Strong MJ, Garces J, Vera JC, Mathkour M, Emerson N, Ware ML. Brain tumors: epidemiology and current trends in treatment. *Brain Tumors Neurooncol.* 2015;1(1):1-21.
2. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol.* 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96.
3. Arvold ND, Lee EQ, Mehta MP, Margolin K, Alexander BM, Lin NU, et al. Updates in the management of brain metastases. *Neuro Oncol.* 2016;18(8):1043-65.
4. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol.* 2021;23(Supplement\_3):iii1-iii105.
5. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *science.* 2002;295(5560):1662-4.
6. Petrik V, Loosemore A, Howe FA, Bell BA, Papadopoulos MC. OMICS and brain tumour biomarkers. *British Journal of Neurosurgery.* 2006;20(5):275-80.
7. Chuang H-Y, Hofree M, Ideker T. A Decade of Systems Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2010;26(1):721-44.
8. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols.* 2011;6(7):1060-83.
9. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *Journal of Mass Spectrometry.* 2016;51(7):461-75.
10. Medina J, van der Velpen V, Teav T, Guitton Y, Gallart-Ayala H, Ivanisevic J. Single-Step Extraction Coupled with Targeted HILIC-MS/MS Approach for Comprehensive Analysis of Human Plasma Lipidome and Polar Metabolome. *Metabolites.* 2020;10(12):495.
11. Dunn WB, Winder CL. Sample preparation related to the intracellular metabolome of yeast: Methods for quenching, extraction, and metabolite quantitation. *Methods in Enzymology.* 500: Elsevier; 2011. p. 277-97.
12. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst.* 2012;137(2):293-300.
13. Nakayasu ES, Nicora CD, Sims AC, Burnum-Johnson KE, Kim Y-M, Kyle JE, et al. MPLEx: a robust and universal protocol for single-sample integrative

- proteomic, metabolomic, and lipidomic analyses. *MSystems*. 2016;1(3):e00043-16.
14. Kang J, David L, Li Y, Cang J, Chen S. Three-in-one simultaneous extraction of proteins, metabolites and lipids for multi-omics. *Frontiers in Genetics*. 2021;12.
  15. Draper NR, Pukelsheim F. An overview of design of experiments. *Statistical Papers*. 1996;37(1):1-32.
  16. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J, et al. Experimental design and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 1998;42(1-2):3-40.
  17. Das AK, Dewanjee S. Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation. *Computational Phytochemistry*. 2018:75-106.
  18. Jacyna J, Kordalewska M, Markuszewski MJ. Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *J Pharmaceut Biomed*. 2019;164:598-606.
  19. Organization WH. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals: World Health Organization; 2018.
  20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
  21. Afshar P, Mohammadi A, Plataniotis KN, editors. Brain tumor type classification via capsule networks. 2018 25th IEEE international conference on image processing (ICIP); 2018: IEEE.
  22. Umphred 3rd D. Neurological rehabilitation 3rd ed. St. Louis, Mosby-Year Book. Inc; 1995.
  23. Konecne S, Goodman C, Boissonnault W. Central nervous system neoplasms. Pathology: Implications for the Physical Therapist Philadelphia, Pa: WB Saunders Co. 1998:702-22.
  24. Hill CI, Nixon CS, Ruehmeier JL, Wolf LM. Brain Tumors. *Physical Therapy*. 2002;82(5):496-502.
  25. Şimşek AB, Dicle A. Primer beyin tümörü: Klinik özellikler, tedavi ve bakım. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*. 2017;6(2):102-13.
  26. Zulch KJ. Histological typing of tumours of the central nervous system. *International histological classification of tumours No 21*. 1979:19-24.
  27. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 1993;3(3):255-68.
  28. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(3):215-25; discussion 26-9.

29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
30. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, et al. International Society of Neuropathology- Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain pathology.* 2014;24(5):429-35.
31. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
32. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
33. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics.* 2007;25(4):867-90.
34. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurologic clinics.* 2007;25(4):925-46.
35. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Berger MS. Evaluation of epidemiologic evidence for primary adult brain tumor risk factors using evidence-based medicine. *Guiding Neurosurgery by Evidence.* 2006;19:54-79.
36. Miller AB, Morgan LL, Udasin I, Davis DL. Cancer epidemiology update, following the 2011 IARC evaluation of radiofrequency electromagnetic fields (Monograph 102). *Environmental research.* 2018;167:673-83.
37. Liu Y, Carson-Walter EB, Cooper A, Winans BN, Johnson MD, Walter KA. Vascular gene expression patterns are conserved in primary and metastatic brain tumors. *Journal of neuro-oncology.* 2010;99(1):13-24.
38. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, et al. Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1164-77.
39. Ostrom QT, Wright CH, Barnholtz-Sloan JS. Brain metastases: epidemiology. *Handbook of clinical neurology.* 2018;149:27-42.
40. Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, et al. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back? *Radiation oncology.* 2011;6(1):1-5.
41. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma subclassifications and their clinical significance. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):284-97.
42. Her N-G, Oh J-W, Oh YJ, Han S, Cho HJ, Lee Y, et al. Potent effect of the MDM2 inhibitor AMG232 on suppression of glioblastoma stem cells. *Cell death & disease.* 2018;9(8):1-12.

43. Saadeh FS, Mahfouz R, Assi HI. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *The International journal of biological markers*. 2018;33(1):22-32.
44. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*. 2004;64(19):6892-9.
45. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(7):405-17.
46. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *The Lancet*. 2004;363(9420):1535-43.
47. Goutagny S, Kalamarides M. Meningiomas and neurofibromatosis. *Journal of neuro-oncology*. 2010;99(3):341-7.
48. Perry A, Cai DX, Scheithauer BW, Swanson PE, Lohse CM, Newsham IF, et al. Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000;59(10):872-9.
49. Smith JS, Lal A, Harmon-Smith M, Bollen AW, McDermott MW. Association between absence of epidermal growth factor receptor immunoreactivity and poor prognosis in patients with atypical meningioma. *Journal of neurosurgery*. 2007;106(6):1034-40.
50. Pachow D, Andrae N, Kliese N, Angenstein F, Stork O, Wilisch-Neumann A, et al. mTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(5):1180-9.
51. Yuzawa S, Nishihara H, Tanaka S. Genetic landscape of meningioma. *Brain tumor pathology*. 2016;33(4):237-47.
52. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *Journal of neurosurgery*. 1997;86(1):113-20.
53. Board PATE. Adult central nervous system tumors treatment (PDQ®). PDQ Cancer Information Summaries [Internet]: National Cancer Institute (US); 2021.
54. Li L, Liu Z, Han R, Li L, Wang M, Huang D, et al. Genetic heterogeneity between paired primary and brain metastases in lung adenocarcinoma. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2020;14:1179554920947335.
55. Malone H, Yang J, Hershman DL, Wright JD, Bruce JN, Neugut AI. Complications following stereotactic needle biopsy of intracranial tumors. *World neurosurgery*. 2015;84(4):1084-9.
56. Trojanowski P, Jarosz B, Szczepanek D. The diagnostic quality of needle brain biopsy specimens obtained with different sampling methods—Experimental study. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-7.
57. Dunbar E, Yachnis AT. Glioma diagnosis: immunohistochemistry and beyond. *Advances in anatomic pathology*. 2010;17(3):187-201.

58. Jelski W, Mroczko B. Molecular and circulating biomarkers of brain tumors. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(13):7039.
59. Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. *Expert review of molecular diagnostics*. 2017;17(10):943-7.
60. Wang L-B, Karpova A, Gritsenko MA, Kyle JE, Cao S, Li Y, et al. Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma. *Cancer Cell*. 2021;39(4):509-28. e20.
61. Heiland DH, Wörner J, Haaker JG, Delev D, Pompe N, Mercas B, et al. The integrative metabolomic-transcriptomic landscape of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 2017;8(30):49178.
62. Liu W, Zhou Y, Duan W, Song J, Wei S, Xia S, et al. Glutathione peroxidase 4- dependent glutathione high- consumption drives acquired platinum chemoresistance in lung cancer- derived brain metastasis. *Clinical and translational medicine*. 2021;11(9):e517.
63. Wibom C, Surowiec I, Mörén L, Bergström P, Johansson M, Antti H, et al. Metabolomic patterns in glioblastoma and changes during radiotherapy: a clinical microdialysis study. *Journal of proteome research*. 2010;9(6):2909-19.
64. Gilard V, Ferey J, Marguet F, Fontanilles M, Ducatez F, Pilon C, et al. Integrative Metabolomics Reveals Deep Tissue and Systemic Metabolic Remodeling in Glioblastoma. *Cancers*. 2021;13(20):5157.
65. Bogusiewicz J, Kupcewicz B, Goryńska PZ, Jaroch K, Goryński K, Birski M, et al. Investigating the Potential Use of Chemical Biopsy Devices to Characterize Brain Tumor Lipidomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7):3518.
66. Wang F-X, Chen K, Huang F-Q, Alolga RN, Ma J, Wu Z-X, et al. Cerebrospinal fluid-based metabolomics to characterize different types of brain tumors. *Journal of Neurology*. 2020;267(4):984-93.
67. Ma J, Li T, Chen H, Wang C, Wang H, Li Q. Lipidomic analysis and diagnosis of glioblastoma multiforme with rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2021;42(19):1965-73.
68. de Mera Melero-Fernandez R, Villaseñor A, Rojo D, Carrión-Navarro J, Gradillas A, Ayuso-Sacido A, et al. Ceramide Composition in Exosomes for Characterization of Glioblastoma Stem-Like Cell Phenotypes. *Frontiers in oncology*. 2021;11:788100-.
69. Baranovičová E, Galanda T, Galanda M, Hatok J, Kolarovszki B, Richterová R, et al. Metabolomic profiling of blood plasma in patients with primary brain tumours: Basal plasma metabolites correlated with tumour grade and plasma biomarker analysis predicts feasibility of the successful statistical discrimination from healthy subjects—a preliminary study. *IUBMB life*. 2019;71(12):1994-2002.
70. Trautwein C, Zizmare L, Mäurer I, Bender B, Bayer B, Ernemann U, et al. Tissue metabolites in diffuse glioma and their modulations by IDH1 mutation, histology, and treatment. *JCI insight*. 2022;7(3).

71. Mören L, Bergenheim AT, Ghasimi S, Brännström T, Johansson M, Antti H. Metabolomic screening of tumor tissue and serum in glioma patients reveals diagnostic and prognostic information. *Metabolites*. 2015;5(3):502-20.
72. Mock A, Rapp C, Warta R, Abdollahi A, Jäger D, Sakowitz O, et al. Impact of post-surgical freezing delay on brain tumor metabolomics. *Metabolomics*. 2019;15(5):1-8.
73. Shen J, Song R, Hodges TR, Heimberger AB, Zhao H. Identification of metabolites in plasma for predicting survival in glioblastoma. *Molecular Carcinogenesis*. 2018;57(8):1078-84.
74. Gao P, Yang C, Nesvick CL, Feldman MJ, Sizdahkhani S, Liu H, et al. Hypotaurine evokes a malignant phenotype in glioma through aberrant hypoxic signaling. *Oncotarget*. 2016;7(12):15200.
75. Zhao H, Heimberger AB, Lu Z, Wu X, Hodges TR, Song R, et al. Metabolomics profiling in plasma samples from glioma patients correlates with tumor phenotypes. *Oncotarget*. 2016;7(15):20486.
76. Pekov S, Sorokin A, Kuzin A, Bocharov K, Bormotov D, Shivalin A, et al. Analysis of Phosphatidylcholines Alterations in Human Glioblastomas Ex Vivo. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021;15(3):241-7.
77. Locasale JW, Melman T, Song S, Yang X, Swanson KD, Cantley LC, et al. Metabolomics of human cerebrospinal fluid identifies signatures of malignant glioma. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
78. Mören L, Wibom C, Bergström P, Johansson M, Antti H, Bergenheim AT. Characterization of the serum metabolome following radiation treatment in patients with high-grade gliomas. *Radiation Oncology*. 2016;11(1):1-9.
79. Li W, Jia H, Li Q, Cui J, Li R, Zou Z, et al. Glycerophosphatidylcholine PC (36:1) absence and 3'-phosphoadenylate (pAp) accumulation are hallmarks of the human glioma metabolome. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
80. Ijare OB, Hambarde S, Brasil da Costa FH, Lopez S, Sharpe MA, Helekar SA, et al. Glutamine anaplerosis is required for amino acid biosynthesis in human meningiomas. *Neuro Oncol*. 2021.
81. Fitzpatrick G, Rahman M, Garrett T, Kresak J. MNGI-11. HIGH-GRADE AND LOW-GRADE MENINGIOMAS HARBOR DIFFERING METABOLOMIC PROFILES. *Neuro Oncol*. 2019;21(Suppl 6):vi141.
82. Jarmusch AK, Pirro V, Baird Z, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(6):1486-91.
83. Bogusiewicz J, Gaca-Tabaszewska M, Olszówka D, Jaroch K, Furtak J, Harat M, et al. Coated Blade Spray-Mass Spectrometry as a New Approach for the Rapid Characterization of Brain Tumors. 2022.
84. Lu AY, Turban JL, Damisah EC, Li J, Alomari AK, Eid T, et al. Novel biomarker identification using metabolomic profiling to differentiate radiation

- necrosis and recurrent tumor following Gamma Knife radiosurgery. *Journal of Neurosurgery*. 2017;127(2):388-96.
85. Su J, Song Q, Qasem S, O'Neill S, Lee J, Furdui CM, et al. Multi-omics analysis of brain metastasis outcomes following craniotomy. *Frontiers in Oncology*. 2021;10:3346.
  86. Chuang H-Y, Hofree M, Ideker T. A decade of systems biology. *Annual review of cell and developmental biology*. 2010;26:721-44.
  87. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003;300(5617):286-90.
  88. Bentley DR. The human genome project—an overview. *Medicinal research reviews*. 2000;20(3):189-96.
  89. Rattray NJ, Deziel NC, Wallach JD, Khan SA, Vasiliou V, Ioannidis J, et al. Beyond genomics: understanding exposotypes through metabolomics. *Human genomics*. 2018;12(1):1-14.
  90. Westerhoff HV, Palsson BO. The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature biotechnology*. 2004;22(10):1249-52.
  91. Created with BioRender.com.
  92. Vailati-Riboni M, Palombo V, Loor JJ. What are omics sciences? Periparturient diseases of dairy cows: Springer; 2017. p. 1-7.
  93. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*. 2017;18(1):1-15.
  94. Cho W. Omics approaches in cancer research. An omics perspective on cancer research: Springer; 2010. p. 1-9.
  95. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-95.
  96. Dong Z, Chen Y. Transcriptomics: advances and approaches. *Science China Life Sciences*. 2013;56(10):960-7.
  97. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):193-7.
  98. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: technologies and their applications. *Journal of chromatographic science*. 2017;55(2):182-96.
  99. Beger RD. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*. 2013;3(3):552-74.
  100. Fukusaki E. Application of Metabolomics for High Resolution Phenotype Analysis. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2014;3(Spec Iss 3):S0045-S.
  101. Nemutlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18 O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.



102. Eylem CC, Baysal I, Erikci A, Yabanoglu-Ciftci S, Zhang S, Kır S, et al. Gas chromatography-mass spectrometry based <sup>18</sup>O stable isotope labeling of Krebs cycle intermediates. *Analytica Chimica Acta*. 2021;1154:338325.
103. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical cancer research*. 2009;15(2):431-40.
104. Yang K, Han X. Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends in biochemical sciences*. 2016;41(11):954-69.
105. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(2):112-24.
106. Ernst R, Ejsing CS, Antonny B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *Journal of molecular biology*. 2016;428(24):4776-91.
107. Stephenson DJ, Hoeflerlin LA, Chalfant CE. Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational Research*. 2017;189:13-29.
108. Micheel CM, Nass SJ, Omenn GS. Omics-based clinical discovery: Science, technology, and applications. *Evolution of Translational Omics: Lessons Learned and the Path Forward*: National Academies Press (US); 2012.
109. Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang LH, Lam HYK, Chen R, et al. Personal Omics Profiling Reveals Dynamic Molecular and Medical Phenotypes. *Cell*. 2012;148(6):1293-307.
110. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*. 2019;9(4).
111. Kang JN, David L, Li YY, Cang J, Chen SX. Three-in-One Simultaneous Extraction of Proteins, Metabolites and Lipids for Multi-Omics. *Front Genet*. 2021;12.
112. Nakayasu ES, Nicora CD, Sims AC, Burnum-Johnson KE, Kim YM, Kyle JE, et al. MPLEx: a Robust and Universal Protocol for Single-Sample Integrative Proteomic, Metabolomic, and Lipidomic Analyses. *Msystems*. 2016;1(3).
113. Xu J, Bankov G, Kim M, Wretling A, Lord J, Green R, et al. Integrated lipidomics and proteomics network analysis highlights lipid and immunity pathways associated with Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener*. 2020;9(1).
114. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical chemistry*. 1978;24(10):1663-73.
115. Horning EC, Horning M-G. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical chemistry*. 1971;17(8):802-9.
116. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*. 2007;35(suppl\_1):D521-D6.
117. 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(suppl\_1):D603-D10.

118. Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, Navarro M, Salek RM, Yanes O. Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;78:23-35.
119. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic acids research*. 2022;50(D1):D622-D31.
120. Han X, Gross RW. The Foundations and Development of Lipidomics. *Journal of lipid research*. 2021:100164.
121. Kishimoto K, Urade R, Ogawa T, Moriyama T. Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: suitable methods for “lipidome” analysis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;281(3):657-62.
122. Lindblom G, Orädd G, Rilfors L, Morein S. Regulation of lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* and *Escherichia coli* membranes: NMR studies of lipid lateral diffusion at different growth temperatures. *Biochemistry*. 2002;41(38):11512-5.
123. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of lipid research*. 2003;44(6):1071-9.
124. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X. Metabolomics for biomarker discovery: moving to the clinic. *BioMed research international*. 2015;2015.
125. Subramaniam S, Fahy E, Gupta S, Sud M, Byrnes RW, Cotter D, et al. Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chemical reviews*. 2011;111(10):6452-90.
126. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids<sup>1</sup>. *Journal of lipid research*. 2005;46(5):839-61.
127. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CR, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids<sup>1</sup>. *Journal of lipid research*. 2009;50:S9-S14.
128. Ridgway N, McLeod R. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*: Elsevier; 2008.
129. Dennis EA. Lipidomics joins the omics evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(7):2089-90.
130. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*. 2012;98(1):30.2. 1-.2. 24.
131. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The Human Serum Metabolome. *Plos One*. 2011;6(2).
132. Quehenberger O, Dennis EA. MECHANISMS OF DISEASE The Human Plasma Lipidome. *New Engl J Med*. 2011;365(19):1812-23.

133. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Neumeister VM, Rimm DL. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Laboratory investigation*. 2015;95(4):385-96.
134. Pinto J, Domingues MRM, Galhano E, Pita C, do Céu Almeida M, Carreira IM, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *Analyst*. 2014;139(5):1168-77.
135. Vuckovic D. Sample preparation in global metabolomics of biological fluids and tissues. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*: Elsevier; 2020. p. 53-83.
136. Shryock JC, Rubio R, Berne RM. Extraction of adenine nucleotides from cultured endothelial cells. *Analytical biochemistry*. 1986;159(1):73-81.
137. Dunn WB, Winder CL. Sample Preparation Related to the Intracellular Metabolome of Yeast: Methods for Quenching, Extraction, and Metabolite Quantitation. *Method Enzymol*. 2011;500:277-97.
138. Zhang AH, Sun H, Wang P, Han Y, Wang XJ. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*. 2012;137(2):293-300.
139. Want EJ, O'Maille G, Smith CA, Brandon TR, Uritboonthai W, Qin C, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2006;78(3):743-52.
140. Fiehn O, Kind T. Metabolite profiling in blood plasma. *Metabolomics*: Springer; 2007. p. 3-17.
141. Braga CP, Adamec J. Metabolome analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*: Elsevier; 2018. p. 463-75.
142. Maharjan RP, Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*. 2003;313(1):145-54.
143. Ellefsen KN, Concheiro M, Suzuki M, Rice KC, Elmore JS, Baumann MH, et al. Quantification of methylone and metabolites in rat and human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2015;33(2):202-12.
144. Godzien J, Ciborowski M, Whiley L, Legido-Quigley C, Ruperez FJ, Barbas C. In-vial dual extraction liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to streptozotocin-treated diabetic rats. Tips and pitfalls of the method. *Journal of Chromatography A*. 2013;1304:52-60.
145. Cajka T, Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014;61:192-206.
146. Zhao Y-Y, Wu S-P, Liu S, Zhang Y, Lin R-C. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;220:181-92.

147. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
148. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Phys.* 1959;37(8):911-7.
149. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of lipid research.* 2008;49(5):1137-46.
150. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of lipid research.* 2008;49(5):1137-46.
151. Orata F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications.* 2012:83-108.
152. Jiménez-Martín E, Ruiz J, Pérez-Palacios T, Silva A, Antequera T. Gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl-tert-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2012;60(10):2456-63.
153. Qiu Y, Reed D. Gas chromatography in metabolomics study. *Advances in gas chromatography.* 2014:83-101.
154. Gullberg J, Jonsson P, Nordstrom A, Sjostrom M, Moritz T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2004;331(2):283-95.
155. A J, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, et al. Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome. *Anal Chem.* 2005;77(24):8086-94.
156. Danielsson APH, Moritz T, Mulder H, Spegel P. Development of a gas chromatography/mass spectrometry based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. *Metabolomics.* 2012;8(1):50-63.
157. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016;114:30.4.1-4.2.
158. Moros G, Chatziioannou AC, Gika HG, Raikos N, Theodoridis G. Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Bioanalysis.* 2017;9(1):53-65.
159. Kiseleva O, Kurbatov I, Ilgisonis E, Poverennaya E. Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites.* 2022;12(1):15.
160. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(1):19-34.
161. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B.* 2012;910:2-13.

162. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem.* 2008;1:45-69.
163. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical biology.* 2008;5(1):011001.
164. Monteiro M, Carvalho M, Bastos M, Guedes de Pinho P. Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Current medicinal chemistry.* 2013;20(2):257-71.
165. Weckwerth W. *Metabolomics: methods and protocols*: Springer Science & Business Media; 2007.
166. Brown M, Dunn WB, Dobson P, Patel Y, Winder C, Francis-McIntyre S, et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst.* 2009;134(7):1322-32.
167. Nicholson G, Rantalainen M, Maher AD, Li JV, Malmodin D, Ahmadi KR, et al. Human metabolic profiles are stably controlled by genetic and environmental variation. *Molecular systems biology.* 2011;7(1):525.
168. Chen Z, Xu X, Zhang J, Liu Y, Xu X, Li L, et al. Application of LC-MS-based global metabolomic profiling methods to human mental fatigue. *Analytical chemistry.* 2016;88(23):11293-6.
169. Wang H, Muehlbauer MJ, O'Neal SK, Newgard CB, Hauser ER, Bain JR, et al. Recommendations for improving identification and quantification in non-targeted, GC-MS-based metabolomic profiling of human plasma. *Metabolites.* 2017;7(3):45.
170. Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC trends in analytical chemistry.* 2008;27(3):228-37.
171. Williams MD, Reeves R, Resar LS, Hill HH. Metabolomics of colorectal cancer: past and current analytical platforms. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2013;405(15):5013-30.
172. Kraly JR, Holcomb RE, Guan Q, Henry CS. Microfluidic applications in metabolomics and metabolic profiling. *Analytica chimica acta.* 2009;653(1):23-35.
173. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID. Mass spectrometry- based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass spectrometry reviews.* 2011;30(5):884-906.
174. Abian J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry.* 1999;34(3):157-68.
175. Grob RL, Barry EF. *Modern practice of gas chromatography*: John Wiley & Sons; 2004.
176. Eiceman G. Instrumentation of gas chromatography. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.* 2006.

177. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis: Cengage learning; 2017.
178. McNair HM, Miller JM, Snow NH. Basic gas chromatography: John Wiley & Sons; 2019.
179. Shimadzu's Fundamental Guide to Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). Shimadzu Corporation; 2020.
180. Madji Hounoum B, Blasco H, Nadal-Desbarats L, Diémé B, Montigny F, Andres CR, et al. Analytical methodology for metabolomics study of adherent mammalian cells using NMR, GC-MS and LC-HRMS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407(29):8861-72.
181. Wang L, Du Y, Xu B-j, Deng X, Liu Q-h, Zhong Q-q, et al. Metabolomics study of metabolic changes in renal cells in response to high-Glucose exposure based on liquid or gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Frontiers in pharmacology*. 2019:928.
182. Goulitquer S, Croyal M, Lalande J, Royer A-L, Guitton Y, Arzur D, et al. Consequences of blunting the mevalonate pathway in cancer identified by a pluri-omics approach. *Cell death & disease*. 2018;9(7):1-12.
183. Hoffman Ed, Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications. West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxelles, Belgique. 2007;1(2):85.
184. Maher S, Jjunju FP, Taylor S. Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. *Reviews of Modern Physics*. 2015;87(1):113.
185. Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). Shimadzu Corporation; 2019.
186. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009;30(1):19.
187. Li W, Zhang J, Francis L. Handbook of LC-MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations. 2013.
188. Hiraoka K. Fundamentals of mass spectrometry: Springer; 2013.
189. Striegel A. Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation. Fanali, S. 2013:193-223.
190. Weng YJ, Gan HY, Li X, Huang Y, Li ZC, Deng HM, et al. Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*. 2019;20(9):447-59.
191. Jain A, Li XH, Chen WN. An untargeted fecal and urine metabolomics analysis of the interplay between the gut microbiome, diet and human metabolism in Indian and Chinese adults. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-13.
192. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabolomics. *Journal of proteome research*. 2007;6(2):443-58.
193. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas- Oates J. Metabolomic applications of hplc-lc-ms. *Mass spectrometry reviews*. 2010;29(5):671-84.

194. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Resson HW. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. 2012;8(2):470-81.
195. Liu Y, Lu S, Zhao L, Dong X, Zhu Z, Jin Y, et al. Effects of glaucocalyxin A on human liver cancer cells as revealed by GC/MS-and LC/MS-based metabolic profiling. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2018;410(14):3325-35.
196. Lange M, Fedorova M. Evaluation of lipid quantification accuracy using HILIC and RPLC MS on the example of NIST® SRM® 1950 metabolites in human plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2020;412(15):3573-84.
197. Li A, Hines KM, Xu L. Lipidomics by HILIC-ion mobility-mass spectrometry. *Ion Mobility-Mass Spectrometry: Springer*; 2020. p. 119-32.
198. Sampsonidis I, Witting M, Koch W, Virgiliou C, Gika HG, Schmitt-Kopplin P, et al. Computational analysis and ratiometric comparison approaches aimed to assist column selection in hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2015;1406:145-55.
199. Ren L, Hong ES, Mendoza A, Issaq S, Hoang CT, Lizardo M, et al. Metabolomics uncovers a link between inositol metabolism and osteosarcoma metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(24):38541.
200. Barupal DK, Zhang Y, Shen T, Fan S, Roberts BS, Fitzgerald P, et al. A comprehensive plasma metabolomics dataset for a cohort of mouse knockouts within the international mouse phenotyping consortium. *Metabolites*. 2019;9(5):101.
201. Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Frenich AG, Maresca MAR, Vidal JLM. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;89:203-12.
202. Rhoades SD, Weljie AM. Comprehensive optimization of LC–MS metabolomics methods using design of experiments (COLMeD). *Metabolomics*. 2016;12(12):1-12.
203. Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(29):25435-42.
204. Ho CS, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003;24(1):3.
205. Gowda G, Djukovic D. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Mass Spectrometry in Metabolomics*. 2014:3-12.
206. Schwaiger-Haber M, Stancliffe E, Arends V, Thyagarajan B, Sindelar M, Patti GJ. A Workflow to Perform Targeted Metabolomics at the Untargeted Scale on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *ACS measurement science Au*. 2021;1(1):35-45.
207. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole–time- of- flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*. 2001;36(8):849-65.

208. Mastrangelo A, Ferrarini A, Rey-Stolle F, Garcia A, Barbas C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Analytica chimica acta*. 2015;900:21-35.
209. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*. 2006;78(3):779-87.
210. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*. 2015;12(6):523-6.
211. Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. *Nature Biotechnology*. 2020;38(10):1159-63.
212. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*. 2010;11(1):1-11.
213. Styczynski MP, Moxley JF, Tong LV, Walther JL, Jensen KL, Stephanopoulos GN. Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery. *Analytical chemistry*. 2007;79(3):966-73.
214. Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic acids research*. 2021;49(W1):W388-W96.
215. Wu Y, Li L. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *Journal of Chromatography A*. 2016;1430:80-95.
216. Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, et al. The great importance of normalization of LC-MS data for highly- accurate non-targeted metabolomics. *Biomedical Chromatography*. 2017;31(1):e3864.
217. Begou O, Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. Quality control and validation issues in LC-MS metabolomics. *Metabolic profiling: Springer*; 2018. p. 15-26.
218. Saccenti E, Hoefsloot HC, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MM. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 2014;10(3):361-74.
219. HÉBERGER K. Chemoinformatics—multivariate mathematical—statistical methods for data evaluation. *Medical Applications of Mass Spectrometry: Elsevier*; 2008. p. 141-69.
220. Brereton RG. *Chemometrics: Ellis Horwood Chichester*; 1990.
221. Brereton RG. *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant: John Wiley & Sons*; 2003.
222. Skartland LK, Mjøs SA, Grung B. Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(38):6823-31.



223. Ghanem KM, Al-Garni SM, Al-Shehri AN. Statistical optimization of cultural conditions by response surface methodology for phenol degradation by a novel *Aspergillus flavus* isolate. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(15).
224. Schultz TA. An introduction to the design of experiments: A simplified approach. *Quality Progress*. 2000;33(9):122.
225. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*: John Wiley & sons; 2017.
226. Bowden GD, Pichler BJ, Maurer A. A design of experiments (DoE) approach accelerates the optimization of copper-mediated <sup>18</sup>F-fluorination reactions of arylstannanes. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-10.
227. Das AK, Dewanjee S. Optimization of extraction using mathematical models and computation. *Computational phytochemistry*: Elsevier; 2018. p. 75-106.
228. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of chromatography B*. 2012;910:2-13.
229. Dejaegher B, Vander Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;56(2):141-58.
230. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström C, Wold S. *Design of experiments. Principles and Applications*, Learn ways AB, Stockholm. 2000.
231. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons; 2016.
232. Weissman SA, Anderson NG. Design of experiments (DoE) and process optimization. A review of recent publications. *Organic Process Research & Development*. 2015;19(11):1605-33.
233. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(6):889-901.
234. Demir Ö, Aksu B, Özsoy Y. İlaç formülasyonu geliştirilmesinde deney tasarımı (DoE) seçimi ve kullanımı. 2017.
235. Jiye A, Huang Q, Wang G, Zha W, Yan B, Ren H, et al. Global analysis of metabolites in rat and human urine based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2008;379(1):20-6.
236. Jiye A, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem*. 2005;77(24):8086-94.
237. Ritter JB, Genzel Y, Reichl U. Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: optimization using experimental design. *Analytical biochemistry*. 2008;373(2):349-69.
238. Danielsson AP, Moritz T, Mulder H, Spéjel P. Development of a gas chromatography/mass spectrometry based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. *Metabolomics*. 2012;8(1):50-63.

239. AlMasoud N, Correa E, Trivedi DK, Goodacre R. Fractional factorial design of MALDI-TOF-MS sample preparations for the optimized detection of phospholipids and acylglycerols. *Analytical chemistry*. 2016;88(12):6301-8.
240. Mueller A, Jungen H, Iwersen-Bergmann S, Raduenz L, Lezius S, Andresen-Streichert H. Determination of ethyl glucuronide in human hair samples: A multivariate analysis of the impact of extraction conditions on quantitative results. *Forensic Science International*. 2017;271:43-8.
241. Al Hamimi S, Sandahl M, Armeni M, Turner C, Spégel P. Screening of stationary phase selectivities for global lipid profiling by ultrahigh performance supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018;1548:76-82.
242. Broadhurst DI, Kell DB. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*. 2006;2(4):171-96.
243. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future. *Journal of mass spectrometry*. 2016;51(8):535-48.
244. Rodrigues AM, Ribeiro-Barros AI, António C. Experimental design and sample preparation in forest tree metabolomics. *Metabolites*. 2019;9(12):285.
245. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(6):1523-48.
246. Dudzik D, Barbas-Bernardos C, García A, Barbas C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;147:149-73.
247. Schiffman C, Petrick L, Perttula K, Yano Y, Carlsson H, Whitehead T, et al. Filtering procedures for untargeted LC-MS metabolomics data. *BMC bioinformatics*. 2019;20(1):1-10.
248. Bai Y, Song Y, Zhang J, Fu S, Wu L, Xia C, et al. GC/MS and LC/MS Based Serum Metabolomic Analysis of Dairy Cows With Ovarian Inactivity. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8.
249. Yang Y, Yin Y, Chen X, Chen C, Xia Y, Qi H, et al. Evaluating different extraction solvents for GC-MS based metabolomic analysis of the fecal metabolome of adult and baby giant pandas. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-9.
250. Bruce SJ, Tavazzi I, Parisod V, Rezzi S, Kochhar S, Guy PA. Investigation of human blood plasma sample preparation for performing metabolomics using ultrahigh performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2009;81(9):3285-96.
251. Tumanov S, Kamphorst JJ. Recent advances in expanding the coverage of the lipidome. *Current opinion in biotechnology*. 2017;43:127-33.
252. Sarafian MH, Gaudin M, Lewis MR, Martin FP, Holmes E, Nicholson JK, et al. Objective Set of Criteria for Optimization of Sample Preparation Procedures for Ultra-High Throughput Untargeted Blood Plasma Lipid Profiling by Ultra

- Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(12):5766-74.
253. Reichl B, Eichelberg N, Freytag M, Gojo J, Peyrl A, Buchberger W. Evaluation and optimization of common lipid extraction methods in cerebrospinal fluid samples. *J Chromatogr B.* 2020;1153.
254. Lee DY, Kind T, Yoon YR, Fiehn O, Liu KH. Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(28):7275-86.
255. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, Poojary MM, Narayana VK, Boughton BA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics.* 2018;14(11):1-31.
256. Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bauer A, Opialla T, Kempa S, Fleming CA, et al. Optimized workflow for on-line derivatization for targeted metabolomics approach by gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites.* 2021;11(12):888.
257. Lindahl A, Saaf S, Lehtio J, Nordstrom A. Tuning Metabolome Coverage in Reversed Phase LC-MS Metabolomics of MeOH Extracted Samples Using the Reconstitution Solvent Composition. *Anal Chem.* 2017;89(14):7356-64.
258. Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander Heyden Y. Comparison of Plackett-Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Analytica chimica acta.* 2007;595(1-2):59-71.
259. Zhou Y, Song J-Z, Choi FF-K, Wu H-F, Qiao C-F, Ding L-S, et al. An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsis* species. *Journal of Chromatography A.* 2009;1216(42):7013-23.
260. Hecht ES, Oberg AL, Muddiman DC. Optimizing mass spectrometry analyses: a tailored review on the utility of design of experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 2016;27(5):767-85.
261. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol.* 2014;16(7):896-913.
262. Brennan PM, Butler HJ, Christie L, Hegarty MG, Jenkinson MD, Keerie C, et al. Early diagnosis of brain tumours using a novel spectroscopic liquid biopsy. *Brain communications.* 2021;3(2):fcab056.
263. Ozawa M, Brennan PM, Zienius K, Kurian KM, Hollingworth W, Weller D, et al. Symptoms in primary care with time to diagnosis of brain tumours. *Family practice.* 2018;35(5):551-8.
264. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin Hiv Aids.* 2010;5(6):463-6.
265. Ruiz-Perez D, Guan HB, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *Bmc Bioinformatics.* 2020;21.

266. Johnson JL, Johnson LA. Homeostasis of Lipid Metabolism in Disorders of the Brain. 2022.
267. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2017;1859(9):1558-72.
268. Kennedy EP. Metabolism of lipides. *Annual review of biochemistry*. 1957;26(1):119-48.
269. Ecker J, Liebisch G. Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. *Progress in lipid research*. 2014;54:14-31.
270. Shakya S, Gromovsky AD, Hale JS, Knudsen AM, Prager B, Wallace LC, et al. Altered lipid metabolism marks glioblastoma stem and non-stem cells in separate tumor niches. *Acta neuropathologica communications*. 2021;9(1):1-18.
271. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 2005;438(7068):612-21.
272. Tosi MR, Tugnoli V. Cholesteryl esters in malignancy. *Clinica chimica acta*. 2005;359(1-2):27-45.
273. Tugnoli V, Tosi M, Tinti A, Trincherro A, Bottura G, Fini G. Characterization of lipids from human brain tissues by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 2001;62(6):297-306.
274. Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, et al. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer discovery*. 2011;1(5):442-56.
275. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(4):431-8.
276. Ramstedt B, Slotte JP. Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS letters*. 2002;531(1):33-7.
277. Green DR. Apoptosis and sphingomyelin hydrolysis: the flip side. *The Journal of cell biology*. 2000;150(1):F5-F8.
278. Seijo L, Merchant TE, van der Ven LT, Minsky BD, Glonek T. Meningioma phospholipid profiles measured by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids*. 1994;29(5):359.
279. Denizot Y, De Armas R, Durand K, Robert S, Moreau J-J, Caire F, et al. Analysis of Several mRNA in Human Meningiomas. *Mediators of Inflammation*. 2009.
280. Lehnhardt FG, Röhn G, Ernestus RI, Grüne M, Hoehn M. <sup>1</sup>H- and <sup>31</sup>P- MR spectroscopy of primary and recurrent human brain tumors in vitro: malignancy- characteristic profiles of water soluble and lipophilic spectral components. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the*

- Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo. 2001;14(5):307-17.
281. Postmus PE, Sleijfer DT, Haaxma-Reiche H. Chemotherapy for central nervous system metastases from small cell lung cancer. A review. *Lung cancer*. 1989;5(4-6):254-63.
  282. Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, Mongellaz C, Prohaska R, Battini J-L, et al. Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell*. 2008;132(6):1039-48.
  283. Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC, et al. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(11):2842-8.
  284. Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss S, Mack WJ, McTaggart RA, et al. Dehydroascorbic acid, a blood–brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11720-4.
  285. Ramírez E, Jara N, Ferrada L, Salazar K, Martínez F, Oviedo MJ, et al. Glioblastoma invasiveness and collagen secretion are enhanced by vitamin C. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2022.
  286. Cansev M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain research reviews*. 2006;52(2):389-97.
  287. Abbadi S, Rodarte JJ, Abutaleb A, Lavell E, Smith CL, Ruff W, et al. Glucose-6-phosphatase Is a Key Metabolic Regulator of Glioblastoma Invasion. *Molecular Cancer Research*. 2014;12(11):1547-59.
  288. Hu P, Li S, Tian N, Wu F, Hu Y, Li D, et al. Acidosis enhances the self-renewal and mitochondrial respiration of stem cell-like glioma cells through CYP24A1-mediated reduction of vitamin D. *Cell death & disease*. 2019;10(1):1-14.
  289. Doull J, Frawley J, George W, Loomis T, Squire R, Taylor S. Cigarette ingredients: A complete list and background. Covington and Burling, Washington, DC. 1994:517941576-1600.
  290. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen M-L, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;35(Supplement\_1):S6-S16.
  291. Quinn M, McMillin M, Galindo C, Frampton G, Pae HY, DeMorrow S. Bile acids permeabilize the blood brain barrier after bile duct ligation in rats via Rac1-dependent mechanisms. *Digestive and Liver Disease*. 2014;46(6):527-34.
  292. Mertens KL, Kalsbeek A, Soeters MR, Eggink HM. Bile acid signaling pathways from the enterohepatic circulation to the central nervous system. *Frontiers in neuroscience*. 2017:617.

## 8. EKLER

### EK-1: İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

#### Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

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

#### Standart Hata Hesaplanması

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

#### T-Testi

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}}$$

$\bar{x}$  = Ortalama

$\mu$  = Tahmini ortalama

$\sigma$  = Standart sapma

$n$  = Ölçüm sayısı

#### F-Testi

$$F = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

#### Standart Sapma

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$\bar{x}$  = Ortalama

$s$  = Standart Sapma

$N$  = Örnek Sayısı

**Tahmini  $R^2$** 

$$Tahmini R^2 = 1 - \left[ \frac{PRESS}{SS_{kalıntı} + SS_{model}} \right]$$

**Düzeltilmiş  $R^2$** 

$$Düzeltilmiş R^2 = 1 - \left[ \left( \frac{SS_{kalıntı}}{df_{kalıntı}} \right) / \left( \frac{SS_{kalıntı} + SS_{model}}{df_{kalıntı} + df_{model}} \right) \right]$$

**EK-2: Kodlanmış Matematiksel Model**

LC-qTOF-MS ile yapılan metabolomik analizlerin kromatografik parametrelerine ait optimizasyon çalışması için oluşturulan Box-Behnken tasarımında faktörlerin yüksek seviyelerinin +1, düşük seviyelerinin ise -1 olarak kodlanması ile elde edilen matematiksel model aşağıdaki gibidir.

$$\text{TPA} = +3.090\text{E}+08$$

$$+7.829\text{E}+06 \quad \text{A}$$

$$-3.795\text{E}+07 \quad \text{B}$$

$$-5.361\text{E}+07 \quad \text{C}$$

$$+3.530\text{E}+06 \quad \text{AB}$$

$$-1.090\text{E}+07 \quad \text{AC}$$

$$-1.387\text{E}+07 \quad \text{BC}$$

$$-9.549\text{E}+07 \quad \text{A}^2$$

$$-8.254\text{E}+06 \quad \text{B}^2$$

$$+6.538\text{E}+06 \quad \text{C}^2$$

**Faktörler**

A: Hareketli fazdaki FA oranı (%)

B: Akış Hızı (mL/min)

C: Kolon Sıcaklığı (°C)

**Cevap Değişkeni**

TPA: Toplam Pik Alanı



### EK-3: Tez Çalışmasına ait Etik Kurul İzni



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1452

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 02 TEMMUZ 2019 SALI  
**Toplantı No** : 2019/17  
**Proje No** : GO 19/720 (Değerlendirme Tarihi: 02.07.2019)  
**Karar No** : 2019/17-12

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Nursabah Elif Başçı AKDUMAN'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Ali İhsan ÖKTEN, Doç. Dr. Yurdal GEZERCAN, Uzm. Dr. Süleyman ALTINTAŞ, Uzm. Dr. Vedat AÇIK ile birlikte çalışacakları ve Uzm. Kim. Cemil Can EYLEM'in doktora tezi olan, GO 19/720 kayıt numaralı, "*Glioblastoma Multiforme, Menenjiyom(Birincil) ve Metastaz (İkincil) Beyin Tümörlerine Ait Fenotiplerin Belirlenmesinde Kullanılacak Bütünleşik Omiks Analizler İçin Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Uygulanması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Ağustos 2019-01 Şubat 2021 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	9 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	10 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
İZİNLİ		İZİNLİ	
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	11. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet ŞİKLAM	(Üye)	12. Doç. Dr. H. Hüseyin TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
İZİNLİ		İZİNLİ	
6. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	15. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
İZİNLİ			
8. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	16. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

## EK-4: Orjinallik Raporu

Turnitin Orjinallik Raporu	
İşleme kondu: 05-Tem-2022 23:52 +03 NUMARA: 1867014714 Kelime Sayısı: 80872 Gönderildi: 1	
<b>GLİOBLASTOMA MULTİFORME, MENENJİYOM (BİRİNCİL) VE METASTAZ (İKİNCİL) BEYİN TÜMÖRLERİNE AIT FENOTİPLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILACAK BÜTÜNLEŞİK OMİKS ANALİZLER İÇİN ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE U Cemil Can Eylem tarafından</b>	
Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%9	İnternet Sources: %9 Yayınlar: %3 Öğrenci Ödevleri: %2
2% match (30-Oca-2016 tarihli internet)	<a href="http://www.molvis.org/molvis/v20/appendices/mv-v20-1605-app-1.pdf">http://www.molvis.org/molvis/v20/appendices/mv-v20-1605-app-1.pdf</a>
1% match (08-Tem-2019 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/7722/bask%c4%b1%20son%283%29.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/7722/bask%c4%b1%20son%283%29.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
1% match (03-Mar-2022 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25836/10433936.pdf?sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25836/10433936.pdf?sequence=1</a>
< 1% match (16-Kas-2021 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25393/tez.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25393/tez.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (07-May-2019 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/3715/TEZ-bas%c4%b1lan.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/3715/TEZ-bas%c4%b1lan.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (25-Ara-2021 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/6294/%c3%96zge%20%c3%96zer-TEZson.docx?isAllowed=n&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/6294/%c3%96zge%20%c3%96zer-TEZson.docx?isAllowed=n&amp;sequence=1</a>
< 1% match (07-May-2019 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1160/a1de52ef-a04e-47c0-8651-6e44ec023c92.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1160/a1de52ef-a04e-47c0-8651-6e44ec023c92.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (25-Ara-2021 tarihli internet)	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25246/10237264%20Elif%20Damla%20G%c3%b6k%20Y%20tezi.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=3">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25246/10237264%20Elif%20Damla%20G%c3%b6k%20Y%20tezi.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=3</a>
< 1% match (16-Mar-2022 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25918/10236783.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25918/10236783.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (11-May-2021 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/23505/TU%c4%9e%c3%87E%20%c3%87E%20N%20TEZ-%c3%9cAES.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/23505/TU%c4%9e%c3%87E%20%c3%87E%20N%20TEZ-%c3%9cAES.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (24-Oca-2022 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/23249/10374030.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/23249/10374030.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (24-Oca-2022 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25417/Melike%20Say%c4%b1n%20TEZ%20PENAC.%202.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25417/Melike%20Say%c4%b1n%20TEZ%20PENAC.%202.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (17-Ara-2019 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1979/37f986ec-9f07-4bbf-826f-f7190d81aa52.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1979/37f986ec-9f07-4bbf-826f-f7190d81aa52.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (25-Ara-2021 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25541/10404359.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25541/10404359.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (02-Mar-2020 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/22190/10328234.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/22190/10328234.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (09-Oca-2020 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/21588/FUNDA%20B%c3%9c%c5%9eRA%20DUMANKAYA%20%c3%9cKSEK%20.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/21588/FUNDA%20B%c3%9c%c5%9eRA%20DUMANKAYA%20%c3%9cKSEK%20.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (24-Şub-2020 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/7603/Ozlem%20TOK%20PhD%20Tez-24.06.19.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=3">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/7603/Ozlem%20TOK%20PhD%20Tez-24.06.19.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=3</a>
< 1% match (24-Şub-2020 tarihli internet)	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/8467/G%c3%bczide%20ATALIK-Tez.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/8467/G%c3%bczide%20ATALIK-Tez.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>
< 1% match (24-May-2022 tarihli internet)	<a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/494163/yokAcikBilim_326599.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/494163/yokAcikBilim_326599.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet)	<a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet)	<a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/54194/yokAcikBilim_10312710.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500_12812/54194/yokAcikBilim_10312710.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>

**EK-5: Digital Makbuz****Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Cemil Can Eylem  
Ödev başlığı: Cemil Can Eylem Tez  
Gönderi Başlığı: GLİOBLASTOMA MULTİFORME, MENENJİYOM (BİRİNCİL) VE M...  
Dosya adı: Doktora\_Tez\_CAN\_Bask\_D\_zenlenmi.pdf  
Dosya boyutu: 24.23M  
Sayfa sayısı: 295  
Kelime sayısı: 80,872  
Karakter sayısı: 450,327  
Gönderim Tarihi: 05-Tem-2022 11:38ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1867014714



## 9. ÖZGEÇMİŞ

YÖK 100/200, TUBİTAK 1001 ve 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programları tarafından desteklendim.