

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

**OKSİJEN-18 TEMELLİ GC-MS İLE FARKLI KANSER
HÜCRELERİNİN METABOLİK DİNAMİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ceylin ÖKTEN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2026**

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

**OKSİJEN-18 TEMELLİ GC-MS İLE FARKLI KANSER
HÜCRELERİNİN METABOLİK DİNAMİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Ceylin ÖKTEN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU**

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2026**

**OKSİJEN-18 TEMELLİ GC-MS İLE FARKLI KANSER HÜCRELERİNİN METABOLİK
DİNAMİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMASI**

Öğrenci: Ceylin ÖKTEN

Danışman: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Bu tez çalışması 06.08.2026 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN*
(Ankara Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

28 Ağustos 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

06/08/2026

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

Ceylin ÖKTEN

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

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

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

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

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

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

ETİK BEYAN

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

Ceylin ÖKTEN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi, tecrübe ve destekleriyle yoluma ışık tutan kıymetli danışmanım Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Tez jüri üyelerim olarak değerli geri bildirimleriyle sundukları katkılarından ötürü Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ ve Prof. Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN'a,

Hücre kültürü hazırlanması çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE, Esin Gülce SEZA ve Berna KOCAMAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, Ülkü YILMAZ'a,

Manevi desteğini benden hiç esirgemeyen Nurdan ÖZCAN'a,

Ve bana dünyanın en şanslı evladı olduğumu hiç unutturmayan canım aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TOA-2025-21846 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Sağladığı bilimsel ve finansal destek için Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

ÖZET

Ökten C., Oksijen-18 Temelli GC-MS ile Farklı Kanser Hücrelerinin Metabolik Dinamiklerinin Karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Kanser hücreleri, hızlı proliferasyonlarını sürdürebilmek için enerji metabolizmalarını yeniden programlamaktadır. Bu nedenle metabolomik ve fluksomik yaklaşımlar kanser metabolizmasının araştırılmasında önemli araçlardır. Ancak elde edilen verilerin güvenilirliği örnek hazırlama ve metabolit tüketme yöntemlerine doğrudan bağlıdır. Bu çalışmada, A549 hücre hattında metanol, perklorik asit ve metanol–perklorik asit tüketme yöntemleri karşılaştırılmış; seçilen yöntem daha sonra A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında $H_2^{18}O$ tabanlı fluksomik analizlerde uygulanmıştır. Tüketme yöntemlerinin karşılaştırılmasında amino asit metabolizması, glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile ilişkili metabolitlerin göreceli bollukları GC-MS ile belirlenmiştir. Metanol yöntemi, incelenen metabolit gruplarında genel olarak daha yüksek ve dengeli göreceli bolluklar sağladığından $H_2^{18}O$ işaretleme çalışmaları için seçilmiştir. A549, Hep3B ve LoVo hücreleri %30 $H_2^{18}O$ içeren ortamda 5, 15 ve 30 dakika inkübe edilmiş ve seçilmiş metabolitlerin göreceli ^{18}O işaretlenme profilleri değerlendirilmiştir. TCA döngüsü metabolitlerinde Hep3B ve LoVo hücrelerinin A549 hücrelerine göre daha yüksek $H_2^{18}O$ katılımı gösterdiği, glikoliz ve fosfat metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerde ise A549 hücrelerinde daha yüksek göreceli işaretlenme elde edildiği belirlenmiştir. Amino asit metabolizmasında da hücre hatlarına özgü farklı işaretlenme profilleri gözlenmiştir. Sonuç olarak, metanol temelli tüketme yöntemi GC-MS tabanlı metabolomik ve $H_2^{18}O$ tabanlı fluksomik analizler için uygun bir örnek hazırlama yaklaşımı sunmuş; bulgular üç kanser hücre hattının farklı metabolik dinamiklere sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Metabolomiks, Fluksomiks, Kütle Spektrometrisi, TCA döngüsü, Glikoliz

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi BAP (TOA-2025-21846)

ABSTRACT

Ökten C., Oxygen-18 Based GC-MS for Comparison of Metabolic Profiles in Different Cancer Cell Lines, Master's Thesis, Graduate School of Health Sciences Analytical Chemistry Program, Hacettepe University, Ankara, 2026. Cancer cells reprogram their energy metabolism to sustain rapid proliferation. Therefore, metabolomic and fluxomic approaches are important tools for investigating cancer metabolism. However, the reliability of the obtained data directly depends on sample preparation and metabolite quenching procedures. In this study, methanol, perchloric acid, and methanol–perchloric acid quenching methods were compared in A549 cells, and the selected method was subsequently applied to H₂¹⁸O-based fluxomic analyses in A549, Hep3B, and LoVo cell lines. Relative abundances of metabolites associated with amino acid metabolism, glycolysis, and the tricarboxylic acid (TCA) cycle were determined by GC-MS. Methanol generally provided higher and more balanced relative abundances across the investigated metabolite groups and was therefore selected for H₂¹⁸O labeling experiments. A549, Hep3B, and LoVo cells were incubated in medium containing 30% H₂¹⁸O for 5, 15, and 30 min, and relative ¹⁸O labeling profiles of selected metabolites were evaluated. TCA cycle metabolites showed higher H₂¹⁸O incorporation in Hep3B and LoVo cells than in A549 cells, whereas metabolites associated with glycolysis and phosphate metabolism generally exhibited higher relative labeling in A549 cells. Cell-line-specific differences were also observed in amino acid metabolism. In conclusion, the methanol-based quenching method provided a suitable sample preparation approach for GC-MS-based metabolomic and H₂¹⁸O-based fluxomic analyses, and the findings demonstrated distinct metabolic dynamics among the three cancer cell lines.

Keywords : Metabolomics, Fluxomics, Mass Spectrometry (MS), TCA Cycle, Glycolysis

Supported By: Hacettepe University BAP (TOA-2025-21846)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Omik Analizleri	6
2.1.1. Metabolomik	8
2.1.2. Fluksomiks	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.2. Hücre Kültürü Hazırlama Çalışmaları	26
3.3. Metabolomik Analizler	30
3.3.1. GC-MS Kullanılarak Gerçekleştirilen Metabolomik Analizler	30
3.4. Fluksomiks Analizleri	32
4. BULGULAR	35
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	35
4.2. Tüketme Çözeltisi Optimizasyonu	35
4.2.1. Tüketme Yöntemlerine Ait Genel Metabolomik Profiller	43
4.2.2. Amino Asitler	45
4.2.3. Glikoliz ve İlişkili Karbonhidrat Metabolitleri	46
4.2.4. TCA Döngüsü Metabolitleri	48
4.2.5. Diğer Metabolit Grupları	49
4.3. Fluksomik Analizi	50
4.3.1. TCA Döngüsü İşaretlenmesi	53

4.3.2. Amino Asit Metabolitlerinin İşaretlenmesi	54
4.3.3. Fosfat Metabolitleri ve Diğer Metabolitlerin İşaretlenmesi	55
4.4. Metabolomik Analizler	56
5. TARTIŞMA	59
5.1. Tüketme Optimizasyonu	59
5.2. H ₂ ¹⁸ O Tabanlı Fluksomik Analizler	62
5.2.1. TCA Döngüsü Metabolitlerinin H ₂ ¹⁸ O İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi	62
5.2.2. Amino Asit Metabolitlerinin H ₂ ¹⁸ O İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi	64
5.2.3. Fosfat ve Glikolizle İlişkili Metabolitlerin H ₂ ¹⁸ O İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi	65
5.3. Metabolomik Analizler	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	75
Ek 1. Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\tilde{x}_{ij}$	Normalize edilmiş değer
x_{ij}	Metabolit pik alanı
$\bar{x}_i$	Metabolit ortalama pik alanı
$x_{\max}$	Metabolit için maksimum pik alanı
$x_{\min}$	Metabolit için minimum pik alanı
s_i	Standart sapma
ATP	Adenozin Trifosfat
CE-MS	Kapiler Elektroforez-Kütle Spektrometrisi
CRC	Kolorektal Kanser
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
GTP	Guanozin Trifosfat
G3P	Gliserol-3-Fosfat
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
m/z	Kütle/Yük Oranı (Mass-to-Charge Ratio)
MeOH	Metanol
MS	Kütle Spektrometrisi
MSTFA	N-Metil-N- (Trimetilsilil)Trifloroasetamid
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCA	Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis)
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler Ayırma Analizi
QC	Kalite Kontrol
RNA	Ribonükleik Asit
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü
TMCS	Trimetilklorosilan

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Omiks Analizleri.	7
2.2. Metabolomik analiz süreçleri	12
2.3. ^{18}O işaretleme mekanizması ile işaretlenmiş metabolitlerin farklı metabolik yolak analizlerindeki kullanımını gösteren şematik sunum	17
2.4. Canlı organizmaların işaretlenmesi.	18
2.5. Fosfometabolitlerin ve metabolik profillerin analizi için ^{18}O tabanlı analitik teknikler A) NMR ve B) Kütle dedektörü.	19
2.6. Krebs döngüsü metabolitlerinin ^{18}O ile işaretlenmeye başladığı noktaların gösterimi	21
2.7. Krebs döngüsünde ilk döngü sonunda işaretlenen metabolitler ve ^{18}O 'nun bağlandığı konumların gösterimi	22
2.8. Krebs döngüsünde ikinci döngü sonunda işaretlenen metabolitler ve ^{18}O 'nun bağlandığı konumların gösterimi	23
3.1. H_2^{18}O işaretleme deney tasarımı	27
4.1. A549 hücrelerinden metanol tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları	36
4.2. A549 hücrelerinden metanol-perklorik asit tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları	37
4.3. A549 hücrelerinden perklorik asit tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları	38
4.4. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi metabolit profillerinin A) PCA, B) PLS-DA ve C) hiyerarşik kümeleme ısı haritası analizleri	44
4.5. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi amino asit metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi	45
4.6. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi glikoliz metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi	46
4.7. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi TCA döngüsü metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi	48

4.8.	Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi çeşitli metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi	49
4.9.	LoVo hücrelerinden elde edilen metabolit ekstraktının 60 dakikalık GC-MS yöntemiyle analizine ait toplam iyon kromatogramı	51
4.10.	Sitrik aside ait $H_2^{18}O$ işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve $H_2^{18}O$ katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir	52
4.11.	İnorganik fosfata ait $H_2^{18}O$ işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve $H_2^{18}O$ katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir	52
4.12.	Piroglutamata ait $H_2^{18}O$ işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve $H_2^{18}O$ katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir	53
4.13.	A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında TCA döngüsü metabolitlerinin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur	54
4.14.	A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında amino asit metabolitlerinin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur	55
4.15.	A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında fosfat metabolitleri ve diğer metabolitlerin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur	56
4.16.	^{18}O işaretleme öncesinde elde edilen işaretlenmemiş metabolomik verilere ait (A) temel bileşenler analizi (PCA), (B) kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) ve (C) Isı haritası	58

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Metabolik Ölçeklendirme Yöntemleri.	15
3.1. Kullanılan Kimyasallar.	25
3.2. Kullanılan Cihazlar.	25
3.3. Kullanılan Cam Malzeme ve Sarf Malzemeler.	25
3.4. GC-MS Analizi Kromatografik Koşulları	31
3.5. ^{18}O izotop analizleri için GC-MS analizi kromatografik koşulları.	32
3.6. Amino asit metabolitlerinin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri.	33
3.7. Glikoliz metabolizması ve diğer metabolitlerin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri.	33
3.8. TCA döngüsü metabolitlerinin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri.	34
4.1. GC-MS analizi sonucunda tanımlanan metabolitlerin normalizasyon sonrası bağıl bolluk değerleri (ortalama $\pm$ standart hata) ve p-değerleri.	39

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla karakterize karmaşık bir hastalıktır; bu hastalıkta sadece genetik ve epigenetik değişiklikler değil, aynı zamanda hücresel metabolizmanın yeniden programlanması da önemli bir rol oynar. Kanser hücreleri, tümör mikroortamının zorlu koşullarına uyum sağlamak için enerji üretim ve tüketim mekanizmalarını değiştirerek büyüme avantajı elde eder. Bu nedenle, metabolik yeniden programlama, kanser biyolojisinin temel özelliklerinden biri olarak kabul edilir (1).

Sağlıklı hücreler enerji üretimi için ağırlıklı olarak oksidatif fosforilasyona ihtiyaç duyarken, birçok kanser hücresi oksijen varlığında bile glikozu öncelikli olarak laktata dönüştürür. Warburg Etkisi olarak bilinen bu olgu, artan glikoz alımı ve yükselen laktat üretimi ile karakterize edilir (2). Bu metabolik kayma, enerji verimi açısından daha az verimli görünse de hücre çoğalması için gerekli biyosentetik ara maddelerin oluşumunu destekler. Artan glikolitik aktivite sadece enerji üretimine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda hücre büyümesi için gerekli olan nükleotidlerin, amino asitlerin ve lipidlerin sentezini de kolaylaştırır. Dahası, kanser hücrelerindeki metabolik değişiklikler glikolizle sınırlı değildir; Trikarboksilik Asit (TCA) döngüsünde ve diğer merkezi metabolik yollarda da önemli yeniden programlama meydana gelir. Bu değişiklikler, hücrelerin redoks dengesini korurken enerji taleplerini karşılamalarını sağlar (3).

Kanser hücrelerinin düşük oksijen koşullarında çoğalmayı sürdürme yeteneği, dikkat çekici metabolik esnekliklerini yansıtır. Sonuç olarak, kanser hücreleri enerji üretimini biyosentetik taleplerle dengeleyerek hızlı büyümeyi sürdürebilir. Metabolomik, kanserdeki bu metabolik değişikliklerin anlaşılmasında kritik bir rol oynar. Metabolomik analizler, hücreler içindeki metabolitlerin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlayarak biyolojik sistemlerin fonksiyonel durumuna doğrudan bir bakış açısı sunar (4). Bununla birlikte, metabolit düzeylerinin belirlenmesinin yanı sıra metabolik yolaklardaki dinamik değişikliklerin değerlendirilmesinde kararlı izotop işaretleme ve fluksomik yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. Fluksomik analizler ise metabolik yolaklarda metabolitlerin dönüşüm dinamiklerini ortaya koyarak metabolik aktivitenin zamana bağlı değerlendirilmesini sağlar (5).

Özellikle karbon-13 (^{13}C) ve oksijen-18 (^{18}O) gibi kararlı izotop işaretleme teknikleri, metabolik yolların izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kararlı izotop işaretleme yaklaşımları, metabolik yolların dinamik olarak izlenmesini mümkün kılar. Kararlı izotop işaretleme yaklaşımları, izotopların metabolitlere katılımının izlenmesi yoluyla metabolik yolk aktivitelerinin ve dönüşüm dinamiklerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (6). GC-MS ve LC-MS gibi kütle spektrometresi tabanlı analitik platformlar, yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlayarak metabolomik ve fluksomik analizlerin güvenilirliğini artırır.

Kolorektal kanser, tanı ve tedavideki önemli ilerlemelere rağmen, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Benzer şekilde, akciğer kanseri ve karaciğer kanseri de yüksek görülme sıklığı ve ölüm oranları nedeniyle en kritik kanser türleri arasındadır (7). Mevcut tedavi stratejileri başlangıçta etkili olsa da zamanla tedavi direncinin gelişmesi klinik başarıyı sınırlamakta ve hastalık yönetimini zorlaştırmaktadır (8). Bu olgu, kanser hücrelerinin özellikle metabolik esneklik yoluyla değişen çevresel koşullara uyum sağlama yeteneğiyle yakından ilişkilidir (9). Bu nedenle, kanser hücrelerindeki metabolik adaptasyon mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, daha etkili ve sürdürülebilir tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için gereklidir (10).

Bu tezde, farklı kanser hücre hatlarının enerji metabolizması, metabolomik ve fluksomik yaklaşımlar kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Glikoliz ve TCA döngüsü gibi temel metabolik yollarla ilişkili metabolitlerin göreceli bollukları GC-MS ile değerlendirilmiş; H_2^{18}O işaretleme yaklaşımı kullanılarak seçilmiş metabolitlerin zamana bağlı izotop işaretlenme ve dönüşüm dinamikleri incelenmiştir. Bu çalışmanın, farklı kanser hücre hatlarının enerji metabolizmaları arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulmasına katkı sağlaması, metabolik yeniden programlanmanın daha iyi anlaşılmasını desteklemesi ve gelecekte yürütülecek biyobelirteç ve metabolizma temelli araştırmalara metodolojik bir temel oluşturması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kolorektal kanser (CRC), dünya genelinde yaygın olarak görülen ve özellikle erken evrede tespit edilmediğinde olumsuz klinik sonuçlarla ilişkili olan önemli bir malignitedir. Amerikan Kanser Derneğinin tahminlerine göre, 2026 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 108.860 yeni kolon kanseri ve 49.990 yeni rektum kanseri vakasının görülmesi beklenmektedir. Kolorektal kanserin genel görülme sıklığı 1980'lerin ortalarından itibaren azalma eğilimi göstermiştir. Bu azalma büyük ölçüde tarama uygulamalarının yaygınlaşması ve yaşam tarzıyla ilişkili risk faktörlerindeki değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, bu eğilim bütün yaş gruplarında benzer değildir. 2013–2022 yılları arasında görülme sıklığı özellikle ileri yaştaki bireylerde yılda yaklaşık %1 oranında azalırken, 50 yaşın altındaki bireylerde yılda %2,9 ve 50–64 yaş grubunda yılda %0,4 oranında artmıştır (11).

Kolorektal kanserin erken tanısında kullanılan mevcut yöntemlerin bir bölümünün invaziv olması veya yeterli duyarlılığa sahip olmaması, daha güvenilir biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları önemli hâle getirmiştir. Metabolomik, hastalıkla ilişkili fenotipik değişikliklerin metabolit düzeyindeki yansımalarını incelemesi nedeniyle biyobelirteç araştırmalarında umut vadeden bir analitik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (12). Yapılan çalışmalar, CRC hastalarının metabolit profillerinin sağlıklı bireylerden, adenomatöz polipli hastalardan ve farklı hastalık evrelerindeki bireylerden farklılaştığını göstermektedir. Bu değişiklikler içerisinde özellikle amino asit ve yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili metabolitler sıklıkla bildirilmektedir (12).

Bağırsak mikrobiyotası da kolorektal kanser patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Belirli mikrobiyal popülasyonlar ile dışkı metabolitlerinin düzeyleri arasında bildirilen ilişkiler, mikrobiyota bileşimi ile kolorektal kanserde gözlenen metabolik düzensizlikler arasında bağlantı bulunduğunu düşündürmektedir. Genel olarak bu bulgular, metabolik profillemenin kolorektal kansere özgü biyobelirteçlerin belirlenmesi ve erken tanının geliştirilmesi açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (12).

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Hastalık, akciğer dokusundaki hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalmasıyla karakterize edilmekte; erken dönemde kontrol altına alınmadığında çevre dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz gelişebilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ne ilişkin 2022 yılı verileri, günlük yaklaşık 1.700 kansere bağlı ölümün 350'den fazlasının akciğer kanserinden kaynaklandığını ve bu sayının meme, prostat ve pankreas kanserlerinden kaynaklanan toplam ölüm sayısını aştığını göstermektedir (13).

Akciğer kanserinde meydana gelen metabolik değişikliklerin belirlenmesi; hastalık fenotipinin, tümör evresinin ve tedaviye verilen yanıtın değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle metabolomik çalışmaların önemli bir bölümü, erken tanıda kullanılabilecek duyarlı ve maliyet etkin biyobelirteçlerin belirlenmesine odaklanmaktadır. Tümör hücreleri, artan enerji ve biyosentez gereksinimlerini karşılamak ve değişen mikroçevresel koşullara uyum sağlamak amacıyla metabolik yeniden programlanma göstermektedir. Bu yeniden programlanmanın temel özelliklerinden biri, oksijen varlığında dahi glikozun ağırlıklı olarak laktata dönüştürüldüğü aerobik glikolizin artmasıdır. Warburg etkisi olarak tanımlanan bu metabolik adaptasyon, akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunun ve hayatta kalmasının desteklenmesinde önemli rol oynamaktadır (14).

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya genelinde en sık görülen primer karaciğer kanseri türüdür ve önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. HCC gelişimi; hepatit B ve C virüsü enfeksiyonları, kronik alkol kullanımı, siroz ve metabolik disfonksiyonla ilişkili steatohepatit gibi kronik karaciğer hastalıklarıyla ilişkilidir. Hastalığın oluşumu ve ilerlemesinin viral enfeksiyonlar, hepatositlerde meydana gelen genetik değişiklikler, kronik inflamasyon ve çeşitli demografik faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (15).

HCC prognozu, hastalığın tanı aldığı evreden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu nedenle ultrasonografi ve kan temelli testler kullanılarak yüksek riskli gruplarda yürütülen gözetim programları, hastalığın daha erken dönemde belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Tedavi seçenekleri arasında karaciğer rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu, transarteriyel kemoembolizasyon, radyoterapi, sistemik tedaviler,

hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi bulunmaktadır. Bununla birlikte, tedavi alanındaki gelişmelere rağmen ileri evre HCC'nin yönetimi güçlüğünü korumaktadır. Bu durum, hastalığın moleküler ve metabolik mekanizmalarının daha ayrıntılı biçimde incelenmesini gerekli kılmaktadır (15).

Omik teknolojileri, HCC'nin oluşumu ve ilerlemesiyle ilişkili genetik, transkripsiyonel, protein düzeyindeki ve metabolik değişikliklerin kapsamlı biçimde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. HCC'nin belirgin moleküler ve metabolik heterojenitesi göz önünde bulundurulduğunda, omik temelli yaklaşımlar biyobelirteç araştırmalarına, erken tanı çalışmalarına, prognoz değerlendirilmesine ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek önemli araçlardır (15).

Kolorektal kanser, akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinom farklı dokulardan köken almakta ve kendilerine özgü genetik, moleküler ve histopatolojik özellikler göstermektedir. Bununla birlikte, hızlı hücre çoğalmasının sürdürülmesi, biyosentetik gereksinimlerin karşılanması ve değişen mikroçevresel koşullara uyum sağlanması amacıyla metabolik yolların yeniden düzenlenmesi, bu kanser türlerinin ortak özelliklerinden biridir. Merkezi karbon metabolizması, amino asit metabolizması ve lipid metabolizmasında meydana gelen bu değişiklikler, kanser hücrelerinin enerji üretimi ve hücre yapısı gereksinimlerinin karşılanmasında önemli rol oynamaktadır (3).

Kanser biyolojisindeki bu karmaşık değişikliklerin yalnızca tek bir metabolik yolak veya sınırlı sayıda metabolit üzerinden bütünüyle açıklanması mümkün değildir. Kanser; genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler dâhil olmak üzere birbiriyle ilişkili çok sayıda biyolojik düzeyde meydana gelen değişiklikleri kapsayan dinamik ve çok faktörlü bir süreçtir. Bu nedenle kanser hücrelerindeki metabolik yeniden programlanmanın ve enerji metabolizmasındaki farklılıkların anlaşılabilmesi için kapsamlı ve sistem düzeyinde analitik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda omik teknolojileri, farklı moleküler katmanların bütüncül biçimde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (16).

Özellikle metabolomik ve fluksomik yaklaşımlar, farklı kanser hücrelerinin metabolik profillerinin ve metabolik dönüşüm dinamiklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesinde önemli araçlar sunmaktadır (17).

2.1. Omik Analizleri

İnsan genomunun dizilenmesine yönelik çalışmaların başlamasından itibaren hız kazanan teknolojik gelişmeler, hücre ve dokulardaki moleküler bileşenlerin geniş ölçekli ve yüksek verimli yöntemlerle incelenmesini mümkün kılmıştır. Biyolojik sistemlerin farklı moleküler düzeylerde kapsamlı biçimde profillenmesini amaçlayan bu araştırma alanları genel olarak omik bilimleri olarak adlandırılmaktadır (18).

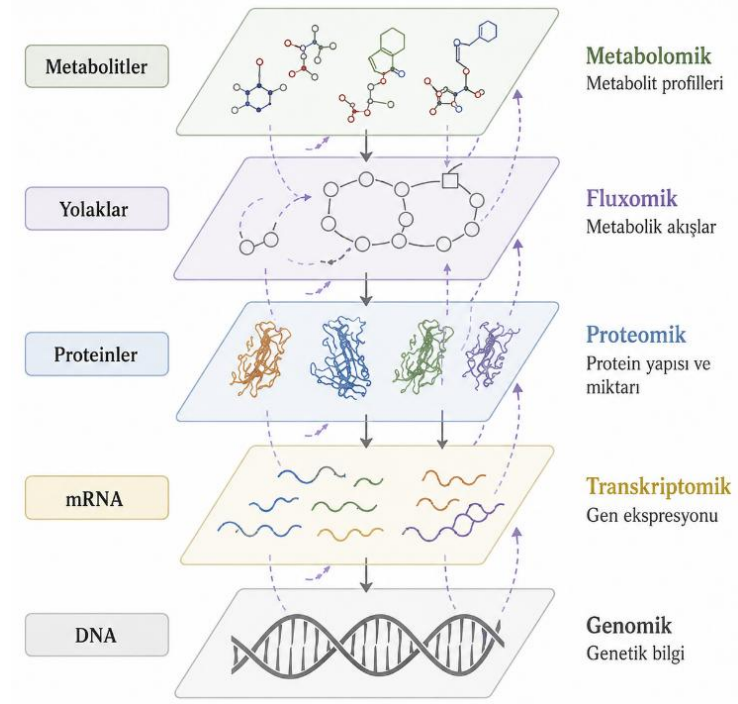
Genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik, lipidomik ve epigenomik; omik bilimleri kapsamında yer alan başlıca disiplinlerdir. Bu alanlar sırasıyla genlerin, RNA transkriptlerinin, proteinlerin, metabolitlerin, lipidlerin ve epigenetik düzenlemelerin sistematik olarak incelenmesine odaklanmaktadır. Omik yaklaşımların temel amacı, biyolojik süreçlerin yalnızca tek bir molekül veya yolak üzerinden değil, sistem düzeyinde ve bütüncül biçimde anlaşılmasını sağlamaktır (22).

Transkriptom, belirli bir hücrede, dokuda veya organizmada belirli bir zamanda ifade edilen kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin tamamını kapsamaktadır. Transkriptomik analizler, gen ifade örüntülerinin belirlenmesine ve farklı biyolojik koşullar altında meydana gelen transkripsiyonel değişikliklerin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (20).

Proteom ise biyolojik bir sistemde ifade edilen proteinlerin tamamını ifade etmektedir. Proteomik çalışmalar; proteinlerin bolluğunun, yapısının, translasyon sonrası modifikasyonlarının, etkileşimlerinin ve biyolojik ya da çevresel uyaranlara yanıt olarak meydana gelen değişikliklerin incelenmesini kapsamaktadır (21).

Metabolom, bir biyolojik sistemde belirli bir zamanda bulunan düşük molekül ağırlıklı metabolitlerin bütününi temsil etmekte ve sistemin metabolik fenotipi hakkında bilgi sağlamaktadır. Metabolomik ise bu metabolitlerin kapsamlı olarak tanımlanmasına ve göreceli ya da mutlak düzeylerinin belirlenmesine odaklanmaktadır. Metabolitler, genomik ve proteomik düzeyde meydana gelen

değişikliklerin yanı sıra çevresel koşulların ve hücresel aktivitelerin de etkisini yansıttığından, metabolomik analizler biyolojik sistemlerin fonksiyonel durumunun değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (25). Başlıca omik analiz alanları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Omiks Analizleri.

Farklı omik katmanlarından elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi, hastalık mekanizmalarının daha ayrıntılı biçimde anlaşılmasına, biyobelirteç adaylarının belirlenmesine, erken tanı yaklaşımlarının geliştirilmesine, tedavi yanıtının değerlendirilmesine ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin oluşturulmasına katkı sağlayabilmektedir (23). Bununla birlikte, geleneksel metabolomik analizler çoğunlukla belirli bir zaman noktasındaki metabolit düzeyleri hakkında bilgi vermekte ve metabolik yollardaki dönüşümlerin yönü veya hızı hakkında tek başına yeterli bilgi sağlamamaktadır (24).

Metabolik süreçlerin dinamik olarak değerlendirilmesinde kararlı izotop işaretleme yaklaşımlarından yararlanılmaktadır. Bu yaklaşımlarda, izotopla işaretlenmiş bir substratın veya çözücünün metabolitlere katılımı izlenerek metabolik dönüşümler hakkında bilgi elde edilmektedir. Özellikle suyun substrat veya ürün

olarak yer aldığı reaksiyonlarla ilişkili fosfat grubu içeren metabolitlerde, $H_2^{18}O$ kullanılarak gerçekleştirilen işaretleme çalışmaları metabolitlerin dönüşüm ve yenilenme dinamiklerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, ^{18}O işaretlenme düzeylerinin doğrudan mutlak metabolik fluks olarak yorumlanabilmesi için uygun kinetik modellerin ve nicel hesaplama yaklaşımlarının kullanılması gerekmektedir (19).

Bu tez kapsamında, farklı kanser hücrelerinin enerji metabolizmasının değerlendirilmesinde özellikle metabolomik ve fluksomik yaklaşımlara odaklanılmış ve bu yaklaşımlar izleyen bölümlerde ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

2.1.1. Metabolomik

Metabolom, bir hücre, doku, organ veya biyolojik sistemde belirli bir zamanda bulunan düşük molekül ağırlıklı endojen ve eksojen metabolitlerin tamamını ifade etmektedir. Metabolom; gen ekspresyonu, protein aktivitesi, çevresel faktörler, beslenme, ilaç kullanımı ve mikrobiyota gibi çok sayıda biyolojik ve çevresel etmenin ortak etkisini yansıttığından, organizmanın fizyolojik ve patolojik durumuna ilişkin en yakın moleküler göstergelerden biri olarak kabul edilmektedir (26).

Metabolomik, biyolojik sistemlerde bulunan metabolitlerin kapsamlı olarak tanımlanması, göreceli veya mutlak düzeylerinin belirlenmesi ve biyolojik süreçlerde meydana gelen değişimlerin metabolik düzeyde değerlendirilmesini amaçlayan omik bilim dalıdır. Genomik, transkriptomik ve proteomik yaklaşımların aksine metabolomik, genetik bilginin fonksiyonel çıktısını doğrudan yansıtan metabolitleri incelemesi nedeniyle biyolojik sistemlerin fenotipine en yakın moleküler yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (25,26).

Son yıllarda yüksek çözünürlüklü analitik platformlar ve gelişmiş veri analiz yöntemlerindeki ilerlemeler sayesinde metabolomik, temel bilimlerden klinik araştırmalara kadar geniş bir uygulama alanı kazanmıştır. Kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkta metabolomik analizler; hastalık mekanizmalarının aydınlatılması,

biyobelirteç adaylarının belirlenmesi, erken tanının desteklenmesi ve tedaviye verilen yanıtın değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (26).

Kanser hücreleri, kontrolsüz proliferasyonlarını sürdürebilmek amacıyla enerji üretimi, biyosentez ve redoks dengesini sağlayan metabolik yollarda kapsamlı yeniden programlanma göstermektedir. Bu metabolik değişiklikler, metabolit düzeylerinde meydana gelen farklılıklar şeklinde metaboloma yansımaktadır. Bu nedenle metabolomik analizler, farklı kanser türlerinin metabolik fenotiplerinin karşılaştırılmasına, tümör gelişimi sırasında ortaya çıkan metabolik değişimlerin belirlenmesine ve hastalığa özgü biyobelirteçlerin araştırılmasına olanak sağlamaktadır (3).

Bununla birlikte metabolomik analizler çoğunlukla belirli bir zaman noktasındaki metabolit düzeylerini ortaya koymakta, metabolik yollarda meydana gelen dönüşümlerin yönü veya hızına ilişkin doğrudan bilgi sağlamamaktadır. Bu nedenle metabolomik veriler, gerektiğinde kararlı izotop işaretleme temelli fluksomik yaklaşımlarla desteklenerek metabolik süreçlerin dinamik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım, metabolik yeniden programlanmanın hem statik hem de dinamik yönlerinin birlikte incelenmesini mümkün kılmaktadır (32).

Metabolomik çalışmalar genel olarak hedefli ve hedeflenmemiş olmak üzere iki temel yaklaşımla yürütülmektedir. Bu iki yaklaşımın temel farkı, analiz öncesinde incelenecek metabolitlerin belirlenip belirlenmemesine dayanmaktadır.

Hedefli metabolomik, daha önceden belirlenmiş metabolitlerin doğru ve hassas biçimde nicelendirilmesini amaçlamaktadır. Bu yaklaşımda analiz edilecek metabolitler önceden seçildiğinden, genellikle izotop işaretli veya yapısal olarak benzer iç standartlar kullanılmakta ve kantitatif doğruluğu yüksek sonuçlar elde edilmektedir. Hedefli metabolomik; belirli metabolik yolların incelenmesi, biyobelirteç doğrulama çalışmaları ve klinik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir (28).

Buna karşılık hedeflenmemiş metabolomik, herhangi bir metabolit grubuna öncelik vermeden biyolojik örnekte mümkün olduğunca fazla sayıda metabolitin aynı

anda belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu yaklaşım, metabolik profilde beklenmeyen değişikliklerin ortaya çıkarılmasına, yeni biyobelirteç adaylarının belirlenmesine ve biyolojik sistemlerin genel metabolik durumunun değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle keşif odaklı çalışmalarda hedeflenmemiş metabolomik önemli avantajlar sunmaktadır (28).

Her iki yaklaşımda da örnek hazırlama, kromatografik ayırma ve kütle spektrometrik analiz aşamaları büyük ölçüde benzer olmakla birlikte, veri toplama ve değerlendirme stratejileri farklılık göstermektedir. Hedefli analizlerde belirlenen metabolitlere ait iyonlar yüksek seçicilikle izlenirken, hedeflenmemiş analizlerde örnekte bulunan tüm iyonların mümkün olduğunca kapsamlı biçimde kaydedilmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle hedeflenmemiş metabolomik çalışmaları daha geniş veri kümeleri üretmekte ve gelişmiş biyoinformatik ile çok değişkenli istatistiksel analiz yöntemlerinin kullanılmasını gerektirmektedir (28).

Hedefli metabolomik yüksek doğruluk ve kantitatif performans sağlamasına rağmen yalnızca önceden belirlenmiş metabolitlerle sınırlıdır. Buna karşılık hedeflenmemiş metabolomik, çok daha geniş metabolit kapsamı sunmasına rağmen veri işleme sürecinin daha karmaşık olması ve metabolit tanımlamasındaki güçlükler nedeniyle daha kapsamlı analiz süreçleri gerektirmektedir. Bu nedenle iki yaklaşım birbirini tamamlayıcı nitelikte olup araştırmanın amacı doğrultusunda uygun yöntem seçilmektedir (28).

Bu çalışmada, farklı kanser hücrelerinin metabolik profillerinin kapsamlı olarak karşılaştırılması ve tüketme yöntemlerinin geniş metabolit kapsamı açısından değerlendirilmesi amaçlandığından hedeflenmemiş metabolomik yaklaşımı tercih edilmiştir. Bu yaklaşım sayesinde farklı metabolik yollarda meydana gelen değişikliklerin birlikte değerlendirilmesi ve metabolik yeniden programlanmanın daha kapsamlı biçimde ortaya konulması hedeflenmiştir.

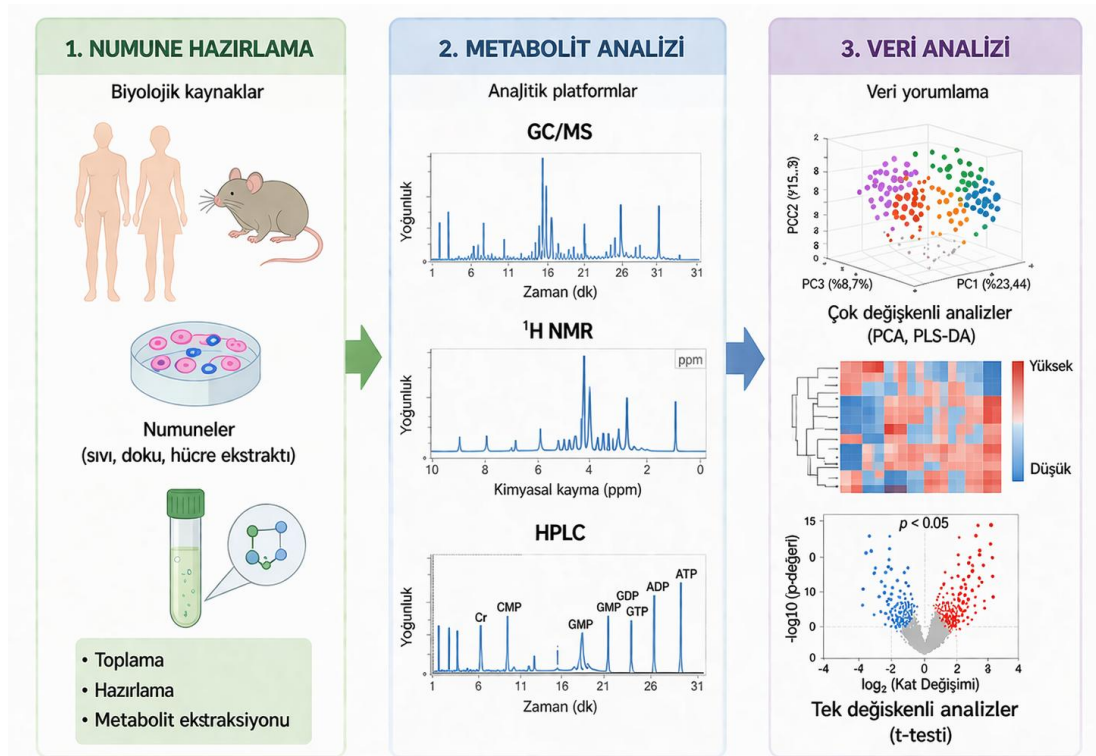
Metabolomik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan analitik platformlar nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile kütle spektrometrisi (MS) tabanlı sistemlerdir. Kütle spektrometrisi, metabolitlerin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çoğunlukla gaz kromatografisi (GC-MS) veya sıvı kromatografisi (LC-MS) ile

birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca kapiler elektroforez-kütle spektrometrisi (CE-MS) gibi alternatif platformlar da belirli metabolit gruplarının analizinde kullanılabilmektedir. Her analitik platformun duyarlılığı, metabolit kapsamı, örnek hazırlama gereksinimleri ve uygulama alanları farklılık gösterdiğinden, uygun yöntemin seçimi çalışmanın amacı ve hedeflenen metabolit profiline göre yapılmaktadır (27,28).

LC-MS, geniş metabolit kapsamı, yüksek duyarlılığı ve türevlendirme gerektirmemesi nedeniyle metabolomik araştırmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Özellikle farklı polaritelere sahip metabolitlerin aynı analizde değerlendirilebilmesine olanak sağlaması önemli bir avantajdır. Bununla birlikte, karmaşık veri yapısı ve metabolit tanımlamasındaki güçlükler nedeniyle gelişmiş veri işleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (28). GC-MS ise yüksek kromatografik ayırma gücü, analizler arasındaki yüksek tekrarlanabilirliği ve kapsamlı spektral kütüphaneler sayesinde güvenilir metabolit tanımlaması ve kantitatif analiz olanağı sunmaktadır. Ancak analiz öncesinde metabolitlerin uçucu hale getirilebilmesi için kimyasal türevlendirme basamağı gerektirmesi ve termal olarak kararsız bileşiklerin analizindeki sınırlılıkları başlıca dezavantajları arasında yer almaktadır. NMR spektroskopisi ise minimum örnek hazırlığı gerektirmesi, yüksek tekrarlanabilirliği ve doğrudan kantitatif analiz yapabilmesi gibi önemli avantajlara sahip olmakla birlikte, kütle spektrometrisi tabanlı yöntemlere kıyasla daha düşük duyarlılığa sahip olması nedeniyle düşük bolluktaki metabolitlerin analizinde sınırlı kalabilmektedir (28).

Bu analitik platformlar birbirini tamamlayıcı özelliklere sahip olup, araştırmanın amacına göre tek başlarına veya birlikte kullanılabilmektedir. Bu çalışmada, farklı kanser hücrelerinin enerji metabolizmasında rol oynayan amino asitler, organik asitler, şekerler ve şeker fosfatları gibi küçük moleküllü metabolitlerin geniş kapsamlı olarak değerlendirilmesi amaçlandığından, yüksek ayırma gücü, yüksek tekrarlanabilirliği ve kapsamlı spektral kütüphaneleri nedeniyle GC-MS analiz platformu tercih edilmiştir. Bu yaklaşım, farklı tüketme yöntemlerinin metabolit geri kazanımı üzerindeki etkilerinin güvenilir biçimde karşılaştırılmasına ve hücrelere ait metabolik profillerin ayrıntılı olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

Bu çalışmada GC-MS analiz platformu, farklı tüketme yöntemlerinin metabolit geri kazanımı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve A549, Hep3B ve LoVo hücrelerine ait metabolik profillerin karşılaştırılması amacıyla kullanılmıştır. GC-MS'nin yüksek ayırma gücü, geniş spektral kütüphaneleri ve güvenilir kantitatif performansı, enerji metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin doğru ve tekrarlanabilir şekilde belirlenmesine katkı sağlamıştır. Metabolomik analiz sürecinin temel aşamaları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Metabolomik analiz süreçleri

Metabolomik analizler sonucunda elde edilen veriler, çok sayıda metabolit ve örneğe ait bilgiyi aynı anda içeren yüksek boyutlu veri kümelerinden oluşmaktadır. Bu nedenle biyolojik olarak anlamlı sonuçlara ulaşabilmek için ham verilerin uygun veri işleme ve istatistiksel analiz aşamalarından geçirilmesi gerekmektedir. Veri analizi süreci genel olarak pik tespiti, pik hizalama, metabolit tanımlama, normalizasyon, veri dönüşümü, ölçeklendirme ve çok değişkenli istatistiksel analiz basamaklarını içermektedir (29).

Veri analizinin ilk aşamasında kromatografik pikler belirlenmekte, farklı örneklerde aynı metabolite ait pikler hizalanmakta ve spektral kütüphaneler kullanılarak metabolit tanımlamaları gerçekleştirilmektedir. Daha sonra örnek hazırlama, tüketme, enjeksiyon hacmi ve cihaz performansından kaynaklanabilecek teknik değişkenliğin etkisini azaltmak amacıyla normalizasyon işlemi uygulanmaktadır. Normalizasyon, biyolojik gruplar arasındaki gerçek metabolik farklılıkların teknik değişkenlikten ayrılmasını sağlayarak sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır. Kullanılan yöntem; örnek türüne, çalışma tasarımına ve analitik platforma bağlı olarak değişebilmekte olup hücre sayısı, toplam protein miktarı, toplam pik alanı, kalite kontrol örnekleri veya iç standartlar esas alınarak gerçekleştirilebilmektedir (25).

Normalizasyonun ardından veri dönüşümü ve ölçeklendirme işlemleri uygulanmaktadır. Veri dönüşümü, özellikle metabolit yoğunluklarının geniş bir aralıkta değiştiği veri kümelerinde varyansın dengelenmesini ve dağılımın normale yaklaştırılmasını amaçlamaktadır. Ölçeklendirme ise farklı bolluk düzeylerine sahip metabolitlerin çok değişkenli analizlere dengeli katkı sağlaması için kullanılmaktadır. Ortalama merkezleme, otomatik ölçeklendirme ve Pareto ölçeklendirme metabolomik çalışmalarda en sık kullanılan yöntemler arasında yer almakta olup, uygulanacak yöntem veri yapısı ve araştırmanın amacına göre belirlenmektedir.

Veri ön işleme basamaklarının tamamlanmasının ardından örnekler arasındaki benzerliklerin ve metabolik farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla çok değişkenli istatistiksel analizler uygulanmaktadır. Bu analizlerde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA)'dır. PCA, herhangi bir grup bilgisi kullanmadan veriyi daha az sayıda bileşene indirger ve örneklerin dağılımını, kümelenme eğilimlerini, aykırı değerleri ve veri yapısını görselleştirmeye olanak sağlar. Bu nedenle metabolomik çalışmalarında ilk keşif analizi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (29).

Gruplar arasındaki metabolik farklılıkların daha ayrıntılı olarak incelenmesi amacıyla ise denetimli bir yöntem olan Kısmi En Küçük Kareler Ayırıcı Analizi (Partial Least Squares–Discriminant Analysis, PLS-DA) kullanılmaktadır. PLS-DA, örneklerin ait olduğu grup bilgisini modele dahil ederek gruplar arasındaki ayrımı en

üst düzeye çıkarmayı amaçlar. Bunun yanında grupların ayırımına en fazla katkı sağlayan metabolitlerin belirlenmesine de olanak sağlayarak biyobelirteç keşfi çalışmalarında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte modelin aşırı uyuma karşı uygun doğrulama yöntemleriyle değerlendirilmesi gerekmektedir (30).

Sonuç olarak metabolomik veri analizi, yalnızca metabolitlerin belirlenmesini değil, aynı zamanda elde edilen verilerin uygun ön işleme ve istatistiksel analiz yöntemleriyle biyolojik olarak anlamlı bilgiye dönüştürülmesini sağlayan bütüncül bir süreçtir. Analitik platformlardan elde edilen yüksek boyutlu verilerin doğru şekilde işlenmesi, metabolik değişimlerin güvenilir olarak yorumlanabilmesi ve biyolojik çıkarımların doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir. Metabolomik veri analizinde yaygın olarak kullanılan ölçeklendirme yöntemleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Metabolik Ölçeklendirme Yöntemleri.

Yöntem	Formül	Amaç	Avantajlar	Dezavantajlar
Merkezi Ortalama	$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$	Benzerlikten ziyade farklılıklara odaklanma	Verideki ofseti ortadan kaldırır	Heteroskedastik veride tek başına yeterli olmayabilir
Otomatik Ölçeklendirme	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / s_i$	Metabolitleri korelasyonlara göre karşılaştırma	Tüm değişkenler eşit öneme sahip olur	Ölçüm hatasını artırabilir
Aralıklı Ölçeklendirme	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / (x_{imax} - x_{imin})$	Biyolojik aralığa göre karşılaştırma	Değişkenler aynı aralığa getirilir	Aykırı değerlere duyarlı, hatayı artırabilir
Pareto Ölçeklendirme	$\tilde{x}_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_i) / \sqrt{s_i}$	Büyük değerlerin etkisini azaltma	Veri yapısını kısmen korur	Büyük değişimlere duyarlı olabilir

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

x_{ij} : Metabolit pik alanı

$\bar{x}_i$: Metabolit ortalama pik alanı

$x_{\max}$: Metabolit için maksimum pik alanı

$x_{\min}$: Metabolit için minimum pik alanı

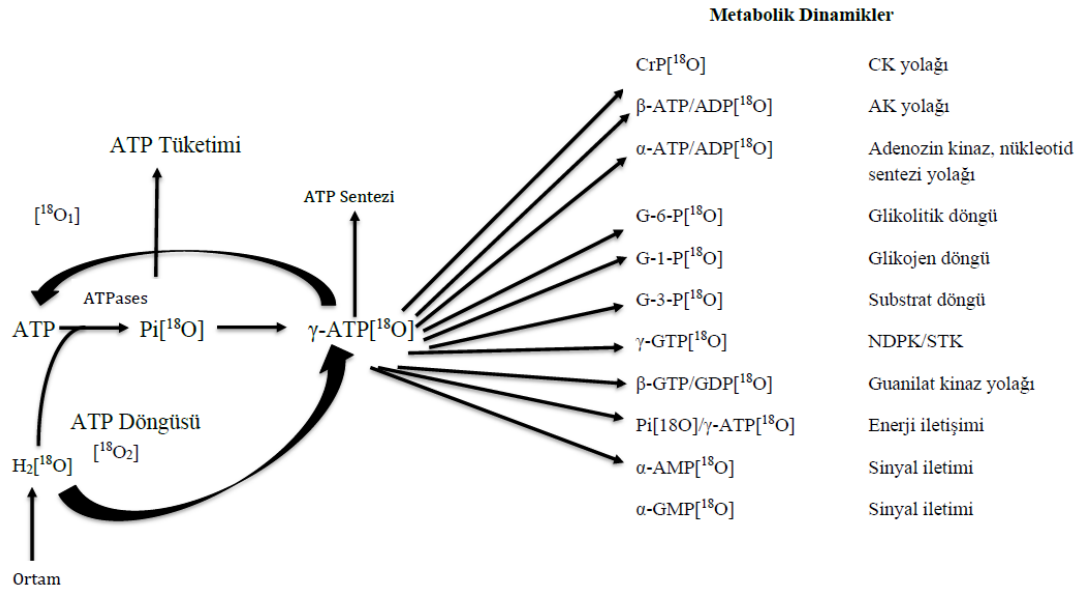
s_i : Standart sapma

2.1.2. Fluksomiks

Metabolitlerin sentezi ve parçalanmasından sorumlu metabolik yollar dinamik, düzenlenmiş ve birbiriyle bağlantılı yapılardır. Bu nedenle yalnızca belirli bir zaman noktasındaki metabolit düzeylerinin belirlenmesi, metabolik ağların işlevsel aktivitesinin tam olarak açıklanması için yeterli değildir. Fluksomik, metabolik yollarda gerçekleşen madde dönüşümlerinin ve metabolit devirlerinin zamana bağlı olarak incelenmesini amaçlayan omik yaklaşımdır. Kararlı izotop işaretleme deneylerinden elde edilen veriler, metabolik ağların dinamik özelliklerinin ve farklı biyolojik koşullara verdiği yanıtların değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte mutlak metabolik fluksların nicel olarak hesaplanabilmesi için izotop işaretlenme verilerinin uygun kinetik ve matematiksel modellerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (32,33).

Fluksomik çalışmalarda metabolik dönüşümlerin izlenmesi amacıyla çoğunlukla ^{13}C , ^{15}N ve ^{18}O gibi radyoaktif olmayan kararlı izotoplar kullanılmaktadır. Kullanılacak izotop, incelenen metabolik yolak ve araştırma amacına göre seçilmektedir. ^{13}C işaretli substratlar karbon iskeletlerinin, ^{15}N işaretli bileşikler ise azot içeren metabolitlerin dönüşümlerinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. H_2^{18}O ile işaretleme yaklaşımında ise işaretli su, hücre içi su havuzuyla dengelenmekte ve suyun substrat veya ürün olarak yer aldığı enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ^{18}O metabolitlere aktarılmaktadır. Bu yaklaşım özellikle fosfat transfer reaksiyonlarının, ATP dönüşümünün ve enerji metabolizmasıyla ilişkili

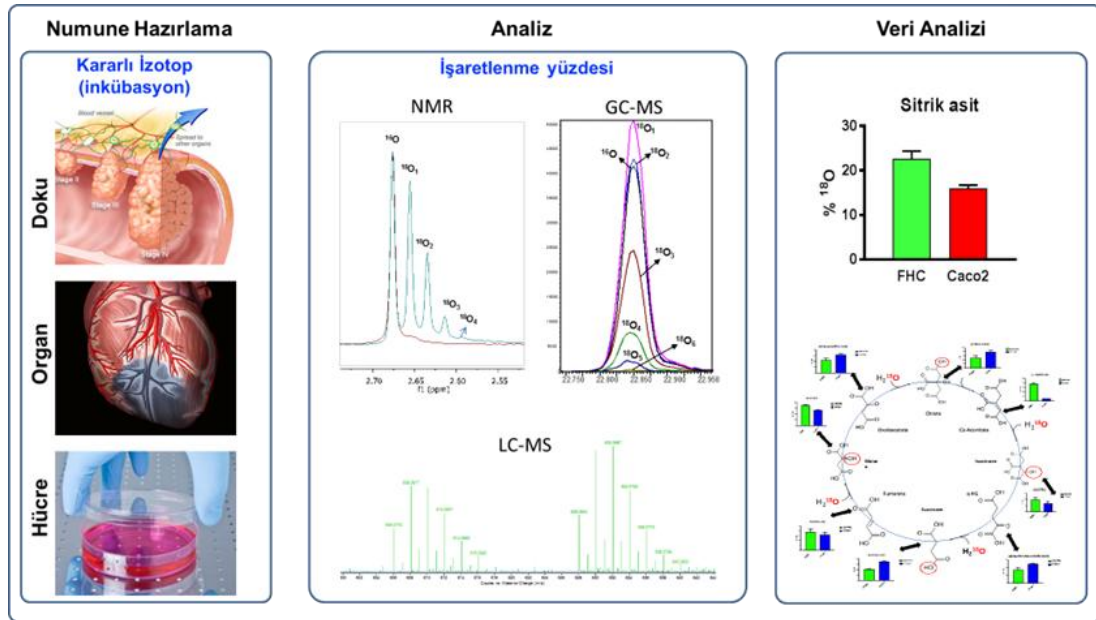
fosfometabolitlerin dinamiklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. ^{18}O işaretlenme düzeyi metabolik dönüşüm hakkında bilgi vermekle birlikte, tek başına belirli bir enzimin aktivitesinin veya mutlak metabolik fluksun doğrudan ölçümü olarak değerlendirilmemelidir (34).



Şekil 2.3. ^{18}O işaretleme mekanizması ile işaretlenmiş metabolitlerin farklı metabolik yolak analizlerindeki kullanımını gösteren şematik sunum (19).

Metabolik işaretleme sırasında ^{18}O 'nun fosfat ve fosfometabolitlere katılması büyük ölçüde enzim katalizli reaksiyonlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Fizyolojik koşullarda inorganik fosfat ile H_2^{18}O arasındaki enzimatik olmayan oksijen değişimi sınırlı olduğundan, gözlenen işaretlenme metabolik reaksiyonlarla ilişkilendirilebilmektedir. Hücreler veya dokular H_2^{18}O içeren bir ortamda inkübe edildiğinde işaretli su hücre içi su havuzuyla dengelenir. ATP'nin hidrolizi sırasında ^{18}O öncelikle inorganik fosfata katılabilir; ATP'nin yeniden sentezi ve fosfat transfer reaksiyonları sonucunda ise işaret fosforillenmiş metabolitlere aktarılabilir. ATP'nin farklı fosforil gruplarında gözlenen işaretlenme, ATP üretimi, tüketimi ve fosfat transfer sistemlerinin dinamikleri hakkında bilgi sağlayabilmektedir. Bu nedenle H_2^{18}O işaretlemesi, ATP turnover'ı ve hücrel enerji dönüşümünün incelenmesinde kullanılan tamamlayıcı yaklaşımlardan biridir (34) (Şekil 2.3).

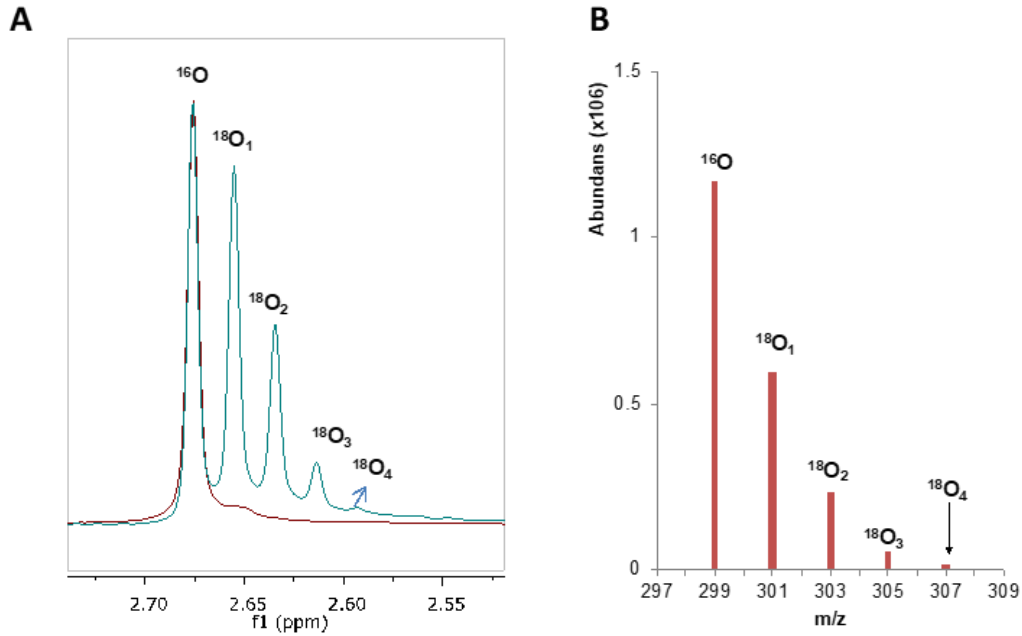
Kararlı izotop işaretleme deneyleri canlı organizmalar, dokular ve hücre kültürleri üzerinde gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.4). Bu amaçla biyolojik sistem, uygun oranda kararlı izotop içeren ortamda belirli bir süre inkübe edilmektedir. İnkübasyon koşulları, hücrelerin veya dokuların canlılığını ve metabolik bütünlüğünü koruyacak şekilde düzenlenmelidir. İşaretleme süresinin sonunda metabolik reaksiyonlar hızlı biçimde durdurulmalı ve metabolitler uygun tüketme yöntemiyle biyolojik örnekten ayrılmalıdır. Metabolik söndürme ve tüketme basamaklarının hızlı ve tekrarlanabilir biçimde gerçekleştirilmesi, işaretlenme örüntüsünün örnekleme sonrasında değişmesini önlemek açısından önemlidir. Fosfometabolitlerin ve metabolik profillerin analizinde kullanılan ^{18}O tabanlı analitik teknikler Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Canlı organizmaların işaretlenmesi (24).

Fosfor içeren metabolitlerin yüksek polaritesi, kromatografik ayrılmalarını ve analitik olarak belirlenmelerini güçleştirebilmektedir. Fosfometabolitlerin analizi için ^{31}P NMR, GC-MS, LC-MS, CE-MS ve HPLC gibi farklı tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu platformların metabolit kapsamı, duyarlılığı ve örnek hazırlama gereksinimleri farklı olduğundan, tek bir analitik yöntem tüm fosfometabolit sınıflarını kapsamlı biçimde belirleyememektedir. Şeker fosfatları ve düşük molekül ağırlıklı türevlendirilebilir metabolitler GC-MS ile analiz edilebilirken,

nükleotidler çoğunlukla LC-MS ile, fosfolipidler ise LC-MS veya NMR tabanlı yöntemlerle değerlendirilmektedir (29).



Şekil 2.5. Fosfometabolitlerin ve metabolik profillerin analizi için ^{18}O tabanlı analitik teknikler A) NMR ve B) Kütle dedektörü (29).

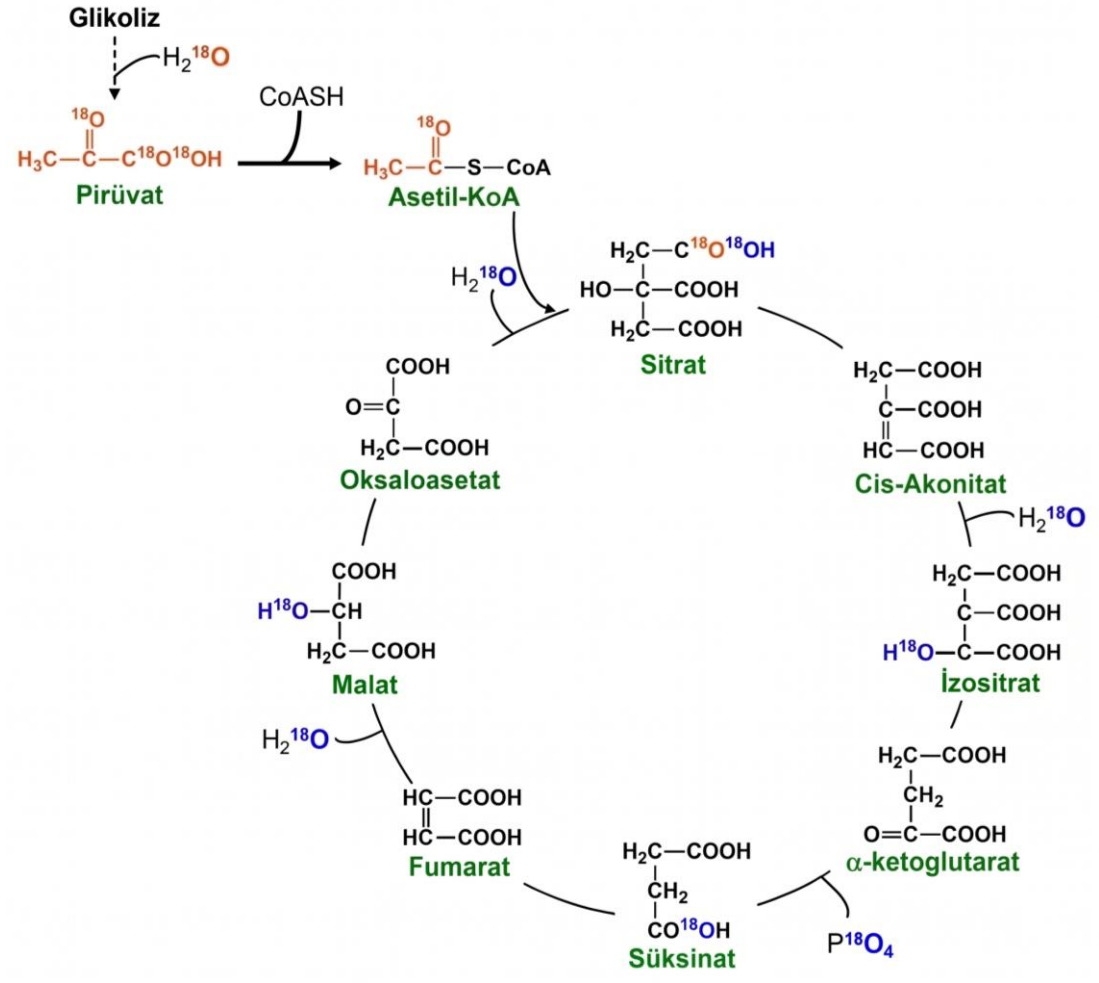
^{18}O destekli GC-MS yaklaşımı, düşük molekül ağırlıklı fosfometabolitlerin ^{18}O ve ^{16}O içeren izotopologlarının ayrılmasına ve göreceli bolluklarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Türevlendirme sonrasında elde edilen kütle spektrumlarında işaretlenmiş ve işaretlenmemiş türler arasındaki kütle farkları kullanılarak ^{18}O katılımı değerlendirilebilmektedir. ATP ve GTP gibi doğrudan GC-MS analizine uygun olmayan daha büyük fosfatlı bileşiklerin incelenmesinde ise fosforil grupların daha küçük ve analiz edilebilir moleküllere enzimatik olarak aktarılmasına dayanan dolaylı yaklaşımlar kullanılabilmektedir.

^{18}O destekli ^{31}P NMR yaklaşımında ise izotop katılımının neden olduğu spektral kaymalardan yararlanılarak fosfometabolit düzeyleri ve işaretlenme durumları birlikte değerlendirilebilmektedir. NMR'nin ayırma ve türevlendirme gereksiniminin sınırlı olması önemli bir avantaj sağlarken, kütle spektrometrisine göre daha düşük duyarlılığa sahip olması, daha yüksek örnek miktarı ve daha uzun ölçüm süresi gerektirmesi kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle NMR ve MS tabanlı

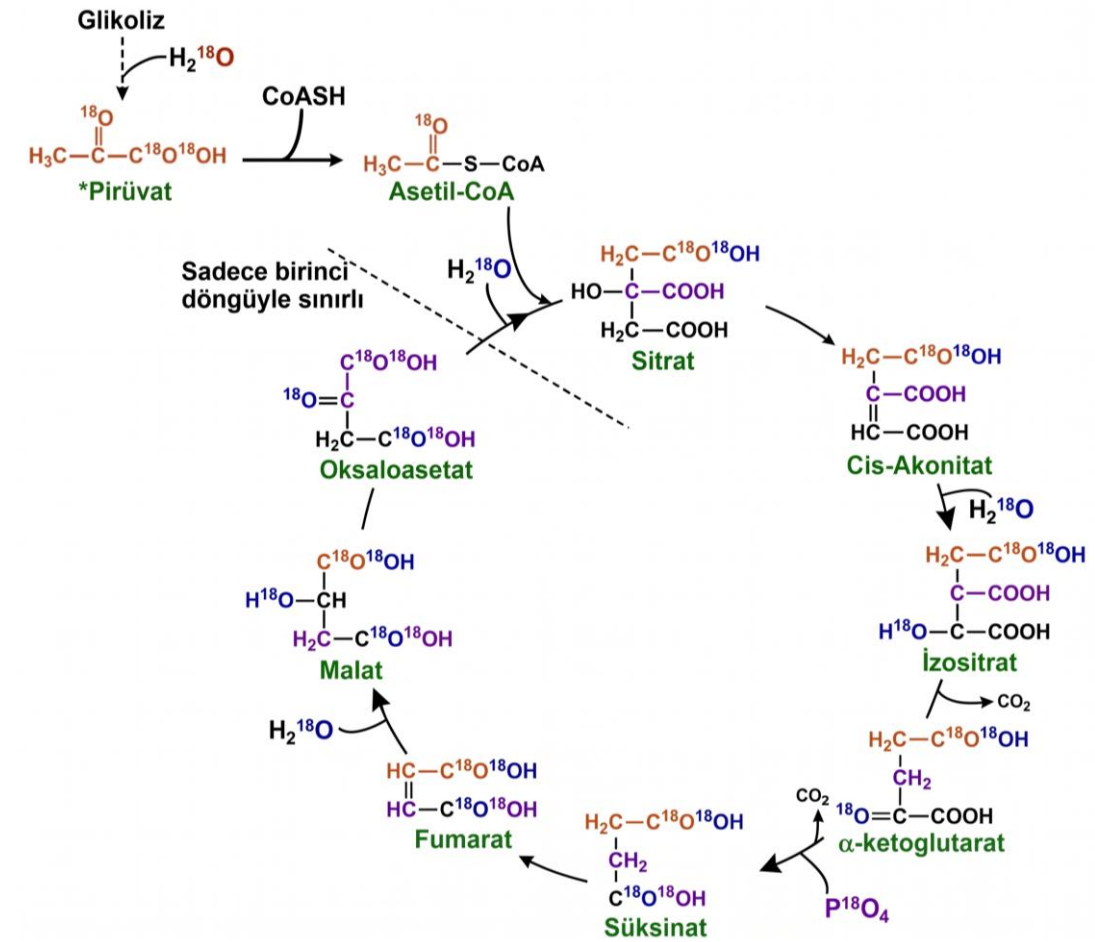
yöntemler, fosfometabolitlerin düzeyleri ile metabolik turnover'larının değerlendirilmesinde birbirini tamamlayıcı yaklaşımlar olarak kullanılmaktadır.

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, karbonhidratlar, yağ asitleri ve amino asitlerden elde edilen karbon iskeletlerinin oksidasyonunda merkezi rol oynayan metabolik yollardan biridir. Döngü ara ürünleri yalnızca enerji üretimine değil, amino asit, lipid ve nükleotid biyosentezi gibi çok sayıda hücresel sürece de katkı sağlamaktadır. Kanseri hücrelerinde TCA döngüsünün kullanımı, mitokondriyal işlevler ve anaplerotik reaksiyonlar yeniden düzenlenebildiğinden, döngü metabolitlerinin yalnızca düzeylerinin değil, metabolik dönüşümlerinin de değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

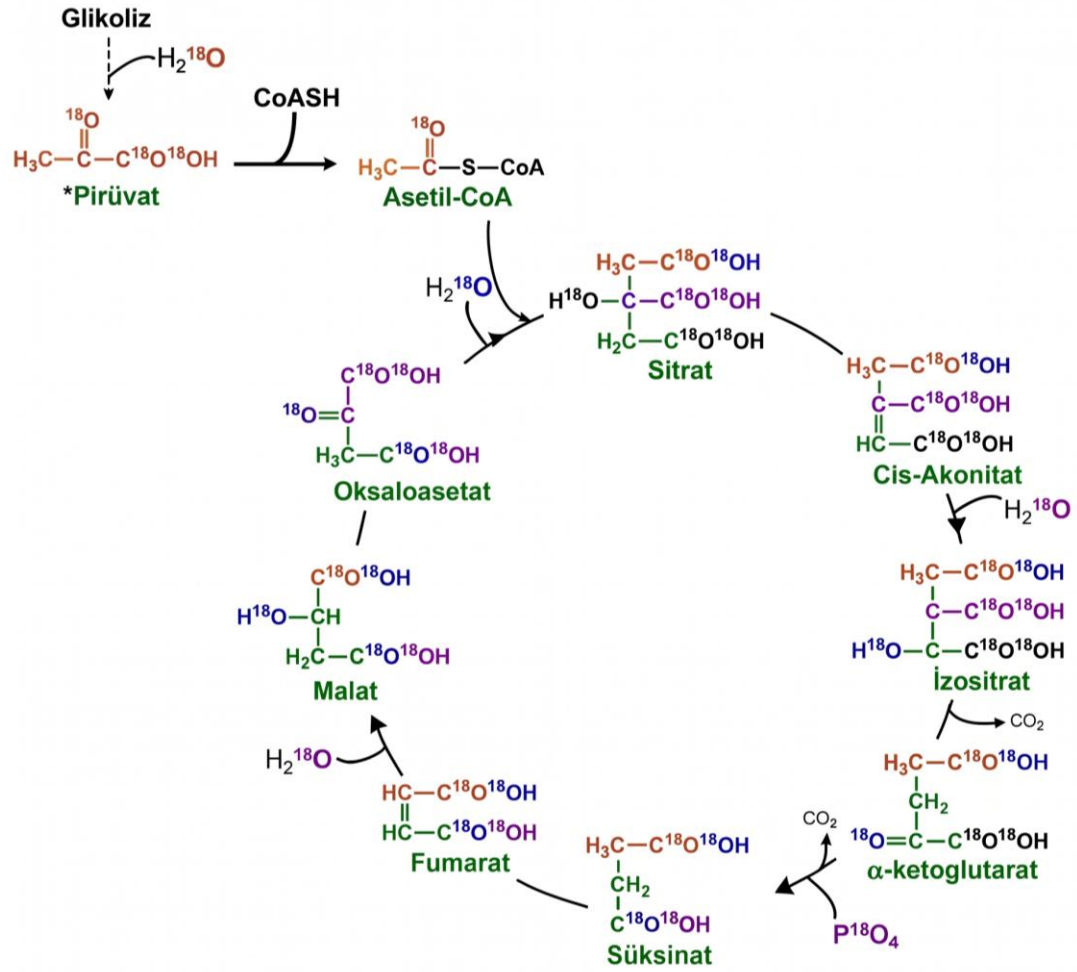
$H_2^{18}O$ işaretleme yaklaşımı, suyun substrat veya ürün olarak yer aldığı reaksiyonlar aracılığıyla ^{18}O 'nun TCA döngüsü ara ürünlerine katılımının izlenmesine olanak sağlamaktadır. TCA döngüsü metabolitleri fosfat grubu içermediğinden, bunların ^{18}O işaretlenmesi fosfometabolitlerde kullanılan ^{31}P NMR yaklaşımıyla doğrudan değerlendirilemez. Buna karşılık GC-MS analizinde moleküle katılan her ^{18}O atomu, ^{16}O içeren karşılığına göre nominal olarak 2 Da'lık kütle artışı oluşturur. Böylece işaretlenmemiş ve farklı düzeylerde işaretlenmiş izotopologların dağılımları değerlendirilerek TCA döngüsü metabolitlerinin zamana bağlı dönüşüm dinamikleri incelenebilir. Bu yaklaşımın TCA döngüsündeki metabolik dinamizmi değerlendirdiği, ancak tek başına mutlak yolak fluksunu doğrudan vermediği dikkate alınmalıdır (33). TCA döngüsü metabolitlerinde ^{18}O işaretlenmesinin başlangıç noktaları ile ilk ve ikinci döngü sonunda oluşan işaretlenme örüntüleri sırasıyla Şekil 2.6, Şekil 2.7 ve Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Krebs döngüsü metabolitlerinin ^{18}O ile işaretlenmeye başladığı noktaların gösterimi (33)



Şekil 2.7. Krebs döngüsünde ilk döngü sonunda işaretlenen metabolitler ve ^{18}O 'nun bağlandığı konumların gösterimi (33)



Şekil 2.8. Krebs döngüsünde ikinci döngü sonunda işaretlenen metabolitler ve ^{18}O 'nun bağlandığı konumların gösterimi (33)

^{18}O 'nun bir metabolite katılması, ^{16}O içeren karşılığına göre her bir işaretli oksijen atomu için nominal olarak 2 Da'lık kütle artışı meydana getirmektedir. Bir metabolitin farklı sayıda ^{18}O atomu içeren moleküler türleri izotopolog olarak tanımlanmakta ve kütle spektrumunda M, M+2, M+4 ve devam eden kütle kaymaları şeklinde izlenebilmektedir. İzotopologlara ait düzeltilmiş pik alanları kullanılarak metabolitin ^{18}O ile işaretlenme düzeyi hesaplanabilmektedir. Hesaplama öncesinde, işaretlenmemiş kontrol örneklerinden yararlanılarak ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O ve diğer doğal izotopların izotopolog dağılımına katkısının düzeltilmesi gerekmektedir. Elde edilen işaretlenme değerleri, deney süresi ve ortamın H_2^{18}O zenginliği dikkate alınarak metabolik turnover'ın karşılaştırmalı değerlendirilmesinde kullanılabilir (33).

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

n: Metabolitte teorik olarak işaretlenebilen toplam oksijen atomu sayısı

Bu alışmada H_2^{18}O işaretleme yaklaşımı, farklı kanser hücrelerinde enerji metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin zamana bağlı işaretlenme örüntülerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen izotopolog dağılımları, metabolitlerin göreceli ^{18}O katılımı ve metabolik turnover özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmada kapsamlı bir metabolik aė modeli kullanılarak mutlak fluks hesaplaması yapılmadığından, sonuçlar doğrudan metabolik akış hızları olarak değil, hücre hatları arasındaki metabolik dinamik ve dönüşüm farklılıklarının göstergeleri olarak yorumlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ile cam ve sarf malzemeleri sırasıyla Tablo 3.1, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Marka
Metanol	ISOLAB
Piridin	MERCK
Metoksiamin Hidroklorür	Sigma
N-metil-N-trimetilsililtrifloraasetat +%1 Trimetilklorosilan	Thermo Scientific

Tablo 3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
GC-MS	Thermo Scientific ISQ7610 Trace 1610
Hassas Terazî	Mettler Toledo AG285
Ultra-Saf Su Cihazı	Bornstead Nanopure Diamond
Otomatik Mikropipet	Dragonlab
Santrifüj	Christ AVC 12-18 CD Plus
Vorteks karıştırıcı	IKA Vorteks Genius 3

Tablo 3.3. Kullanılan Cam Malzeme ve Sarf Malzemeler

Malzeme	Özellik
Balon joje	Çeşitli Hacimlerde
Beher	Çeşitli Hacimlerde
GC Kolonu	DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)

3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

%0,9 NaCl Çözeltisi Hazırlanışı: Sodyum klorürden 9,0 g tartılarak 1000 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve yaklaşık 800 mL ultra saf suda çözülmüştür.

Çözünme tamamlandıktan sonra çözelti hacmi ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve homojen hâle gelinceye kadar karıştırılmıştır.

0,6 M Perklorik Asit Çözeltisi Hazırlanışı: Yaklaşık 70–80 mL ultra saf su üzerine 5,2 mL %70'lik konsantre perklorik asit yavaşça ilave edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

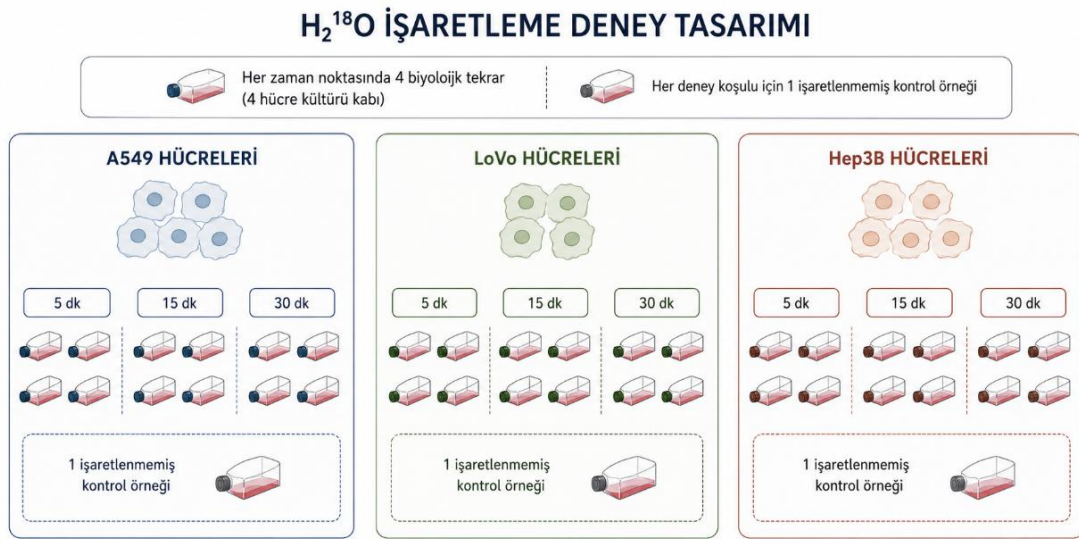
Metanol İçerisinde 0,6 M Perklorik Asit Çözeltisi Hazırlanışı: Yaklaşık 70–80 mL metanol üzerine 5,2 mL %70'lik konsantre perklorik asit kontrollü ve yavaş biçimde ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltinin hacmi metanol ile 100 mL'ye tamamlanmış ve homojen hâle gelinceye kadar karıştırılmıştır.

2 M Potasyum Bikarbonat Çözeltisi Hazırlanışı: Potasyum bikarbonattan 20,02 g tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve yaklaşık 70–80 mL ultra saf suda çözülmüştür. Çözünme tamamlandıktan sonra çözelti hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü Hazırlama Çalışmaları

$H_2^{18}O$ işaretleme deneyleri, A549 akciğer adenokarsinom, LoVo kolorektal adenokarsinom ve Hep3B hepatoselüler karsinom hücre hatlarında metabolik dinamiklerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. A549, LoVo ve Hep3B hücreleri 5, 15 ve 30 dakikalık üç farklı işaretleme süresinde değerlendirilmiştir. Her deney koşulu dört bağımsız biyolojik tekrar ile yürütülmüştür.

Her hücre hattı için doğal izotop dağılımının belirlenmesi amacıyla ayrıca bir işaretlenmemiş kontrol örneği hazırlanmıştır. İşaretlenmemiş kontrol örneklerine $H_2^{18}O$ içermeyen kültür ortamı uygulanmış ve bu örnekler işaretli örneklerle aynı deneysel koşullarda işleme alınmıştır. Deney grupları Şekil 3.1'de gösterildiği şekilde oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. H₂¹⁸O işaretleme deney tasarımı

A549, LoVo ve Hep3B hücreleri, 1 g/L glukoz içeren düşük glukozlu DMEM ortamında; %10 FBS, 4 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ilavesiyle T25 hücre kültürü kaplarında çoğaltılmıştır. Hücreler 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir. Adherent özellik gösteren hücrelerin kültür kaplarının yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları takip edilmiş, deneysel uygulamalarda kullanılacak kültürlerin uygun hücre yoğunluğuna ulaşması sağlanmıştır. Hücre ekim yoğunluğu, H₂¹⁸O ile işaretleme işlemi sırasında yaklaşık %70–80 doygunluğa ulaşılmasını sağlayacak şekilde belirlenmiştir.

İşaretleme ortamı, her hücre hattı için kullanılan kültür ortamının hacimce %30 H₂¹⁸O içerecek şekilde hazırlanmasıyla elde edilmiştir. Hücrelerin maruz kaldığı sıcaklık değişiminin sınırlandırılması amacıyla hazırlanan işaretleme ortamı uygulama öncesinde 37°C'ye getirilmiştir. İşaretleme başlangıcında mevcut kültür ortamı tamamen uzaklaştırılmış ve hücrelere önceden ısıtılmış H₂¹⁸O içeren işaretleme ortamı eklenmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşullarında sırasıyla 5, 15 ve 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

İşaretleme sürelerinin doğru ve karşılaştırılabilir biçimde uygulanabilmesi için işaretleme ortamının hücrelere eklenmesi ile metabolik söndürme işleminin başlatılması arasındaki süre her örnek için ayrı olarak takip edilmiştir. Biyolojik tekrarlar arasındaki deneysel değişkenliğin azaltılması amacıyla hücre kültürü

kaplarında kullanılan ortam hacmi, inkübasyon sıcaklığı, CO₂ düzeyi ve örneklerin işlem sırası tüm deney gruplarında sabit tutulmuştur.

Her işaretleme süresinin sonunda kültür ortamı hızla uzaklaştırılmış ve hücreler soğuk %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Metabolik reaksiyonların mümkün olan en kısa sürede durdurulması amacıyla ilgili söndürme çözeltisi hücrelerin üzerine hemen eklenmiştir. Kullanılan söndürme yöntemine bağlı olarak hücreler sıvı azot kullanılarak dondurulmuş, hücre kazıyıcısı yardımıyla kültür yüzeyinden ayrılmış ve söndürme çözeltisi ile birlikte uygun santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen örnekler sonraki analiz aşamalarına kadar -80°C’de saklanmıştır.

Bu çalışmada örnek toplama işlemi, hücrelerin kültür yüzeyinden kazınarak söndürme çözeltisi ile birlikte tüpe aktarılması olarak tanımlanmıştır. Tüm örnek toplama işlemleri, örnekleme sonrasında meydana gelebilecek metabolik değişikliklerin ve izotop dağılımındaki olası değişimlerin sınırlandırılması amacıyla mümkün olduğunca kısa sürede ve soğuk koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Metabolomik örnek hazırlama aşamasında metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit tüketme yöntemlerinin karşılaştırılması A549 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma sonucunda seçilen metanol yöntemi, H₂¹⁸O işaretleme deneylerinde A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarına uygulanmıştır.

Perklorik Asit Tüketme Prosedürü:

Hücreler, kültür ortamı bileşenlerinin uzaklaştırılması amacıyla 3 mL soğuk %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama çözeltisi tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 mL buz soğukluğunda 0,6 M HClO₄ çözeltisi eklenmiştir. Hücresel metabolizmanın hızla durdurulması ve hücrelerin parçalanmasının kolaylaştırılması amacıyla kültür şişesi sıvı azot kullanılarak dondurulmuştur. Hücreler kazıyıcı yardımıyla yüzeyden ayrılmıştır. Şişe yüzeyi ilave 1 mL soğuk 0,6 M HClO₄ çözeltisi ile yıkanmış ve birleştirilen ekstrakt 15 mL’lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Ekstraktlar, hücresel kalıntıların ve çökelmiş proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 4°C’de 30 dakika süreyle 14.000 × g’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen

süpernatant, çökelti bozulmadan temiz bir tüpe aktarılmıştır. Asidik süpernatanta başlangıçta 200 µL 2 M KHCO₃ çözeltisi eklenmiştir. Karbondioksit çıkışı tamamlanıncaya kadar tüpler tamamen kapatılmamıştır.

Nötralizasyonun ve potasyum perklorat çökmesinin tamamlanması amacıyla örnekler buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Ardından örnekler 4°C’de 5 dakika süreyle 14.000 × g’de tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatantın pH değeri pH kâğıdı ile kontrol edilmiştir. pH değerinin 7,0’ın altında olduğu örneklerle, pH ≥7,0 oluncaya kadar küçük hacimlerde 2 M KHCO₃ çözeltisi eklenmiştir. Her örneğe eklenen toplam KHCO₃ hacmi kaydedilmiştir.

Nötralize edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve GC-MS analizine kadar -80°C’de saklanmıştır.

Perklorik Asit-Metanol Tüketme Prosedürü: Hücreler, kültür ortamı bileşenlerinin uzaklaştırılması amacıyla 3 mL soğuk %0,9 NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama çözeltisi tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 mL önceden soğutulmuş, metanol içerisinde hazırlanmış 0,6 M HClO₄ çözeltisi eklenmiştir. Kültür şişesi 15 saniye süreyle sıvı azot buharına ve ardından 15 saniye süreyle sıvı azota maruz bırakılmıştır. Hücreler kazıyıcı yardımıyla yüzeyden ayrılmıştır. Şişe yüzeyi ilave 1 mL tüketme çözeltisi ile yıkanmış ve birleştirilen ekstrakt uygun santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Örnekler, proteinlerin ve hücresel kalıntıların çöktürülmesi amacıyla 4°C’de 30 dakika süreyle 14.000 × g’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, çökelti bozulmadan temiz bir tüpe aktarılmıştır. Asidik ekstrakta başlangıçta 200 µL 2 M KHCO₃ çözeltisi eklenmiştir. Karbondioksit çıkışı tamamlanıncaya kadar tüpler tamamen kapatılmamıştır.

Örnekler, nötralizasyonun ve tuz çökmesinin tamamlanması amacıyla buz üzerinde 30 dakika bekletilmiş ve ardından 4°C’de 5 dakika süreyle 14.000 × g’de tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatantın pH değeri pH kâğıdıyla kontrol edilmiştir. pH değerinin 7,0’ın altında olduğu örneklerle, pH ≥7,0 oluncaya kadar küçük hacimlerde

2M KHCO_3 çözeltisi eklenmiştir. Her örneğe eklenen toplam KHCO_3 hacmi kaydedilmiştir.

Nötralize edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve GC-MS analizine kadar -80°C 'de saklanmıştır.

MeOH Tüketme Prosedürü: Hücreler, kültür ortamı bileşenlerinin uzaklaştırılması amacıyla önce 3 mL, ardından 2 mL soğuk %0,9 NaCl çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama çözeltisinin tamamen uzaklaştırılmasının ardından hücrelerin üzerine 1 mL buz soğukluğunda MeOH:ultra saf su karışımı (9:1, h/h) eklenmiştir. Kültür şişesi 15 saniye süreyle sıvı azot buharına ve ardından 15 saniye süreyle sıvı azota maruz bırakılmıştır.

Şişe buz üzerine alınmış ve hücreler kazıyıcı yardımıyla yüzeyden ayrılmıştır. Şişe yüzeyi ilave 1 mL MeOH:ultra saf su karışımı (9:1, h/h) ile yıkanmıştır. Birleştirilen ekstrakt 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Örnekler 4°C 'de 30 dakika süreyle $14.000 \times g$ 'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında yaklaşık 1 mL süpernatant, çökelti bozulmadan temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve GC-MS analizine kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.3. Metabolomik Analizler

Metabolomik analizler, GC-MS tekniğinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. GC-MS Kullanılarak Gerçekleştirilen Metabolomik Analizler

Dondurucuda saklanan metabolit ekstraktları analiz öncesinde çıkarılarak çözünmeleri sağlanmış ve ardından vakumlu santrifüj kullanılarak tamamen kurutulmuştur. Kurutulan örnekler, piridin içerisinde 20 mg/mL derişimde hazırlanmış 20 μL metoksiamin hidroklorür çözeltisi eklenmiştir. Örnekler, termal çalkalayıcıda 30°C 'de ve 250 rpm'de 90 dakika inkübe edilerek metoksimasyon işlemine tabi tutulmuştur. Metoksimasyonun ardından örnekler oda sıcaklığına getirilmiş ve her örneğe %1 trimetilklorosilan içeren 80 μL N-metil-N- (trimetilsilil) trifloroasetamid (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiştir. Sililasyon işlemi 37°C 'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme işlemi tamamlanan örnekler GC-

MS viallerine aktarılmış ve DB-5MS kolonu kullanılarak Tablo 3.4'te verilen kromatografik koşullar altında analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. GC-MS Analizi Kromatografik Koşulları

Kolon	DB-5MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
Fırın Sıcaklığı Programı	60°C'den (1 dk tutulur) 325 °C'ye 10°C/dk artışla (10 dk tutulur)
Analiz Süresi	37 dk
Taşıyıcı Gaz ve Akış Hızı	Helyum, 1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	1 µL
Çözücü Gecikme Süresi	2 dakika
Transfer Hat Sıcaklığı	290°C
Kütle Aralığı	m/z 50-650

GC-MS analizlerinden elde edilen ham veriler Chromeleon CDS yazılımı kullanılarak kaydedilmiştir. Ham veri dosyaları, MS-DIAL yazılımında işlenebilmesi amacıyla ABF Converter aracılığıyla ABF formatına dönüştürülmüştür. Dönüştürülen veriler MS-DIAL yazılımına aktarılmış; pik belirleme, pik hizalama ve metabolit tanımlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Metabolitlerin tanımlanmasında Fiehn GC-MS Kütüphanesi ile MS-DIAL spektral kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Metabolit tanımlamaları, kütle spektrumu benzerliği ve MS-DIAL/Fiehn GC-MS kütüphanelerinde yer alan alıkonma indeksi bilgileri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

MS-DIAL yazılımından elde edilen pik alanı verileri Microsoft Excel ortamına aktarılmıştır. Her metabolit için örnekler genelindeki ortalama pik alanı hesaplanmış ve her bir örneğe ait pik alanı ilgili metabolitin ortalama pik alanına bölünerek normalizasyon uygulanmıştır. Normalize edilen veriler çok değişkenli istatistiksel analizler için MetaboAnalyst platformuna yüklenmiştir. Örneklerin genel dağılımının, gruplar arasındaki benzerliklerin ve olası aykırı örneklerin değerlendirilmesi amacıyla temel bileşen analizi (PCA), önceden tanımlanmış deney grupları arasındaki ayrımın incelenmesi amacıyla ise kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler PCA, PLS-DA, hiyerarşik kümeleme/ısı haritası (heatmap) ve bar grafikleri kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.4. Fluksomiks Analizleri

$H_2^{18}O$ ile işaretlenen hücrelerden elde edilen örneklerde amino asit metabolizması, glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü, fosfat metabolizması ve diğer seçilmiş metabolitlerle ilişkili izotopolog dağılımları GC-MS yöntemi kullanılarak incelenmiştir. GC-MS analizinden önce metabolit ekstraktları, Bölüm 3.3.1’de açıklanan metoksimasyon ve sililasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Türevlendirilen örnekler, Tablo 3.5’te verilen GC-MS koşulları altında analiz edilmiştir. Metabolitlerin tanımlanmasında kütle spektrumu bilgileri ile MS-DIAL/Fiehn GC-MS kütüphanelerinde yer alan alikonma indeksi bilgileri birlikte değerlendirilmiştir.

Tablo 3.5. ^{18}O izotop analizleri için GC-MS analizi kromatografik koşulları

Kolon	DB-5MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 μ m film kalınlığı)
Fırın Sıcaklığı Programı	Fırın sıcaklığı artışı 60°C’den (1 dak tutulur) 325°C’ye 5°C /dak (5 dak tutulur)
Analiz Süresi	60 dk
Taşıyıcı Gaz ve Akış Hızı	Helyum, 1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	1 μ L
Çözücü Gecikme Süresi	2 dakika
Transfer Hat Sıcaklığı	290°C
Kütle Aralığı	m/z 50-650

$H_2^{18}O$ ’nun enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla metabolitlere katılması sonucunda, ^{16}O yerine moleküle katılan her bir ^{18}O atomı nominal olarak 2 Da’lık kütle artışı meydana getirmiştir. GC-MS analizinde çoğunlukla tek yüklü iyonlar izlendiğinden bu değişim, seçilen iyon serisinde 2 m/z aralıklarla gözlenmiştir. Bu doğrultuda işaretlenmemiş metabolite ait M+0 iyonunun yanı sıra bir veya daha fazla ^{18}O atomu içeren M+2, M+4, M+6 ve devam eden izotopologlara ait pik alanları belirlenmiştir. İzotopolog analizinde kullanılan seçilmiş iyon değerleri amino asit metabolizması, glikoliz ve TCA döngüsü metabolitleri için sırasıyla Tablo 3.6, Tablo 3.7 ve Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

İzotopolog pik alanlarının doğal izotop katkısına göre düzeltilmesi Python kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her metabolit için işaretli örnekte ölçülen M+2, M+4, M+6 ve devam eden izotopologlara ait pik alanlarından, aynı hücre hattına ait işaretlenmemiş kontrol örneğinde ölçülen karşılık gelen izotopolog pik alanları çıkarılarak düzeltilmiş pik alanları elde edilmiştir. Bu düzeltilmiş pik alanları kullanılarak göreceli izotopolog dağılımları ve ^{18}O işaretlenme düzeyleri hesaplanmıştır.

H_2^{18}O işaretlenme düzeyleri; inkübasyon ortamındaki H_2^{18}O oranı, metabolit için izlenen iyon serisi ve teorik olarak işaretlenebilen oksijen atomu sayısı dikkate alınarak normalize edilmiştir. Elde edilen değerler, farklı hücre hatları ve işaretleme süreleri arasındaki metabolik dönüşüm dinamiklerinin karşılaştırılmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Amino asit metabolitlerinin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri

Metabolit	Alıkonma İndeksi	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$
Glisin	778	248	250	252
Serin	1196	219	221	
Piroglutamat	1087	258	260	262
Fenilalanin	1226	222	224	

Tablo 3.7. Glikoliz metabolizması ve diğer metabolitlerin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri

Metabolit	Alıkonma İndeksi	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$
Gliserol-3-fosfat	1994	357	359	361	
Pirofosfat	950	451	453	455	
Pi	1439	299	301	303	305
O-fosfokolamin	722	299	301		
Kreatinin	733	329	331		

Tablo 3.8. TCA döngüsü metabolitlerinin ^{18}O işaretleme yüzdesinin hesaplamasında kullanılan m/z değerleri

Metabolit	Ahkonma İndeksi	^{16}O	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$
Sitrik asit	1494	273	275	277
Süksinik asit	990	247	249	
Malat	1025	233	235	237
Fumarat	1164	245	247	249

Tüketme yöntemleri arasındaki ikili karşılaştırmalar, normalize edilmiş metabolit pik alanları kullanılarak MetaboAnalyst platformunda gerçekleştirilmiştir. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit grupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda iki yönlü bağımsız örneklemeler Student t-testi kullanılmış ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

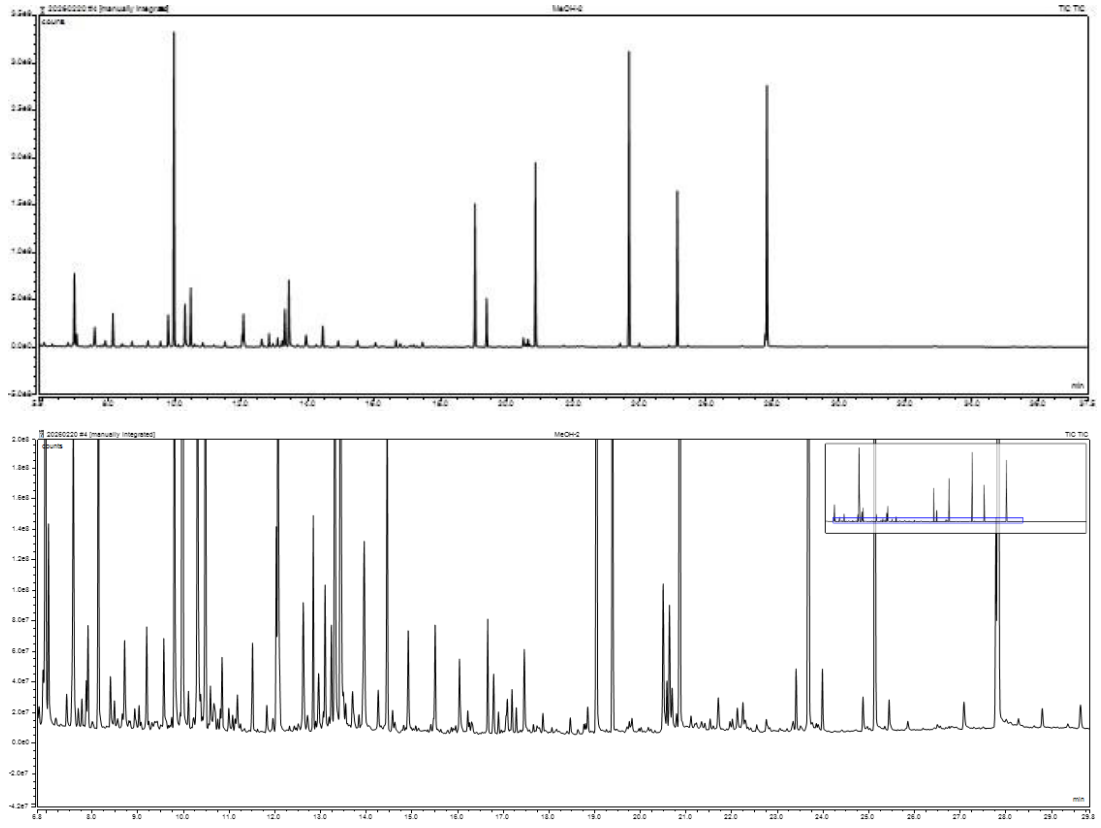
Bu çalışma kapsamında metabolomik analizler ve $H_2^{18}O$ işaretleme deneyleri için iki ayrı hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Metabolomik örnek hazırlama çalışmalarında A549 hücreleri belirlenen kültür koşullarında çoğaltılmış ve metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit tüketme yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Kültür süreci boyunca hücre morfolojisi, yüzeye tutunma ve proliferasyonu düzenli olarak takip edilmiş, kültürlerde gözle görülür mikrobiyal kontaminasyon bulgusu gözlenmemiştir.

$H_2^{18}O$ işaretleme deneylerinde ise hücreler yaklaşık %70-80 doygunluğa ulaştığında işaretleme işlemi başlatılmıştır. Belirlenen işaretleme süresinin sonunda hücreler toplanmış ve metabolit tüketimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde merkezi karbon metabolizması, amino asit metabolizması, glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ile ilişkili metabolitlerin $H_2^{18}O$ katılımı değerlendirilerek zamana bağlı işaretlenme ve metabolik dönüşüm dinamiklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

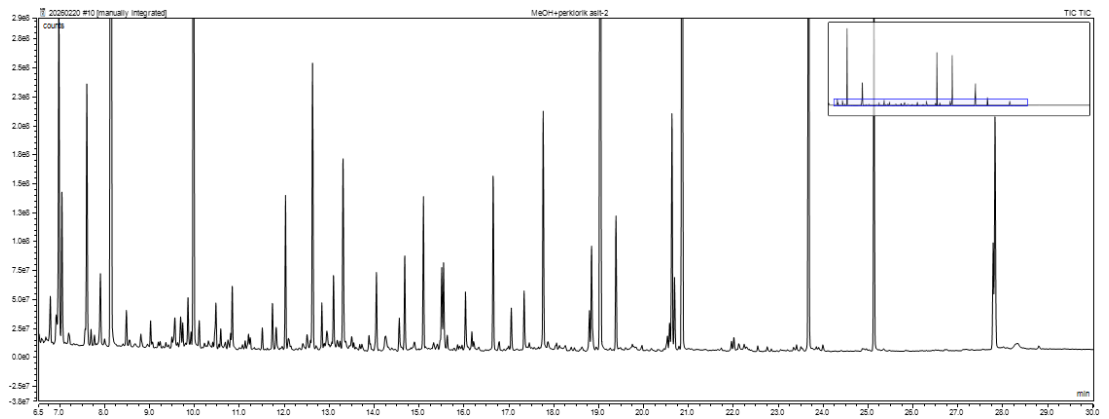
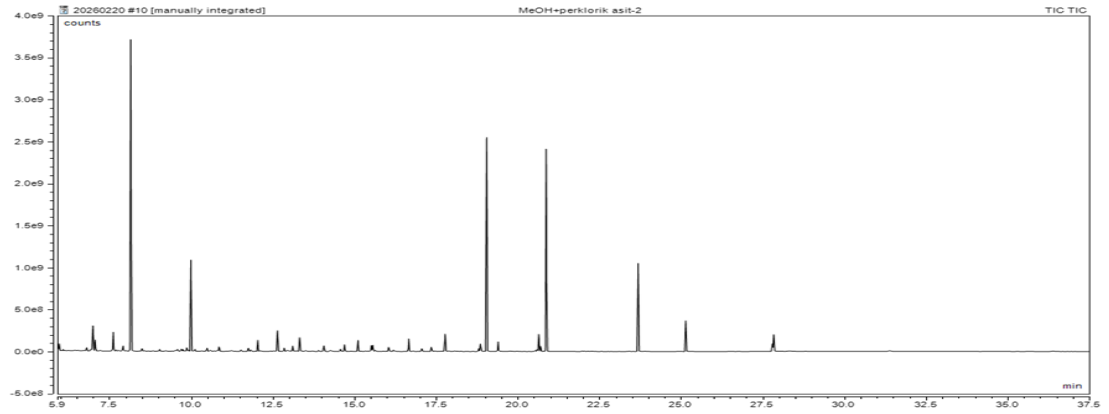
4.2. Tüketme Çözeltili Optimizasyonu

En uygun tüketme çözeltisinin belirlenmesi için A549 hücrelerinden metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit kullanılarak hücre içi metabolitler elde edilmiştir. Elde edilen metabolit ekstraktları GC-MS ile analiz edilmiş; pik belirleme, hizalama, metabolit tanımlama ve normalizasyon işlemlerinin ardından 97 metabolit güvenilir şekilde tanımlanmıştır. Tanımlanan metabolitler amino asitler, organik asitler, şekerler, yağ asitleri, nükleotitler ve farklı metabolik yollara ait ara ürünleri kapsamaktadır.

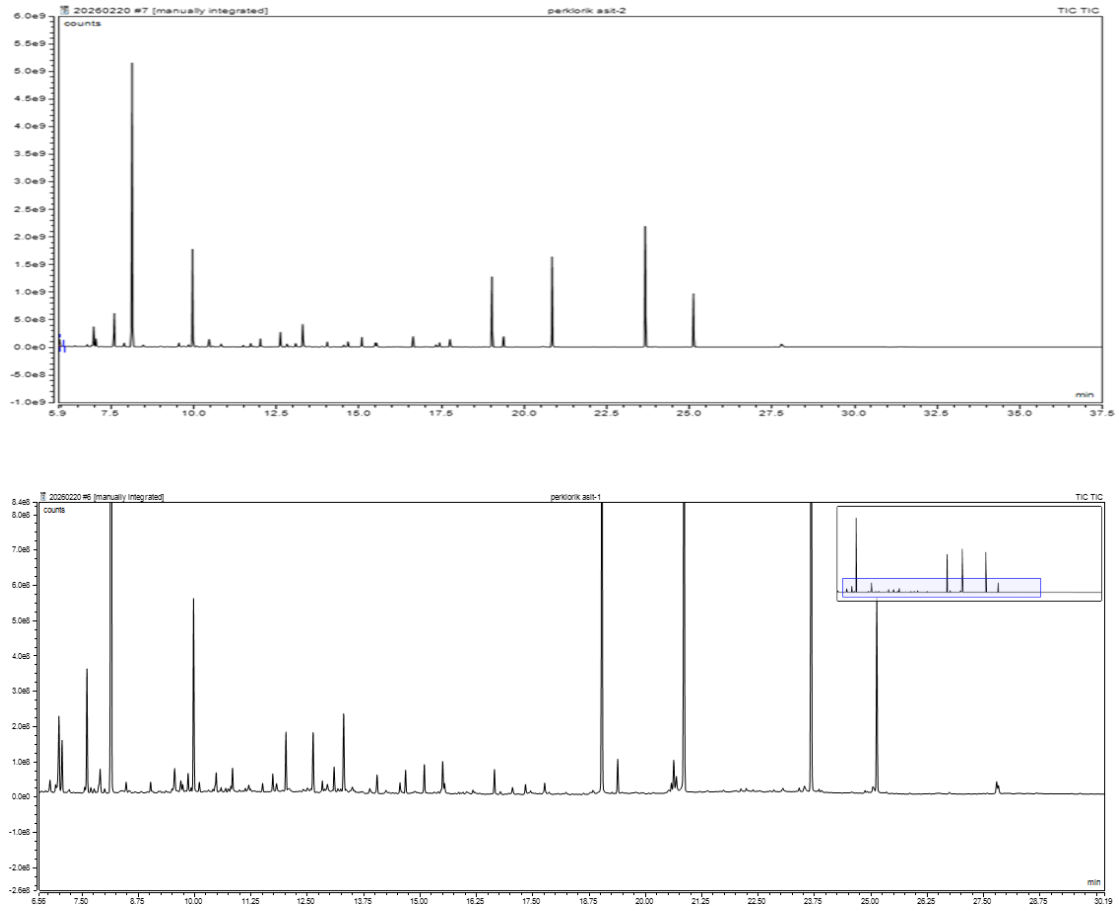
Üç tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları Şekil 4.1, Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te sunulmuştur. Kromatogramlarda metabolit piklerinin yeterli düzeyde ayrıldığı ve her üç yöntemle geniş bir metabolit grubunun belirlenebildiği görülmüştür.



Şekil 4.1. A549 hücrelerinden metanol tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları



Şekil 4.2. A549 hücrelerinden metanol–perklorik asit tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları



Şekil 4.3. A549 hücrelerinden perklorik asit tüketme çözeltisi kullanılarak elde edilen metabolit ekstraktlarına ait temsili GC-MS toplam iyon kromatogramları

Tanımlanan metabolitlerin normalizasyon sonrası göreceli bolluk değerleri ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmıştır. Tüketme yöntemleri arasındaki ikili istatistiksel karşılaştırmalarla birlikte elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1. GC-MS analizi sonucunda tanımlanan metabolitlerin normalizasyon sonrası bağıl bolluk değerleri (ortalama $\pm$ standart hata) ve p-değerleri

	Metabolit bağıl bolluk değerleri			p değerleri		
	Metanol	Metanol+ Perklorik Asit	Perklorik Asit	Metanol - Metanol+ Perklorik Asit	Metanol+ Perklorik Asit - Perklorik Asit	Metanol - Perklorik Asit
1,3-Dihidroksiaseton	2,251 $\pm$ 0,078	0,254 $\pm$ 0,078	0,495 $\pm$ 0,385	6.15$\times 10^{-6}$	3.49 $\times 10^{-1}$	1.50$\times 10^{-3}$
10-Hidroksidekanoik asit	0,781 $\pm$ 0,104	1,18 $\pm$ 0,013	1,039 $\pm$ 0,148	2.76$\times 10^{-3}$	1.75 $\times 10^{-1}$	6.94 $\times 10^{-2}$
2-Hidroksibütirik asit	0,536 $\pm$ 0,242	1,347 $\pm$ 0,582	1,117 $\pm$ 0,543	8.99 $\times 10^{-2}$	6.44 $\times 10^{-1}$	1.65 $\times 10^{-1}$
2-Ketoizokaproik asit	1,114 $\pm$ 0,129	1,097 $\pm$ 0,026	0,789 $\pm$ 0,31	8.41 $\times 10^{-1}$	1.61 $\times 10^{-1}$	1.69 $\times 10^{-1}$
3- (2-Hidroksifenil)propanoik asit	0,561 $\pm$ 0,103	1,245 $\pm$ 0,147	1,194 $\pm$ 0,231	2.77$\times 10^{-3}$	7.64 $\times 10^{-1}$	1.24$\times 10^{-2}$
3-Aminoizobütirik asit	0,695 $\pm$ 0,127	1,317 $\pm$ 0,342	0,988 $\pm$ 0,023	4.19$\times 10^{-2}$	1.72 $\times 10^{-1}$	1.71$\times 10^{-2}$
3-Hidroksipropanoik asit	1,841 $\pm$ 0,184	0,636 $\pm$ 0,394	0,524 $\pm$ 0,209	8.66$\times 10^{-3}$	6.86 $\times 10^{-1}$	1.22$\times 10^{-3}$
3-Üreidopropiyonat	0,014 $\pm$ 0,009	0,796 $\pm$ 0,355	2,19 $\pm$ 0,65	1.89 $\times 10^{-2}$	3.10 $\times 10^{-2}$	4.39$\times 10^{-3}$
4-Hidroksisinnamik asit	0,684 $\pm$ 0,156	1,246 $\pm$ 0,227	1,071 $\pm$ 0,196	2.41 $\times 10^{-2}$	3.69 $\times 10^{-1}$	5.56 $\times 10^{-2}$
6-Deoksi-D-glukoz	0,161 $\pm$ 0,019	0,969 $\pm$ 0,174	1,87 $\pm$ 0,474	1.33$\times 10^{-3}$	3.66 $\times 10^{-2}$	3.36$\times 10^{-3}$
6-Fosfoglukonik asit	1,893 $\pm$ 0,262	0,621 $\pm$ 0,111	0,486 $\pm$ 0,081	1.49$\times 10^{-3}$	1.64 $\times 10^{-1}$	8.82$\times 10^{-4}$
8-Aminokaprilik asit	0,712 $\pm$ 0,045	1,18 $\pm$ 0,938	1,108 $\pm$ 0,149	4.36 $\times 10^{-1}$	9.01 $\times 10^{-1}$	1.16 $\times 10^{-2}$
Alanin	0,192 $\pm$ 0,104	0,864 $\pm$ 1,305	1,944 $\pm$ 1,69	4.24 $\times 10^{-1}$	4.31 $\times 10^{-1}$	1.47 $\times 10^{-1}$
Allo-inozitol	1,546 $\pm$ 0,09	0,574 $\pm$ 0,173	0,881 $\pm$ 0,372	9.87$\times 10^{-4}$	2.64 $\times 10^{-1}$	3.95 $\times 10^{-2}$
Allo-treonin	2,788 $\pm$ 0,309	0,026 $\pm$ 0,003	0,185 $\pm$ 0,292	1.02$\times 10^{-4}$	4.00 $\times 10^{-1}$	4.49$\times 10^{-4}$
Alfa-ketoglutarik asit	1,775 $\pm$ 0,193	0,412 $\pm$ 0,063	0,813 $\pm$ 0,727	3.11$\times 10^{-4}$	3.96 $\times 10^{-1}$	9.10 $\times 10^{-2}$
Glukozamin-1-fosfat	1,779 $\pm$ 0,153	0,441 $\pm$ 0,172	0,78 $\pm$ 0,454	5.49$\times 10^{-4}$	2.93 $\times 10^{-1}$	2.26 $\times 10^{-2}$
Araşidik asit	0,763 $\pm$ 0,081	1,224 $\pm$ 0,038	1,013 $\pm$ 0,109	8.81$\times 10^{-4}$	3.42 $\times 10^{-2}$	3.38 $\times 10^{-2}$
Asparajin	2,391 $\pm$ 0,517	0,373 $\pm$ 0,172	0,236 $\pm$ 0,03	3.03$\times 10^{-3}$	2.47 $\times 10^{-1}$	1.96$\times 10^{-3}$
Aspartik asit	1,988 $\pm$ 0,266	0,173 $\pm$ 0,087	0,839 $\pm$ 0,87	3.61$\times 10^{-4}$	2.58 $\times 10^{-1}$	9.41 $\times 10^{-2}$
Beta-alanin	2,004 $\pm$ 0,147	0,366 $\pm$ 0,104	0,629 $\pm$ 0,488	9.50$\times 10^{-5}$	4.13 $\times 10^{-1}$	9.48$\times 10^{-3}$
Kaprik asit	0,571 $\pm$ 0,101	1,412 $\pm$ 0,152	1,017 $\pm$ 0,058	1.34$\times 10^{-3}$	1.37 $\times 10^{-2}$	2.67$\times 10^{-3}$

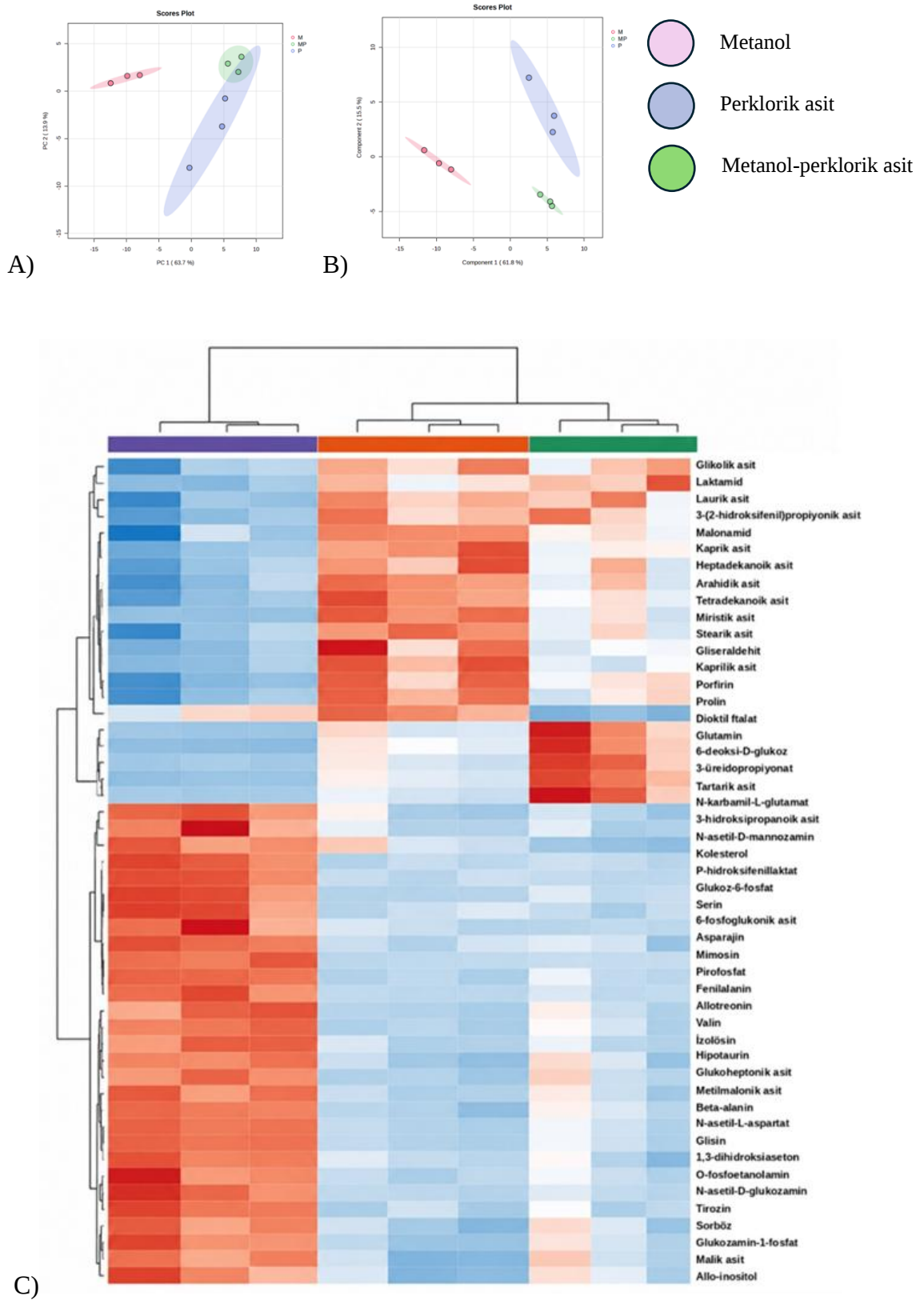
Kaprilik asit	0,481 ± 0,125	1,633 ± 0,213	0,886 ± 0,128	1.27×10⁻³	6.43×10⁻³	1.73×10 ⁻²
Kolesterol	1,931 ± 0,225	0,88 ± 0,511	0,189 ± 0,046	3.11×10 ⁻²	8.03×10 ⁻²	1.95×10⁻⁴
Kolik asit	1,27 ± 0,622	0,862 ± 0,295	0,868 ± 0,321	3.63×10 ⁻¹	9.82×10 ⁻¹	3.76×10 ⁻¹
Sitrik asit	0,924 ± 0,179	0,527 ± 0,194	1,549 ± 0,646	5.98×10 ⁻²	5.85×10 ⁻²	1.81×10 ⁻¹
Estron	0,821 ± 0,172	1,402 ± 0,498	0,776 ± 0,251	1.29×10 ⁻¹	1.24×10 ⁻¹	8.11×10 ⁻¹
Fumarik asit	1,577 ± 0,053	0,593 ± 0,17	0,83 ± 0,424	6.61×10⁻⁴	4.21×10 ⁻¹	3.88×10 ⁻²
Glukoheptonik asit	1,804 ± 0,044	0,442 ± 0,122	0,754 ± 0,496	5.28×10⁻⁵	3.50×10 ⁻¹	2.18×10 ⁻²
Glukoz-6-fosfat	2,381 ± 0,276	0,349 ± 0,06	0,27 ± 0,051	2.39×10⁻⁴	1.57×10 ⁻¹	2.00×10⁻⁴
Glukuronik asit	2,557 ± 1,344	0,33 ± 0,397	0,113 ± 0,134	5.13×10 ⁻²	4.21×10 ⁻¹	3.51×10 ⁻²
Glutamik asit	1,23 ± 0,11	0,461 ± 0,366	1,309 ± 1,136	2.53×10 ⁻²	2.86×10 ⁻¹	9.10×10 ⁻¹
Glutamin	0,128 ± 0,011	0,921 ± 0,288	1,951 ± 0,548	8.89×10⁻³	4.49×10 ⁻²	4.51×10⁻³
Gliseraldehit	0,642 ± 0,083	1,396 ± 0,249	0,962 ± 0,053	7.60×10⁻³	4.15×10 ⁻²	5.06×10⁻³
Gliserol	0,841 ± 0,178	1,376 ± 0,217	0,783 ± 0,096	2.99×10 ⁻²	1.23×10 ⁻²	6.44×10 ⁻¹
Gliserol-3-fosfat	2,058 ± 1,077	0,435 ± 0,159	0,506 ± 0,257	6.12×10 ⁻²	7.04×10 ⁻¹	7.22×10 ⁻²
Glisin	2,25 ± 0,082	0,254 ± 0,078	0,495 ± 0,385	6.89×10⁻⁶	3.48×10 ⁻¹	1.52×10⁻³
Glikolik asit	0,629 ± 0,125	1,227 ± 0,115	1,144 ± 0,198	3.63×10⁻³	5.62×10 ⁻¹	1.89×10 ⁻²
Heptadekanoik asit	0,702 ± 0,099	1,261 ± 0,143	1,037 ± 0,166	5.15×10⁻³	1.52×10 ⁻¹	4.03×10 ⁻²
Hidroksiüre	0,994 ± 0,149	0,782 ± 0,352	1,224 ± 1,275	3.90×10 ⁻¹	5.94×10 ⁻¹	7.72×10 ⁻¹
Hipotaurin	1,976 ± 0,117	0,469 ± 0,135	0,555 ± 0,262	1.26×10⁻⁴	6.38×10 ⁻¹	1.02×10⁻³
İzolösin	2,321 ± 0,103	0,177 ± 0,07	0,502 ± 0,49	7.57×10⁻⁶	3.20×10 ⁻¹	3.27×10⁻³
Laktamid	0,378 ± 0,082	1,151 ± 0,234	1,472 ± 0,297	5.69×10⁻³	2.15×10 ⁻¹	3.53×10⁻³
Laktik asit	1,06 ± 0,036	1,124 ± 0,252	0,816 ± 0,226	6.84×10 ⁻¹	1.90×10 ⁻¹	1.39×10 ⁻¹
Laurik asit	0,632 ± 0,137	1,212 ± 0,108	1,156 ± 0,187	4.47×10⁻³	6.74×10 ⁻¹	1.72×10 ⁻²
Malik asit	1,835 ± 0,171	0,394 ± 0,128	0,771 ± 0,428	3.06×10⁻⁴	2.18×10 ⁻¹	1.61×10 ⁻²
Malonamid	0,618 ± 0,205	1,341 ± 0,006	1,041 ± 0,077	3.64×10⁻³	2.56×10⁻³	2.87×10 ⁻²
Malonik asit	0,55 ± 0,151	1,411 ± 0,344	1,039 ± 0,161	1.66×10 ⁻²	1.66×10 ⁻¹	1.84×10 ⁻²
Mannoz	1,935 ± 1,018	0,295 ± 0,267	0,769 ± 0,958	5.42×10 ⁻²	4.55×10 ⁻¹	2.22×10 ⁻¹

Metiyonin	0,743 ± 0,019	1,203 ± 0,134	1,054 ± 0,223	4.10×10⁻³	3.76×10 ⁻¹	7.40×10 ⁻²
Metilmalonik asit	1,923 ± 0,125	0,342 ± 0,058	0,735 ± 0,545	3.83×10⁻⁵	2.82×10 ⁻¹	2.13×10 ⁻²
Mimosin	1,985 ± 0,085	0,539 ± 0,086	0,476 ± 0,234	3.23×10⁻⁵	6.86×10 ⁻¹	4.66×10⁻⁴
Miristik asit	0,595 ± 0,046	1,444 ± 0,075	0,962 ± 0,135	7.68×10⁻⁵	5.67×10⁻³	1.12×10 ⁻²
N-Asetil-D-glukozamin	1,917 ± 0,247	0,461 ± 0,062	0,622 ± 0,276	5.85×10⁻⁴	3.81×10 ⁻¹	3.75×10⁻³
N-Asetil-D-mannozamin	1,756 ± 0,292	0,644 ± 0,2	0,6 ± 0,192	5.55×10⁻³	7.96×10 ⁻¹	4.59×10⁻³
N-Asetil-L-aspartik asit	1,755 ± 0,054	0,48 ± 0,1	0,764 ± 0,292	4.20×10⁻⁵	1.87×10 ⁻¹	4.45×10⁻³
N-Asetil-L-glutamik asit	1,346 ± 0,083	0,897 ± 0,252	0,757 ± 0,303	4.26×10 ⁻²	5.71×10 ⁻¹	3.14×10 ⁻²
N-Asetil-L-fenilalanin	0,91 ± 0,073	0,705 ± 0,103	1,386 ± 0,414	4.81×10 ⁻²	5.07×10 ⁻²	1.22×10 ⁻¹
N-Karbamil-L-glutamik asit	0,091 ± 0,004	0,568 ± 0,237	2,341 ± 0,738	2.52×10 ⁻²	1.67×10 ⁻²	6.18×10⁻³
Oleik asit	0,739 ± 0,327	1,27 ± 0,329	0,991 ± 0,18	1.18×10 ⁻¹	2.67×10 ⁻¹	3.07×10 ⁻¹
O-Fosfokolamin	1,645 ± 0,085	0,689 ± 0,095	0,666 ± 0,321	2.03×10⁻⁴	9.12×10 ⁻¹	6.91×10⁻³
Oksaloasetik asit	2,428 ± 2,351	0,101 ± 0,053	0,471 ± 0,489	1.62×10 ⁻¹	2.62×10 ⁻¹	2.31×10 ⁻¹
Oksalik asit	0,406 ± 0,041	0,995 ± 0,56	1,6 ± 1,013	1.43×10 ⁻¹	4.16×10 ⁻¹	1.11×10 ⁻¹
Palmitik asit	0,808 ± 0,13	1,205 ± 0,035	0,987 ± 0,117	7.03×10⁻³	3.70×10 ⁻²	1.51×10 ⁻¹
Palmitoleik asit	0,673 ± 0,246	1,388 ± 0,297	0,938 ± 0,113	3.26×10 ⁻²	7.03×10 ⁻²	1.65×10 ⁻¹
Pantotenik asit	1,321 ± 0,02	0,703 ± 0,067	0,976 ± 0,401	1.08×10⁻⁴	3.10×10 ⁻¹	2.11×10 ⁻¹
Fenilalanin	2,546 ± 0,094	0,116 ± 0,084	0,338 ± 0,381	4.82×10⁻⁶	3.79×10 ⁻¹	6.19×10⁻⁴
Fosforik asit	1,609 ± 0,363	0,401 ± 0,206	0,99 ± 0,612	7.44×10⁻³	1.90×10 ⁻¹	2.06×10 ⁻¹
p-Hidroksifenillaktik asit	2,556 ± 0,305	0,232 ± 0,044	0,212 ± 0,116	1.98×10⁻⁴	7.97×10 ⁻¹	2.39×10⁻⁴
Porfin	0,601 ± 0,107	1,358 ± 0,173	1,041 ± 0,058	2.97×10⁻³	3.97×10 ⁻²	3.25×10⁻³
Prolin	0,66 ± 0,111	1,341 ± 0,095	0,999 ± 0,114	1.29×10⁻³	1.62×10 ⁻²	2.10×10 ⁻²
Piroglutamik asit	1,383 ± 0,135	0,376 ± 0,29	1,24 ± 1,148	5.46×10⁻³	2.75×10 ⁻¹	8.41×10 ⁻¹
Pirofosfat	2,84 ± 0,149	0,057 ± 0,024	0,103 ± 0,055	5.75×10⁻⁶	2.62×10 ⁻¹	7.57×10⁻⁶
Pirüvik asit	0,88 ± 0,113	1,236 ± 0,23	0,883 ± 0,085	7.38×10 ⁻²	6.73×10 ⁻²	9.72×10 ⁻¹
Ribitol	1,558 ± 0,182	0,566 ± 0,188	0,875 ± 0,341	2.78×10⁻³	2.42×10 ⁻¹	3.76×10 ⁻²
Ribonik asit gama-lakton	0,933 ± 0,075	0,647 ± 0,2	1,419 ± 0,428	8.14×10 ⁻²	4.75×10 ⁻²	1.25×10 ⁻¹

Riboz	2,173 ± 1,86	0,423 ± 0,331	0,404 ± 0,215	1.84×10 ⁻¹	9.39×10 ⁻¹	1.77×10 ⁻¹
Sedoheptüloz	0,372 ± 0,366	0,624 ± 0,473	2,004 ± 1,779	5.06×10 ⁻¹	2.64×10 ⁻¹	1.94×10 ⁻¹
Serin	2,801 ± 0,514	0,038 ± 0,004	0,161 ± 0,199	7.42×10⁻⁴	3.45×10 ⁻¹	1.15×10⁻³
Sorbitol	1,286 ± 0,194	0,885 ± 0,034	0,829 ± 0,271	2.42×10 ⁻²	7.44×10 ⁻¹	7.64×10 ⁻²
Sorboz	2,237 ± 0,185	0,277 ± 0,16	0,487 ± 0,427	1.57×10⁻⁴	4.70×10 ⁻¹	2.86×10⁻³
Skualen	0,589 ± 0,141	1,452 ± 1,467	0,959 ± 0,169	3.68×10 ⁻¹	5.94×10 ⁻¹	4.32×10 ⁻²
Stearik asit	0,75 ± 0,093	1,253 ± 0,05	0,997 ± 0,084	1.15×10⁻³	1.05×10 ⁻²	2.68×10 ⁻²
Stigmasterol	1,378 ± 0,66	0,846 ± 0,179	0,776 ± 0,427	2.49×10 ⁻¹	8.07×10 ⁻¹	2.55×10 ⁻¹
Süksinik asit	1,269 ± 0,063	0,71 ± 0,096	1,021 ± 0,398	1.07×10⁻³	2.58×10 ⁻¹	3.46×10 ⁻¹
Sükroz	1,76 ± 0,197	0,405 ± 0,208	0,835 ± 0,572	1.21×10⁻³	2.88×10 ⁻¹	5.72×10 ⁻²
Taloz	1,799 ± 0,851	0,371 ± 0,22	0,83 ± 0,979	4.82×10 ⁻²	4.72×10 ⁻¹	2.66×10 ⁻¹
Tartarik asit	0,023 ± 0,013	0,836 ± 0,279	2,141 ± 0,486	7.26×10⁻³	1.56×10 ⁻²	1.65×10⁻³
Tartronik asit	0,569 ± 0,138	1,394 ± 0,321	1,038 ± 0,119	1.49×10 ⁻²	1.45×10 ⁻¹	1.11×10 ⁻²
Tetratriakontan	0,718 ± 0,069	1,267 ± 0,077	1,015 ± 0,064	7.91×10⁻⁴	1.23×10 ⁻²	5.54×10⁻³
Treitol	0,82 ± 0,091	1,166 ± 0,079	1,014 ± 0,178	7.67×10⁻³	2.50×10 ⁻¹	1.69×10 ⁻¹
Treonin	1,676 ± 0,261	0,373 ± 0,146	0,951 ± 0,858	1.65×10⁻³	3.14×10 ⁻¹	2.34×10 ⁻¹
Treoz	0,583 ± 0,547	0,854 ± 1,006	1,563 ± 0,121	7.02×10 ⁻¹	2.93×10 ⁻¹	3.86×10 ⁻²
Trehaloz	1,51 ± 1,191	0,487 ± 0,25	1,004 ± 0,688	2.19×10 ⁻¹	2.88×10 ⁻¹	5.59×10 ⁻¹
Tirozin	2,637 ± 0,335	0,081 ± 0,037	0,282 ± 0,353	1.93×10⁻⁴	3.81×10 ⁻¹	1.10×10⁻³
Üre	0,826 ± 0,147	1,184 ± 0,366	0,989 ± 0,19	1.91×10 ⁻¹	4.59×10 ⁻¹	3.06×10 ⁻¹
Valin	2,311 ± 0,287	0,175 ± 0,06	0,514 ± 0,557	2.26×10⁻⁴	3.54×10 ⁻¹	7.64×10⁻³

4.2.1. Tüketme Yöntemlerine Ait Genel Metabolomik Profiller

Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen metabolomik profiller PCA, PLS-DA ve hiyerarşik kümeleme analizleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çok değişkenli analizlerde aynı tüketme çözeltisiyle hazırlanan biyolojik tekrarların genel olarak birbirine yakın konumlandığı, farklı tüketme çözeltilerinin ise farklı metabolit profilleri oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, tüketme çözeltisinin ölçülen metabolitlerin göreceli bollukları üzerinde belirgin bir etkisinin bulunduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).

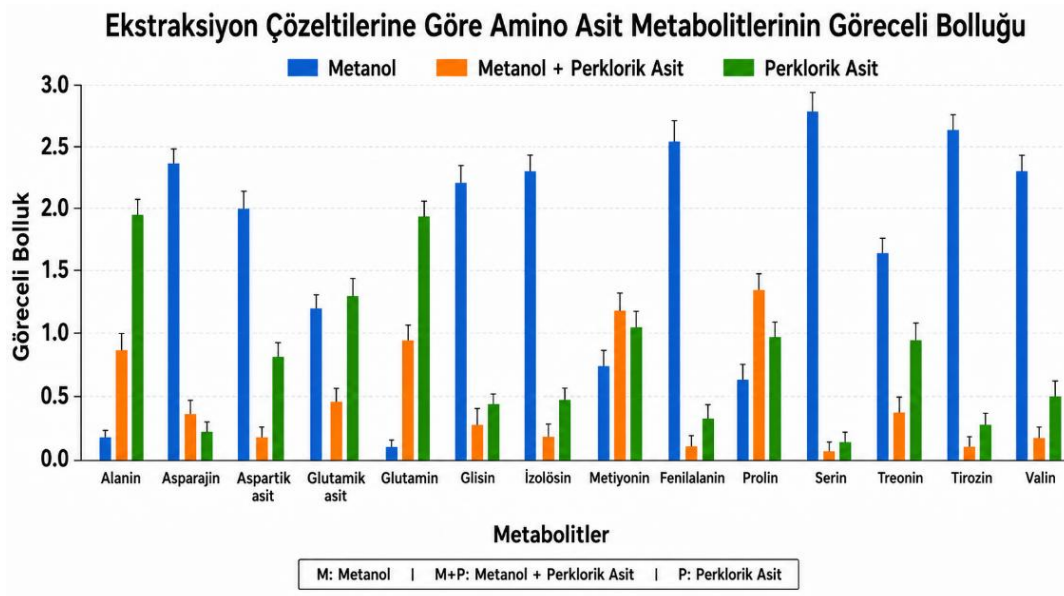


Şekil 4.4. Metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi metabolit profillerinin A) PCA, B) PLS-DA ve C) hiyerarşik kümeleme ısı haritası analizleri

$H_2^{18}O$ işaretleme çalışmalarında amino asit metabolizması, glikoliz ve TCA döngüsüyle ilişkili metabolitlerin izlenmesi planlandığından, tüketme yöntemlerinin bu metabolit grupları üzerindeki etkileri ayrıca değerlendirilmiştir.

4.2.2. Amino Asitler

Amino asit metabolitlerine ait tüketme yöntemi karşılaştırmaları Şekil 4.5’de, sunulmuştur.



Şekil 4.5. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi amino asit metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi

Amino asitlerin önemli bir bölümünde en yüksek göreceli bolluk metanol tüketme çözeltisiyle elde edilmiştir (Şekil 4.5). Glisinin göreceli bolluğu metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $2,250 \pm 0,082$, $0,254 \pm 0,078$ ve $0,495 \pm 0,385$ olarak belirlenmiştir. Metanol ile metanol–perklorik asit ve metanol ile perklorik asit arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur; ilgili p değerleri sırasıyla $6,89 \times 10^{-6}$ ve $1,52 \times 10^{-3}$ ’tür.

Fenilalanin için aynı yöntemlerle sırasıyla $2,546 \pm 0,094$, $0,116 \pm 0,084$ ve $0,338 \pm 0,381$ göreceli bolluk değerleri elde edilmiştir. Metanol yöntemi ile diğer iki yöntem arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 4,82 \times 10^{-6}$ ve $p = 6,19 \times 10^{-4}$). Serinin göreceli bolluğu metanol yönteminde $2,801 \pm 0,514$, metanol–perklorik asit

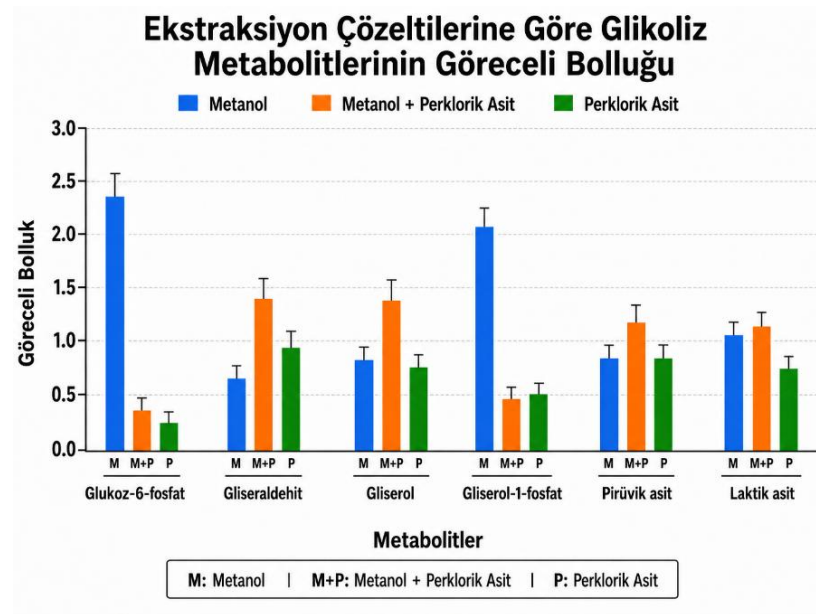
yönteminde $0,038 \pm 0,004$ ve perklorik asit yönteminde $0,161 \pm 0,199$ olarak bulunmuştur. Metanol ile diğer iki yöntem arasındaki farkların anlamlı olduğu belirlenmiştir.

İzolösin, valin, tirozin, asparajin, aspartik asit ve β -alaninde de en yüksek göreceli bolluk metanol yöntemiyle elde edilmiştir. İzolösin için değerler sırasıyla $2,321 \pm 0,103$, $0,177 \pm 0,070$ ve $0,502 \pm 0,490$; valin için $2,311 \pm 0,287$, $0,175 \pm 0,060$ ve $0,514 \pm 0,557$; tirozin için ise $2,637 \pm 0,335$, $0,081 \pm 0,037$ ve $0,282 \pm 0,353$ olarak belirlenmiştir.

Buna karşılık glutaminde en yüksek göreceli bolluk perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir. Glutamin değerleri metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $0,128 \pm 0,011$, $0,921 \pm 0,288$ ve $1,951 \pm 0,548$ olarak bulunmuştur. Metanol ile perklorik asit arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 4,51 \times 10^{-3}$). Prolin ve metiyoninde ise en yüksek ortalama değerler metanol–perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir.

4.2.3. Glikoliz ve İlişkili Karbonhidrat Metabolitleri

Glikoz metabolitlerine ait tüketme yöntemi karşılaştırmaları Şekil 4.6’da sunulmuştur.



Şekil 4.6. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi glikoliz metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi

Glikoliz ve pentoz fosfat yoluyla ilişkili bazı fosforillenmiş metabolitlerde metanol yöntemi daha yüksek göreceli bolluk sağlamıştır. Glukoz-6-fosfatın göreceli bolluğu metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $2,381 \pm 0,276$, $0,349 \pm 0,060$ ve $0,270 \pm 0,051$ olarak belirlenmiştir. Metanol yöntemi ile diğer iki yöntem arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 2,39 \times 10^{-4}$ ve $p = 2,00 \times 10^{-4}$).

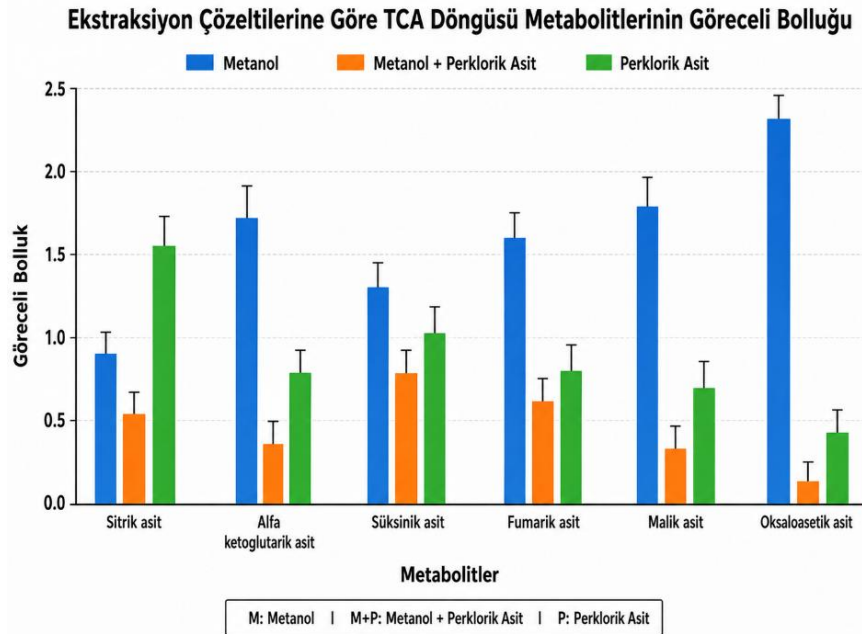
6-Fosfoglukonik asitte sırasıyla $1,893 \pm 0,262$, $0,621 \pm 0,111$ ve $0,486 \pm 0,081$ değerleri elde edilmiştir. Metanol ile diğer iki yöntem arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır. Glukozamin-1-fosfat için göreceli bolluklar sırasıyla $1,779 \pm 0,153$, $0,441 \pm 0,172$ ve $0,780 \pm 0,454$ olarak bulunmuştur.

Gliseraldehit ve gliserolde en yüksek göreceli bolluk metanol–perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir. Gliseraldehit için değerler sırasıyla $0,642 \pm 0,083$, $1,396 \pm 0,249$ ve $0,962 \pm 0,053$; gliserol için $0,841 \pm 0,178$, $1,376 \pm 0,217$ ve $0,783 \pm 0,096$ olarak belirlenmiştir.

Pirüvik asitte metanol–perklorik asit yöntemiyle daha yüksek ortalama değer elde edilmesine karşın yöntemler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Laktik asitte de üç tüketme çözeltisi arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

4.2.4. TCA Döngüsü Metabolitleri

TCA döngüsü metabolitlerine ait tüketme yöntemi karşılaştırmaları Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi TCA döngüsü metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi

TCA döngüsü metabolitlerinden α -ketoglutarik asit, fumarik asit ve malik asitte en yüksek göreceli bolluk metanol yöntemiyle elde edilmiştir. α -Ketoglutarik asit için metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $1,775 \pm 0,193$, $0,412 \pm 0,063$ ve $0,813 \pm 0,727$ değerleri bulunmuştur. Metanol ile metanol–perklorik asit arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 3,11 \times 10^{-4}$).

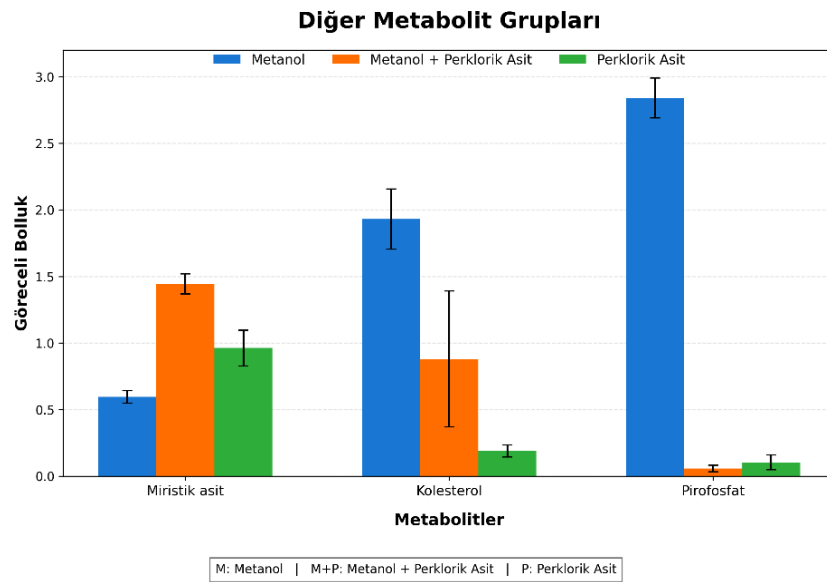
Fumarik asitte göreceli bolluklar sırasıyla $1,577 \pm 0,053$, $0,593 \pm 0,170$ ve $0,830 \pm 0,424$ olarak belirlenmiştir. Metanol ile diğer iki yöntem arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Malik asitte elde edilen değerler sırasıyla $1,835 \pm 0,171$, $0,394 \pm 0,128$ ve $0,771 \pm 0,428$ olup metanol ile diğer yöntemler arasındaki farklar anlamlıdır.

Süksinik asitte en yüksek ortalama değer metanol yöntemiyle elde edilmiştir. Göreceli bolluklar sırasıyla $1,269 \pm 0,063$, $0,710 \pm 0,096$ ve $1,021 \pm 0,398$ olarak

bulunmuştur. Metanol ile metanol–perklorik asit arasındaki fark anlamlı iken metanol ile perklorik asit arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

Sitrik asitte en yüksek ortalama göreceli bolluk perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir. Metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $0,924 \pm 0,179$, $0,527 \pm 0,194$ ve $1,549 \pm 0,646$ değerleri belirlenmiştir. Bununla birlikte sitrik asit için yöntemler arasındaki ikili karşılaştırmalar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Oksaloasetik asitte de metanol yöntemi daha yüksek ortalama değer vermesine rağmen yöntemler arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir.

4.2.5. Diğer Metabolit Grupları



Şekil 4.8. Metanol, metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemleriyle elde edilen A549 hücre içi çeşitli metabolit profillerinin bar grafiği gösterimi

Yağ asitlerinin önemli bir bölümünde en yüksek göreceli bolluk metanol–perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir. Miristik asit için metanol, metanol–perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinde sırasıyla $0,595 \pm 0,046$, $1,444 \pm 0,075$ ve $0,962 \pm 0,135$ değerleri bulunmuştur. Metanol–perklorik asit yöntemiyle elde edilen değer hem metanol hem de perklorik asit yönteminden anlamlı derecede yüksektir. Kaprilik asit, kaprik asit, palmitik asit ve stearik asitte de en yüksek ortalama değerler metanol–perklorik asit yöntemiyle elde edilmiştir.

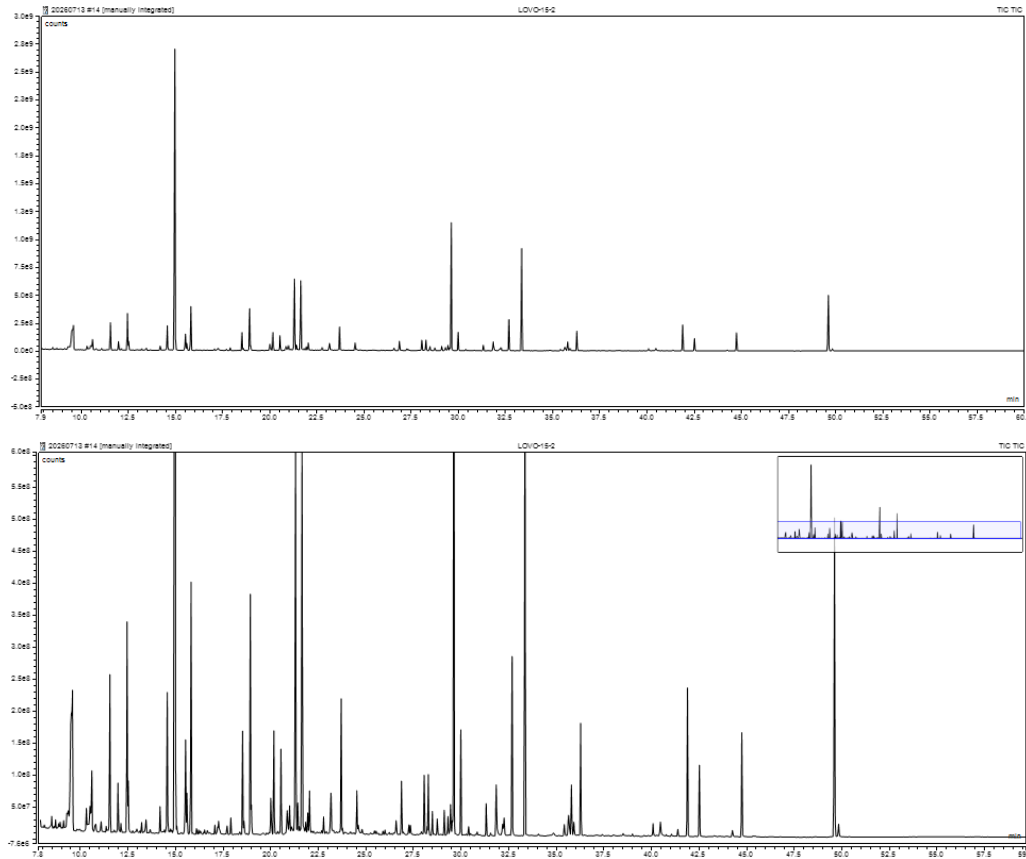
Kolesterolde ise en yüksek göreceli bolluk metanol yöntemiyle elde edilmiştir. Üç yöntemle sırasıyla $1,931 \pm 0,225$, $0,880 \pm 0,511$ ve $0,189 \pm 0,046$ değerleri belirlenmiş; metanol ile perklorik asit arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p = 1,95 \times 10^{-4}$).

Pirofosfatın göreceli bolluğu metanol tüketim yönteminde $2,840 \pm 0,149$, metanol–perklorik asit yönteminde $0,057 \pm 0,024$ ve perklorik asit yönteminde $0,103 \pm 0,055$ olarak belirlenmiştir. Metanol ile diğer iki yöntem arasındaki farklılıklar ileri düzeyde anlamlıdır. O-Fosfokolamin için de en yüksek göreceli bolluk metanol yöntemiyle elde edilmiş ve değerler sırasıyla $1,645 \pm 0,085$, $0,689 \pm 0,095$ ve $0,666 \pm 0,321$ olarak bulunmuştur.

Üç tüketme çözeltisinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, metanol yöntemi amino asitlerin büyük bir bölümünde, fosforillenmiş şekerlerde, TCA döngüsünün birçok ara ürününde ve bazı fosfat metabolitlerinde daha yüksek göreceli bolluk sağlamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda sonraki metabolit ve $H_2^{18}O$ işaretlenme analizlerinde metanol tüketme çözeltisi kullanılmıştır.

4.3. Fluksomik Analizi

Tez kapsamında değerlendirilen metabolitlerin A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri GC-MS analizleri ile karşılaştırılmıştır. Bu analizlere ait temsili bir toplam iyon kromatogramı Şekil 4.9'da sunulmuştur.



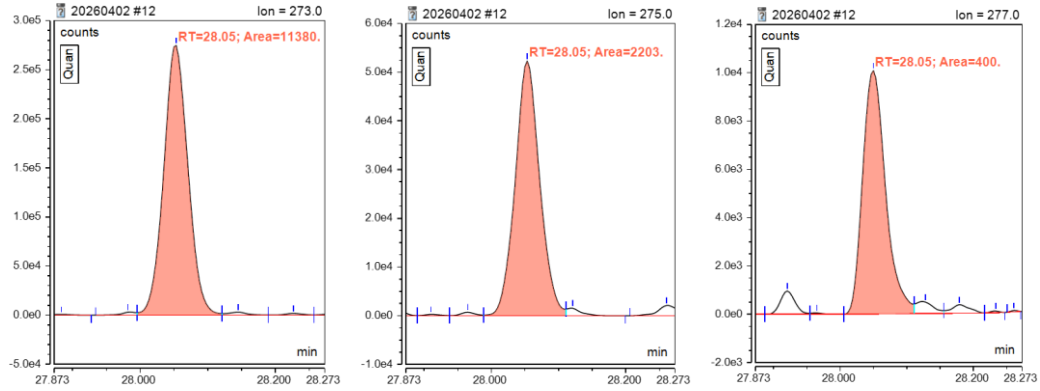
Şekil 4.9. LoVo hücrelerinden elde edilen metabolit ekstraktının 60 dakikalık GC-MS yöntemiyle analizine ait toplam iyon kromatogramı

Kromatogramda farklı alıkonma zamanlarında gözlenen pikler, hücre ekstraktında bulunan ve türevlendirme işlemi sonrasında GC-MS ile ayrılan metabolitleri temsil etmektedir.

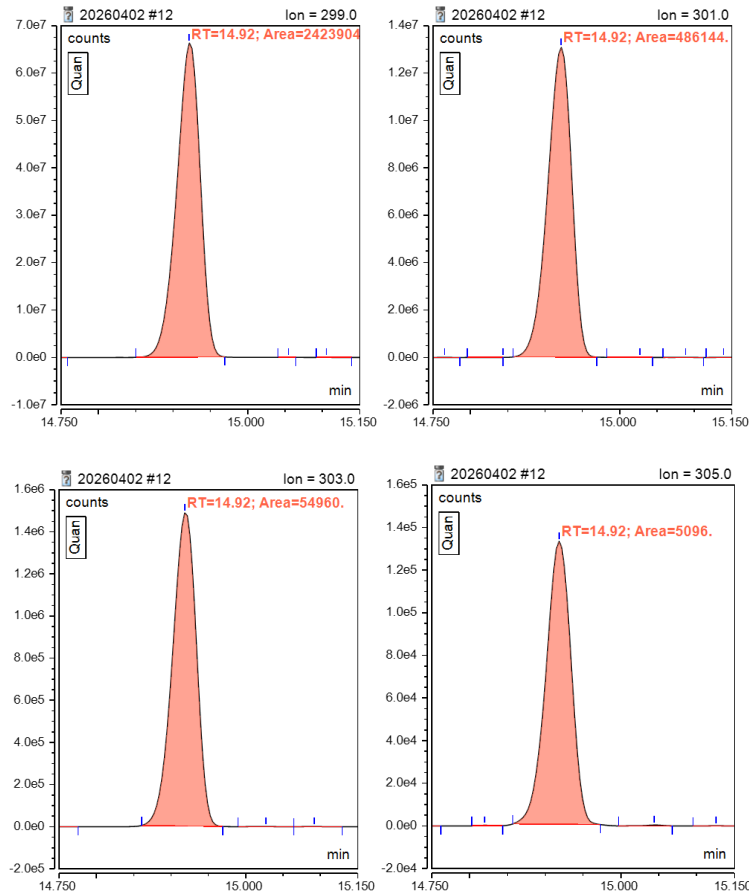
$H_2^{18}O$ işaretlenmesi, metabolitlerin molekül yapılarına ^{18}O atomlarının katılımı sonucunda meydana gelen kütle artışlarının GC-MS analizleri ile izlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu kapsamda her metabolit için işaretlenmemiş (M_0) ve farklı sayılarda ^{18}O içeren izotopologlara ($M_1, M_2, \dots$) ait pik alanları belirlenmiş ve $H_2^{18}O$ işaretlenme yüzdeleri hesaplanmıştır.

İzotop işaretlenmesinin değerlendirilmesine örnek olarak TCA döngüsünden sitrik asit, fosfat metabolitlerinden inorganik fosfat (P_i) ve amino asit metabolizmasından piroglutamata ait seçilmiş iyon kromatogramları ve karşılık gelen kütle spektrumları sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de sunulmuştur. Bu örneklerde inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte işaretlenmemiş izotopologların

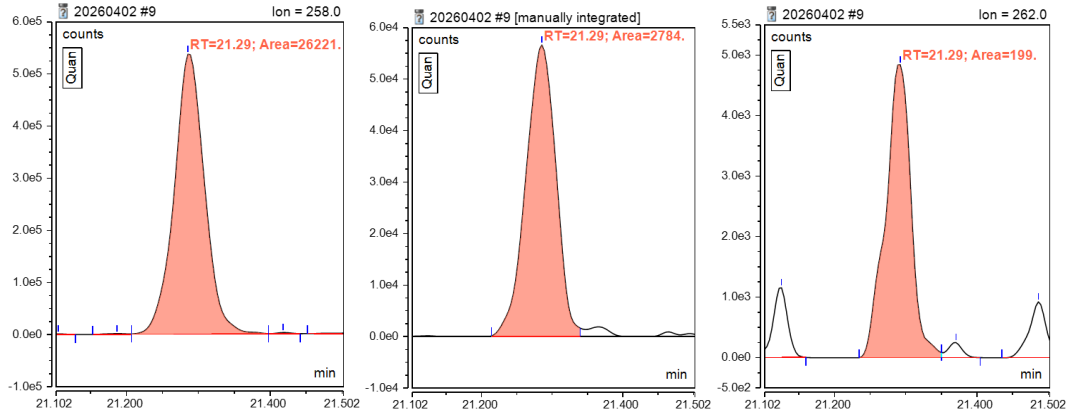
sinyal şiddetlerinin azalırken, ^{18}O içeren izotopologlara ait sinyallerin arttığı gözlenmiştir. Bu değişim, metabolitlerin ilgili metabolik yollardaki dönüşüm dinamiklerinin H_2^{18}O işaretlenmesi kullanılarak izlenebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Sitrik aside ait H_2^{18}O işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve H_2^{18}O katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir



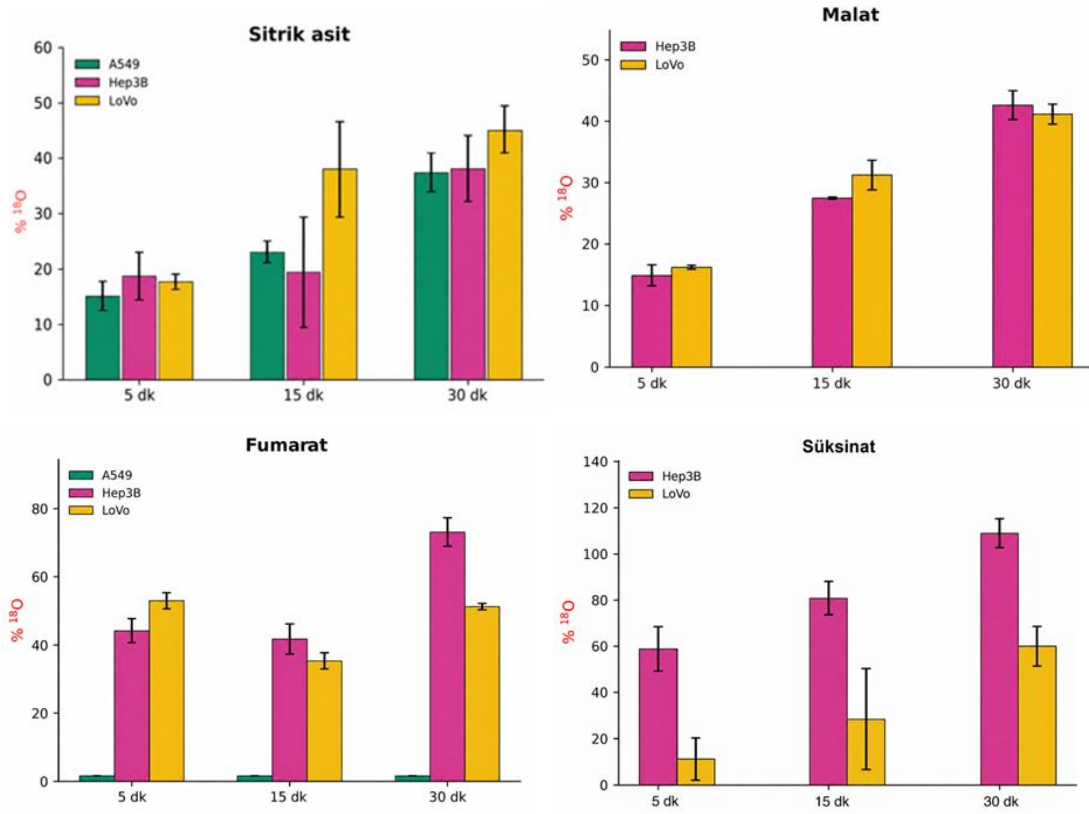
Şekil 4.11. İnorganik fosfata ait H_2^{18}O işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve H_2^{18}O katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir



Şekil 4.12. Piroglutamata ait $H_2^{18}O$ işaretlenmesinin GC-MS seçilmiş iyon kromatogramları ve kütle spektrumları. İşaretlenmemiş (M_0) ve $H_2^{18}O$ katılımı sonucunda oluşan izotopologlara ait pikler gösterilmektedir

4.3.1. TCA Döngüsü İşaretlenmesi

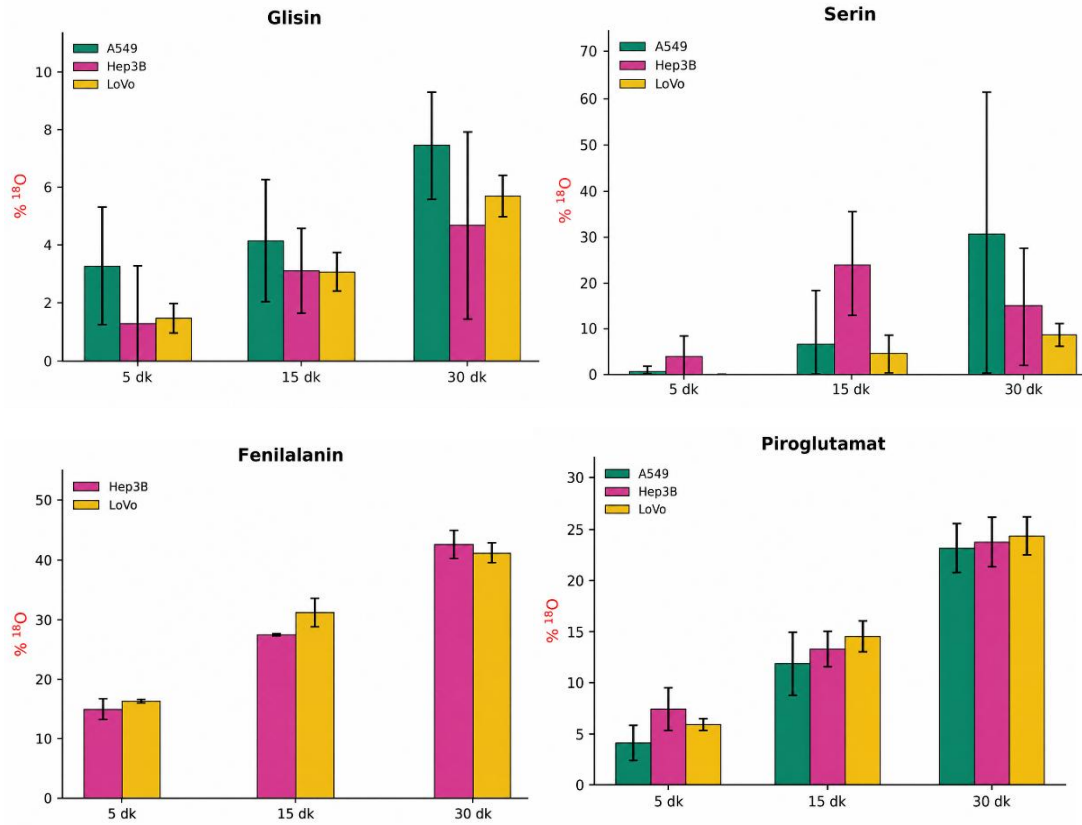
TCA döngüsü metabolitlerine ait $H_2^{18}O$ işaretlenme profilleri Şekil 4.13'te sunulmuştur. Sitrik asitte $H_2^{18}O$ işaretlenmesinin tüm hücre hatlarında inkübasyon süresiyle birlikte arttığı belirlenmiştir. A549 hücrelerinde ortalama işaretlenme yaklaşık %15'ten %37'ye, Hep3B hücrelerinde %19'dan %38'e, LoVo hücrelerinde ise %18'den %45'e yükselmiştir. Malik asitte A549 hücrelerinde işaretlenme gözlenmezken, Hep3B ve LoVo hücrelerinde yaklaşık %15–17 düzeylerinden %41–43 düzeylerine yükselmiştir. Fumaratta A549 hücrelerinde işaretlenme tüm zaman noktalarında yaklaşık %1,6 düzeyinde kalırken, Hep3B hücrelerinde %44'ten %73'e, LoVo hücrelerinde ise yaklaşık %53 düzeyinde seyretmiştir. Süksinatta Hep3B ve LoVo hücrelerinde işaretlenme 30. dakikada sırasıyla yaklaşık %109 ve %60 değerlerine ulaşmıştır.



Şekil 4.13. A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında TCA döngüsü metabolitlerinin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur

4.3.2. Amino Asit Metabolitlerinin İşaretlenmesi

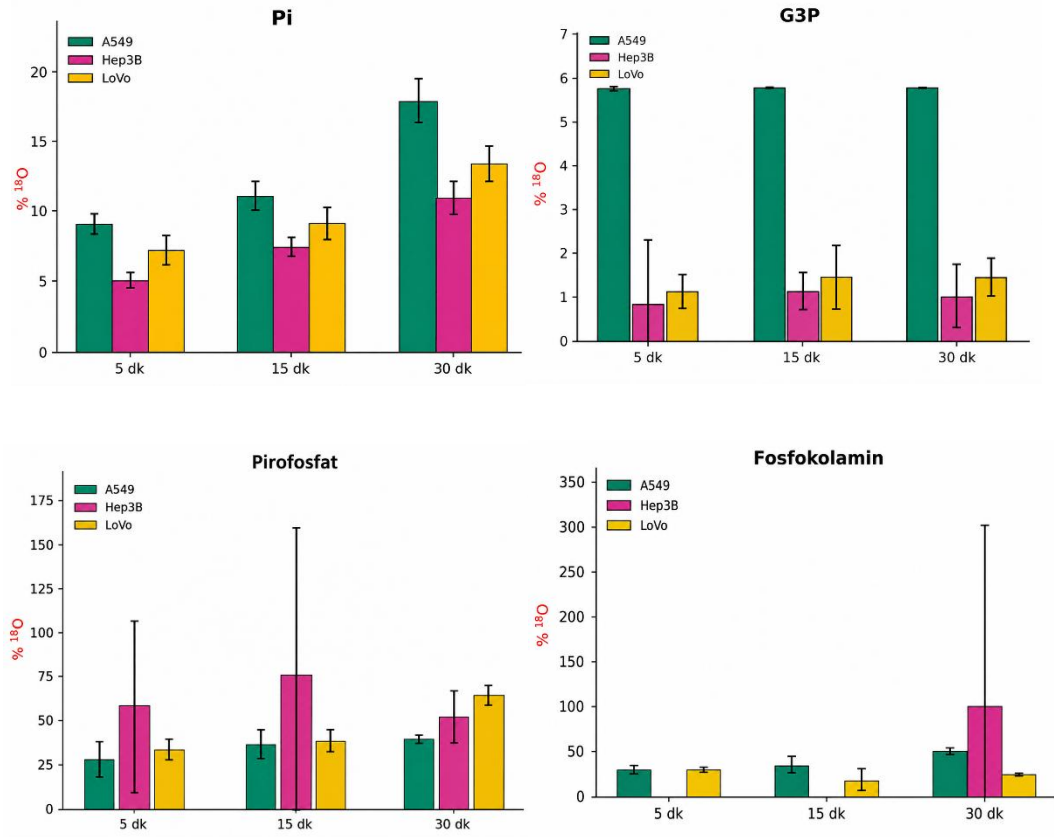
Amino asit metabolitlerine ait $H_2^{18}O$ işaretlenme profilleri Şekil 4.14'te sunulmuştur. Serinde Hep3B ve LoVo hücrelerinde inkübasyon süresine bağlı belirgin artış gözlenirken, A549 hücrelerinde işaretlenme düşük düzeyde kalmıştır. Fenilalaninde A549 hücrelerinde $H_2^{18}O$ işaretlenmesi saptanmazken, Hep3B ve LoVo hücrelerinde işaretlenme 30. dakikada yaklaşık %43 düzeyine ulaşmıştır. Piroglutamatta Hep3B ve LoVo hücrelerinde işaretlenme yaklaşık %24 düzeyine yükselirken, A549 hücrelerinde düşük düzeyde kalmıştır. Glisinde A549 hücreleri özellikle 30. dakikada diğer hücre hatlarına göre daha yüksek işaretlenme göstermiştir.



Şekil 4.14. A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında amino asit metabolitlerinin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur

4.3.3. Fosfat Metabolitleri ve Diğer Metabolitlerin İşaretlenmesi

İnorganik fosfat (Pi), gliserol-3-fosfat, pirofosfat ve O-fosfokolamine ait $H_2^{18}O$ işaretlenme profilleri Şekil 4.15'te sunulmuştur. Gliserol-3-fosfatta (G3P) A549 hücreleri tüm zaman noktalarında Hep3B ve LoVo hücrelerine göre daha yüksek işaretlenme göstermiştir. İnorganik fosfatta A549 hücrelerinde işaretlenme inkübasyon süresiyle birlikte artarken, Hep3B ve LoVo hücrelerinde daha düşük düzeylerde seyretmiştir. Pirofosfatta Hep3B ve LoVo hücrelerinde zamana bağlı artış gözlenmiştir. O-fosfokolaminde A549 hücrelerinde belirgin artış saptanırken, LoVo hücrelerinde orta düzeyde, Hep3B hücrelerinde ise düşük düzeyde işaretlenme belirlenmiştir. Kreatininde $H_2^{18}O$ işaretlenmesi yalnızca LoVo hücrelerinde gözlenmiştir.



Şekil 4.15. A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında fosfat metabolitleri ve diğer metabolitlerin 5., 15. ve 30. dakikalardaki $H_2^{18}O$ işaretlenme düzeyleri. Veriler dört biyolojik tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur

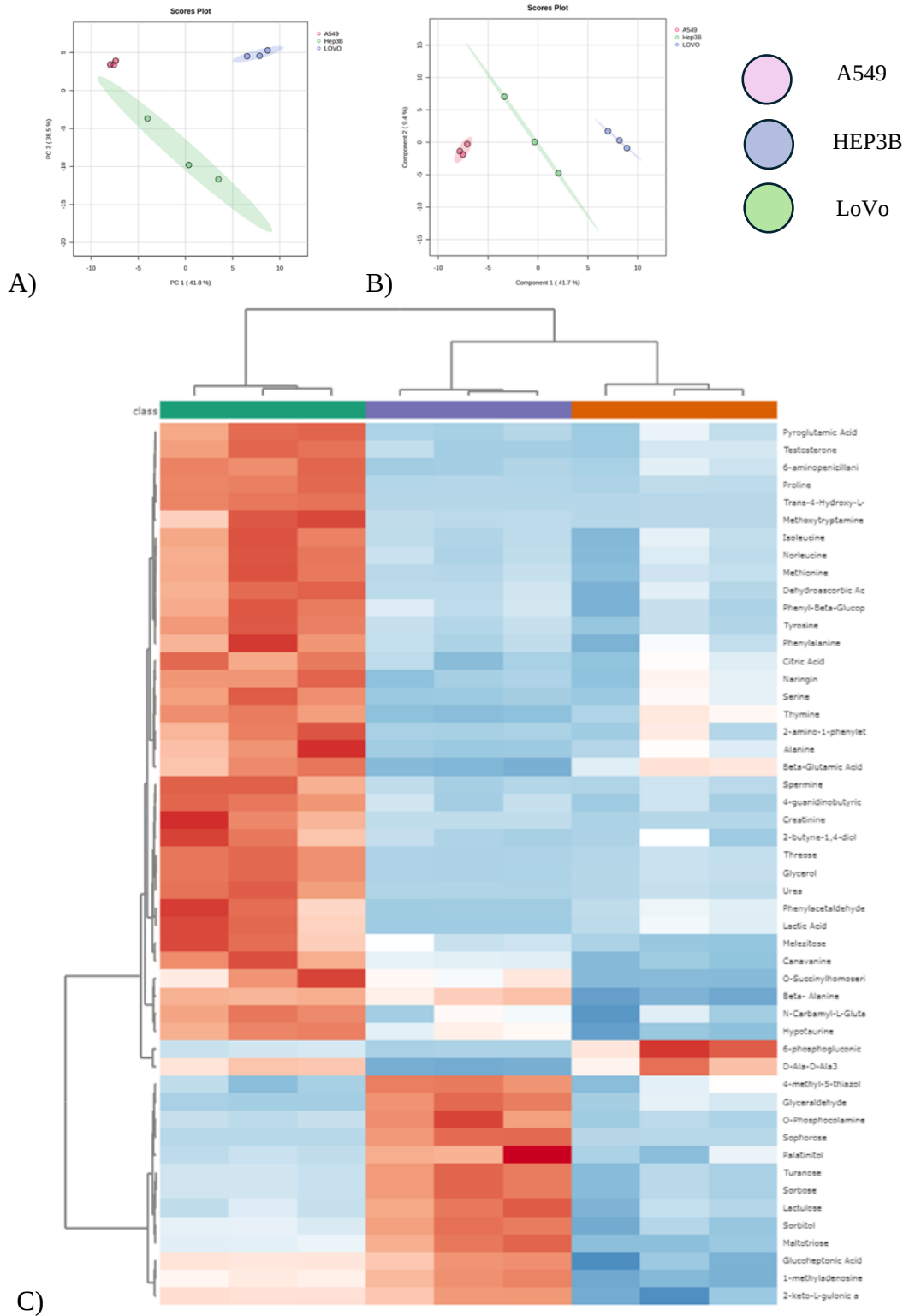
4.4. Metabolomik Analizler

GC-MS ile gerçekleştirilen işaretlenmemiş metabolomik analizler sonucunda A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında 98 metabolit tanımlanmıştır. Tanımlanan metabolitlerin göreceli bollukları kullanılarak hücre hatlarının genel metabolomik profilleri PCA, PLS-DA ve hiyerarşik kümeleme (heatmap) analizleri ile değerlendirilmiştir.

PCA analizinde ilk iki temel bileşen toplam varyansın %80,3'ünü açıklamıştır. PCA skor grafiğinde A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarının metabolomik profillerinin birbirinden ayrıldığı görülmüştür. A549 ve LoVo örnekleri kendi grupları içerisinde birbirine daha yakın konumlanırken, Hep3B örneklerinin daha geniş bir alana dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.16A).

PLS-DA analizinde de üç hücre hattına ait örneklerin birbirinden belirgin şekilde ayrılarak üç ayrı grup oluşturduğu görülmüştür. PLS-DA ile elde edilen grupta, PCA sonuçlarıyla genel olarak uyumlu bulunmuş ve A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarının farklı metabolomik profillere sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.16B).

Isı haritası analizinde, aynı hücre hattına ait biyolojik tekrarların genel olarak birlikte kümelendiği ve metabolitlerin göreceli bolluklarının hücre hatları arasında farklı örüntüler gösterdiği belirlenmiştir. LoVo hücrelerinde belirli bir metabolit grubunun, A549 hücrelerinde ise farklı bir metabolit grubunun daha yüksek göreceli bolluk gösterdiği görülmüştür. Hep3B hücrelerinde birçok metabolitin göreceli bolluğu diğer hücre hatlarına göre daha düşük olmakla birlikte, bazı metabolitlerin daha yüksek göreceli bolluk gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.16C). Bu bulgular, GC-MS ile belirlenen metabolit profillerinin hücre hatlarına özgü farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.16. ^{18}O işaretleme öncesinde elde edilen işaretlenmemiş metabolomik verilere ait (A) temel bileşenler analizi (PCA), (B) kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) ve (C) Isı haritası

5. TARTIŞMA

Metabolomik analizlerde ölçülen metabolit profili yalnızca hücrelerin biyolojik özelliklerini değil, örneklerin toplanması, metabolik reaksiyonların durdurulması, proteinlerin uzaklaştırılması, metabolitlerin tüketilmesi, türevlendirilmesi ve cihaz analizi sırasında uygulanan işlemleri de yansıtmaktadır (45). Hücreler toplandıktan sonra enzimatik reaksiyonların devam etmesi, kararsız metabolitlerin bozunması veya belirli metabolit gruplarının yetersiz tüketilmesi, ölçülen bağıl bollukların örnekleme anındaki hücresel durumu tam olarak temsil etmesini engelleyebilir (46). Bu nedenle tüketme basamağının optimize edilmesi, hücre temelli metabolomik ve izotop işaretleme çalışmalarının analitik güvenilirliğini doğrudan etkileyen temel aşamalardan biridir (47).

Hücre içi metabolitlerin polarite, çözünürlük, kararlılık ve kimyasal yapı bakımından geniş çeşitlilik göstermesi nedeniyle tek bir tüketme yönteminin tüm metabolitler için aynı performansı sağlaması beklenmemektedir. Uygun bir tüketme yönteminin hücre içi reaksiyonları hızlı biçimde durdurması, proteinleri uzaklaştırması, hedef metabolitleri koruması ve kullanılacak analitik platformla uyumlu olması gerekmektedir (48). Bu nedenle yöntem seçimi, tek bir metabolitte elde edilen en yüksek sinyalden çok, çalışmada izlenmesi hedeflenen metabolit gruplarını birlikte temsil etme kapasitesi üzerinden değerlendirilmelidir.

5.1. Tüketme Optimizasyonu

Bu çalışmada üç tüketme yöntemi aynı hücre hattına uygulanmış ve hücre hatlarının biyolojik metabolomik profilleri değil, tüketme yöntemlerinin analitik performansı karşılaştırılmıştır. Özellikle sonraki $H_2^{18}O$ işaretleme çalışmalarında amino asit metabolizması, glikoliz ve TCA döngüsü metabolitlerinin izlenmesi planlandığından, optimizasyon çalışmasının temel değerlendirme ölçütünü bu metabolit gruplarının birlikte ve yeterli düzeyde ölçülebilmesi oluşturmuştur.

Metanol tüketmesinin çok sayıda amino asitte daha yüksek bağıl bolluk sağlaması, bu yöntemin polar ve düşük molekül ağırlıklı hücre içi metabolitlerin tüketilmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Glisin, serin, fenilalanin, izolösin,

valin ve tirozin gibi amino asitlerde metanol ile elde edilen belirgin artış, sonraki işaretleme deneylerinde amino asit metabolizmasının daha geniş kapsamlı izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte glutaminin perklorik asit yöntemiyle, prolin ve metiyoninin ise metanol-perklorik asit yöntemiyle daha yüksek düzeyde ölçülmesi, amino asitlerin tüketme davranışlarının homojen olmadığını göstermektedir. Bu farklılıklar; amino asitlerin polaritesi, asit-baz özellikleri, proteinlerle etkileşimleri, ekstrakt içerisindeki kararlılıkları ve türevlendirme verimleriyle ilişkili olabilir.

Glikoliz ve ilişkili karbonhidrat metabolitlerinde metanolün özellikle glukoz-6-fosfat ve 6-fosfoglukonik asit gibi fosforillenmiş ara ürünlerde daha yüksek bağlı bolluk sağlaması önemlidir. Fosforillenmiş metabolitler hücre toplandıktan sonra devam eden enzimatik reaksiyonlardan hızlı biçimde etkilenebilir. Bu nedenle metanol yöntemiyle elde edilen yüksek değerler, metabolik reaksiyonların daha hızlı sınırlandırılması veya bu bileşiklerin örnek hazırlama sırasında daha iyi korunmasıyla ilişkili olabilir. Bununla birlikte gliseraldehit ve gliserol gibi bazı metabolitlerde metanol-perklorik asit yönteminin daha yüksek değer sağlaması, aynı yolda bulunan metabolitlerin dahi tüketme yöntemlerine farklı yanıt verdiğini göstermektedir.

TCA döngüsü metabolitleri bakımından α -ketoglutarat, fumarat ve malatta metanol tüketme yönteminin öne çıkması, bu yöntemin merkezi karbon metabolizmasının değerlendirilmesi açısından avantajlı olduğunu göstermektedir. Süksinatta da metanol daha yüksek ortalama değer sağlamış, ancak perklorik asit yöntemiyle arasındaki fark biyolojik değişkenlik nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Sitrik asitte en yüksek ortalama değer perklorik asit yöntemiyle elde edilmesi ise tek bir TCA döngüsü ara ürünü üzerinden yöntem seçiminin uygun olmayacağını ortaya koymaktadır. TCA döngüsünün değerlendirilmesinde bir metabolitin maksimum geri kazanımından çok, α -ketoglutarat, fumarat, malat, süksinat ve sitrat gibi birden fazla ara ürünün birlikte ölçülebilmesi daha önemlidir.

Yağ asitlerinde metanol-perklorik asit yönteminin daha yüksek bağlı bolluk sağlaması, metanolün bütün metabolit sınıflarında en iyi yöntem olmadığını açıkça göstermektedir. Bununla birlikte bu çalışmanın temel amacı kapsamlı bir lipidomik profil oluşturmak değil, $H_2^{18}O$ işaretleme ile izlenecek merkezi karbon metabolizması ve amino asit metabolizması metabolitlerini güvenilir biçimde ölçmektir. Bu nedenle

yağ asitlerinde gözlenen üstünlük, yöntem seçiminde ikincil bir ölçüt olarak değerlendirilmiştir.

Fosfat içeren metabolitlerden pirofosfat ve O-fosfokolaminde metanol tüketim yöntemiyle belirgin biçimde daha yüksek bağıl bolluk elde edilmesi, çalışmanın sonraki aşamaları açısından ayrıca önem taşımaktadır. $H_2^{18}O$ işaretleme yaklaşımında fosfat dönüşümlerinin izlenmesi planlandığından, bu bileşiklerin metanol yöntemiyle yüksek ve tekrarlanabilir sinyal vermesi yöntem seçimini destekleyen ek bir bulgudur.

Metanolün genel olarak uygun sonuçlar sağlaması, hücre içi enzimatik reaksiyonları hızlı biçimde sınırlandırması ve protein çökmesini desteklemesiyle ilişkili olabilir (49). Soğuk metanol uygulanması, örnek toplandıktan sonra devam edebilecek hızlı metabolik dönüşümlerin azaltılmasına ve hücre içi metabolit profilinin korunmasına katkı sağlayabilir (50). Metanolün uçucu olması, ekstraktın kurutulmasını kolaylaştırarak GC-MS öncesinde metoksimasyon ve trimetilsililasyon için uygun kuru kalıntının elde edilmesine katkı sağlamaktadır (51).

Bununla birlikte elde edilen bağıl bolluk değerlerinin yalnızca tüketme geri kazanımını yansıtmadığı dikkate alınmalıdır. Ölçülen sinyal; tüketme veriminin yanı sıra metabolitin ekstrakt içerisindeki kararlılığından, türevlendirme etkinliğinden, matriks etkilerinden ve kütle spektrometrik yanıtından da etkilenebilir (52). Bu nedenle sonuçlar mutlak geri kazanım değerleri olarak değil, aynı hücre örneği ve aynı GC-MS koşulları altında üç yöntemin karşılaştırmalı performansı olarak yorumlanmalıdır.

Sonuç olarak metanol-perklorik asit ve perklorik asit yöntemlerinin belirli metabolitlerde avantaj sağladığı görülmekle birlikte, metanol tüketim yöntemi amino asitlerin büyük bir bölümünde, fosforillenmiş şekerlerde, TCA döngüsünün çok sayıda ara ürününde ve fosfat içeren bazı metabolitlerde daha yüksek ve daha dengeli bağıl bolluklar sağlamıştır. Bu nedenle metanol tüketim yönteminin seçimi, tüm metabolitlerde en yüksek sinyali vermesine değil, sonraki $H_2^{18}O$ işaretleme çalışmalarında izlenmesi hedeflenen amino asit metabolizması, glikoliz ve TCA döngüsünü birlikte temsil etme kapasitesine dayandırılmıştır. Uygulama kolaylığı, hızlı protein çöktürme özelliği ve GC-MS türevlendirme basamaklarıyla uyumu da

dikkate alınarak metanol tüketimi, bu çalışmanın hedef metabolit paneli için en uygun genel örnek hazırlama yöntemi olarak belirlenmiştir.

5.2. $H_2^{18}O$ Tabanlı Fluksomik Analizler

Metabolomik analizler, hücrelerin belirli bir zaman noktasındaki metabolit profillerini ortaya koyarak metabolik durum hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bununla birlikte metabolit bollukları, bu metabolitlerin hangi hızlarda sentezlendiği ve tüketildiği hakkında doğrudan bilgi vermemektedir. Aynı metabolit düzeyi farklı hücrelerde farklı metabolik akışların sonucu olabileceğinden, metabolik fenotipin doğru değerlendirilmesi için metabolit havuzlarının zamana bağlı yenilenme dinamiklerinin de incelenmesi gerekmektedir. İzotop işaretleme yaklaşımları bu amaçla yaygın olarak kullanılmakta olup, $H_2^{18}O$ işaretleme yöntemi su molekülünün çok sayıda metabolik reaksiyona katılması sayesinde belirli bir metabolik öncüle bağımlı olmaksızın farklı metabolik yolların dinamik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle $H_2^{18}O$ tabanlı analizler, klasik metabolomik yaklaşımları tamamlayan önemli bir fluksomik araç olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada optimize edilen metanol temelli tüketim yöntemi $H_2^{18}O$ izotop işaretleme ile birleştirilmiş ve A549, Hep3B ve LoVo hücre hatlarında seçilmiş metabolitlerin zamana bağlı işaretlenme profilleri GC-MS kullanılarak değerlendirilmiştir. Hesaplanan işaretlenme değerleri mutlak metabolik akışları değil, metabolit havuzlarının göreceli $H_2^{18}O$ katılımını temsil etmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar, hücre hatları arasındaki metabolik organizasyondaki farklılıkları ortaya koyan göreceli metabolik göstergeler olarak değerlendirilmiştir.

5.2.1. TCA Döngüsü Metabolitlerinin $H_2^{18}O$ İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi

TCA döngüsü, enerji metabolizmasının yanı sıra amino asit, lipid ve nükleotid biyosentezi için gerekli ara metabolitleri sağlayan merkezi bir metabolik ağıdır. Kanser hücrelerinde ise TCA döngüsü yalnızca ATP üretimini desteklememekte; glutaminoliz ve diğer anaplerotik reaksiyonlarla sürekli yeniden şekillenmektedir. Bu nedenle TCA

metabolitlerinde gözlenen $H_2^{18}O$ işaretlenmesi yalnızca döngü aktivitesini değil, merkezi karbon metabolizmasının genel dinamiklerini de yansıtmaktadır (35).

Sitrik asitte üç hücre hattında da işaretlenmenin inkübasyon süresince artması, sitrat havuzunun aktif olarak yenilendiğini göstermektedir. Ortalama işaretlenmenin A549 hücrelerinde yaklaşık %15'ten %37'ye, Hep3B hücrelerinde %19'dan %38'e ve LoVo hücrelerinde %18'den %45'e yükselmesi, göreceli metabolik yenilenmenin özellikle LoVo hücrelerinde daha belirgin olduğunu düşündürmektedir. Sitrat, yalnızca TCA döngüsünün ilk ara ürünü olmayıp lipogenez ve asetil-KoA metabolizmasının da önemli bir bileşeni olduğundan, bu metabolitte gözlenen yüksek işaretlenme enerji metabolizması ile biyosentetik süreçlerin birlikte düzenlendiğini göstermektedir (53). Benzer şekilde kanser hücrelerinde sitrat havuzunun dinamik olarak yenilenmesinin proliferatif metabolizmanın önemli özelliklerinden biri olduğu bildirilmektedir (36).

Malat ve fumarat, hücre hatları arasında en belirgin farklılık gösteren metabolitler olmuştur. Hep3B ve LoVo hücrelerinde malat işaretlenmesi yaklaşık %15–17 düzeylerinden %41–43 seviyelerine yükselirken, A549 hücrelerinde anlamlı bir işaretlenme belirlenmemiştir. Benzer şekilde fumaratta A549 hücrelerinde işaretlenme tüm zaman noktalarında yaklaşık %1,6 düzeyinde kalırken, Hep3B hücrelerinde %44'ten %73'e yükselmiş, LoVo hücrelerinde ise başlangıçta yüksek olan işaretlenme deney süresince büyük ölçüde korunmuştur. Bu bulgular, Hep3B ve LoVo hücrelerinde TCA ara metabolit havuzlarının daha dinamik yenilendiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte malat ve fumarat düzeyleri yalnızca TCA döngüsünden değil, glutaminoliz, malat-aspartat şantı ve diğer anaplerotik reaksiyonlardan da etkilendiğinden, gözlenen farklılıkların merkezi karbon metabolizmasının bütüncül yeniden programlanmasının bir sonucu olduğu değerlendirilmektedir (37).

Süksinat, çalışmada en yüksek göreceli işaretlenmenin gözleendiği metabolitlerden biri olmuştur. Hep3B hücrelerinde yaklaşık %109, LoVo hücrelerinde ise yaklaşık %60 düzeyinde hesaplanan göreceli işaretlenme, süksinat havuzunun bu hücrelerde oldukça dinamik olduğunu göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, sitrat, malat, fumarat ve süksinatta Hep3B ve LoVo hücreleri A549 hücrelerine göre daha yüksek $H_2^{18}O$ katılımı göstermiştir. Bu bulgu, söz konusu hücrelerde TCA ara metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerinin daha belirgin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu metabolitler glutamin metabolizması, amino asit katabolizması ve diğer anaplerotik süreçlerden de etkilendiği için, gözlenen işaretlenme yalnızca TCA döngüsünün aktivitesini değil, merkezi karbon metabolizmasının genel yeniden programlanmasını yansıtmaktadır. Bu sonuçlar, farklı kanser hücre hatlarının enerji üretimi ve biyosentetik gereksinimlerini farklı metabolik stratejilerle karşıladığını göstermektedir (38).

5.2.2. Amino Asit Metabolitlerinin $H_2^{18}O$ İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi

Amino asit metabolizması, kanser hücrelerinde yalnızca protein sentezini desteklemekle kalmayıp enerji üretimi, nükleotid biyosentezi ve redoks homeostazının sürdürülmesinde de önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle amino asitlerde gözlenen $H_2^{18}O$ işaretlenme profilleri, hücrelerin metabolik gereksinimlerine bağlı olarak amino asit havuzlarının yenilenme dinamikleri hakkında bilgi sağlamaktadır (39).

Fenilalaninde A549 hücrelerinde anlamlı bir işaretlenme belirlenmezken, Hep3B ve LoVo hücrelerinde işaretlenmenin yaklaşık %15 düzeylerinden %40'ın üzerine yükselmesi, fenilalanin havuzunun bu hücrelerde daha dinamik yenilendiğini düşündürmektedir. Fenilalanin memeli hücrelerinde sentezlenemeyen esansiyel bir amino asit olduğundan, gözlenen işaretlenmenin de novo biyosentezi değil, protein döngüsü ve amino asit havuzundaki dönüşüm süreçlerini yansıttığı değerlendirilmektedir. Kanser hücrelerinde artmış protein döngüsünün amino asit metabolizmasının yeniden programlanmasına katkı sağladığı bilinmektedir ve elde edilen bulgular bu görüşü desteklemektedir (40).

Serinde Hep3B ve LoVo hücrelerinde zamana bağlı olarak artan işaretlenme, bu hücrelerde serin havuzunun daha dinamik olduğunu göstermektedir. Serin, glikoliz ile tek karbon metabolizması arasında önemli bir bağlantı oluşturduğundan, bu bulgu proliferasyon sırasında artan biyosentetik gereksinimlerle ilişkili olabilir. Son yıllarda özellikle hızlı çoğalan tümör hücrelerinde serin-glisin metabolizmasının yeniden

programlandığı ve nükleotid sentezini desteklediği gösterilmiştir (41). Bununla birlikte $H_2^{18}O$ işaretlenmesi serin sentez hızını değil, serin havuzunun göreceli yenilenmesini yansıttığından sonuçlar bu kapsamda değerlendirilmelidir.

Piroglutamatta Hep3B ve LoVo hücrelerinde zamanla artan işaretlenme, glutatyon metabolizmasının bu hücrelerde daha dinamik olabileceğini düşündürmektedir. Piroglutamat, γ -glutamil döngüsünün önemli ara ürünlerinden biri olup hücrel redoks dengesinin korunmasıyla yakından ilişkilidir. Kanseri hücrelerinde artmış oksidatif stres nedeniyle glutatyon metabolizmasının yeniden düzenlendiği bilinmektedir (54). Ancak piroglutamatın örnek hazırlama sırasında glutamin veya glutamattan oluşabilmesi olasılığı da göz önünde bulundurulmalı ve sonuçlar bu analitik sınırlama dikkate alınarak yorumlanmalıdır (42).

Diğer amino asitlerden farklı olarak glisin en yüksek işaretlenme A549 hücrelerinde belirlenmiştir. Glisinin serin metabolizması, tek karbon metabolizması ve glutatyon sentezi ile yakın ilişkisi dikkate alındığında, bu bulgu A549 hücrelerinde bu metabolik ağların farklı şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir.

Genel olarak amino asit metabolitlerinde gözlenen $H_2^{18}O$ işaretlenme örüntüleri, üç hücre hattının amino asit metabolizmasını farklı biyosentetik gereksinimlere göre yeniden düzenlediğini göstermektedir. Hep3B ve LoVo hücrelerinde fenilalanin, serin ve piroglutamatta daha yüksek göreceli katılım belirlenirken, A549 hücrelerinde glisin metabolizmasının farklılaştığı görülmüştür. Bu bulgular, amino asit metabolitlerinin göreceli yenilenme dinamiklerinin hücre hatları arasında farklılık gösterdiğini desteklemektedir.

5.2.3. Fosfat ve Glikolizle İlişkili Metabolitlerin $H_2^{18}O$ İşaretlenme Profillerinin Değerlendirilmesi

Fosfat metabolitleri, glikoliz, ATP metabolizması, nükleotid biyosentezi ve fosfolipid sentezi gibi temel hücrel süreçlerin merkezinde yer almaktadır. $H_2^{18}O$ işaretleme yaklaşımı, fosforilasyon ve hidroliz reaksiyonları sırasında gerçekleşen oksijen değişimini izleyerek bu metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (43).

A549 hücrelerinde G3P, inorganik fosfat ve O-fosfokolaminde diğer hücre hatlarına göre daha yüksek $H_2^{18}O$ katılımı belirlenmiştir. Özellikle inorganik fosfatta işaretlenmenin yaklaşık %9'dan %18'e yükselmesi, fosfat dönüşüm reaksiyonlarının deney süresince devam ettiğini göstermektedir. Hep3B ve LoVo hücrelerinde ise 30. dakikada sırasıyla yaklaşık %11 ve %13 düzeyinde işaretlenme belirlenmiştir. G3P'de zamanla belirgin bir artış izlenmemesi ise metabolit havuzunun inkübasyonun erken döneminde hızla işaretlenerek göreceli dengeye ulaşmış olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte bu sonuçlar sadece glikolitik akışın arttığını göstermemekte, glikoliz ile ilişkili fosfat metabolitlerinin göreceli yenilenme dinamiklerini yansıtmaktadır.

Pirofosfatta Hep3B ve LoVo hücrelerinde gözlenen artan işaretlenme, pirofosfat havuzunun bu hücrelerde daha dinamik bir yenilenme gösterdiğini düşündürmektedir. Benzer şekilde A549 hücrelerinde O-fosfokolamin işaretlenmesinin daha yüksek olması, fosfolipid metabolizmasının farklı şekilde düzenlendiğine işaret etmektedir. O-fosfokolamin, Kennedy yolunun temel ara ürünlerinden biri olup birçok kanser türünde artmış membran biyosentezi ile ilişkilendirilmektedir (55). Bununla birlikte $H_2^{18}O$ katılımı fosfolipid sentez hızını doğrudan göstermediğinden, elde edilen bulgular fosfolipid metabolizmasının göreceli dinamizmi olarak değerlendirilmelidir (44).

Genel olarak değerlendirildiğinde, A549 hücrelerinde glikoliz ve fosfat metabolizması ile ilişkili metabolitlerde daha yüksek $H_2^{18}O$ katılımı gözlenirken, Hep3B ve LoVo hücrelerinde TCA döngüsü ve amino asit metabolizmasında daha belirgin işaretlenme elde edilmiştir. Bu sonuçlar, üç hücre hattı arasında enerji metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin göreceli yenilenme dinamiklerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte $H_2^{18}O$ işaretleme metabolik yolların mutlak akış hızlarını değil, metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerini yansıttığından, sonuçlar metabolik organizasyondaki farklılıkların göreceli göstergeleri olarak değerlendirilmelidir.

5.3. Metabolomik Analizler

PCA analizinde ilk iki temel bileşen toplam varyansın %80,3'ünü açıklamıştır. A549, Hep3B ve LoVo örneklerinin farklı bölgelerde kümelenmesi, hücre hatlarının hedeflenmemiş metabolit profilleri bakımından birbirinden ayrıldığını göstermektedir. A549 ve LoVo tekrarlarının daha kompakt kümelenmesi bu gruplarda daha düşük grup içi değişkenliğe işaret ederken, Hep3B örneklerinde daha geniş bir dağılım gözlenmiştir.

Denetimli bir yöntem olan PLS-DA analizinde de üç hücre hattı birbirinden ayrılmıştır. Bu ayırım, hücre hatlarının metabolit profillerinin sistematik olarak farklılaştığını desteklemektedir. PCA'da gözlenen doğal kümelenmenin PLS-DA analizinde de korunması, farklılığın yalnızca modele bağlı yapay bir ayırım olmadığını düşündürmektedir.

Isı haritası grafiğinde aynı hücre hattına ait biyolojik tekrarların genel olarak birlikte kümelendiği görülmüştür. Metabolitlerin göreceli bolluk örüntüleri hücre hatlarına göre farklılaşmıştır. LoVo hücrelerinde belirli bir metabolit kümesinin daha yüksek olduğu, A549 hücrelerinde ise farklı bir metabolit grubunun öne çıktığı görülmüştür. Hep3B örnekleri birçok metabolit bakımından daha düşük göreceli bolluk gösterirken, bazı metabolitlerde seçici artışlar sergilemiştir. Bu bulgular, farklı doku kökenlerine sahip hücrelerin metabolik profillerinin birbirinden farklı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, A549 hücrelerinde farklı tüketme yöntemlerinin metabolomik profiller üzerindeki etkileri değerlendirilmiş; ardından seçilen örnek hazırlama yöntemi kullanılarak A549, Hep3B ve LoVo kanser hücre hatlarında $H_2^{18}O$ temelli işaretlenme dinamikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında metabolit tüketimi için farklı yöntemler karşılaştırılmış ve GC-MS analizleri için optimize edilen metanol temelli tüketme yöntemi belirlenmiştir. Geliştirilen örnek hazırlama yaklaşımı daha sonra $H_2^{18}O$ tabanlı izotop işaretleme çalışmalarına uygulanarak aynı analitik platform üzerinde metabolit profilleri ile metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerinin birlikte değerlendirilmesi sağlanmıştır.

Metabolomik analizler, A549 hücrelerinde kullanılan farklı tüketme yöntemlerinin ölçülen metabolitlerin göreceli bollukları ve genel metabolomik profilleri üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Özellikle merkezi karbon metabolizması, amino asit metabolizması ve fosfat metabolizması ile ilişkili metabolitlerde gözlenen göreceli bolluk farklılıkları, kullanılan tüketme yönteminin ölçülen metabolit profilleri üzerinde belirgin bir etkisi bulunduğunu göstermiştir. $H_2^{18}O$ temelli fluksomik analizler ise seçilmiş metabolitlerin zamana bağlı göreceli işaretlenme profillerinin metabolite ve hücre hattına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur. TCA döngüsü metabolitlerinde Hep3B ve LoVo hücrelerinde daha yüksek göreceli $H_2^{18}O$ katılımı belirlenirken, A549 hücrelerinde glikoliz ve fosfat metabolizması ile ilişkili metabolitlerde daha belirgin işaretlenme profilleri elde edilmiştir. Amino asit metabolitlerinde gözlenen hücre hattına özgü işaretlenme örüntüleri, amino asit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerinin A549, Hep3B ve LoVo hücreleri arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, ortak metabolik yollarla ilişkili metabolitlerin $H_2^{18}O$ işaretlenme ve göreceli yenilenme dinamiklerinin farklı kanser hücre hatları arasında değişebildiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın en önemli katkılarından biri, $H_2^{18}O$ temelli izotop işaretleme yaklaşımının kanser hücrelerinde metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerinin değerlendirilmesinde uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermesidir. Metabolomik örnek hazırlama optimizasyonunun $H_2^{18}O$ işaretleme

yaklaşımıyla birlikte kullanılması, aynı GC-MS platformunda hem metabolit profillerinin hem de seçilmiş metabolitlerin göreceli yenilenme dinamiklerinin değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Bu yaklaşım, metabolit profillerine ilişkin statik bilgilerin $H_2^{18}O$ işaretlenmesinden elde edilen göreceli yenilenme dinamikleriyle birlikte yorumlanabilmesine katkı sağlamıştır.

Bununla birlikte çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. $H_2^{18}O$ işaretleme yaklaşımı metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerini ortaya koymasına rağmen mutlak metabolik akışların belirlenmesine olanak sağlamamaktadır. Ayrıca değerlendirmelerin yalnızca 5., 15. ve 30. dakika zaman noktaları ile sınırlı olması, metabolik dönüşümlerin daha uzun zaman aralıklarındaki kinetiğinin incelenmesini sınırlandırmıştır. Ayrıca metabolit pik alanlarının toplam protein miktarına göre normalize edilmemiş olması, tüketme yöntemleri arasındaki karşılaştırmaların göreceli metabolit bollukları üzerinden değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bazı metabolitlerde gözlenen yüksek biyolojik değişkenlik ve göreceli işaretlenme değerleri de sonuçların dikkatli yorumlanmasını gerektirmektedir. Bu nedenle elde edilen bulgular, metabolik yolların mutlak aktivitesinden ziyade metabolit havuzlarının göreceli yenilenme dinamiklerini yansıtan göstergeler olarak değerlendirilmelidir.

Gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda daha sık örnekleme zamanlarının kullanılması, daha geniş metabolit panellerinin incelenmesi ve $H_2^{18}O$ yaklaşımının ^{13}C ve ^{15}N gibi diğer kararlı izotop işaretleme stratejileri ile birlikte uygulanması, metabolik ağların daha ayrıntılı karakterize edilmesine katkı sağlayacaktır. Daha ayrıntılı zaman serilerinin kinetik modelleme yaklaşımlarıyla değerlendirilmesi, metabolit havuzlarının yenilenme dinamiklerinin nicel olarak karakterize edilmesine katkı sağlayabilir. Bunun yanı sıra metabolomik ve fluksomik verilerin transkriptomik, proteomik ve enzim aktivitesi analizleri ile bütünleştirilmesi, kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlanmanın moleküler mekanizmalarının daha kapsamlı olarak açıklanmasına olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma, optimize edilen metanol temelli tüketme yönteminin GC-MS tabanlı metabolomik analizler için uygun olduğunu ve aynı örnek hazırlama yaklaşımının $H_2^{18}O$ işaretleme çalışmalarında uygulanabildiğini göstermiştir.

Metabolomik örnek hazırlama sonuçları ile $H_2^{18}O$ işaretleme bulgularının tamamlayıcı biçimde değerlendirilmesi, çalışmada metabolit profilleri ile göreceli yenilenme dinamiklerinin farklı yönlerden incelenmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen bulgular, $H_2^{18}O$ tabanlı fluksomik yaklaşımın metabolomik çalışmaları tamamlayan uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermekte ve gelecekte gerçekleştirilecek metabolik akış analizleri ile çoklu omik çalışmalar için metodolojik bir temel oluşturmaktadır. Bu yaklaşımın, kanser hücrelerindeki metabolik dinamiklerin daha ayrıntılı incelenmesine ve gelecekte yürütülecek metabolizma temelli araştırmalara katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144 (5):646-674.
2. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324 (5930):1029-1033.
3. Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*. 2016;23 (1):27-47.
4. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29 (11):1181-1189.
5. Buescher JM, Antoniewicz MR, Boros LG, Burgess SC, Brunengraber H, Clish CB, et al. A roadmap for interpreting ¹³C metabolite labeling patterns from cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;34:189-201.
6. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and isotope tracing. *Cell*. 2018;173 (4):822-837.
7. Bray F, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74 (3):229-263.
8. He J, et al. Drug tolerant persister cell plasticity in cancer: a revolutionary strategy for more effective anticancer therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9 (1):209.
9. Fendt SM, et al. Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *Cancer Discov*. 2020;10 (12):1797-1807.
10. Stine ZE, et al. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21 (2):141-162.
11. American Cancer Society. Key statistics for colorectal cancer [Internet]. 2026 [cited 2026 Aug 15]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>
12. Gold A, Modak AS, Batra D, Cendes F. The application of metabolomics in recent colorectal cancer studies: a state-of-the-art review. *Cancers (Basel)*. 2022;14 (3):725.
13. Liang S, et al. Metabolomics analysis and diagnosis of lung cancer: insights from diverse sample types. *Int J Med Sci*. 2024;21 (2):234-249.
14. Kannampuzha S, et al. A systematic role of metabolomics, metabolic pathways, and chemical metabolism in lung cancer. *Vaccines (Basel)*. 2023;11 (2):381.
15. Feng F, Zhao Y. Hepatocellular carcinoma: prevention, diagnosis, and treatment. *Med Princ Pract*. 2024;33 (5):414-423.

16. Menyhárt O, Györfy B. Multi-omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:949-960.
17. Danzi F, et al. To metabolomics and beyond: a technological portfolio to investigate cancer metabolism. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8 (1):137.
18. Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med*. 2013;5 (9):7.
19. Nemutlu E, et al. 18O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croat Med J*. 2012;53 (6):529-534.
20. Lowe R, et al. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*. 2017;13:e1005457.
21. Jiang Y, Rex DAB, Schuster D, Neely BA, Rosano GL, Volkmar N, et al. Comprehensive overview of bottom-up proteomics using mass spectrometry. *ACS Meas Sci Au*. 2024;4 (4):338-417.
22. Institute of Medicine. Evolution of translational omics: lessons learned and the path forward. Washington (DC): The National Academies Press; 2012.
23. Massa C, Seliger B. Combination of multiple omics techniques for a personalized therapy or treatment selection. *Front Immunol*. 2023;14:1258013.
24. Kim IY, et al. Tracing metabolic flux in vivo: basic model structures of tracer methodology. *Exp Mol Med*. 2022;54 (9):1311-1322.
25. Özen G. Metabolomik ve fluksomik çalışmalar ile kolon kanserinde kemoterapötiklere karşı direncin in vitro değerlendirilmesi [doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2019.
26. Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2015;1 (1):a000588.
27. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*. 2007;2 (11):2692-2703.
28. Hajnajafi K, Iqbal MA. Mass spectrometry-based metabolomics: an overview of workflows, strategies, data analysis and applications. *Proteome Sci*. 2025;23 (1):5.
29. Nemutlu E, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 18O-assisted 31P NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics*. 2012;44 (7):386-402.
30. Ruiz-Perez D, Guan H, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*. 2020;21 (Suppl 1):2.
31. van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 2006;7:142. doi:10.1186/1471-2164-7-142.

32. Emwas AHM, Szczepski K, Al-Younis I, Lachowicz JI, Jaremko M. Fluxomics—new metabolomics approaches to monitor metabolic pathways. *Front Pharmacol*. 2022;13:805782.
33. Eylem CC, et al. Gas chromatography–mass spectrometry-based ^{18}O stable isotope labeling of Krebs cycle intermediates. *Anal Chim Acta*. 2021;1154:338325.
34. Nemutlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dzeja PP, Terzic A. Electrospray ionization mass spectrometry and 2D ^{31}P NMR for monitoring $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403 (3):697-706.
35. Anderson NM, et al. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. 2018;9 (2):216-237.
36. Gupta R, Gupta N. Tricarboxylic acid cycle. In: *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*. 2021. p. 327-346.
37. Hou E, Li X, Liu Z, Zhang F, Tian Z. Combined metabolomic and correlation networks analyses reveal fumarase insufficiency altered amino acid metabolism. *Biomed Chromatogr*. 2018;32 (4):e4133.
38. Zhang BH, Yue HY. Reprogramming of energy metabolism in cancer. *Tumor*. 2014;34 (12):1157-1160.
39. Muhammad N, Lee HM, Kim J. Oncology therapeutics targeting the metabolism of amino acids. *Cells*. 2020;9 (8):1904.
40. Liu X, Ren B, Ren J, Gu M, You L, Zhao Y. The significant role of amino acid metabolic reprogramming in cancer. *Cell Commun Signal*. 2024;22 (1):380.
41. Sun W, et al. Target enzymes in serine-glycine-one-carbon metabolic pathway for cancer therapy. *Int J Cancer*. 2023;152 (12):2446-2463.
42. Harris IS, et al. Deubiquitinases maintain protein homeostasis and survival of cancer cells upon glutathione depletion. *Cell Metab*. 2019;29 (5):1166-1181.e6.
43. Zhang P, et al. Challenges and possibilities for the qualitative and quantitative analysis of phosphate metabolites. *Trends Anal Chem*. 2024;180:117909.
44. Li L, Huang Y, Gui Y, Xiang W, Yang M, Hou Y, et al. The role of phosphatidylcholine metabolism in tumors. *Med Oncol*. 2025;42 (10):450
45. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis*. 2013;34 (19):2762-75
46. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Anal Biochem*. 2010;404 (2):155-64
47. Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods*. 2021;18 (7):747-56

48. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:277-304.
49. Dettmer K, Nürnberger N, Kaspar H, Gruber MA, Almstetter MF, Oefner PJ. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399 (3):1127-39.
50. Kapoore RV, Coyle R, Staton CA, Brown NJ, Vaidyanathan S. Influence of washing and quenching in profiling the metabolome of adherent mammalian cells: a case study with the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Analyst.* 2017;142 (11):2038-49.
51. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot.* 2005;56 (410):219-43.
52. Koek MM, Jellema RH, van der Greef J, Tas AC, Hankemeier T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics.* 2011;7 (3):307-28
53. Icard P, Coquerel A, Wu Z, Gligorov J, Fuks D, Fournel L, et al. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells and tumors: an update. *Int J Mol Sci.* 2021;22 (12):6587. doi:10.3390/ijms22126587
54. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res.* 2014;122:69-101. doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5
55. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway—de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* 2010;62 (6):414-428. doi:10.1002/iub.337

8. EKLER

Ek 1. Orjinallik Raporu



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ceylin Ökten
Assignment title: Ceylin tez
Submission title: Ceylin Ökten 21 08 2026 cö.docx
File name: Ceylin_Ökten_21_08_2026_cö.docx
File size: 19.15M
Page count: 90
Word count: 15,469
Character count: 112,470
Submission date: 26-Aug-2026 04:43PM (UTC+0300)
Submission ID: 3000099320

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİJEN-18 TEMELLİ GÜÇLÜ FARKLI KANSER
HÜCRELERİNİN METABOLİK DİNAMİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI
Ceylin ÖKTEN

ANALİTİK KİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2026

Ceylin Ökten 21 08 2026 cö.docx

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

7%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	2%
	Internet Source	
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	1%
	Internet Source	
3	acikbilim.yok.gov.tr	1%
	Internet Source	
4	openaccess.hacettepe.edu.tr	1%
	Internet Source	
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)	1%
	Student Paper	
6	www.dovepress.com	<1%
	Internet Source	
7	Submitted to Hacettepe University	<1%
	Student Paper	
8	Konar, Nevzat. "Farklı hidroliz yöntemleriyle bazı sebzelerden elde edilen fitoöstrojenlerin HPLC ve GC-MS ile belirlenmesi", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024	<1%
	Publication	
9	libres.uncg.edu	<1%
	Internet Source	
10	attachment.news.eu.nasdaq.com	<1%
	Internet Source	
11	bmcbiol.biomedcentral.com	<1%
	Internet Source	
12	jci.org	<1%
	Internet Source	
13	dm5migu4zj3pb.cloudfront.net	<1%
	Internet Source	
14	dergipark.org.tr	<1%
	Internet Source	

9. ÖZGEÇMİŞ