

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

**SÜLFÜR METABOLİZMASINDA YER ALAN  
METABOLİTLERİN MİKTAR TAYİNİ İÇİN LC-MS/MS  
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDE EDİLMESİ**

**Ecz. Elif Damla GÖK TOPAK**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2021**



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

**SÜLFÜR METABOLİZMASINDA YER ALAN  
METABOLİTLERİN MİKTAR TAYİNİ İÇİN LC-MS/MS  
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDE EDİLMESİ**

**Ecz. Elif Damla GÖK TOPAK**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU**

**ANKARA**

**2021**

**ONAY SAYFASI**  
**SÜLFÜR METABOLİZMASINDA YER ALAN METABOLİTLERİN**  
**MİKTAR TAYİNİ İÇİN LC-MS/MS YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE**  
**VALİDE EDİLMESİ**

**Ecz. Elif Damla GÖK TOPAK**

**Danışman: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU**

Bu tez çalışması 05.08.2021 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

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

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

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

Üye: Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI-AKDUMAN  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU-ÇİFTÇİ  
(Hacettepe Üniversitesi)

**ONAY:**

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

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

**Enstitü Müdürü**

16 Ağustos 2021

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

16/08/2021

Ecz. Elif Damla GÖK TOPAK

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

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

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

## ETİK BEYAN

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

Ecz. Elif Damla GÖK TOPAK

## TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum tezimin her aşamasında sahip olduğu kıymetli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan, mezuniyet projemden bu yana öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum, mesleki ve bilimsel birikimiyle bana yol gösteren, dürüstlüğü, yardımseverliği ve çalışma azmini her zaman örnek alacağım, danışman hocam Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler ve biz öğrencilerine kattıkları çalışma disiplinleri için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Tez çalışmam için hücre kültürü çalışmalarının yapılmasına imkân sağlayan Sayın Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ ve Dr. Öğr. Üyesi İpek BAYSAL'a.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında başım sıkıştığında yardımına koşan Yük. Kim. Cemil Can EYLEM'e,

Hayatımın her anında sevgi ve desteklerini esirgemeyen, bu mesleği seçmemde en büyük katkısı olan anneme ve babama, bu zorlu süreçte beni destekleyen sevgili eşim Eren TOPAK ve eşimin ailesine ve beni her zaman dinleyen sevgisini esirgemeyen kardeşim Gökçe'ye,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

## ÖZET

**Gök Topak, E. D., Sülfür Metabolizmasında Yer Alan Metabolitlerin Miktar Tayini için LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi ve Valide Edilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021.** Sülfür metabolitleri, hücresel fonksiyonda kritik roller oynarlar. Sülfür bileşiklerinin düzeylerindeki ve metabolizmasındaki değişikliklerin kanser ile ilişkilendirilmesi bu bileşiklerin klinikte hassas, doğru ve hızlı miktar tayinlerini yapabilme gereksinimini doğurmuştur. Özellikle biyolojik sorulara cevaplar ararken, spesifik metabolitlerin derişimlerinin doğru ve kesin olarak bilinmesi gerekir. Bu tür analizler hedeflenmiş metabolomiks çalışmalar ile elde edilebilir. Bu çalışmalarda LC-MS/MS yaklaşımları, üstün seçiciliği ve duyarlılıkları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Tez çalışmasında kısa analiz süresine (12 dk) sahip ve türevlendirme aşaması gerektirmeden sülfür metabolizmasında yer alan metabolitlerin eş zamanlı analizi için yeni bir LC-MS/MS yöntemi sunulmuştur. Yöntem, metabolitler için 0,05-10 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Geliştirilen yöntem validasyon çalışmaları ile seçici, kesin, doğru, duyarlı, doğrusal ve sağlam bulunmuştur. Geliştirilen yöntem insan hepatoselüler karsinom (HepG2), insan akciğer adenokarsinom (A549), insan sağlıklı akciğer epitel (BEAS-2B), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve insan sağlıklı kolon epitel (FHC) hücre hatlarına uygulanarak sülfür metabolitlerinin miktarları belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sülfür metabolitleri, hücre kültürü, LC-MS/MS, kanser, hedeflenmiş metabolomiks, yöntem geliştirme, validasyon



## ABSTRACT

**Gök Topak, E. D., An LC-MS/MS Method Development and Validation for Quantification of Metabolites in Sulfur Metabolism, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Analytical Chemistry Program Master Thesis, Ankara, 2021.** Sulfur metabolites play critical roles in cellular function. Changes in the levels and metabolism of sulfur compounds, were associated with cancer, which have led to the need to make precise, accurate and fast determination of the amount of these compounds in the clinic. The concentrations of specific metabolites should be known accurately and precisely, especially when searching for answers to biological questions. Such analyses can be obtained through targeted metabolomic studies. Because of their superior selectivity and sensitivity, LC-MS/MS approaches are widely employed in these studies. A new LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of metabolites with a short analysis time (12 min) and metabolites involved in sulfur metabolism without the need for a derivatization step is presented in the thesis study. The method was found linear for metabolites ranging from 0,05 to 10 µg/mL. The developed method was found to be selective, precise, accurate, sensitive, linear, and robust with validation studies. The amounts of sulfur metabolites were determined by applying the developed method to cell lines of human hepatocellular carcinoma (HepG2), human lung adenocarcinoma (A549), human healthy lung epithelium (BEAS-2B), human colorectal adenocarcinoma (Caco-2), and human healthy colon epithelial (FHC).

**Keywords:** Sulfur metabolites, cell culture, LC-MS/MS, cancer, targeted metabolomics, method development, validation

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xvii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1 Omiks Teknolojisi	3
2.1.1 Genomiks	3
2.1.2 Transkriptomiks	4
2.1.3 Proteomiks	5
2.1.4 Metabolomiks	6
2.2 Sülfür metabolizması	12
2.2.1 Hedeflenen Metabolitler	13
2.2.2 Kaynak özeti	15
2.3 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	25
2.3.1 Sıvı Kromatografisi	25
2.3.2 Kütle Spektrometresi	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	40

3.2	Kullanılan Cihazlar	40
3.3	Kullanılan Sarf Malzemeler	41
3.4	Kullanılan Yazılım Programları	41
3.5	Çözeltilerin Hazırlanması	41
3.6	Hücre Kültürü Çalışmaları	42
3.7	Analiz Yöntemi	43
3.7.1	Optimizasyon Çalışmaları	43
3.7.2	Analiz Koşulları	44
3.8	Yöntemin Hücre Kültürü Örneklerine Uygulanması	45
3.8.1	Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması	45
3.8.2	Yöntemin Numunelere Uygulanması	45
3.9	Analitik Yöntem Validasyonu	46
3.9.1	Validasyon Parametreleri	46
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	47
4.1	Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	47
4.1.1	MS/MS Yönteminin Optimizasyonu Sonuçları	47
4.1.2	Kromatografik Koşulların Optimizasyonu Sonuçları	50
4.1.3	Sistem uygunluk	54
4.2	Analitik Yöntem Validasyonu	55
4.2.1	Seçicilik	55
4.2.2	Taşınma	55
4.2.3	Duyarlılık	56
4.2.4	Doğrusallık	57
4.2.5	Keskinlik ve Doğruluk	60
4.2.6	Matriks etkisi	62
4.2.7	Sağlamlık	63

4.2.8	Tutarlılık	64
4.2.9	Stabilite	66
4.3	Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması	68
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>EKLER</b>	
	EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
	EK 2. Orjinallik Raporu Örneği	
	EK 3. Dijital Makbuz	
<b>9.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>88</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>APCI</b>	Atmosfer basıncı kimyasal iyonizasyon
<b>AYBA</b>	N-(akridin-9-yl)-2-bromoasetamid
<b>A549</b>	İnsan akciğer adenokarsinom
<b>BA</b>	Bronşiyal aspirasyonlar
<b>BALF</b>	Bronko alveolar lavaj sıvısı
<b>BEAS-2B</b>	İnsan sağlıklı akciğer epitel
<b>BH</b>	Bağlı hata
<b>Bkz</b>	Bakınız
<b>BSS</b>	Bağlı standart sapma
<b>Caco-2</b>	İnsan kolorektal adenokarsinom
<b>CE</b>	Çarpışma enerjisi
<b>CE-MS</b>	Kapiler elektroforez kütle spektrometrisi
<b>CID</b>	Çarpışma sonrası parçalanma
<b>CSF</b>	Beyin omurilik sıvısı
<b>Cys</b>	Sistin
<b>CysSA</b>	Sistein sülfirik asit
<b>CytcA</b>	Sisteik asit
<b>DC</b>	Doğru akım
<b>Der</b>	Derişim
<b>DiART</b>	Döteryum izobarik amin reaktif etiketi
<b>dk</b>	Dakika
<b>DTT</b>	Ditiyotreitol
<b>ESI</b>	Elektrosprey iyonizasyon
<b>ESI-MS</b>	Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi
<b>Eks</b>	Ekstraksiyon
<b>FBS</b>	Fetal sığır serumu
<b>FEM</b>	N-(2-ferrosenetil)maleimid
<b>FHC</b>	İnsan sağlıklı kolon epiteli
<b>fmol</b>	Femtomol

<b>FMEA</b>	Ferrosenkarboksilik asit-(2-maleimidoil)etilamit
<b>FT-IR</b>	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi
<b>GC</b>	Gaz kromatografisi
<b>GC-MS</b>	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
<b>GSA</b>	Glutasyon sülfonamit
<b>GSH</b>	Glutasyon
<b>GSSG</b>	Glutasyon disülfid
<b>h</b>	Hacim
<b>HAEC</b>	İnsan aort endotel hücreleri
<b>Hcys</b>	Homosistein
<b>HELA</b>	İnsan rahim ağzı kanseri
<b>HepG2</b>	İnsan hepatoselüler karsinom
<b>HF</b>	Hareketli faz
<b>HFBA</b>	Heptaflorobütirik asit
<b>HILIC</b>	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek performans sıvı kromatografisi
<b>HUVEC</b>	İnsan göbek bağı entatal hücreleri
<b>IAA</b>	İyodoasetik asit
<b>IAM</b>	İyodoasetamid
<b>ICH</b>	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
<b>IEC</b>	İyon değiştirme kromatografisi
<b>İM</b>	İyonizasyon modu
<b>IPCF</b>	İzopropil kloroformat
<b>İS</b>	İç standart
<b>K</b>	Kolon
<b>KS</b>	Kolon Sıcaklığı
<b>k'</b>	Kapasite faktörü
<b>L</b>	Litre
<b>LC</b>	Sıvı kromatografisi
<b>LC-MS/MS</b>	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
<b>LLOQ</b>	Alt tayin sınırı
<b>LOD</b>	Gözlenebilme sınırı

<b>Log P</b>	N-oktanol/ su partiyon katsayısı
<b>LR</b>	Etiketli reaktif
<b>m/z</b>	Kütle-yük
<b>m</b>	Metre
<b>M</b>	Molar
<b>MA</b>	Moleküler ağırlık
<b>MALDI</b>	Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu
<b>mBrB</b>	Monobromobimane
<b>Met</b>	Metiyonin
<b>MeCN</b>	Asetonitril
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRM</b>	Çoklu reaksiyon izleme
<b>MS</b>	Kütle spektrometrisi
<b>N</b>	Etkinlik (teorik tabaka sayısı)
<b>NACss</b>	N-asetil sistein disülfid
<b>NEM</b>	N-etilmaleimit
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nL</b>	Nanolitre
<b>nM</b>	Nanomolar e
<b>NMR</b>	Nükleer manyetik rezonans
<b>NP-LC</b>	Normal faz sıvı kromatografisi
<b>NPM</b>	N-fenilmaleimit
<b>PBMC</b>	Periferik kan mononükleer hücreleri
<b>P. Çök</b>	Protein Çöktürme
<b>PFHA</b>	Perfloroheptanoik asit
<b>PGC</b>	Gözenekli grafit karbon
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>Q</b>	Dört kutuplu analizör

<b>r</b>	Korelasyon katsayısı
<b>R<sup>2</sup></b>	Tanımlayıcılık katsayısı
<b>RA</b>	İndirgen madde
<b>RF</b>	Radyo frekansa
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>RP-LC</b>	Ters faz sıvı kromatografisi
<b>s</b>	Saniye
<b>SAH</b>	S-adenosilhomosistein
<b>SAM</b>	S-adenosilmetiyonin
<b>Ser</b>	Serin
<b>SH</b>	Standart hata
<b>SS</b>	Standart sapma
<b>Tau</b>	Taurin
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>TCEP</b>	Tris(2-karboksietil) fosfin
<b>TDFHA</b>	Tridekafloroheptanoik asit
<b>TFA</b>	Trifloroasetik asit
<b>Tür</b>	Türevlendirme ajanı
<b>tr</b>	Alıkonma zamanı
<b>V</b>	Volt
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b><math>\bar{X}</math></b>	Ortalama



## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Omiks çalışmaları.	6
2.2.	Bir metabolomiks deneyin aşamaları.	8
2.3.	Sülfür metabolitleri için basitleştirilmiş metabolik yolak.	13
2.4.	HILIC'teki sabit fazların fonksiyonel grubu.	28
2.5.	HILIC kromatografisi ayırım mekanizması.	30
2.6.	ESI'nin şematik gösterimi.	35
2.7.	Dört kutuplu MS'nin çalışması prensibinin şematik gösterimi.	36
2.8.	Tek aşamalı kütle spektrometrisi ve tandem kütle spektrometrisi karşılaştırması.	37
2.9.	LC-MS/MS sistemlerinde çeşitli tarama şekilleri ile kütle analizi.	38
4.1.	Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.	48
4.2.	Sistein ve sistinin farklı kolonlarda ayırımı.	50
4.3.	Tüm sülfür metabolitlere ait örnek kromatogramlar.	52
4.4.	Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.	58
4.5.	Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.	59
4.6.	Donma-çözülme döngüsünün sülfür metabolitleri üzerindeki etkisi.	66
4.7.	Sülfür metabolitlerinin oto örnekleyicideki kararlılık çalışmaları.	67
4.8.	Sülfür metabolitlerinin farklı hücre hatlarındaki derişimleri.	68

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
2.1.	Sülfür metabolitleri molekül yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.	14
2.2.	Sülfür yolağı hedeflenmiş metabolomiks analizler.	17
2.3.	Kütle spektrometresinin iyonizasyon kaynakları ve bazı özellikleri.	33
3.1.	Metabolitlerin analizi için gradiyent elüsyon şartları.	44
3.2.	LC-MS/MS analiz parametreleri.	45
4.1.	Optimum MRM koşulları.	49
4.2.	Sistem uygunluk test kriterleri.	54
4.3.	Sistem uygunluk parametrelerinin değerlendirilmesi.	54
4.4.	Sülfür metabolitleri analiz yönteminin taşınma etkisi.	56
4.5.	LLOQ değerleri için kesinlik ve doğruluk çalışmaları.	56
4.6.	Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler.	60
4.7.	Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları.	61
4.8.	Matriks etkisi.	62
4.9.	Sağlamlık çalışması için parametreler ve seviyeleri.	63
4.10.	Sağlamlık çalışması için deney tasarımı.	63
4.11.	Sülfür metabolitlerinin sağlamlık çalışmasından hesaplanan p değerleri.	64
4.12.	Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri.	65

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sülfür metabolitleri tüm canlı organizmalarda oldukça önemli fonksiyonlar sergilerler. Hücresel redoks mekanizmalarını düzenleyerek ateroskleroz, kanser, yaşlanma ve solunum yolu hastalığı dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olan serbest radikalleri, reaktif oksijen türlerini ve toksik bileşikleri detoksifiye ederler. Hücre sisteminin dengesini sağlamada ve korumada oldukça etkilidirler. Sülfür bileşiklerinin düzeylerindeki ve metabolizmasındaki değişiklikler ya da sülfür metabolizmasında yer alan enzimlerdeki herhangi bir bozukluk, doğuştan gelen metabolizmal, akciğer, kanser, nörodejeneratif kardiyovasküler, karaciğer ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmesi bu bileşiklerin klinikte hassas, doğru ve hızlı miktar tayini yapabilmeye gereksinimi doğurmuştur (1-3).

Kanser hücrelerinin ayırt edici özelliği metabolizma hızının artması ve kontrolsüzce çoğalmasındadır. Kanser hücrelerinin metabolizma hızının artması ile ilişkili hücrede reaktif oksijen türleri de artar. Kanser hücresi bunun üstesinden gelebilmek için antioksidan savunmalara güvenir. Sülfür metabolitleri ise antioksidan savunmada anahtar bir oyuncudur ve tümör başlangıcı, ilerlemesi, metastaz ve direnç ile geniş çapta ilişkilidirler. Bu metabolitler kanser hücresi büyümesi için önemli olan nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin sentezi için gerekli öncülleri sağlarlar (4-7).

Özellikle biyolojik sorulara cevaplar ararken, spesifik metabolitlerin derişimlerinin doğru ve kesin olarak bilinmesi gerekir. Hassas, doğru ve daha kısa bir zaman dilimi içinde daha fazla deney yapabilmek için analitik teknolojiler ve yüksek verim sağlayan otomatik cihazlar kullanılmaktadır.

Son yıllarda sıvı kromatografi uygulamalarında ayırma hızını ve verimliliği arttırmak için çeşitli analitik stratejiler geliştirilmiştir. Tıptaki gelişmeler ve tedavi sürecinde kaynaklanan ihtiyaçlar göz önüne alındığında metabolitlerin tayini için analizde geliştirilen teknolojiler önem arz etmektedir. Metabolik çalışmalarda, metabolitlerin ayrılmasında temel yöntem sıvı kromatografisi (LC)'dir. Bununla birlikte LC-UV yöntemleri birden fazla analitin eş zamanlı olarak izlenmesi ve çok çeşitli metabolitlerin profillenmesi için yetersiz olabilmektedir. Kompleks gerçek numuneler ve incelenen bileşiklerin düşük derişimlerde son derece seçici ve hassas yöntemler gerektirir.

Çok sayıda kompleks numune analizi yapılan daha yüksek ayırma verimliliği sağlayan ve hızlı bir şekilde tayini gerçekleştiren sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kromatografisi günümüzde biyolojik numune analizinde büyük bir önem kazanmıştır. Belirli hipotez odaklı çalışmalarda, özellikle biyolojik sorulara cevaplar aranırken, bazı spesifik metabolitlerin derişimlerinin doğru ve kesin olarak bilinmesi gerekir.

Kararsızlık, güçlü polarite ve lüminesans bir grubun yokluğu, sülfür bileşiklerinin analizi için zorluk teşkil etmektedir. Kaynaklar incelendiğinde biyolojik örneklerdeki sülfür içeren bileşikler için genellikle apolar C18 kolonlar kullanılmıştır. Ancak en çok tercih edilen bu kolon türünde ayırımın gerçekleştirilebilmesi için metabolitlerin türevlendirilmesi gerektirmektedir (8). Çalışmamızda kullanımı kolay, hızlı ve eş zamanlı ayırımı sağlayan hassas ve doğru bir yöntemi bulmak amaçlanmıştır. Bu amaçla sülfür metabolizmasında yer alan 8 bileşiğin (sistein, sistin, taurin, hipotaurin, glutatyon, sisteamin, serin ve metiyonin) ilk defa aynı anda analizi için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Geliştirilen yöntem farklı kanser ve kontrol hücre hatlarına uygulanarak farklı kanser türlerindeki derişimlerinin belirlenmesi ve farklılık gösteren metabolitlerin biyobelirteç olarak etkinliğinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Omiks Teknolojisi

Biyolojik sistemler, birçok farklı düzenleyici özelliğe sahip kompleks organizmalardır. Omiks teknolojileri (genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks) genler, transkriptler, proteinler, metabolitler ve hücreler gibi aralarında var olan ağları, yolları ve etkileşimli ilişkileri analiz etmek için biyolojik bir sistemin çeşitli bileşenleri arasındaki dinamik etkileşimleri ortaya çıkarır (Şekil 2.1). Her bir omiks tekniği hücre/sistem biyolojisinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Güçlü "omiks" teknolojileri, biyobelirteç keşfi, hücre büyümesi, hücre ölümü, hücre metabolizma ve kanserin erken tespiti ile ilişkili sinyal moleküllerinin tanımlanması için yeni yollar açmıştır. (9, 10).

Kanser, genetik mutasyonlar (kalıtsal veya somatik) veya çevresel faktörler yoluyla çok sayıda faktörün neden olduğu karmaşık bir hastalıktır. Gelişen omik teknolojileri, genomiks, proteomiks, metabolomiks dahil olmak üzere kanser araştırmaları ve kişiselleştirilmiş ilaç keşfi için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Yüksek verimli omiks teknolojilerindeki son gelişmeler kanserin moleküler analizinde benzeri görülmemiş bir hız ve ayrıntıda yeni fırsatlar sağlamıştır.

Omiks teknolojisinin kanser araştırmalarında uygulanması, kanser mekanizmasının ortaya çıkmasına ve kanserin çeşitli evrelerinde gen, protein ve metabolit profillerine ilişkin yeni anlayışların ortaya çıkmasına yol açan çok boyutlu analitik yaklaşımlar sağlar (11).

#### 2.1.1 Genomiks

Gen, kalıtsal özellikleri nesiller arası aktaran ve biyokimyasal ve fizyolojik olayların işleyişini kontrol eden kalıtımın temel birimidir. Genom organizmanın kromozomlarında bulunan genetik şifrelerin bütünü temsil eder.

İlk omiks disiplini olan genomiks bir organizmanın genomunu inceleyen bunların birbirleri ve çevre ile etkileşimlerini bütünsel olarak ele alan ve ortaya çıkan bilgiyi veri tabanlarında işleyen ve anlamlandıran bilim dalıdır.

Genomiks yapısal ve fonksiyonel genomiks olarak iki gruba ayrılmıştır. Yapısal genomiks genom yapılarının karakterizasyonunu içeren bir genomiks alanıdır.

Fonksiyonel genomiks ise yapısal genomik alanı tarafından sağlanan verilerin gen işlevlerini açıklamada kullanılan alandır.

Sağlıklı olmak ve hastalık durumunu birçok faktör etkiler ancak bireyin genetik geçmişinin önemli bir belirleyici olduğu açıktır. Bu nedenle, bu genetik arka planı incelemek, sağlık ve hastalığı birbirinden ayıran yolları belirleyen bireysel mutasyonları ve/veya varyantları anlamak için büyük önem taşımaktadır. İnsan Genom Projesi, biyolojik örneklerdeki büyük biyobelirteç setlerini sistematik olarak tanımlayabilen önemli yeni teknolojilerin geliştirilmesine yol açmıştır (12).

Genomikslerin uygulanması, tümör oluşumunu anlamamıza ve kanser hastalarının klinik yönetiminde önemli bir etkiye sahip olacak bir dizi yeni onkojenin keşfine yol açabildiği belirtilmiştir. Kemoterapötik sonuçla ilişkilendirilen genetik profillemeye, kanser tedavisi için yeni hedefleri gösterebilen onkogeneze, tümör büyümesi ve terapötik yanıtın anlaşılmasına da katkıda bulunur (11).

### **2.1.2 Transkriptomiks**

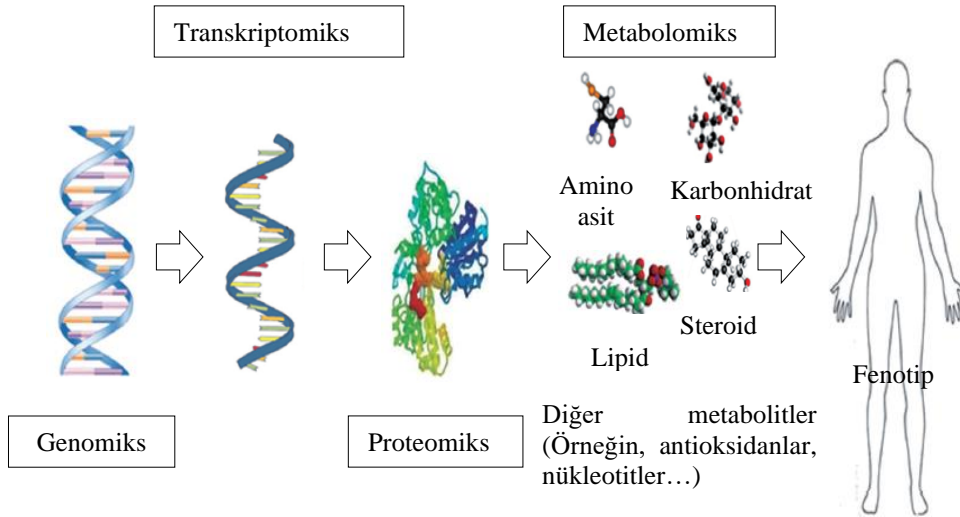
İnsan Genom Projesinin tamamlanmasının ardından genomdaki kodlanmayan bölgelerin araştırılmasına ve ribonükleik asit (RNA) dizilemelerine yönelinmiştir. Transkriptom, bir hücredeki RNA transkriptlerinin toplam tamamlayıcısıdır. Transkriptomiks ise genomdan RNA moleküllerine kopyalanmış genin kapsamlı bir şekilde incelenmesidir. Böylece transkriptom dizileme ile hücreler içerisindeki dinamik işleyişin eş zamanlı incelenmesi mümkündür. Transkriptomik genleri deşifre etmemize izin vererek genomu tamamlar ve yine teşhis edilmemiş genetik hastalık vakalarını tanımlamaya yardımcı olur. Tanısı daha zor olan belli bir belirteci bulunmayan klinik durumlarda transkriptomiks teknolojisi değerlendirilmektedir. Örneğin otizmlili bireyler ile otizmlili olmayan yüzlerce kişi karşılaştırılarak otizmlili bireylerdeki farklılığın bağıntıları tanımlanabilmiştir (13).

Transkriptomikler, kanser teşhisinde çeşitli roller oynar. Kanserde çok sayıda mikroRNA düzensizdir. Son yıllarda mikroRNA, tümör oluşumunun anlaşılmasında önem kazanmakta ve bazılarının tanısal rollere sahip olduğuna inanılmaktadır (11).

### 2.1.3 Proteomiks

Proteinler canlılarda biyokimyasal yolların önemli bileşenleri olarak hizmet eden canlıda birçok işlevi olan hayati parçalardır. Proteom organizma tarafından sentezlenebilen ya da bir organizma ya da sistem tarafından modifiye edilebilen proteinlerinin tamamıdır. Proteom kelimesi aslında protein ve genomun bir kombinasyonudur ve 1994 yılında Mark Wilkins tarafından türetilmiştir. Proteomiks, proteinlerin uzaysal dağılımı, proteinlerin çevresel uyaranlara tepkisi, hasta ve sağlıklı biyolojik sistemler arasındaki protein durumlarındaki farklılıklar dahil olmak üzere biyolojik bir sistemdeki tüm proteinlerin karakterizasyonudur. Proteinler hemen hemen her biyolojik süreçte doğrudan yer alır, bu nedenle hücredeki proteinlerin kapsamlı analizi, bu moleküllerin nasıl etkileşime girdiği konusunda benzersiz bir küresel bakış açısı sağlar. Hücre, proteinlerinin seviyesini ve aktivitesini düzenleyerek iç ve dış değişikliklere yanıt verir, bu nedenle proteomdaki niteliksel veya niceliksel değişiklikler, bu düzenleyici ağın eylem halindeki bir anlık görüntüsünü sağlar. Proteinler bir organizmanın yaşamında temel bir rol oynadığından, proteomiks teknolojisi, belirli bir hastalığı gösteren biyobelirteçlerin keşfedilmesinde etkilidir (14, 15).

Proteomiks, sinyal ağlarında yer alan hem hücresel protein ekspresyon seviyelerinin hem de protein-protein etkileşimlerinin araştırılmasını sağlar. Tümör hücrelerinde protein ekspresyon modelinin yüksek verimli proteomik teknolojileri ile izlenmesi, potansiyel kanser biyobelirteçlerini keşfetme fırsatları sunar. Kanser patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak, tanı için yeni kanser biyobelirteçleri geliştirmek ve fonksiyonel proteomiks imzaları kullanarak erken teşhis için proteomiksin uygulanmasına yoğun bir ilgi vardır (11).



**Şekil 2.1.** Omiks çalışmaları (10).

#### 2.1.4 Metabolomiks

Metabolitler düşük moleküler ağırlıklı (<1500 Da) biyomoleküllerdir. Genomun, proteomun ve hücre zarlarının yapı taşları olup sinyal molekülleri, enerji kaynakları ve metabolik ara ürünler olarak organizmalarda önemli roller oynarlar. Seviyeleri biyolojik fonksiyonlar hakkında bütüncü bilgi sağlar ve genetik veya çevresel değişikliklere yanıt olarak biyolojik sistemlerin fenotiplerini tanımlar. Genler ve proteinlerin aksine, metabolitler biyokimyasal aktivite ile doğrudan bağlantılıdır bu nedenle fenotip ile ilişkilendirilmeleri daha kolaydır. Bu bağlamda, metabolomiks, klinik teşhis için yaygın olarak benimsenen güçlü bir yaklaşım haline gelmiştir. Metabolit analizi, hücre içi ve hücre dışı metabolitleri tanımlamak ve ölçmek için analitik tekniklerin kullanılmasını içerir. Başarılı metabolomik çalışmalar, uygun numune hazırlamaya, yenilikçi cihaza ve biyoinformatik araçlara dayanır. Metabolitler, polarite, asitlik ve uçuculuk gibi fizikokimyasal olarak farklılıklar gösterir. Bu nedenle, geniş bir metabolit yelpazesini aynı anda analiz etmek zordur (10).

Metabolomik teknolojisinin amaçlarından biri hücrenin, organın veya organizmanın tüm metabolit profilini tespit etmek, diğeri ise organizmanın harici bir değişikliğe (örneğin, hastalık başlangıcı veya çevre kirliliği) yanıt olarak metabolit profilindeki değişikliği incelemektir. Metabolomik çalışmalar, hastalıkların



teşhisinde, tedaviye yanıtın incelenmesinde ve biyobelirteçlerin keşfinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (16, 17).

Metabolomik çalışmalarda, fenotipin metabolomik profillerini ortaya çıkarmak için çok sayıda metabolitin kapsamlı bir analizi aynı anda yapılmalıdır.

Metabolomik çalışmalarında numune hazırlama aşamasında dikkat edilecek çeşitli adımlar vardır. Numunelerin toplandığı anın günün aynı zaman dilimlerinde olması önemlidir. Diyetin etkisinin veya numune toplama gününün, saatinin kontrol edilmemesi, metabolit seviyelerinde biyolojik olarak ilgili değişiklikler gibi görünen gruplar arasında aşırı varyasyona ve/veya farklılıklara yol açabilir.

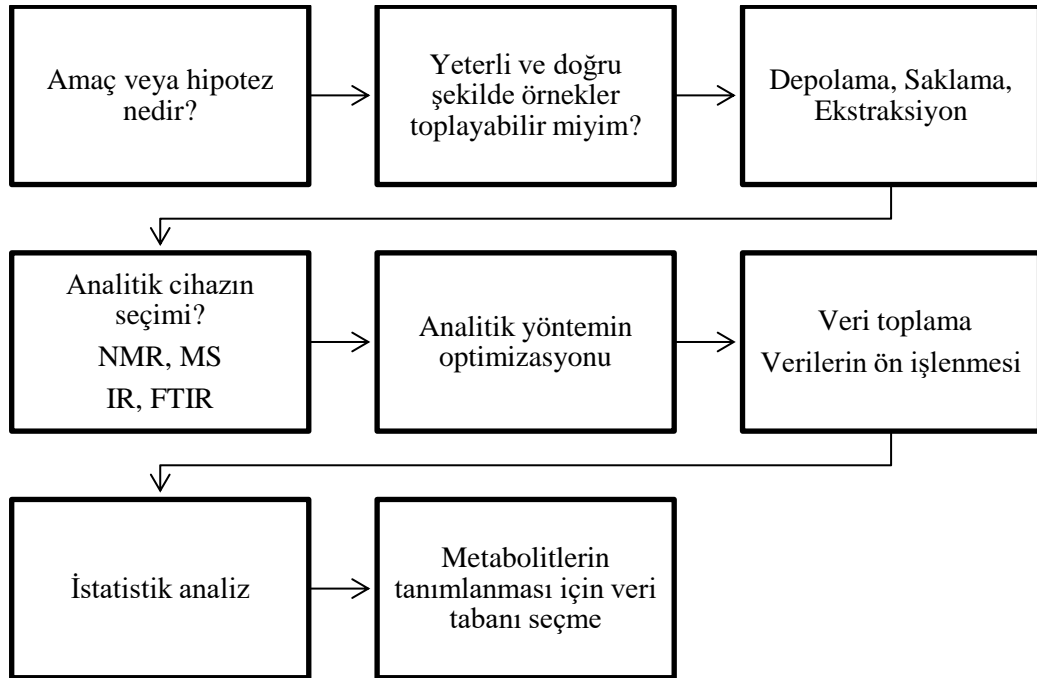
Biyolojik olmayan varyasyona neden olabilecek bir faktör, numunelerin toplandığı veya saklandığı kaplardır. Karşılaştırılacak tüm gruplarda aynı cins materyaldeki kaplardan kullanılması çok önemlidir. Benzer şekilde, numuneler grup etkisi yaratmayacak şekilde saklanmalıdır. Plazma numuneleri alınırken aynı tip pıhtılaştırıcı (EDTA, heparin veya sitrat) kullanılmalıdır. Numuneler için barkodların kullanılması, numunelerin kimliklerinin karıştırılmasına yol açmadan bir dondurucuya rastgele yerleştirilmesine olanak tanır. Bu sırada numunelerin -80 °C'de saklanması tercih edilir. Ayrıca, karşılaştırma amacıyla aynı donma-çözülme döngülerine sahip numuneler kullanılmalıdır (18).

Hücrelerden veya dokulardan metabolitlerin analizi için bir endişe, metabolizmanın durdurulma hızıdır. Canlı hücrelerde, adenozin trifosfat veya glutamin gibi biyolojik olarak önemli metabolitlerin yarı ömürleri birkaç saniye (ve bazen daha az) olabilir ve santrifüjleme yoluyla hücrelerin topaklanması gibi görünüşte zararsız adımlar dramatik değişikliklere yol açabilir (19).

Numune hazırlama aşaması matriks etkisini azaltmak ve hassasiyeti artırmak için önemli adımlardandır (Şekil 2.2.). Ayrıca, numune hazırlama, yüksek verimli çalışmalara izin vermek için yüksek oranda tekrarlanabilir, sağlam ve hızlı olmalıdır. En uygun ekstraksiyon yöntemi hem numune tipine hem de analizi hedeflenen metabolitlere bağlıdır. Biyolojik bir numunedeki metabolitler benzer fizikokimyasal özelliklere sahip kısımlara bölünebilir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu genellikle bir numuneyi hidrofobik metabolitler veya hidrofilik metabolitlerden oluşan iki gruba ayırabilmek için kullanılabilir (10). Plazma çalışmalarında ilk adım proteinlerin çöktülmesini içerirken dokuların çalışmasında ilk adım, metabolitlerin ekstraksiyonundan önce

numunenin homojenizasyonunu içermelidir (20). İdrarda analiz yapabilmek için basit filtrasyon yöntemi kullanılabilir (10).

Metabolomik çalışmalar biyolojik sıvılar, dokular dışında hücre kültürü örnekleri de yürütülmektedir. Hücre hatlarının metabolik işlevleri biyolojik materyale göre daha sınırlı olmasına rağmen kolay kullanım, neredeyse sınırsız yaşam süresi, standartlaştırılmış kültür koşulları veya donöre bağlı olmayan stabil fenotip gibi in vitro çalışmalar için avantajlar sunarlar. Hücre kültüründe analiz için amaca ve analiz edilecek metabolitlere göre uygun olan bir ekstraksiyon çözeltisi seçmek önemlidir (21).



Şekil 2.2. Bir metabolomiks deneyin aşamaları (18).

### Metabolomiks analiz tipleri

Metabolomikte kullanılabilen iki ana yaklaşım, hedeflenmemiş ve hedeflenmiş yaklaşımlardır. Seçilen yaklaşım, deneyinizi nasıl tasarlayacağınızı, numunelerinizi nasıl hazırlayacağınızı ve hangi analitik tekniklerin kullanılacağını belirleyecektir. Hedeflenmiş analizde belirli bir metabolit kümesini incelemek gerekir. Hedeflenmemiş analiz de ise mümkün olduğu kadar çok metabolitin ölçülmesi amaçlanır.

Hedeflenmemiş metabolomik çalışmaların amacı, bir numunedeki en geniş metabolit aralığını ölçmek; hücrelerde, biyolojik sıvılarda veya dokularda bulunan tüm metabolomun profilini ve fenotipin tanımlanması için yeni biyobelirteçler bulmaktır. Hedeflenmemiş metabolomik biyolojik örnekleri karşılaştırmak için mümkün olduğu kadar çok metaboliti eş zamanlı olarak analiz etmek hipotez oluşturma için yararlıdır. Ancak hedeflenmemiş metabolomiklerdeki en büyük darboğaz, bilinmeyen özellikteki metabolitlerin tanımlanmasıdır. Metabolitler, çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip düşük pikomolar ila milimolar derişimlerde bulunur. Bu nedenle, biyolojik bir numunede bulunan tüm metabolitleri gözlemlemek imkansızdır. Maksimum metabolit sayısını tespit etmek için numune hazırlama aşaması ve uygun analitik cihaz seçimi önemlidir (10).

Hedeflenmiş metabolomik çalışmalar, çalışmadaki metabolitlerin her biri için kalibrasyon eğrileri oluşturmak için standartları kullanarak halihazırda fenotiple ilişkili metabolitler olarak bilinen sınırlı sayıda biyobelirteçlerin miktarını belirlemeyi amaçlar. Böylelikle analizi planlanan metabolitler veya ilgilenilen metabolik yollar için nicel bilgi sağlar. Spesifik biyokimyasal soruları veya hipotezleri yanıtlar. Hedeflenmiş analizler bilinen metabolitlerden oluşur ve her analizi amaçlanan metabolitler için özel analitik yöntem, standartlar veya kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler kullanılarak tayini gerçekleştirilir. Bu analitik yaklaşım, genellikle biyoaktif olan ve biyolojik sistemlerde önemli roller oynayan düşük seviyeli metabolitler için özellikle tercih edilir. Ayrıca, asıl ilgi belirli bir metabolit sınıfı veya bir metabolik yol olduğunda, hedeflenmiş yaklaşımlar belirli hedefe daha iyi bir bakış açısı sağlayabilir. Hedeflenen metabolik analiz, moleküler yapıları nedeniyle iyi gözlemlenmeyen bazı metabolitler için de bir fayda sağlayabilir (10).

Hedeflenmiş veya hedeflenmemiş analizleri karşılaştırdığımızda hedeflendirilmemiş analiz ile yeni biyobelirteç keşfedilirken hedeflenmiş analizde bilinen metabolitlerin miktar tayini gerçekleştirilir. Hedeflenen yaklaşımlar tarafından sağlanan nicel bilgiler güvenilirdir ve hedeflenmemiş yaklaşımlardan daha duyarlıdır. Hedeflenen metabolomiks analizdeki başarı, plazma, idrar, doku, beyin omurilik sıvısı vb. gibi spesifik bir numuneden metabolit ekstraksiyonun verimine bağlıdır.

Veri analizi, çok basit olan hedeflenmiş analize kıyasla hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarda en büyük zorluktur. Hedeflenmemiş metabolomiks veri

kümeleri, bazı yeni yüksek çözünürlüklü MS cihazları için örnek başına gigabayt düzeyinde dosya boyutlarındadır ve analiz sonuçları karmaşıktır. Tespit edilen binlerce tepe noktasının tek tek incelenmesi pratik değildir.

Biyoanalitik yöntemlerin validasyonu, yöntemlerin geçerli uygulamalar için güvenilir olmasını sağlar. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar için doğrulama stratejilerini iyi tanımlayan hiçbir kılavuz yoktur ve araştırma grupları tarafından alternatif doğrulama stratejileri kullanılmaktadır ve hedeflenmemiş yaklaşımların doğrulanması konusunda henüz bir fikir birliğine varılmamıştır (10, 17). Hedeflenmiş metabolomikler için, biyoanalitik doğrulama stratejilerini belirleyen birkaç doğrulama kılavuzu izlenebilir (22, 23).

### **Metabolomiks analizlerin biyomedikal uygulamaları**

Metabolitler, çeşitli biyokimyasal reaksiyonların substratları ve ürünleridir ve genellikle genom ve proteomun temel biyolojisi ile ilişkilidir. Metabolomiks, kimyasal-biyolojik etkileşimleri keşfetmeyi ve temel, translasyonel ve klinik araştırmalarda metabolitlerin rollerini anlamayı amaçlar. Biyomedikal için en temsili örnek, diyabet hastaları için kan şekeri seviyesinin belirlenmesi olacaktır. Günümüzde kullanılan ilaçların büyük kısmı küçük moleküllerdir ve bunların yarısından fazlası metabolitlerden türetilmiştir. Hastalıklar, genom veya proteomun metabolitlerle olumsuz etkileşimleri ile ilişkilidir ve birçok genetik bozuklukta düzensiz bir metabolizma söz konusudur. MS kullanan analitik platformlardaki son gelişmeler, metabolomiklerin biyomedikal araştırmalarda önemli bir strateji haline gelmesini sağlamıştır (10).

### **Metabolomiks analizlerin kanser ile ilişkisi**

Metabolomik çalışmalar, birçok küçük molekülün eş zamanlı olarak izlenmesinin yanı sıra çok sayıda hücresel yolun fonksiyonel olarak izlenmesine izin vererek kanser teşhisi, tedavisi için faydalıdır. Metabolomik çalışmalar hayvan deneylerindeki toksikolojik testlerde ve biyobelirteçlerin değerlendirilmesinde genomik ve proteomiklere göre daha büyük başarı şansına sahip olabileceğini göstermiştir (11).

## Metabolomiks analizler için analitik cihazlar

Metabolomiks, yenilikçi analitik enstrümantasyon ile birlikte gelişmiştir. Metabolit analizi için kütle spektrometrisi (MS), nükleer manyetik rezonans (NMR), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometrisi ve Raman spektrometrisi dahil olmak üzere çeşitli analitik tekniklerin tümü uygulanmıştır. FT-IR ve Raman spektroskopisi, çeşitli metabolitler için kullanılan hızlı ve yüksek verimli analitik yöntemlerdir. Bu spektroskopik yöntemler, bütünsel yapıları nedeniyle genellikle metabolik değişikliklerin profiline uygulanır ve belirli dalga boylarındaki absorpsiyonlar ile gözlemlenen metabolik bileşenlerin tanımlanması için önemli ipuçları sağlayabilir. Ancak FT-IR ve Raman spektrometresi duyarlılığı ve seçiciliği diğer yöntemlerden daha düşüktür. Metabolomikste yaygın olarak kullanılan bir strateji olan NMR spektroskopisi de minimum numune hazırlama basamakları ile hızlı bir yöntemdir. NMR spektrumlarındaki kimyasal kaymalar, spesifik metabolitlerin tanımlanması için çok önemli kanıtlar sağlayabilir. Bununla birlikte, NMR duyarlılığı MS'den daha düşüktür. MS yüksek duyarlılığı nedeniyle metabolomiks için en uygun teknoloji olmaya devam etmektedir. NMR, mikromolar aralıktaki metabolitleri ölçebilirken, MS kullanımı, pikomolar ve nanomolar derişimlere kadar algılamaya izin verir. Ek olarak MS, diğer stratejilere kıyasla çok çeşitli moleküler türleri tespit edebilir ve minimum miktarda numuneden binlerce metaboliti aynı anda hızlı bir şekilde ölçmek mümkündür (10).

Son zamanlarda, MS tabanlı metabolomiks en popüler metabolomiks strateji haline gelmiştir. Daha hassas ayırım için ayırma modülleri genellikle MS sistemine bağlanmaktadır (10).

Hedeflenmemiş analizlerde metabolitlerin farklı derişimlerde olması ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle herhangi bir tek analitik platform bir numunedeki tüm metabolitleri gözlemlemekte yeterli olamayabilmektedir. Gözlenen metabolitlerin kapsamını artırmak için çoklu analitik platformlar kullanılmalıdır. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) genellikle steroidler ve yağ asitleri dahil olmak üzere küçük ve uçucu metabolitler için tercih edilen platformdur ve metabolitlerin uçuculuğunu artırmak için sıklıkla kimyasal türevlendirme yapılır. LC-MS, hidrofilik veya hidrofobik doğasından bağımsız olarak daha geniş bir metabolit yelpazesini tespit edebilir. Kapiler elektroforez kütle spektrometrisi (CE-MS), hidrofilik metabolitleri

tespit etmek için diğer platformlardan daha uygundur. Hedeflenmemiş metabolomiks için birden fazla analitik platform önerilmesine rağmen, tüm laboratuvarların bu analitik cihazların tümüne erişimi yoktur. Bu nedenle, çoğu durumda, kullanılan analitik platformlar, uygunluklarına ve uygulamaya bağlı olarak seçilir. LC-MS veya CE-MS platformu kullanıldığında, global metabolom profilleme verileri hem pozitif hem de negatif iyon modunda analiz edilmelidir. Pozitif iyon modu, temel metabolitleri tespit edebilirken, negatif iyon modu asidik metabolitleri daha iyi tespit edebilir. Böylece, hem pozitif hem de negatif iyon modundan kütle spektrometrik verileri alındığında metabolitlerin maksimum kapsamı elde edilebilir (10).

LC-MS aletlerindeki ve analitik stratejilerdeki gelişmeler, hedeflenen metabolomiks analizlerde büyük ilerleme sağlamıştır. Bu teknoloji artık karmaşık biyolojik numunelerde düzinelerce veya yüzlerce metabolitin hassas hedefli ölçümünü gerçekleştirebilmektedir. Çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunu kullanan klasik hedeflenmiş kantifikasyon tahlili, yüksek kaliteli metabolit kantitasyonunun temeli olmuştur. GC-MS, uçucu metabolitlerin tespiti için en uygun MS yöntemi olmuştur. Ancak bu teknik genellikle uçuculuğu iyileştirmek için kimyasal türevlendirme gerektirir ve uygulamasının moleküler boyut, uçuculuk ve polarite açısından sınırlamaları vardır. LC-MS'de numune türevlendirme genellikle gerekli değildir ve daha çeşitli kimyasal yapılara ve artan moleküler boyutlara sahip metabolitler ölçülebilir (10, 24).

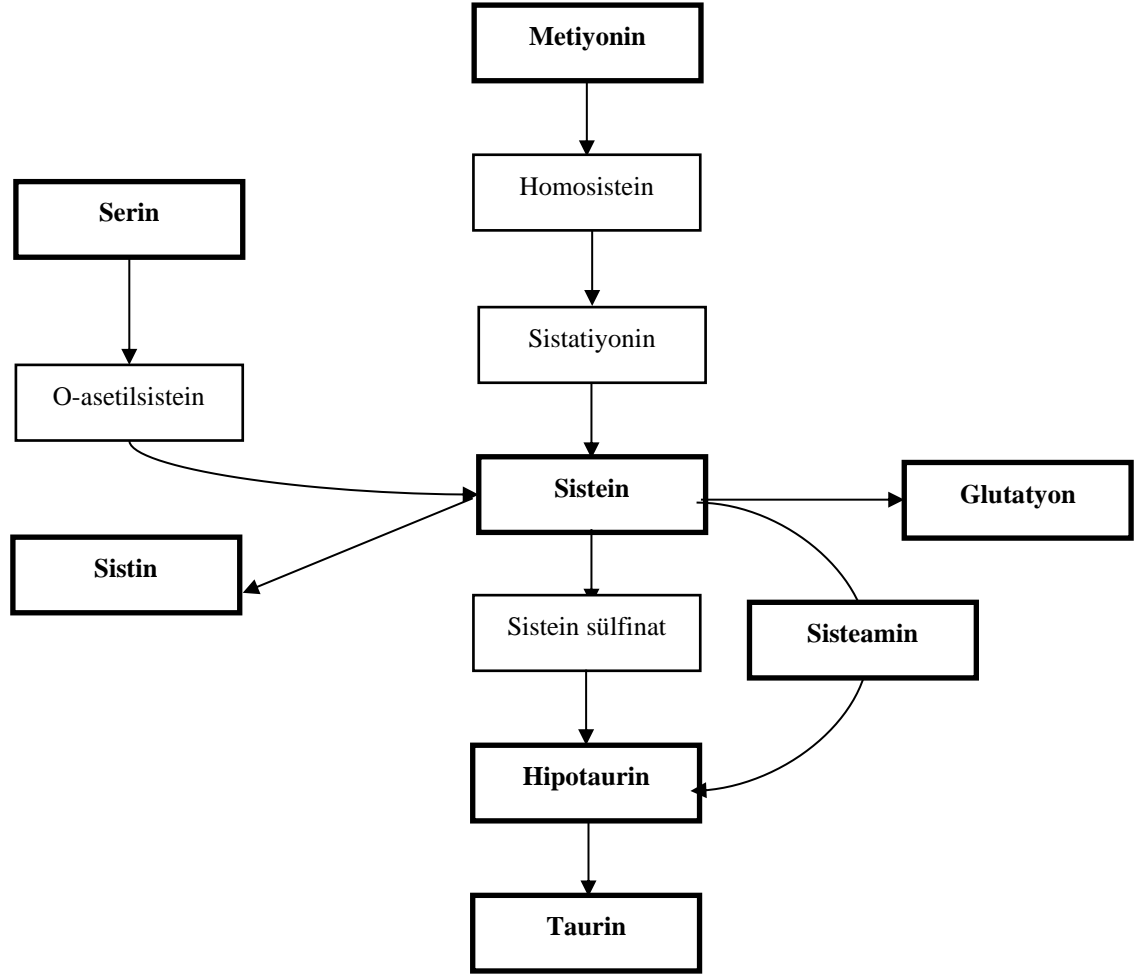
Hedeflenmiş analiz gerçekleştirilen çalışmamızda LC-MS/MS cihazı kullanıldığından bu cihaz daha ayrıntılı incelenecektir.

## **2.2 Sülfür metabolizması**

Sülfür içeren bileşikler vücuttaki kritik fizyolojik bileşenlerdir ve çok sayıda hayati fonksiyona hizmet eder. Sülfür bileşikleri, organizmalardaki serbest radikal derişiminin değişimine duyarlıdır ve antioksidan aktivitenin göstergeleri olarak kullanılabilir. Glutatyon, sistein, metiyonin gibi sülfür metabolitleri, homeostazda birçok rol oynar ve birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemlidir (25).

Birden fazla metabolit analizi için hedeflenen analizler aynı anda gerçekleştirilebilir. Bu metabolitler aynı gruba (amino asitler, şekerler, vb.) ait olabilir veya farklı alt küme metabolit gruplarından metabolitleri içerebilir. Bu tez kapsamında

sülfür metabolizması yolağında (Şekil 2.3.) yer alan seçilmiş metabolitlerin analizi gerçekleştirilmeyi amaçlanmıştır.



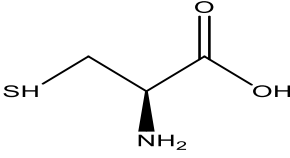
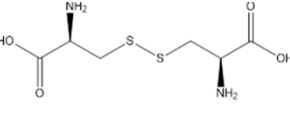
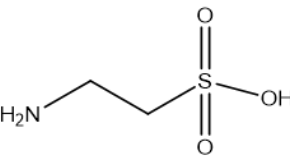
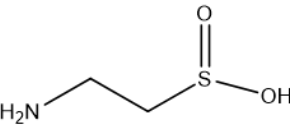
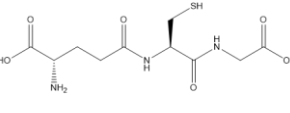
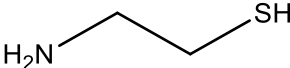
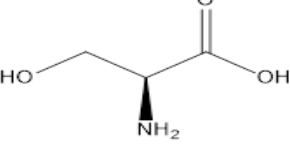
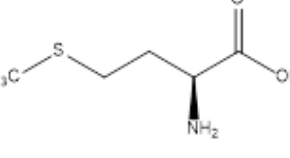
**Şekil 2.3.** Sülfür metabolitleri için basitleştirilmiş metabolik yolak (26-29).

Biyolojik sıvılardan sülfür ile ilgili metabolitlerin miktarının belirlenmesi, metabolik bozuklukları olan hastaları izlemek ve teşhis etmek için esastır. Son yıllarda biyolojik örneklerdeki sülfür ile ilgili metabolitleri analiz etmek için çeşitli analitik stratejiler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden LC-MS/MS yaklaşımları, üstün seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle sülfür metabolitleri analizlerinde kullanılmaktadır.

### 2.2.1 Hedeflenen Metabolitler

Tez kapsamında analizi hedeflenmiş olan metabolitlere ait molekül yapısı ve fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.1.'de listelenmiştir (30, 31).

**Tablo 2.1.** Sülfür metabolitleri molekül yapısı ve fizikokimyasal özellikleri

Metabolit	Molekül Yapısı	Fizikokimyasal Özellikler
Sistein		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 121,16 <b>LogP:</b> -2,6 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 23,1
Sistin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 240,30 <b>LogP:</b> -3,2 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 16,8
Taurin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 125,15 <b>LogP:</b> -2,2 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 105
Hipotaurin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 109,15 <b>LogP:</b> -1,2 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 38,8
Glutatyon		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 307,32 <b>LogP:</b> -2,7 <b>Çözünürlük(g/L):</b> 292,5
Sisteamin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NS <b>MA (g/mol):</b> 77,15 <b>LogP:</b> -0,42 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 23,5
Serin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> <b>MA (g/mol):</b> 105 <b>LogP:</b> -3,4 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 480 g/L
Metiyonin		<b>Kapalı Formülü:</b> C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S <b>MA (g/mol):</b> 149,21 <b>LogP:</b> -1,8 <b>Çözünürlük (g/L):</b> 23,9

\*MA: Moleküler ağırlık, log P: n-oktanol/ su partiyon katsayısı



### 2.2.2 Kaynak özeti

Sülfür içeren metabolitleri analiz etmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda düşük derişimlerde ve eş zamanlı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu bölümde LC-MS/MS ile yapılan sülfür içeren metabolitlerin analizlerini içeren çalışmalar incelenmiş ve Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Sülfür içeren metabolitlerin fizikokimyasal özelliklerinden (çok polar olmaları ve *in vivo* ve *ex vivo* koşullarda da oldukça reaktiftir olmaları) dolayı analizlerinde çeşitli zorluklar vardır. Kolonlarda kısa tutulma süreleri nedeniyle ticari ters faz kolonlarda polar bileşikleri ayırmak son derece zordur. Tablo 2.2. incelendiğinde çeşitli sülfür metabolitleri analizi için C18, C8, diol, siyano, HILIC kolonları kullanıldığı görülmüştür. Sülfür metabolitlerini ayırmada en çok C18 kolonlar kullanılmaktadır fakat C18 kolonundaki analizleri için türevlendirilmeleri gerekmektedir.

Yuan W. ve ark. (32)'nin yaptığı çalışmada analiz edilen sülfür bileşikleri türevlendirme olmadan analitlerin çoğu polar hareketli faz ile kolondan erken ayırım gerçekleşmiş ve ayırıcılığın düşük olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, metabolitlerin döteryum izobarik amin reaktifi (DiART) ile türevlendirilmesi sonucunda metabolitlerin hidrofobiklik özelliği artırılmış bu da pik şekillerini ve alıkonma süreleri C18 kolonda iyileştirmiştir.

Le A. ve ark. (33)'nin yaptığı çalışmada türevlendirme aşaması olmadan gözenekli grafit karbon (PGC) ve C18 ile ayırım sağlanmıştır. İki kolon kullanılarak iyon baskılama en aza indirilmiştir.

Hem metanol hem de asetonitril, C18 kolonlarında ayırma için yaygın olarak kullanılan organik fazlardır.

Biyolojik önemlerinden dolayı, farklı matrikslerde sülfür metabolitlerinin tanımlanması için sağlam ve güvenilir yöntemler geliştirmek için son yıllarda önemli çabalar sarf edilmiştir. Asetonitril, metanol, etanol ve sülfosalisilik asit ile proteinlerin çöktürülmesi, sülfür analizi için en çok tercih edilen yöntemler olmuştur. Biyolojik numunelerdeki sülfür metabolitlerini, redoksa duyarlıdır. Bunun önüne geçebilmek için örnek hazırlamaların ilk adımlarında maddeler stabilize edilebilir. Bu amaçla ditiyotreitrol (DTT) ve tris(2-karboksietil) fosfin (TCEP) gibi indirgeyici ajanlar veya Ellman's, iyodoasetik asit (IAA), N-etilmaleimit (NEM), DiART, iyodoasetamid

(IAM) ve izopropilkloroformat (IPCF), N-(akridin-9-il)-2-Bromoasetamid (AYBA) ve monobromobiman (mBrB) gibi türevlendirici ajanların numune hazırlama sırasında kullanıldığı görülmüştür.

**Tablo 2.2.** Sülfür yolağı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

Metabolitler	Materyal	Numune Hazırlama	Yöntem	Öncü iyon→ Parçalanma iyon	Doğrusallık	LOD /LLOQ	Geri kazanım (%)	Kaynak
Cysta Cys-ss Hcy-ss Met Ser Tau	Plazma İdrar CSF	P. Çök: %6 sülfosalisilik asit Seyr.:2 mM TDFHA	E: LC-MS/MS *K: PGC (50 x 4,6 mm, 3 µm) KS: 40 °C HF: 1 mM TDFHA Akış hızı:0,3 mL/dk **C18 (100 x 2,1 mm, 2,7 µm) KS: 65 °C HF (A): 1 mM TDFHA HF (B):1 mM TDFHA + MeCN Akış hızı: 0,35 mL/dk Enj: 5 µL	223,1→88,2 241→74 269,1→135,9 150,1 →133 106,1→60,1 126→108	10-1000 µM	1,0/10 2,5/5 0,1/0,1 0,1/1 <0,01 /<0,01 1,0/1,0 µM	-	(33)
Met Hcys	Plazma	RA: DTT P. Çök: MeOH + %0,1 HFBA	E: LC-MS/MS K: C8 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) HF: 0,1% HFBA + MeOH (70:30, h/h) Akış hızı: 0,25 mL/dk İM: Pozitif	136,2→90 150,3→104	0,8-400 µmol/L	0,04/ 0,8 µmol/L	102 91	(34)
GSG Hcys GSSG Cys Hcys-ss	Sıçan doku (Karaçiğer, beyin, akciğer, kalp, böbrek) Eritrositler, Plazma	Tür.: 10 mM Ellman's P. Çök: %20 5- sülfosalisilik asit	E: LC/MS K: C18 (250 x 3,2 mm, 5 µm) HF (A): 0,1% TFA HF (B): MeCN Akış hızı: 0,6 mL/dk Enj: 20 µL	505 333 613 319 269	0,2- 100 µg/mL	3,3/ - 29,6/ - 3,3/ - 16,5/ - 14,9/ - pmol	112 99 110 86 98	(35)

**Tablo 2.2. (Devam)** Sülfür yoluğı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

Ser Htau CysSA CytcA Cysta Cyste Cys-ss Met SAM	HAEC	LR: DiART	E: LC-MS/MS K: C18 (200 x 2,1 mm, 3 µm) HF (A):10 mM FA HF (B):10 mM FA MeOH Akış hızı: 0,85 mL/dk	-	0,01-5 µM	95 /- 46 /- 21 /- 13 /- 1 /- 17 /- 3 /- 2 /- 87 /- nM	85	(32)
<sup>a</sup> Hcys <sup>b</sup> Cys	*Plazma **İdrar	*RA: DTT P. Çök: (0,1 FA ve 0,025 % TFA: MeOH, 5:3) **RA:1744 mM TCEP P. Çök: (0,1 FA ve %0.025 TFA: MeOH 5:3)	E: LC-MS/MS K: C8 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) HF: 0,1% FA: MeOH (7:3, h/h) Akış hızı: 1 mL/dk Enj: 3 µL İM: Pozitif	136→90 122→76	-	<sup>a,*</sup> 5-100 <sup>b,*</sup> 50 -360 <sup>a,**</sup> 2,5 -15.0 <sup>b,**</sup> 25 -200 µmol/L	<sup>a,*</sup> 95-106 <sup>b,*</sup> 94-101 <sup>a,**</sup> 97-100 <sup>b,**</sup> 96- 103	(36)
GSH GSSG	PBMC	Tür.: NEM P. Çök: Soğuk MeCN	E:LC-MS K: Diol (250 x 2 mm, 7 µm) HF: 1% Asetik asit: MeCN (75:25, h/h) Akış hızı: 0,5 mL/dk Enj.: 10 µL İM: Pozitif	433,2 455,4 307,2 613,2	0,01-20 0,05- 0,2 µM	0,01-0,05 0,05-20 µM	99-101 106-112	(37)

**Tablo 2.2. (Devam)**Sülfür yolağı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

GSH Cys Hcys NAC GSH Cys-Gly Cys Hcys	İdrar	Seyr.:1 mM EDTA + %0,05 FA Tür.: FEM + FMEA RA: TCEP	E: LC-MS/MS K: C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm) HF (A): MeCN HF (B): 10 mM amonyum format (pH: 4) Akış hızı: 0,9 mL/dk Enj.: 10 µL İM: Pozitif	660→213- 185 474→213-185 488 →213- 185 516→213-185 617→422- 144 488→422- 144 431→365- 212 445→379- 246 473→407- 278	-	30-110/- nM	-	
GSH Cys NAC Hcy Cys-Gly	Plazma Doku	P. Çök: %10 5- sülfosalisilik asit Tür.: mBrB	E: LC-MS/MS K: C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm) KS: 25 °C HF (A): 0,1% FA HF (B): 0,1% FA MeCN Akış hızı: 1,0 mL/dk Enj.: 8 µL İM: Pozitif	498,1 → 435,1 312,3 → 225,3 354,1 → 225,1 326,0 → 225,2 369,2 → 192,1	1-400 µM	0,31-4,98/- fmol	-	(39)
Cys Hcys Cys-Gly GSH	Plazma (sıçan)	RA: TCEP P. Çök: 2 M TCA Tür.: NPM (20 mmol/L MeCN) Eks.: SPE	E: LC-MS/MS K: Amit (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) KS: 40 °C HF (A): 0,25% FA içeren 50 mM amonyum format HF(B): MeCN Akış hızı: 0,5 mL/dk Enj.: 10 µL İM: Pozitif	295→202,2-184,1 309→263,2-174,1 352→ 261,2- 259,2 481→ 352,3-249,2	8,6-400 0,54-20 0,7-20 1,79-40 µM	2,84 /8,6 0,18 /0,54 0,23 /0,71 0,59 /1,79 µM	82-98 98-125 100-107 79-92	(40)

**Tablo 2.2. (Devam)** Sülfür yoluğı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

GSH Cys Hcys Cys-Gly Glu-Cys SAM SAH Cysta Met	Plazma (Sıçan)	Der.: NEM P. Çök: %0,1 FA MeCN	E: LC-MS/MS K: Amit (150 x 2,1 mm, 1,7 µm) KS: 30 °C HF (A): %0,1 FA HF (B): %0,1 FA MeCN Akış hızı: 0,2 mL/dk Enj: 10 µL İM: Pozitif	433,0→304,0 247,0→230,0 261,1→215,0 304,1→287 376,1→247,0 399,2→250,0 385,1→136,0 223,1→134,0 150,0→104,1	0,2-20 0,1- 40 0,0125-5 0,05-10 0 025-5 0,05-10 0,002-2 0,025-5 - µg/mL	0,8-200 1,6-100 1 /12,5 1 /25 0,2 /5 2 /50 0,2 /2 1 /5 - ng/mL	-	
<sup>a</sup> GSH <sup>b</sup> GSSG <sup>c</sup> γ-Glu- Cys <sup>d</sup> Cys-Gly <sup>e</sup> Cys <sup>f</sup> Cys-ss, <sup>g</sup> Hcys <sup>h</sup> Hcys-ss	Karaciğer (Fare)	TA.:10 mM IAM P. Çök: Soğuk salisilik asit (%10 a/h)	E: LC-MS/MS K: C18 (100 x 2 mm, 3 µm) HF (A): %0,1 FA HF (B): %0,1 FA ve %20 MeCN Akış hızı 0,25 mL/dk İM: Pozitif	366,2→237,1 613,2→355,1 309,2→180,1 237,2→174,1 180,1→89,2 241,1→152,1 194,1→56,2 269,2→136,1	a,b 100- 100,000 c-h 100- 10,000 ng/mL	c,d,e,g - /100 a,b,f, h - /200 ng/mL	89 113 96 111 84 58 106 62	(42)
Tau Ser Cys Hcys Met Cysta SAH SAM	*Plazma **CSF	RA: TCEP P. Çök: MeOH + %1 FA	E: UPLC-MS/MS K: C18 (100 x 2,1 mm, 2,5 µm) HF (A): 5 mM PFHA HF (B): MeCN Enj:10 µL İM: Pozitif	126→108 106→60 122→59 136→90 150→104 223→134 385→134 399→250	1 -7 µM	*0,1-2/ 0,5-3,0 **0,05-4/ 0,125-5 µM	*90-108 **96-109	(43)

**Tablo 2.2.** Sülfür yolağı hedeflenmiş metabolomiks analizler

GSH GSSG GSA	HUVEC BALF Nötrofil Eritrositler	Der.: NEM P. Çök: %80 Soğuk alkol	E: LC-MS/MS K: PGC (100 x 2,1 mm) KS: 40 °C HF (A): %0,5 FA HF (B): %0,5 FA MeCN/IPA (50:50, h/h) Akış Hızı: 0,2 mL/dk Enj: 50 µL IM: Pozitif	433 → 304 613 → 484 338 → 263	0,9-4,3 1,2-1,2 0,7-0,7 µg/L- mg/L	- /0,1 pmol	>90	(44)
Cyste Cys GSH Hcys	Hücre (Hela)	Eks.: MeCN: %0,5 FA 1 mM EDTA (80:20, h/h) RA.: TCEP Tür.: AYBA	E: LC-MS K: C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) HF (A): %0,1 FA HF (B): MeOH Akış hızı: 3,0 L/ dk	-	0,1-400 nM	2,4-192,3/ 7,3-576,9 pM	77-113	(45)
Hcys Cys Met	*Plazma **İdrar	RA: DTT P. Çök: %0,1 FA + %0,05 TFA MeCN	E: LC-MS/MS K: Siyano (330 x 2,1 mm, 1,7 µm) HF: %0,1 FA MeCN: Su (50:50, h/h) Akış hızı: 0,5 mL/dk	136,0→90,1 122,0→76,0 150,0→103,8	>200 >2000 >2000 µmol/	0,2 /0,4 0,5 /0,9 0,2 /0,4 µmol/L	*101-102 97-100 101-103 **94-98 101-104 94-97	(46)

**Tablo 2.2. (Devam)** Sülfür yoluğı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

Met Ser Tau	Plazma	P. Çök: %0,15 FA 10 mM amonyum format %85 MeCN	E: LC-MS K: Amit (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) KS: 35 °C HF (A): 0,15 % FA in 10 mM amonyum format 85 % MeCN HF (B): 0 15 % FA in 10 mM amonyum format (pH: 3) Akış Hızı: 0,4 mL/dk Enj: 2 µL İM: Pozitif	-	0,0-100 0,1-500 0,0-250 µM	0,0002-0,11 /0,001-0,36 µmol/L	-	(47)
Cys Cys-ss GSSG Hcy NAC	Plazma	TA.: NEM Seyr.:5 mM fosfat tamponu (pH:6,5) RA: DTT 1 P. Çök: MeOH	E: LC-MS/MS K: C18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) KS: 40 °C HF (A): %0,1 FA HF (B): %0,1 FA MeCN İM: Pozitif	247,1→184-126 241→120-74 307,1→231-130 261,1→56,0 289,1→230,0	-	-	-	(48)



**Tablo 2.2. (Devam)** Sülfür yoluğı hedeflenmiş metabolomiks analizler.

Cys-gly SAH SAM tHcy Cysta Met GSH Cys	Plazma	RA: DTT P. Çök: MeOH Seyr.: HF (10 µg/mL DTT)	E: LC-MS/MS K: C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) HF (A): %0,15 FA içeren 5 mM amonyum format (pH: 2,8) HF (B): 0,15% FA MeCN Akış hızı: 0,5 mL/dk İM: Pozitif	179,2 → 76,0 385,2 → 136,2 399,3 → 250,2 136,1 → 90,0 223,2 → 134,2 150,0 → 104,0 308,2 → 179,2 122,0 → 76,0	0,2- 16 µg/mL 2- 320 ng/mL 4- 320 ng/mL 0,2- 16 µg/mL 1- 80 ng/mL 0,4-16 µg/mL 0,1-8 µg/mL 1,2-32 µg/mL	0,5 /- 0,25 /- 0,25 /- 1 /- 0,25 /- 0,5 /- 1 /- 1 /- ng/mL	87-93 87-95 86-92 89-90 87-99 99-104 83-110 85-86	(49)
*Hcys Cys GSH Cys-Gly  **Hcys Cys GSH Hcys-ss Cys-ss GSSG Cys-Gly	Plazma	Tür.: *IAM+IPCF, **IPCF Seyr.: 5 mM fosfat tamponu (pH: 6,5) RA: DTT Eks.: SPE	E: LC-MS/MS K: C18 (150 x 3,0 mm, 3 µm) HF: 1 mM amonyum format + MeOH:Su (80:20, h/h) Akış hızı: 0,2 mL/dk İM: Pozitif	*321,0 → 142,0 307,0 → 116,0 535,5 → 418,5 364 → 116 **350,0 → 204,0 336,5 → 190,3 564,5 → 162,2 525,5 → 262,0 497,5 → 248,5 953,5 → 836,5 393,3 → 248,5	0,05-100 nM	* 0,5 /10-20  ** 0,25-0,5 /5-20 nM	>92	(50)

AYBA: N-(akridin-9-il)-2-bromoasetamid, BA: Bronşiyal aspirasyonlar, BALF: Brokoalveolar lavaj sıvısı, BPDS: Bbatofenantrolindisülfonik asit disodyum tuzu, Cys: Sistein, CytA: Sisteik asit, CysSA: Sistein sülfonik asit Cys-Gly: Sisteinil-glisin, DTT: Ditiyotreitil, Eks: Ekstraksiyon, FEM: N-(2-ferroseneetil)maleimid, FMEA: Ferrosenkaboksilik asit-(2-maleimidoil)etilamid, GSA: Glutasyon sülfonamid, GSH: Glutasyon, GSH-ss-Cys:, GSSG: Glutasyon disülfid, HAEC: İnsan Aort Endotel

Hücreleri, Hcys: Homosistein, Hela: İnsan rahim ağzı kanseri, HFBA: Heptaflorobütirik asit, HUVEC: İnsan göbek bağı endotel hücreleri, IAM: İyodoasetamid, IM: İyonizasyon modu, IPCF: İzopropilkloroformat, K: Kolon, KS: Kolon sıcaklığı LR: Etiketli reaktif, MeCN:Asetonitril, MeOH:Metanol, Met: Metiyonin, HF: Hareketli faz, NACss: N-asetil sistein disülfid, NEM: N-etilmaleimid, NPM: N-fenilmaleimid, PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri, P. Çök: Protein Çöktürme, PFHA: Perfloroheptanoik asit, pmol: Pikomol, RA: İndirgeyici ajan , SAH: S-adenosilhomosistein , SAM: S-adenosilmetiyonin, Ser:Serin, SPE: Katı faz ekstraksiyonu, Seyr: Seyreltme, Sist: Sistatyonin Tau: Taurin, TCA: Trikloroasetik asit, TCEP: (tris(2-karboksietil)fosfin), TDFHA: Tridekafloroheptanoik asit, TFA: Trifloroasetik asit

### 2.3 Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

Sıvı kromatografisi, bir sıvıda çözülmüş halde bulunan bileşenlerin kolonda yer alan sabit faz ile etkileşime girmesiyle kolon içinde farklı hızlarla hareket etmesi sonucu ayırımını sağlar. Kolonda ilerleme yüksek basınç ile sağlanır. Kütle Spektrometresi (MS) ise bilinmeyen bileşiklerin, tanımlanması ve yapının aydınlatılması için kullanılır. LC-MS sıvı kromatografinin çözme gücünü ve kütle spektrometrisinin algılama özgülüğünü birleştiren güçlü bir analitik tekniktir. Bu teknik karışımdaki bileşenleri hem kolondan çıkış zamanına göre hem de kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre analiz etmektedir. LC-MS'nin, disolüsyon, biyoyararlanım, biyo eşdeğerlik ve farmakodinamik çalışmalarında kullanımı yaygındır (51, 52).

Kromatografinin ve MS'nin birleşimi nicel analiz için saptama sınırını önemli ölçüde düşürürken aynı zamanda yüksek seçiciliği ile ölçümün güvenilirliğini arttırmıştır.

MS iyonlaşma sırasında moleküler çarpışmaları önlemek için yüksek vakum gerektirir. LC ise yüksek basınç tekniğidir.

#### 2.3.1 Sıvı Kromatografisi

Yüksek tekrarlanabilirliği ve doğruluğu nedeniyle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ilaç endüstrisinde ilaç maddelerini tanımlamak ve miktar tayini için kullanılan en yaygın analitik tekniklerden biridir, (51).

#### Sabit faz

LC sisteminde sabit faz sistemin önemli bir parçalarından biridir. Çünkü sabit faz analit ile etkileşime girerek ayırımdan sorumludur.

LC'de sabit fazın içine konduğu kolonlar genellikle paslanmaz çelik borudan yapılmaktadır. Paslanmaz çelik, tüm organik çözücüler ve çoğu sulu tampon ile kullanışlıdır. Bununla birlikte, klorür içeren hareketli fazlar paslanmaz çeliğin özellikle düşük pH'ta yavaşça "halojenür çatlağına" neden olabilir, bu nedenle bu koşulları içeren yöntemlerde kolon dikkatli kullanılmalıdır. Numunelerin paslanmaz çelikle zararlı bir şekilde etkileşime girebileceği özel uygulamalar için cam, cam kaplı paslanmaz çelik ve plastikten yapılmış ticari kolonlar da mevcuttur. Ancak çalışmalar

biyolojik numuneleri ayırmak için cam kolonlara nadiren ihtiyaç duyulduğunu ve paslanmaz çelik kolonların çoğu uygulama için yeterli olduğunu göstermiştir.

Belirli bir ayırma için gereklilikler genellikle kullanılacak kolonun tipini ve konfigürasyonunu (partikül boyutu, uzunluk, iç çap, vb.) belirler.

LC'de sabit fazın parçacık boyutu 1,7-5 µm aralığında değişmektedir. Parçacık boyutu küçüldükçe ayırma gücü ve tabaka sayısı artmaktadır. Parçacık boyutu küçük olan kolonlarda pikler daha keskin olmaktadır. Ayırma gücünün artmasının sebebi kolondan daha düzenli akış sağlaması ve çözünen maddenin hareketli faz ve sabit fazdaki alacağı yolun parçacık boyutu ile orantılı olmasıdır. Ayrıca Eddy difüzyon etkisi azalır. Ancak parçacık boyutu küçüldükçe hareketli fazın akmasına karşı gösterilen direnç artar. Hareketli fazı geçirmek için daha fazla basınç gerekir. Başka bir dezavantajı ise çözücünün daha küçük partikül boyutlarında parçacıkların arasında geçerken sürtünme ısisının artmasına bağlı olarak kolonun giriş kısmı ile çıkış kısmı arasında sıcaklık farkı oluşmasıdır.

LC'de kolonların uzunluğu genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmasına rağmen analiz süresi ve numune başına düşen maliyet artmaktadır.

Kolonların iç çapı 1-5 mm arasında değişmektedir. Günümüzde en yaygın kullanılan iç çap boyutu 2,1 mm'dir. MS sistemlerinde hareketli faz hızının daha yavaş olması gerektiğinden dar kolonlar bu teknik ile daha uyumludur. Ayrıca dar kolonlar ile daha az atık oluşmaktadır.

Sabit faz olarak genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı maddeler kullanılmaktadır. Günümüzde ise hızlı analiz yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlar kullanılmaya başlanmıştır.

LC'de analitlerin ayırımı sırasında sabit fazın özellikleri çok önem taşımaktadır. Firmalar bu yüzden farklı özelliklerde kolon materyalleri üretimi yapmaktadır.

Sabit faz ile hareketli faz tipine ve bunların etkileşimlerine göre ayırım mekanizması farklılaşmaktadır. Normal faz sıvı kromatografisinde (NP-LC), sabit faz, hareketli fazdan daha polardır. Polar analitler, polar olmayan analitlere göre daha güçlü bir şekilde sabit faz tarafından tutulur ve tutulma, hareketli fazın polaritesinde azaldıkça artar. NP-LC'de sabit fazdaki bağlı yapılar siyano, diol, amino gibi polar

fonksiyonel gruplardır. Ters faz sıvı kromatografisinde (RP-LC) fazların polaritesinde NP-LC'ye göre tersi bir durum söz konusudur. Polar olmayan bir sabit faz ve polar hareketli faz kullanılır. "Benzer benzeri çeker" prensibine dayalı olarak, analitin polarite tercihine göre polar hareketli faza veya polar olmayan sabit fazda bulunur. Sabit fazdaki fonksiyonel grup bir C18 ya da C8 zinciri gibi apolar bir gruptur. İyon değiştirme kromatografisi (IEC), zıt yüklü bir fonksiyonel grup içeren sabit faz için analitin elektrostatik afinitesine dayalı olarak yüklü türleri (iyonları) tutar ve ayırır. Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC), polar bileşikleri ayırmak için alternatif bir LC yöntemidir. (53-56). Tez çalışmaları HILIC kolon ile gerçekleştirildiğinden daha detaylı verilmiştir.

### **Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi**

HILIC, polar bileşikleri ayırmak için tercih edilebilen bir sıvı kromatografisidir.

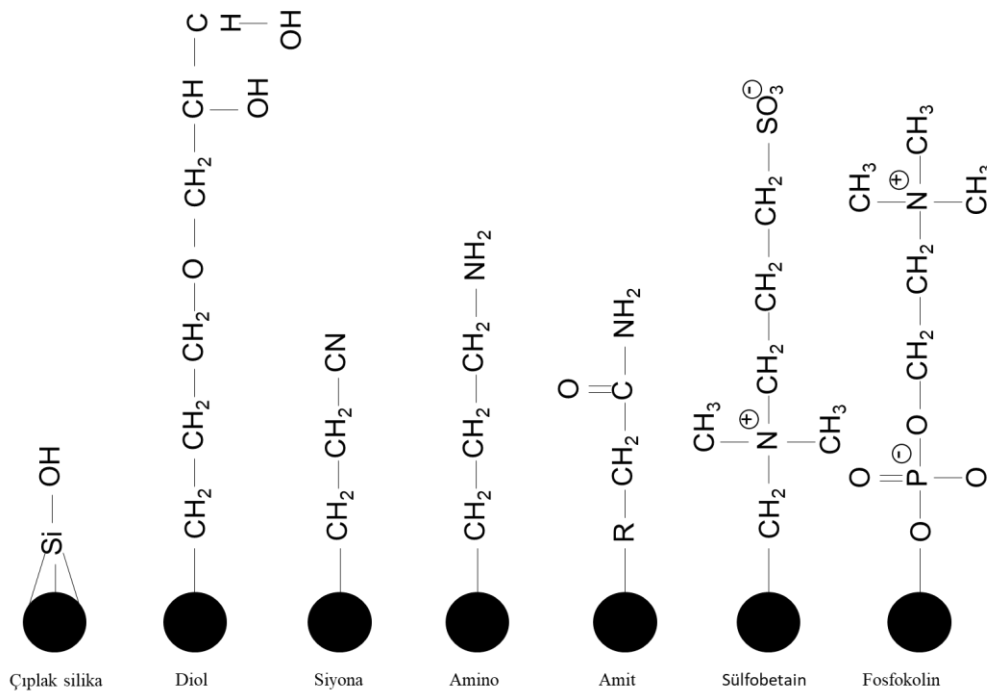
Normal faz sıvı kromatografisi gibi, HILIC de silika, amino veya siyano gibi geleneksel polar sabit fazlar kullanır ancak kullanılan hareketli faz, ters faz sıvı kromatografisinde kullanılanlara benzerdir. HILIC ayrıca iyon kromatografisinde olduğu gibi yüklü maddelerin analizine de izin verir.

Yöntem geliştirme aşamasında uygun bir kolon/hareketli faz kombinasyonu ile temel kromatografik parametrelerin araştırılmasını gerektirir. Analitlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin anlaşılması, uygun analitik koşulların seçilmesi için çok değerli olabilir. Bir analitin logP değeri (oktanol – su dağılım katsayısı) uygun bir ayırma modunun seçilmesine olanak tanır.  $\log P < 0$  olan bir analit HILIC için uygundur,  $\log P > 0$  ise ters faz için daha uygundur. İki mod arasındaki örtüşme bölgesinde herhangi biri kullanılabilir.

HILIC'in normal faz sıvı kromatografisi ve ters faz sıvı kromatografisine göre birçok avantajı vardır. Polar numuneler, HILIC'te kullanılan sulu hareketli fazda her zaman iyi çözünürlük gösterir, bu da NP-LC'de sıklıkla karşılaşılan zayıf çözünürlüğün dezavantajlarının üstesinden gelir. HILIC'te pahalı iyon çifti reaktifleri gerekli değildir. HILIC için kullanılan hareketli faz, elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosfer basıncı kimyasal iyonizasyon (APCI) için mükemmel bir eşleşmedir. Ayrıca, hareketli fazlardaki yüksek organik içerik, eluent buharlaşmasını kolaylaştırır

ve elektrosprey arayüzünde iyonizasyon verimini artırır, bu da ESI-MS ile gerçekleştirilen analizlerde yüksek hassasiyete yol açar. Karbonhidratların peptitlerin ve polar farmasötiklerin vb. analizine başarıyla uygulanmıştır. HILIC, proteomik, glikomik ve metabolomiks araştırmalarda rutin bir teknik haline gelmiştir (57, 58) .

Çeşitli destek malzemelerine ve yüzey kimyasına sahip HILIC'te kullanılan sabit fazlar, belirli ayırma problemlerine uyacak şekilde geçmişten günümüze sürekli olarak genişlemiştir. HILIC kolonlarının temel tipleri arasında çıplak silika veya diol bağlı fazlar, amino veya anyon bağlı fazlar, amin bağlı fazlar, katyon bağlı fazlar ve zwitteriyon bağlı fazlar yer almaktadır (Şekil 2.4.) (59).



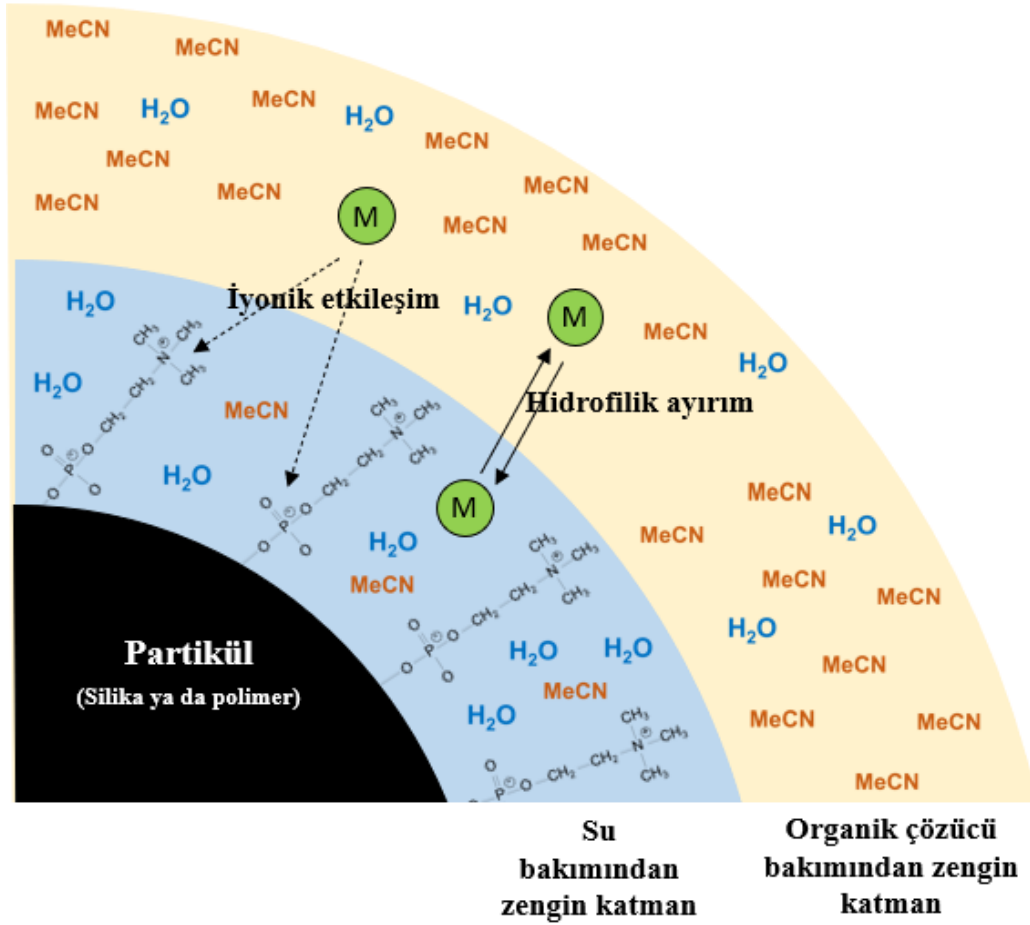
**Şekil 2.4.** HILIC olarak kullanılan sabit fazların fonksiyonel grupları (59).

HILIC' teki hareketli faz, ters faz sıvı kromatografisinde olduğu gibi su ile karışabilen organik çözücünün karışımından oluşur. Hareketli fazdaki organik faz oranı, sulu faz tabakasının bileşimini belirleyen baskın bir parametredir.

Asetonitril, çoğu HILIC uygulamasında en çok tercih edilen organik çözücüdür. Metanol ise organik faz olarak nadiren kullanılmaktadır. Bu, daha az ölçüde diğer alkoller – etanol, 2-propanol vb. için de geçerlidir. Asetonitrili daha az toksik bir çözücüyle değiştirmek için birkaç girişim rapor edilmiştir ancak asetonitrilin tetrahidrofuran ile değiştirilebildiği birkaç uygulama dışında şimdiye kadar çok

başarılı olunmamıştır. Aseton, asetonitril ile benzer polariteye sahiptir ancak HILIC koşulları altında daha düşük tutma ve önemli seçicilik farklılıkları gösterir ve daha düşük yoğunluklu MS sinyalleri sağlar.

HILIC ayırma sistemlerinin özellikleri hem sabit faza hem de hareketli fazın bileşimine büyük ölçüde bağlıdır. Çözülen analit hareketli faz ve sabit fazın yüzeyindeki sulu faz tabakası arasında dengede kalır (Şekil 2.5.) (58). HILIC ayırma mekanizması incelendiğinde ayırımın polar fonksiyonel gruplar ve sabit faz arasındaki hidrojen bağına ve iyonize fonksiyonel gruplar üzerindeki elektrostatik etkileşimlere de bağlı olduğu görülmüştür (Şekil 2.5.). Hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik (iyon değiştirme) etkileşimleri numuneye, sabit faza ve hareketli fazın bileşimine bağlı olarak alıkonmaya katkıda bulunabilir. Hidrojen bağı çok düşük su derişimlerde çok önemlidir. Elektrostatik etkileşimler, esas olarak, anyonik, katyonik veya zwitteriyonik gruplar içeren HILIC sabit fazlar üzerinde iyonik veya iyonlaşabilir polar analitlerin tutulmasını etkiler. Ek olarak, uygun deneysel koşullar altında, sabit faza bağlı ligandlarının (veya çok düşük organik çözücü derişimlerinde siloksan gruplarının) hidrofobik kısımları ile analitlerin polar olmayan kısımları arasındaki Van der Waals etkileşimlerin de mevcut olabildiği belirtilmiştir (60, 61).



Şekil 2.5. HILIC kromatografisi ayırım mekanizması (59).

### Hareketli Faz

LC sistemlerinde kullanılan su, asetonitril, metanol, etanol, kloroform LC-MS sistemi için de uygundur. Ancak kullanılan çözeltilerin saflık derecesi her zaman LC-MS bazlı bir ayırma için uygun olmayabileceği not edilmelidir. Örneğin, Thomas M Annesley'in yaptığı çalışmada farklı ticari firmalardan satın alınan metanollerin ESI-MS ile analiz sırasında iyonizasyon değişiklikleriyle ilişkilendirilebileceğini belirtmiştir (56, 62).

LC-MS'de fosfat ve sodyum asetat gibi inorganik iyon içeren tamponların kullanımından kaçınılmalıdır. Bunlar iyon baskılanmasına neden olurlar ve iyon kaynağını hızla kirletebilirler. Amonyum asetat, amonyum format veya amonyum bikarbonat gibi tamponlar MS sistemi için daha uygundur. Buna rağmen, bu tamponlar da iyon baskılanmasına neden olur, bu nedenle kullanılan tampon derişiimi,



iyi kromatografik sonuçlar üretmek için gereken minimum düzeyde olmalıdır. Trifloroasetik asit ve diğer florlu karboksilik asitler gibi iyon çifti reaktifleri de iyon baskılamasına neden olur, bu nedenle derişimleri en düşük miktarda tutulmalıdır.

Hareketli fazın daha yüksek organik içeriği, EST'de iyonizasyon verimliliğini de artırabilir. Örneğin, polar moleküller ters faz kolonlarında zayıf bir şekilde tutulur ve düşük organik içerikle kromatogramın başlangıcında ayrılır. Bu, nispeten zayıf iyonizasyon verimliliğine neden olacaktır ve polar girişimlerin bu bölgede iyon bastırmaya neden olacak şekilde birlikte ayrışması daha olasıdır. Bunun üstesinden gelmenin bir yolu, polar analitlerin tutulduğu ve hareketli fazın daha yüksek organik içeriği ile ayrıştırıldığı HILIC sabit fazların kullanılmasıdır (56).

### **Pompa**

Pompa, sistem boyunca hareketli fazın akışını sağlamak için kullanılır. Bir LC pompası yüksek basınç altında çalışabilmeli, tutarlı bir basınç sağlayabilmeli ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak kullanılmalıdır. Akış hızındaki bir değişiklik analizi büyük ölçüde etkileyebileceğinden pompanın önemi büyüktür.

Çözücülere veya sulu tampon ve organik çözücülerin herhangi bir karışık bileşimine karşı inert olan malzemeden oluşur. 10 mL/dk'ya kadar yüksek hacimli hareketli faz sağlar. Kullanılan üç ana pompa türü vardır; pistonlu pompa, şırınga pompaları ve sabit basınçlı pompalar (51). Fakat LC-MS sistemlerinde akış hızı 0,5 mL/dk'yı aşmamalıdır. Aksi durumlarda iyonlaştırma etkinliğini azalmasına ve MS'in kirlenmesine neden olunur.

### **Kolon Fırını**

Analiz edilen numuneler kolon sıcaklığından etkilenir. Tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için tutarlı sıcaklık koşullarını korumak önemlidir. Oda sıcaklığında analiz edilse bile tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için sıcaklığı sabit tutmak da önemlidir. Kolonlar sabit ısıda tutulabilmek için kolon fırını içerisinde tutulur.

### **Enjektör**

Numunenin kromatografik sisteme enjekte edilmesi için kullanılır. Genellikle 1µL ile 100 µL arası numune hacmi enjekte edilebilir. Enjeksiyon hacmi, 2 mL'ye

kadar hacme kadar artırılabilir. Otomatik ve manuel olmak üzere kullanılan iki ana enjektör türü vardır. Otomatik enjektörler daha rahat ve kullanıcı dostudur ve manuel enjektörlere kıyasla daha doğru ve hassastır (51).

### 2.3.2 Kütle Spektrometresi

MS farmasötik, klinik, biyokimya, su analizleri, gıda analizleri ve biyomedikal gibi birçok alanda uygulamaya sahip nicel ve nitel sonuç veren güçlü bir analitik araçtır. Uygun numune hazırlama yöntemleri ve kütle spektroskopisi teknikleri kullanıldığında yüz binlerce madde tespit edilebilir. Hassasiyet, algılama sınırları, hız ve uygulamalarının çeşitliliği ile günümüzde öne çıkan bir teknolojidir.

MS teknolojisi son derece hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Bu ilerleme yeni cihazların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Yeni atmosferik basınç kaynakları geliştirilmiştir. Mevcut analizörler mükemmelleştirilmiştir ve yeni analizör kombinasyonları ile yeni hibrit cihazlar hayata geçirilmiştir (63).

MS'nin temel prensibi katı, sıvı veya gaz olabilecek bir numunedeki moleküllerin iyonlaşmasını, yani moleküllerin çözüldüğü gaz fazına dönüşümünü içerir. İyon haline getirilen bu yüklü moleküller elektriksel veya manyetik alanda hareket ederek  $m/z$  oranlarına göre analiz edilirler. Bilgisayar, analizörden  $m/z$  ve dedektörden (yoğunluk) gelen verileri bir kütle spektrumuna dönüştürür. Bir MS spektrumunda, x koordinatı  $m/z$  değerlerini temsil ederken, y eksenini toplam iyon sayılarını gösterir (64-66).

MS numune enjeksiyon sistemi, yüksek vakum sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü, detektörden ve veri sisteminden oluşur. İyon akımının geçişini artırmak için iyon kaynağı, analizör bölgesi ve detektör vakum altında tutulur.

### Numune Girişi

Bir giriş sisteminin işlevi, minimum vakum kaybı ile iyon kaynağına numune vermektir. Kütle spektrometreleri, çeşitli numune giriş sistemlerine sahiptir ve çalışılacak numune tipi için uygun giriş sistemi kullanılır (67).

## İyon Kaynağı

Analiz edilecek bileşiklerin doğasına bağlı olarak LC-MS'de çeşitli iyon kaynakları kullanılabilir. Elektron İyonizasyon (EI), ESI, APCI, Matriks-destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu (MALDI), Kimyasal İyonizasyon (CI) LC-MS'de kullanılan iyon kaynaklarıdır (Tablo 2.3.). Bu tez kapsamında ESI tekniği kullanıldığı için daha ayrıntılı anlatılmıştır.

**Tablo 2.3.** Kütle spektrometresi iyonizasyon kaynakları ve bazı özellikleri (66).

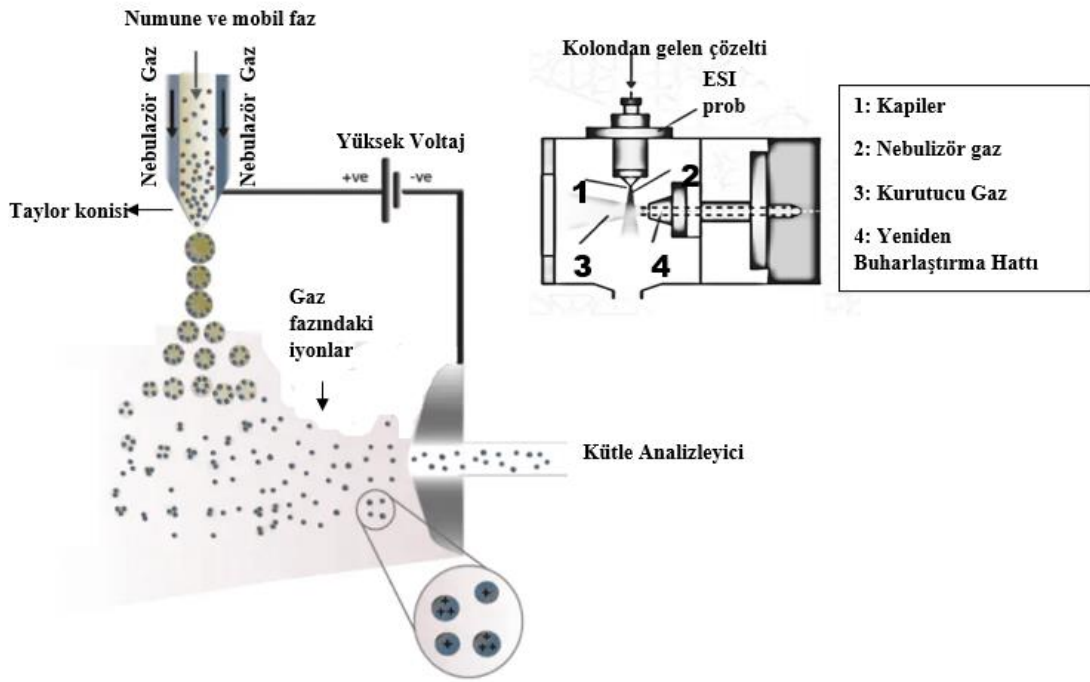
İyonizasyon tekniği	İyonizasyon tipi	Cihaz	Uygulama alanları
<b>EI</b>	Sert iyonizasyon tekniğidir.	GC-MS bağlantılı cihazların kullanımı oldukça yaygındır.	Uçucu bileşikler için uygundur.
<b>ESI</b>	En yumuşak iyonizasyon tekniğidir.	LC-MS için en popüler yöntemdir.	Uçucu olmayan ve polar bileşikler için uygundur.
<b>APCI</b>	Yumuşak iyonizasyon tekniğidir.	LC-MS için uygun bir yöntemdir.	Uçucu olmayan ve polar bileşikler için uygundur.
<b>MALDI</b>	Yumuşak iyonizasyon tekniğidir.	Zaman-yol bağımlı kütle spektroskopisiyle (TOF, <i>Time of Flight MS</i> ) birleştirilerek kullanılır. Fakat LC ile uygun değildir.	Uçucu olmayan bileşikler için uygundur.
<b>CI</b>	EI'dan daha yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir.	GC-MS uygulamaları için yaygın olarak kullanılan başka bir iyonizasyon yöntemidir.	Uçucu bileşikler için uygundur.

APCI: Atmosfer basıncı kimyasal iyonizasyon, CI: Kimyasal iyonizasyon EI: Elektron iyonizasyon, ESI: Elektrosprey iyonizasyon, GC-MS: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, LC-MS: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi, MALDI: Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu

## Elektrosprey İyonizasyon

Günümüzde kullanılan en popüler LC-MS tekniği olan elektrosprey iyonizasyon, atmosferik basınç altında çalışır ve oldukça hassas bir tekniktir.

ESI, yüksek voltaj (4,5 kV) uygulanabilen çok ince bir kapiler iğne içerir. ESI'de genellikle seyreltik (polar uçucu çözücüde mM'den daha az) bir analit çözeltisi, düşük akış hızında (tipik olarak 1–20  $\mu$ L) bir hipodermik iğne veya paslanmaz çelik kapiler aracılığıyla sabit bir hacimde kaynak odacığına püskürtülür. Bu sırada kapiler iğneye (3–4 Kv) yüksek bir elektrik potansiyeli uygulanır ve bu da yüksek yüklü damlacıkların oluşmasına (nebulizasyon) neden olur. Geleneksel HPLC akış hızları için (1–1000  $\mu$ L/dk), numune çözeltisi kapiler tüpün ucundan çıkarken nebulizasyonuna yardımcı olmak için yüksek hızda sıkıştırılmış nitrojen gazı eş eksenli olarak verilir. Nano akış hızlarında (<1  $\mu$ L/dk) ise, elektrik alanının kuvveti, nano sprej olarak bilinen işlemde, nebülize edici gaz kullanılmadan numune çözeltisini ince damlacıklara bölmek için yeterince güçlüdür. Kılcaldan çıkan yüklü damlacıklar "benzer" yüklerin birikmesinden kaynaklanan itme kuvvetleri ve mikro damlacığın küresel yapısını korumaya çalışan yüzey gerilimi kuvvetleri ile bir denge sızlık yaratır. Yüklü damlacıklar Sir Ingram Taylor tarafından keşfedilen Taylor konisi adı verilen bir koni görünümü oluşturur. Bu aşamada damlacıkların çapının daha da küçültülmesi Taylor konisinin kritik bir noktaya gerilmesine neden olur, burada yük sıvı yüzeyden kaçar ve kulombik patlama olarak bilinen bir süreçte bir gaz fazı iyonu olarak yayılır. Oluşan iyonlar kütle analizörüne gönderilir (54, 66, 67). ESI'nin şematik gösterimi Şekil 2.6.'da sunulmuştur.



Şekil 2.6. ESI'nin şematik gösterimi (68).

### 2.3.2.1 Kütle Analizörü

İyonizasyondan sonra iyonlar, iyonların  $m/z$  oranına göre ayrıldığı kütle analiz cihazına aktarılır. MS sistemin kalbi bu bölümdür. Çeşitli kütle spektrometreleri vardır ve bunlar genellikle cihazın kullandığı kütle analizi yöntemine göre ayırt edilir (69). Her kütle analizörünün avantajları ve sınırlamaları vardır. Bir kütle analizörünün performansını ölçmenin beş ana özelliği, kütle aralığı sınırı, analiz hızı, iletim, kütle doğruluğu ve çözünürlüktür. Kütle aralığı, kütle analizörünün iyonları ölçebileceği  $m/z$  sınırını belirler. Tarama hızı olarak da adlandırılan analiz hızı, analizörün belirli bir kütle aralığındaki ölçüm yaptığı hızıdır.

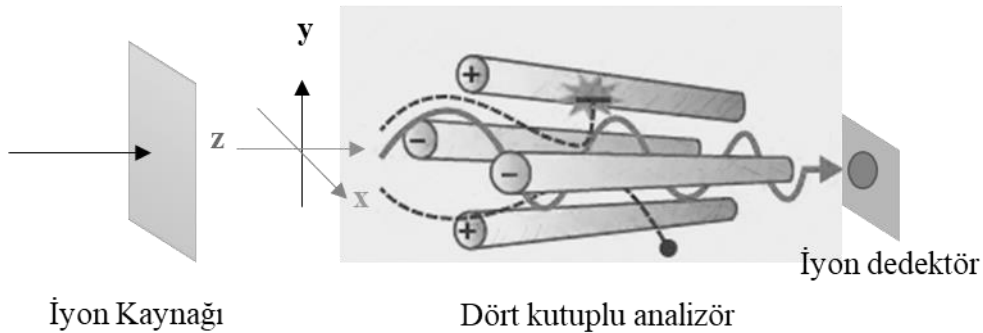
İletim, detektöre ulaşan iyonların sayısı ile kütle analizörüne giren iyonların sayısıdır. Kütle doğruluğu, teorik  $m/z$  ile ölçülen  $m/z$  arasında gözlenen farktır. Genellikle ppm olarak ifade edilir. Kütle doğruluğu büyük ölçüde analizörün kararlılığı ve çözünürlüğü ile bağlantılıdır. Düşük çözünürlüklü bir cihaz, yüksek doğruluk sağlayamaz. Ayırma gücü, bir cihazın kütleleri ayırabilme yeteneği,  $m/\Delta m$  ya da  $m/m^{1/2}$  ile gösterilen rezolusyonu ile ifade edilir. Cihazın ayırma gücü ne kadar

büyük ise benzer kütlelere sahip olan iki pikin birbirinden ayrılması bir o kadar iyidir (61).

### Dört Kutuplu Analizör

Dört kutuplu analizör (kuadrupol), radyal bir dizide paralel olarak yerleştirilmiş dört hiperbolik veya silindirik metal çubuktan oluşur (Şekil 2.7.). İyonların ayırımını sağlayabilmek için bu çubuklara doğru akım (DC) voltajı ve bir radyo frekansa (RF) bağlı alternatif akım voltajı uygulanır. Karşıt çubuklar aynı polaritede olup komşu çubuklar ise zıt polaritededirler. Amaç yalnızca belirlenen  $m/z$ 'ye sahip iyonların dört kutupludan başarıyla geçmesi ve dedektöre ulaşmasıdır. Detektöre ulaşan iyon miktarı ise sinyale dönüştürülür.

İyonizasyon ünitesinden üretilen iyonlar küçük bir delikten geçerek bu 4 çubuğun arasındaki eksen (z) doğrultusunda ilerler. Karşılıklı çubuklar arasında bir elektriksel alan oluşturmak için çubuklara uygulanan potansiyeller zamana bağlı değiştirilir. İyonların hareketi elektrik alanlarının neden olduğu kuvvete bağlıdır. Bu sırada RF değiştirilir. Buna bağlı olarak da iyonlar sinüs dalgası hareketi yaparlar. Bu hareket sırasında kararsız iyonlar, çubuklara çarparak salınım alanının etkisinden kurtulur ve dedektöre ulaşamaz. Çubuklara çarpmayan iyonlar ise bu 4 çubuğun arasından geçerek dedektöre ulaşır (61, 67).



**Şekil 2.7.** Dört kutuplu MS'nin çalışma prensibinin şematik gösterimi (70).

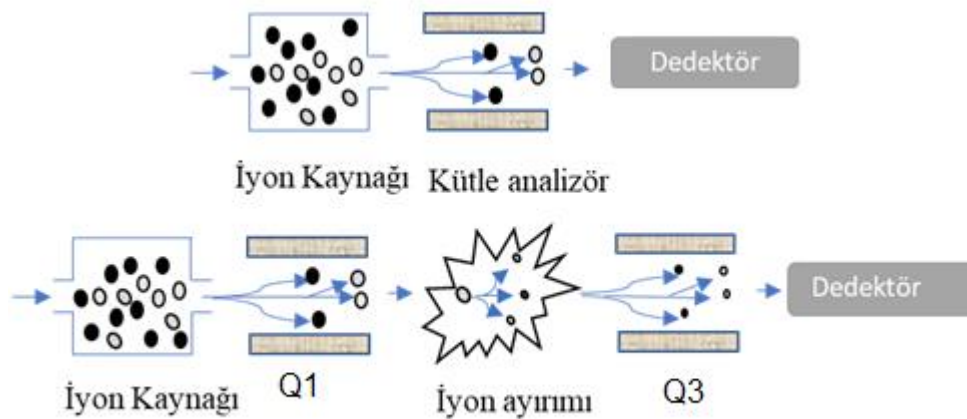
### Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS)

MS, nicel ve nitel analizde çok yararlı ve güçlü bir araçtır. Analitleri tanımlayabilir ve temel bileşim, izotopik analiz ve yapısal bilgiler hakkında doğru

kütle bilgisi sağlayabilir. Bununla birlikte, tek bir kütle spektrometresinin sınırlamaları vardır. Tek bir MS hem kromatografi hem de  $m/z$  (örn. İzomerler) için çözünürlüğün yetersiz olduğu durumlarda güvenilir nicel ve nitel bilgi sağlamayabilir. Bu, özellikle numune matriksinin karmaşık olduğu ve hedef analitlerin çok düşük derişimlerde olduğu durumlardır. Bu nedenle, daha yüksek bir seçicilik, özgünlük ve hassasiyet sağlayan ve hedef analitlerin ilave benzersiz kütle ve yapısal bilgilerini veren bir teknik gereklidir.

MS/MS sistemi aralarında bir çarpışma veya parçalanma hücresi ile seri olarak bağlanmış iki kütle analiz cihazından oluşur. İyonlar birinci kütle analizöründe (Q1) ayrılır, çarpışma hücresine girer ve parçalanmaya uğrar, bu da ikinci kütle analizöründe (Q3) ayrıştırılan ve tespit edilen ürün iyonları adı verilen iyonların oluşumuyla sonuçlanır (66).

Tek aşamalı MS ile MS/MS cihazı arasındaki farkları Şekil 2.8.'de de gösterilmektedir (66).



**Şekil 2.8.** Tek aşamalı kütle spektrometrisi (üstte) ve tandem kütle spektrometrisi (altta) karşılaştırması (66).

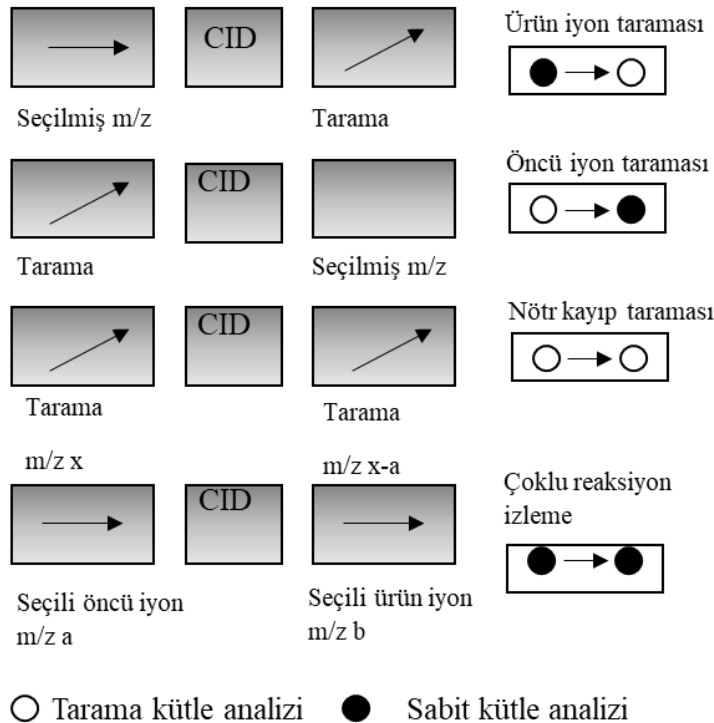
Yaygın olarak kullanılan hibrit kütle spektrometrelerinden biri, 1970'lerin sonlarında piyasaya sürülen üçlü dört kutuplu alettir. Bu enstrümantasyon şu anda QqQ olarak kısaltılmıştır, burada küçük q çarpışma hücresini ifade eder (66).

Esasen, üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi, tek dört kutuplu kütle analizörü ile aynı prensipte çalışır. İki kütle filtresinin (Q1 ve Q3) her biri dört paralel, silindirik

metal çubuk içerir. Hem Q1 hem de Q3, DC ve RF potansiyelleri tarafından kontrol edilirken, çarpışma hücresi q yalnızca RF potansiyeline maruz kalır. Çarpışma hücresi (q) ile ilişkili RF potansiyeli, seçilen tüm iyonların içinden geçmesine izin verir.

MS/MS analizi için seçilen iyon, birinci dört kutuplu tarafından filtrelendir ve çarpışma hücresi içindeki bir inert gaz akımı (örneğin, helyum, argon, ksenon) ile çarpışmaya uğrar. Böyle bir çarpışma, bazı kinetik enerjinin iç enerjiye aktarılmasına ve iyonların parçalanmasına neden olacaktır. Parçalanma derecesi ve ürün iyon türleri, sağlanan enerjiye bağlıdır çünkü bazı kimyasal bağlar, kırılma için diğerlerinden daha yüksek aktivasyon enerjisi gerektirir. Çarpışma enerjisi arttıkça, moleküler iyon bolluğu azalır ve çeşitli ürün iyonları oluşturmak için parçalanma meydana gelir. Daha da yüksek çarpışma enerjilerinde (örneğin > 50 V), parçalanma derecesi daha genişir ve bu da kütle spektrumunda moleküler iyon göstermez ve daha düşük  $m/z$  ürün iyonları bolluğu ile sonuçlanır (66).

Bu sistem dört farklı tarama türünün gerçekleştirilmesine izin verir. Bunlar öncül iyon taraması, nötr kayıp taraması, ürün iyon taraması ve çoklu reaksiyon izlemedir (Şekil 2.9.).



**Şekil 2.9.** LC-MS/MS sistemlerinde çeşitli tarama şekilleri ile kütle analizi (71).  
(CID: (Çarpışma sonrası parçalanma))



Ürün iyon taraması (eski adıyla *daughter iyon* taraması) belirli bir  $m/z$  oranına sahip bir öncü iyonu birinci kütle analizöründe seçilir. İkinci kütle spektrofotometresi parçalanmadan kaynaklanan ürün iyonlarının belirlenen  $m/z$  aralığında belirlenmesinden oluşur. Bu iyon tarama modu analitin yapı aydınlatılması için kullanılır. Öncü iyon taramasında (*Precursor ion*) Spektrum, ikinci kütle spektrometresinin seçilen bir ürün iyonunu iletecek şekilde ayarlanması ve birinci kütle analizörünün yalnızca seçilen ürün iyonunu vermek üzere parçalanmış öncü iyonları iletmek için belirli bir  $m/z$  aralığında taraması ile elde edilir. Bu tarama, bir karışımdaki yakından ilişkili bir bileşik sınıfının tanımlanması için kullanışlıdır. Nötr iyon taraması  $q^2$ 'de parçalanma yoluyla belirli bir nötr parçanın (örneğin,  $H_2O$ ,  $NH_3$ ) kaybına yol açan tüm iyonların seçici olarak tanınmasına izin verir. Öncü iyon taramasında olduğu gibi bu teknik de bir karışımdaki yakından ilişkili bileşik sınıflarının seçici olarak tanımlanmasında da yararlıdır. Örneğin, 44 Da'lık kayıp, karboksilik asitlerin yaygın bir reaksiyonudur. Çoklu iyon izleme (MRM) kompleks karışımlarda bulunan analitlerin nicel ölçümlerinde kullanışlıdır. Bu tarama modu ürün-iyon taramasına benzer. Ancak ikinci kütle analizöründe geniş bir kütle aralığında taramak yerine, iki kütle analizörü, analitin bir veya daha fazla seçilmiş öncü-ürün çifti (*precursor-product* çifti) izlemek üzere ayarlanır (61, 71).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal	Firma
Asetonitril (LC-MS saflıkta)	(Merck)
Metanol (LC-MS saflıkta)	(J. T. Baker)
İzopropil alkol (HPLC saflıkta)	(Sigma Aldrich)
Formik asit (LC-MS saflıkta)	(Merck)
Su (LC-MS saflıkta)	(Merck)
Amonyum asetat	(Sigma Aldrich)
Sistein	(Sigma Aldrich)
Sistin	(Sigma Aldrich)
Taurin	(Acros Organics)
Hipotaurin	(Acros Organics)
Glutatyon	(Sigma Aldrich)
Sisteamin	(Sigma Aldrich)
Serin	(Sigma Aldrich)
Metiyonin	(Sigma Aldrich)
Fenilalanin-1- <sup>13</sup> C	(Sigma Aldrich)
Sistin-1,1'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	(Sigma Aldrich)
Sistein-1- <sup>13</sup> C	(Sigma Aldrich)

#### 3.2 Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	(Shidmadzu 8030)
Santrifüj	(Hermle Z233 M-2)
Vorteks karıştırıcı	(Ika Vortex 3)
Hassas terazi	(Mettler-Toledo AG285)
Ultrasonik banyo	(Bandelin, Sonorex)
Derin donduruculu buzdolabı	(Arçelik)

### 3.3 Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme	Firma
C18 kolon	(Inertsil ODS-4 C18; (50x2,1 mm, 3 µm))
HILIC kolon	(Merck SeQuant ZIC-HILIC (150x4,6 mm, 5 µm))
HILIC kolon	(Merck SeQuant ZIC-HILIC (100x4,6 mm, 5 µm))
HILIC kolon	(Merck SeQuant ZIC-HILIC (50x4,6 mm, 5 µm))
NH <sub>2</sub> kolon	(Phenomenex Luna NH <sub>2</sub> (100x2 mm, 3 µm))
Vial vida kapaklı	(Shidmadzu)
İnsert (200 µL)	(Shidmadzu)
Ependorf tüp	Polipropilen, 1,5-2 mL
Mikropipet	Eppendorf (0,1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
Balon joje	5-250 mL pyreks®

### 3.4 Kullanılan Yazılım Programları

Yazılım	Firma
LabSolutions yazılımı	(Shidmadzu, versiyon 5.72)
Excel	(Microsoft)

### 3.5 Çözeltilerin Hazırlanması

**Standart stok çözeltiler:** Sistin hariç ve diğer tüm sülfür metabolitleri %0,1 formik asit: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile 1000 µg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Sistin ise formik asit:su:asetonitril (50:25:25, h/h/h) karışımı ile 1000 µg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Bütün stok çözeltiler -20 °C'de küçük miktarlara bölünerek (100 µL) saklanmıştır.

**Standart çözeltiler:** 1,00 µg/mL derişimdeki çözeltiler stoklardan %0,1 formik asit: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) ile seyreltilerek günlük hazırlanmıştır.

**%0,1 formik asit çözeltisi:** İçinde bir miktar distile su bulunan bir litrelik balon jojeye derişik formik asit (%86) çözeltisinden 1 mL alınarak aktarılmış ve bir litreye distile su ile tamamlanmıştır.

**%0,1 formik asit içeren asetonitril çözeltisi:** İçinde bir miktar asetonitril bulunan bir litrelik balon jojeye derişik formik asit (%86) çözeltisinden 1 mL alınarak aktarılmış ve bir litreye asetonitril ile tamamlanmıştır.

**İç standart stok çözeltileri:** Fenilalanin-1-<sup>13</sup>C ve Sistein-1-<sup>13</sup>C %0,1 formik asit içeren su: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile 1000 µg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Sistin-1,1'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub> formik asit:su:asetonitril (50:25:25, h/h/h) karışımı ile 1000 µg/mL derişiminde hazırlanmıştır.

### 3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma kapsamında, insan hepatoselüler karsinom (HepG2), insan akciğer adenokarsinom (A549), insan sağlıklı akciğer epitel (BEAS-2B), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2), insan sağlıklı kolon epitel (FHC) hücre hatları kullanılmıştır. HepG2, A549, BEAS-2B ve FHC hücre hatları antibiyotiklerle desteklenen (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin), %10 oranında fetal sığır serumu (FBS) içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (4,5 g/L glukoz ve L-Glutaminli) (DMEM) besiyeri ile, Caco-2 hücre hattı ise antibiyotiklerle desteklenen (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin), %20 FBS içeren DMEM besiyeri ile süspande edilerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda muhafaza edilmiş ve %100 doluluğa ulaşmış hücre hatlarında hasat işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.7 Analiz Yöntemi

Sülfür metabolitlerin analizleri optimize edilen LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

#### 3.7.1 Optimizasyon Çalışmaları

##### MS/MS Koşullarının Optimizasyonu

MS/MS yönteminin optimizasyonunda kullanılmak üzere her bir sülfür metaboliti için stok çözeltisinden %0,1 formik asit: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) çözeltisi ile seyreltilerek son derişimleri 1 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler LC-MS/MS sistemine kolon kullanılmadan 0,3 mL/dk akış hızında %0,1 formik asit: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) hareketli faz kullanılarak sırasıyla enjekte edilmiştir. MRM koşullarının optimizasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Metabolit standart çözeltileri MS sisteminde analiz edilerek uygun iyonizasyon modu ve metabolitlere ait öncü iyonlar belirlenmiştir.
2. Parçalanma iyonların belirlenmesi amacıyla aynı çözeltiler seçilen iyonizasyon modunda farklı çarpışma enerjileri kullanılarak parçalanma ürünleri belirlenmiştir.
3. Seçilen parçalanma iyonunun en yüksek sinyal şiddetinde elde edebilmek için her bir metabolite ait çarpışma enerjisi ve dört kutuplu voltajları (Q1 ve Q3) optimize edilmiştir.

##### Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

Kromatografik koşulların optimize edilebilmesi en hassas, hızlı, tekrarlanabilir analizler için farklı seçenekleri denenmesi gerektiği karmaşık bir süreçtir. Bu aşamada aşağıdaki sorulara cevap alınmıştır (72).

1. En uygun kolon hangisidir?
2. Maddelerin ayrımı için ve kullanılan cihaza uygun en iyi hareketli faz (organik faz içeriği, tampon tipi, tampon derişimi gibi) hangisidir?
3. İzokratik elüsyon yeterli midir yoksa bir gradiyent sistemi mi izlenmelidir?

4. Gradyent elüsyonu uygulandığında gradyent elüsyon beklenen gradyent süresi nedir? Kaç adım gerekli?
5. Optimum sıcaklık nedir?
6. Optimum akış hızı nedir?

Optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için farklı özellikte analitik kolonlar, farklı hareketli fazlar ve farklı gradyent elüsyon programı denenmiş ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

### 3.7.2 Analiz Koşulları

LC-MS/MS yöntemi ile sülfür metabolitlerin analizinde ESI iyon kaynağı kullanılarak pozitif iyonizasyon modlarında MRM kullanılmıştır.

LC-MS/MS analizleri hareketli faz olarak %0,1 formik asit: %0,1 formik asit içeren asetonitril (50:50, h/h) kullanılarak MerckSeQuant ZIC-HILIC (100x4,6mm, 5 µm) kolonda ve 0,35 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Analiz sırasında uygulanan gradyent elüsyon şartları Tablo 3.1’de ve kullanılan diğer LC-MS/MS parametreleri Tablo 3.2.’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Metabolitlerin analizi için gradyent elüsyon şartları.

Zaman (dk)	% Hareketli Faz A (%0,1 formik asit)	% Hareketli Faz B (%0,1 formik asit içeren asetonitril)
1,0	5	95
5,0	95	5
9,0	95	5
10,0	5	95
12,0	5	95

**Tablo 3.2.** LC-MS/MS analiz parametreleri.

Nebulizer gaz akışı	3 L/dk
İyon kaynağı sıcaklığı	400° C
Kolon sıcaklığı	30° C
İyon kaynağı	Elektrosprey
İyon tarama şekli	MRM

### 3.8 Yöntemin Hücre Kültürü Örneklerine Uygulanması

%100 doluluğa ulaşmış hücre hatları, inkübatörden çıkarılmış ve bekletilmeden 5 mL fosfat tuz tamponu ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır. Hücreler üzerine 1 mL metanol:su (9:1, h/h) çözeltisinden eklenmiş ve hafif bir şekilde petri kutusu çalkalandıktan sonra sıvı azot içine konarak hücrelerin dondurulması sağlanmıştır. Sıvı azot içinde bekletilen petri kutularındaki hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla falkon tüplere kazınarak alınmıştır. Hücrelerin kazındığı petri kutularına 1 mL daha metanol:su (9:1, h/h) çözeltisi eklenerek işlemler tekrarlanmış ve elde edilen çözelti falkon tüpe aktarılmıştır. Falkon tüpler 60000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek proteinler çöktürülmüştür. -20 °C'de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

#### 3.8.1 Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5 ve 10 µg/mL konantrasyon değerlerinde ve 1 µg/mL iç standart içerecek şekilde 1000 µL'lik çözelti hacminde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden seyreltme hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler LC-MS/MS cihazında analiz edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. Her metabolite ait pik alanının iç standart pik alanına bölünmesiyle elde edilen değerler, standart derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

#### 3.8.2 Yöntemin Numunelere Uygulanması

1 mL metanol:su (9:1, h/h) ile proteinleri çöktürülerek elde edilmiş berrak santrifügat halindeki hücre kültürü örneklerinden 200 µL alınarak ependorf tüplere aktarılmış ve uçurilmaya bırakılmıştır. Uçurulan örneklere hareketli faz karışımı ile

seyreltilmiş 200 µL iç standart (1 µg/mL) eklenerek 1 dk vortekslenmiştir. 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak santrifügattan 150 µL alınmış ve viallere aktarılmıştır. Örnekler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

### **3.9 Analitik Yöntem Validasyonu**

Analitik yöntem validasyonu, belirli bir analizde kullanılmak amacıyla geliştirilen yöntemin kesinliğinin, güvenilirliğinin ve kalitesinin belirtilen koşullara uygunluğunu kanıtlamak için gerçekleştirilmektedir. Ayrıca valide edilmiş yöntemin analiz koşullarında herhangi bir değişiklik yapılmış ise yöntem rutin analizlerde kullanılmadan önce tekrar valide edilmelidir.

#### **3.9.1 Validasyon Parametreleri**

Analitik yöntem validasyonu belirli validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu parametrelerin analizi için farmakopeler veya Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda, Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve İlaç Uygulamaları Kurumu (US FDA) gibi yasal kuruluşların hazırladığı kılavuzlar kullanılmaktadır.

Geliştirilen yöntem ICH biyoanalitik yöntem validasyon kılavuzuna göre seçicilik, doğrusalılık, duyarlılık, matriks etkisi, taşınma, kesinlik, doğruluk, tutarlılık ve sağlamlık açısından test edilmiştir (22).

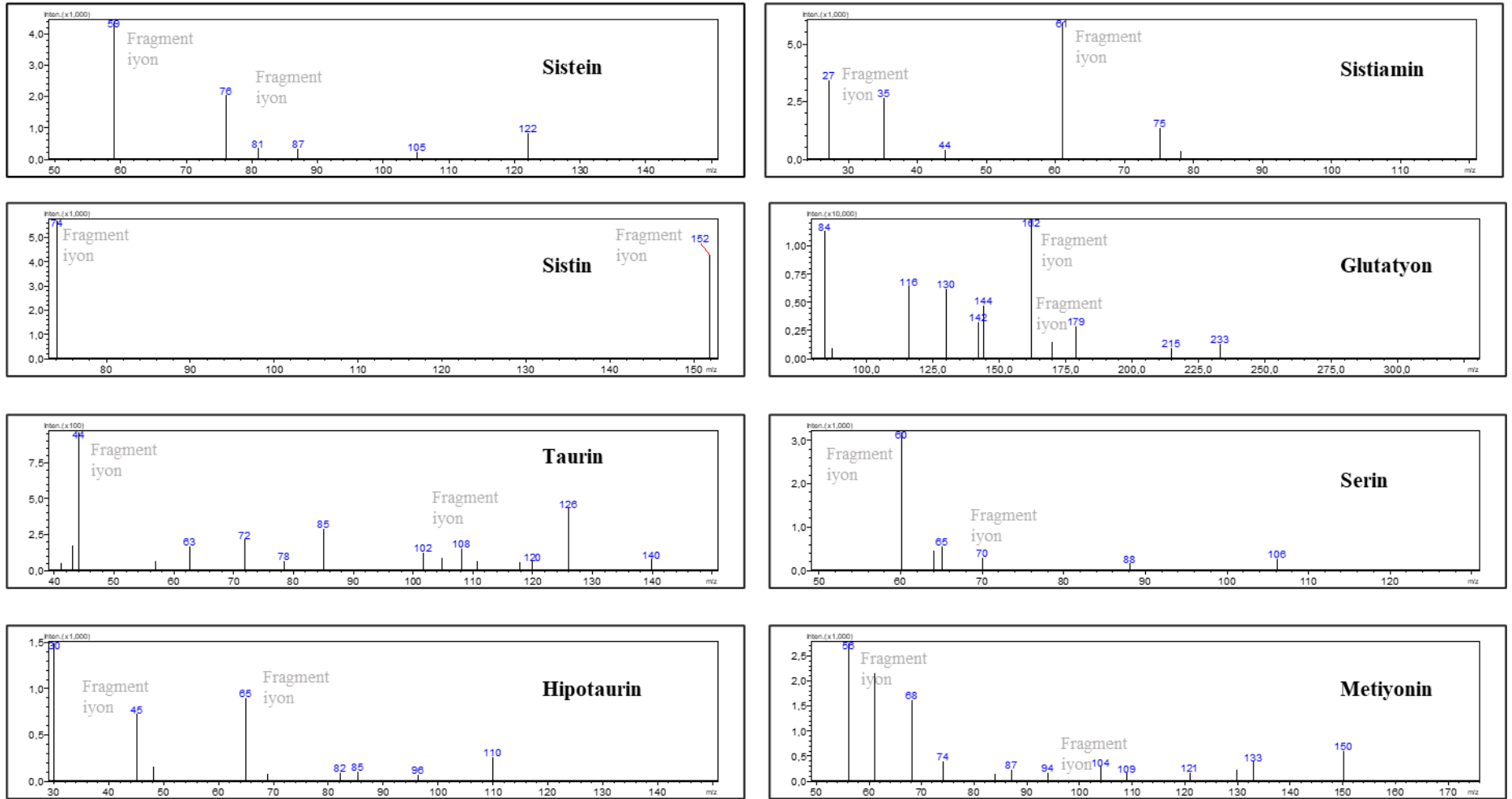


## **4. BULGULAR**

### **4.1 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi**

#### **4.1.1 MS/MS Yönteminin Optimizasyonu Sonuçları**

Analizi gerçekleştirilen sülfür metabolitlerinin MS/MS parçalanma modellerine ait kütle spektrumları Şekil 4.1.'de ve optimum MRM koşulları Tablo 4.1.'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Metabolitlere ait MS/MS spektrumları.

**Tablo 4.1.** Optimum MRM koşulları.

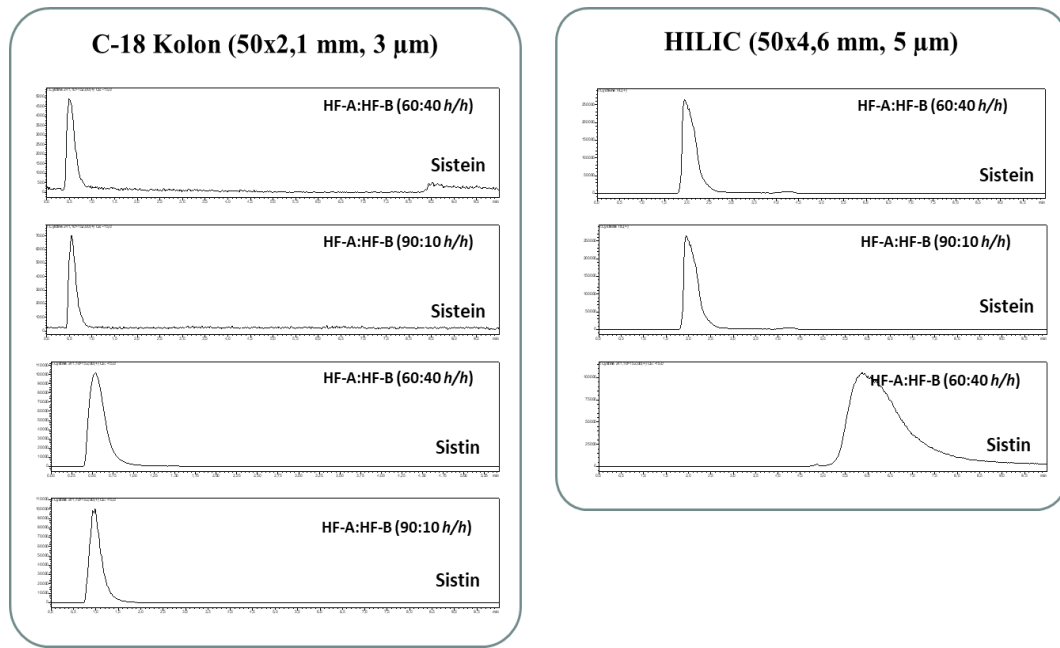
Standart	<i>m/z</i>	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
<b>Sistein</b>	121,80→ 59,10*	-13	-22	-11
	121,80→ 76,20	-14	-17	-30
<b>Sistin</b>	242,0→152,1*	-25	-15	-15
	242,0→74,0	-25	-29	-15
<b>Taurin</b>	126,10 → 107,9*	-16	-21	-18
	126,00 → 44,90	-12	-15	-30
<b>Hipotaurin</b>	110,00 → 65,10*	-12	-21	-16
	110,00 → 45,10	-12	-15	-30
<b>Serin</b>	106,0→60,1*	-15	-25	-15
	106,0→70,0	-12	-18	-15
<b>Glutatyon</b>	307,90 → 179,10*	-18	-13	-12
	307,90 → 162,00	-11	-19	-17
<b>Sisteamin</b>	77,8→61,0*	-13	-15	-11
	77,8→35,2	-12	-25	-12
<b>Serin</b>	106,0→60,1*	-15	-25	-15
	106,0→70,0	-12	-18	-15
<b>Metiyonin</b>	149,8 → 104,05*	-10	-15	-11
	149,8→56,05	-10	-21	-13
<b>Fenilalanin-1-<sup>13</sup>C (İS)</b>	167,1→121,1*	-15	-15	-24
	167,1→ 104	-10	-27	-22
<b>Sistin-1,1'-<sup>13</sup>C<sub>2</sub> (İS)</b>	243,1→152,7*	-18	-19	-25
	243,1→120,9	-12	-14	-30
<b>Sistein-1-<sup>13</sup>C (İS)</b>	123→59,1*	-13	-22	-11
	123→76,2	-14	-17	-30

\*Nicel parçalanma iyonu, CE: Çarpışma enerjisi, Q1 (V): Birinci kuadropol voltajı, Q3 (V): Üçüncü kuadropol voltajı

#### 4.1.2 Kromatografik Koşulların Optimizasyon Sonuçları

Belirlenen analiz koşullarında sülfür metabolitleri için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.3.'de verilmiştir.

Kromatografik ayırım için ilk olarak Inertsil ODS-4 C18 (50x2,1 mm, 3 µm) kolon kullanılarak sistin ve sistein metabolitleri denenmiştir. Ancak metabolitlerin C18 sabit faz ile etkileşime girmeyerek kolonda tutunmadıkları görülmüştür (Şekil 4.2.). Polar özellikte kolonlar ile optimizasyon çalışmasına devam edilmiştir. Sülfür metabolitleri farklı polarite ve partikül çapına sahip dört farklı polar kolon MerckSeQuant ZIC-HILIC (150x4,6 mm, 5 µm), MerckSeQuant ZIC-HILIC (100x4,6 mm, 5 µm), MerckSeQuant ZIC-HILIC (50x4,6 mm, 5 µm), ve Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> (100x2 mm, 3 µm) kullanılarak analiz edilmiştir.

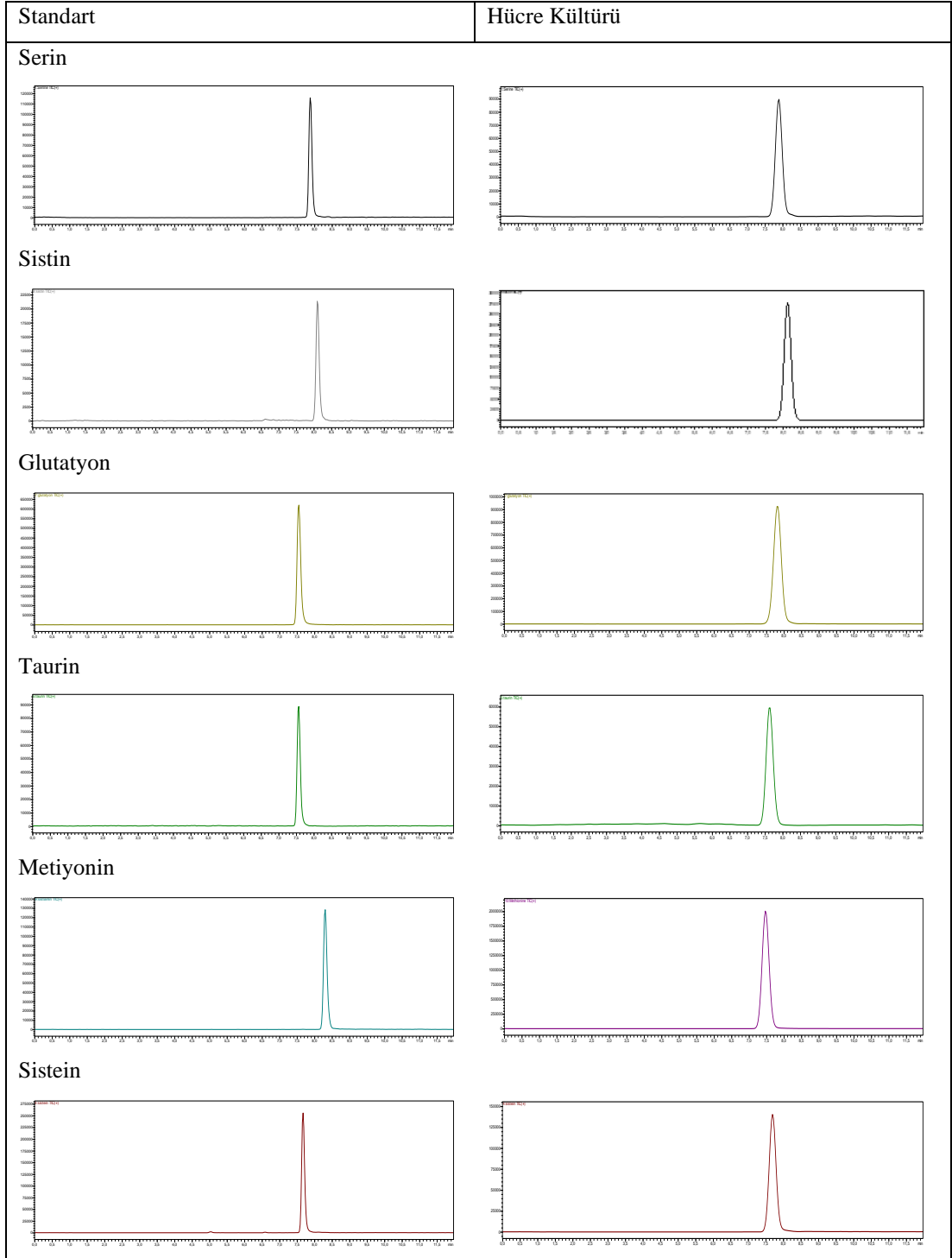


**Şekil 4.2.** Sistein ve sistinin farklı kolonlarda ayırımı.

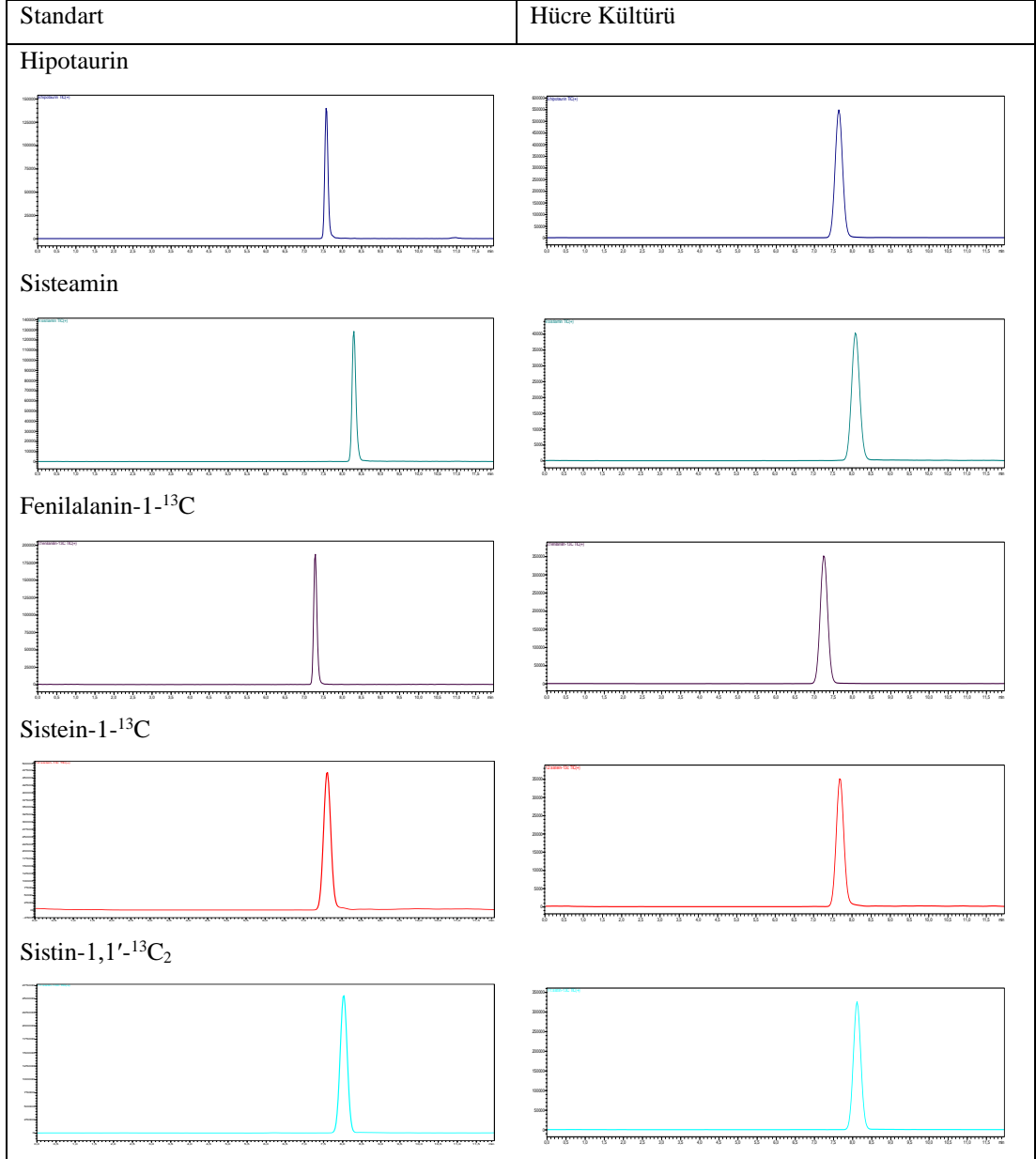
(HF- A: %0,1 formik asit çözeltisi ve HF-B %0,1 formik asit içeren asetonitril)

En iyi ayırımın ve pik şekillerinin elde edildiği MerckSeQuant ZIC-HILIC (100x4,6 mm, 5 µm) kolon sabit faz olarak seçildikten sonra optimum ayırımı sağlayabilmek için farklı hareketli faz bileşimleri (A: 20 mM amonyum format-B: % 0,1 formik asit içeren asetonitril; A: 20 mM amonyum asetat asetat-B: % 0,1 formik asit içeren asetonitril; A: %5 asetonitril içinde %0,1 formik asit- B: %95 asetonitril içinde %0,1 formik asit; A: % 0,1 formik asit çözeltisi ve B: %0,1 formik asit içeren

asetonitril) denenmiştir. En iyi ayırımın %0,1 formik asit ve %0,1 formik asit içeren asetonitril karışımından oluşan hareketli faz ile sağlandığı görülmüştür.



**Şekil 4.3.** Tüm sülfür metabolitlere ait örnek kromatogramlar (Soldakiler: Standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) Sağdakiler: Hücre kültürü örneği)



**Şekil 4.3. (Devam)** Tüm sülfür metabolitlere ait örnek kromatogramlar (Soldakiler: Standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) Sağdakiler: Hücre kültürü örneği)

### 4.1.3 Sistem uygunluk

Geliştirilen yöntemin optimum analiz koşulları altında sistem uygunluğu, enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü ( $k'$ ), kuyruklanma faktörü, kolon verimliliği (teorik plaka sayısı,  $N$ ) parametreleri (Tablo 4.2.) açısından belirlenmiştir (73).

**Tablo 4.2.** Sistem uygunluk test kriterleri.

Test edilen parametre	Sınır değer
Enjeksiyon kesinliği	$BSS \leq \%1, n > 5$
Kapasite faktörü ( $k'$ )	$k' > 2$
Kuyruklanma faktörü	$\leq 1,5$
Teorik tabaka sayısı ( $N$ )	$N > 2000$

n: Enjeksiyon sayısı

Sistem uygunluk testi  $1 \mu\text{g/mL}$  derişimdeki standart karışım çözeltisinin on iki tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre her bir metabolite ait alıkonma zamanı, enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı Tablo 4.3.'te verilmiştir.

**Tablo 4.3** Sistem uygunluk parametrelerinin değerlendirilmesi (n=12).

Metabolit	Alıkonma zamanı (dk)	Enjeksiyon kesinliği	Kapasite faktörü ( $k'$ )	Kuyruklanma faktörü	Teorik tabaka sayısı
Sistein	7,631	0,061	8,301	1,079	5153
Sistin	8,041	0,049	8,800	1,004	6904
Taurin	7,701	0,064	8,383	1,104	4381
Hipotaurin	7,607	0,043	8,280	1,121	5485
Glutasyon	7,695	0,059	8,384	1,075	4344
Sisteamin	7,905	0,070	8,640	1,064	5279
Serin	7,806	0,046	8,510	1,112	5768
Metiyonin	7,371	0,060	7,990	1,110	4700

n: Enjeksiyon sayısı



## 4.2 Analitik Yöntem Validasyonu

Güvenilir sonuçlar elde etmek için uygulanan biyoanalitik yöntemlerin iyi karakterize edilmesi, tam olarak doğrulanması çok önemlidir. Validasyonun temel amacı analiz edilen matrikslerden analit derişim belirlenmesi için yöntemin güvenilirliğini göstermektir.

Biyoanalitik yöntemler için ICH kılavuzu göz önüne alınmıştır (22). Geliştirilen yöntem seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, matriks etkisi, taşınma, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, tutarlılık açısından test edilmiştir.

### 4.2.1 Seçicilik

Analitik yöntem, ilgilenilen analit(ler)i ve İS'yi matriksteki endojen bileşenlerden veya numunedeki diğer bileşenlerden ayırt edebilmelidir. Kromatogramlar geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla incelenmiştir (Şekil 4.3.). Ayrıca sülfür metabolitleri 5 farklı derişimde (0,5, 1, 2, 5, 10 µg/mL) hücre kültüründen elde edilen ekstraktlara ve hareketli faza eklenmiştir. Daha sonra geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş ve matriks etkisini değerlendirmek için hücre kültüründen elde edilen ekstraktlar ve hareketli faz çözeltilerinden oluşan kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.8.).

### 4.2.2 Taşınma

Ardışık enjeksiyonlarda bir önceki enjeksiyondan kaynaklanan taşınma miktarı analiz sonuçlarını etkileyecek düzeyde olmamalıdır. İki enjeksiyon arası taşınma varsa bulunması gereken değerden daha yüksek miktarda değerler ile analiz sonuçlanabilir. Taşınma, yöntem geliştirme sırasında ele alınmalı ve en aza indirilmelidir.

Validasyon sırasında taşınma, standartları içeren yüksek derişimli numuneden (10 µg/mL) sonra hareketli faz enjeksiyonu ile değerlendirilmiştir. Yüksek derişimdeki standardı takiben yapılan hareketli faz enjeksiyonundaki alanlar her bir metabolitin LLOQ alanlarıyla karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.4.'de sunulmuştur (22).

**Tablo 4.4.:** Sülfür metabolitleri analiz yönteminin taşınma etkisi (n=3).

Maddeler	% Alan oranı*
Sistein	7,47±0,32
Sistin	1,7±0,39
Taurin	5,87±3,23
Hipotaurin	11,74±0,90
Glutatyon	6,66±0,35
Sisteamin	Tespit edilemedi
Serin	3,17±0,31
Metiyonin	1,2±0,12
Fenilalanin-1- <sup>13</sup> C	0,13±0,00
Sistin-1,1'- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	0,33±0,09
Sistein-1- <sup>13</sup> C	1,21±0,03

\* 100 x Hareketli fazdaki alan/LLOQ'daki alan, Ortalama± Standart hata  
n: Enjeksiyon sayısı

### 4.2.3 Duyarlılık

Gözlenebilme sınırı (LOD), metabolitlerin varlığının tespit edebildiği ancak kesin miktarının ölçemediği en düşük analit derişimidir. Alt tayin sınırı (LLOQ), bir numunedeki kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle güvenilir bir şekilde ölçülebilen en düşük analit derişimidir. LOD değerleri sistin ve sistein için 0,0005 µg/mL, serin, glutatyon, metiyonin ve hipotaurin için 0,005 µg/mL, taurin ve sisteamin için 0,01 µg/mL'dir. LLOQ değeri ise her metabolit için 0,05 µg/mL bulunmuş ve her bir metabolit için BSS ve BH değerleri Tablo 4.5.'de verilmiştir.

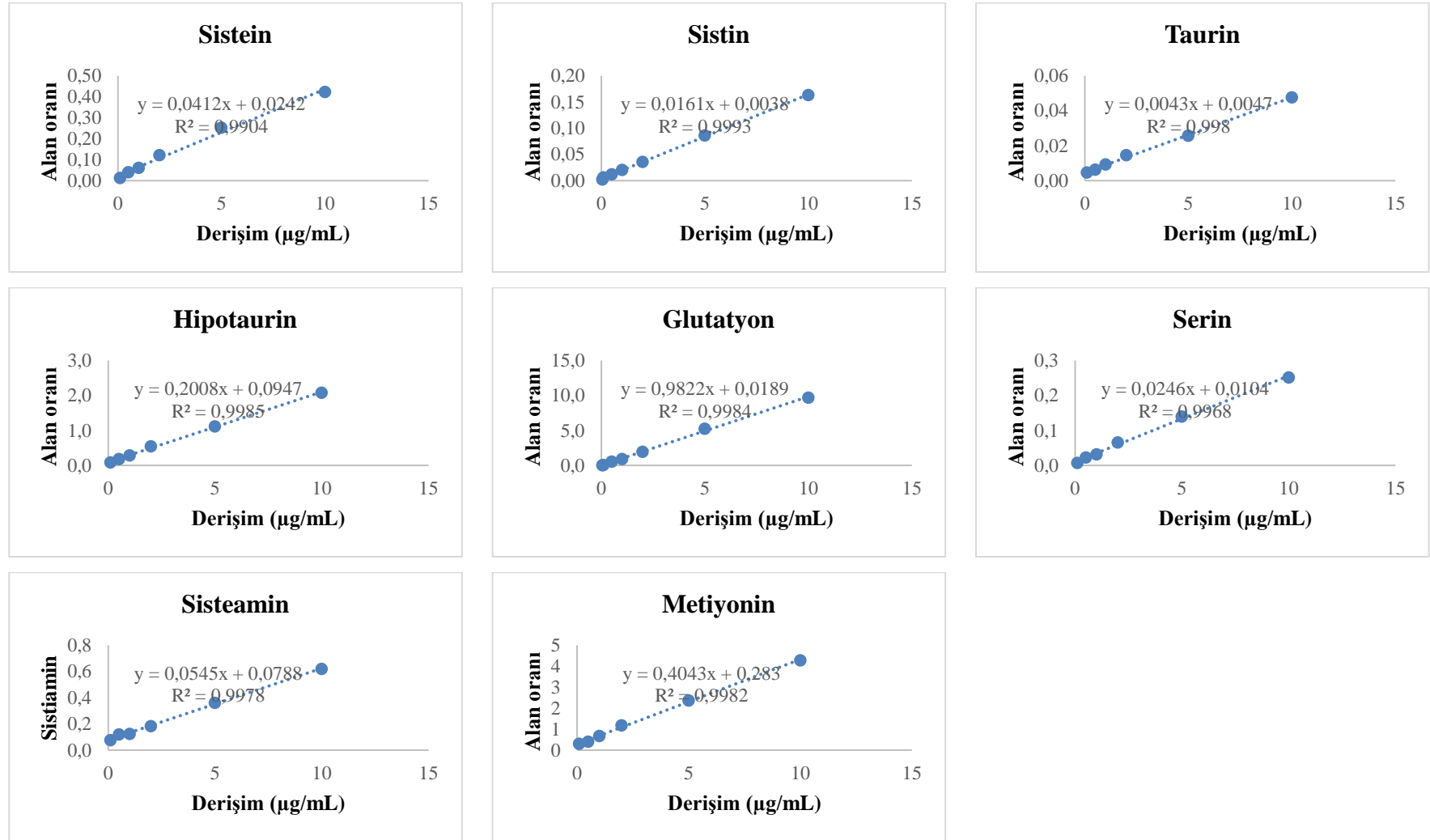
**Tablo 4.5.** LLOQ değerleri için kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=3).

	Sistein	Sistin	Taurin	Hipotaurin	Glutatyon	Sisteamin	Serin	Metiyonin
$\bar{X}$	0,052	0,049	0,051	0,050	0,051	0,048	0,054	0,051
BSS <sup>a</sup>	4,585	1,180	6,033	1,368	6,767	5,340	9,211	1,338
BH <sup>b</sup>	3,018	-1,192	1,462	2,423	1,229	-0,010	8,653	1,598

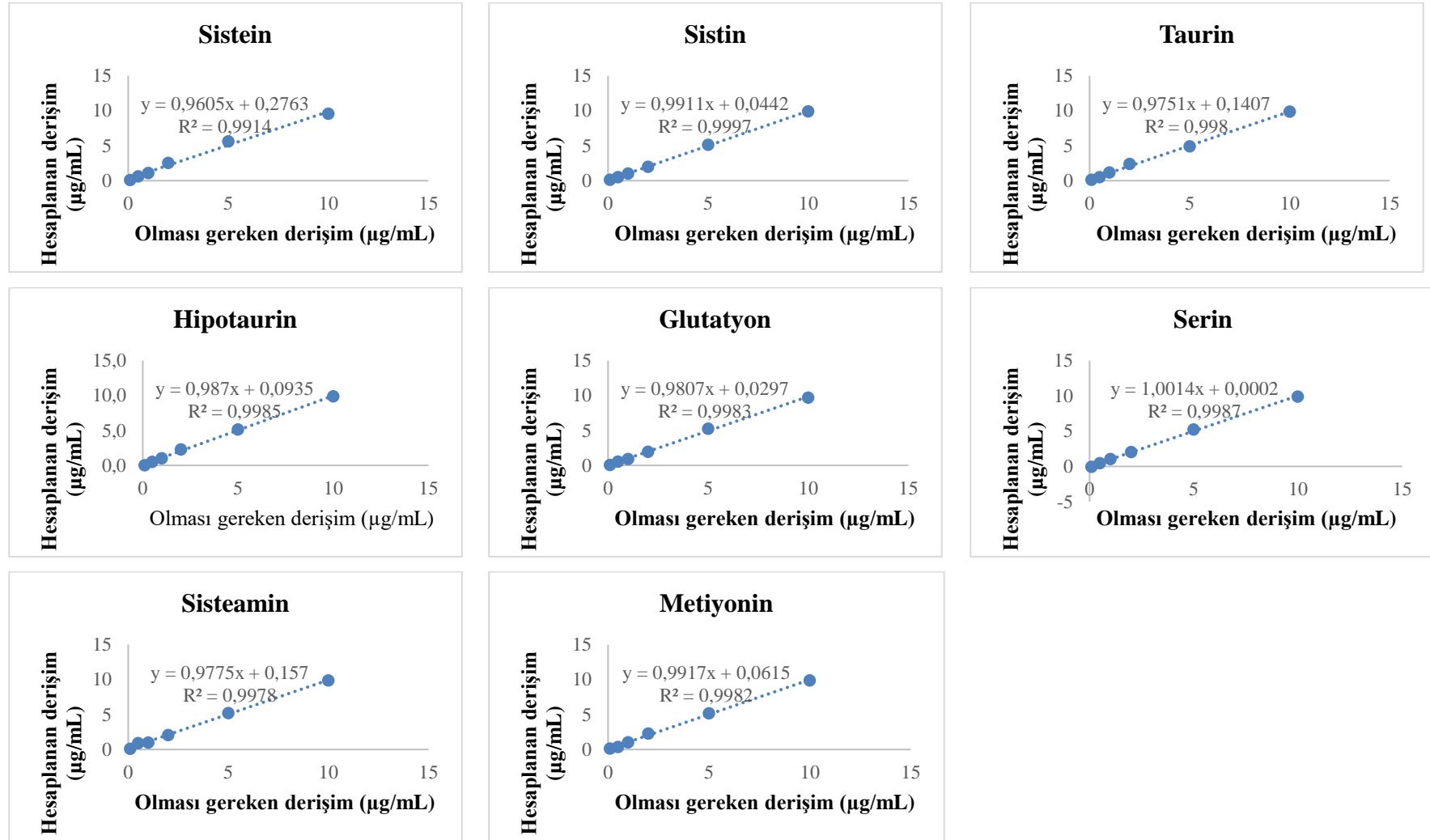
$\bar{X}$ : Ortalama (µg/mL), <sup>a</sup>: BSS, Bağıl standart sapma, <sup>b</sup>: BH, Bağıl hata, n: Enjeksiyon sayısı

#### 4.2.4 Doğrusallık

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile farklı miktarlarda sülfür metabolitleri ve sabit miktarda iç standart içeren kalibrasyon çözeltileri analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, en küçük kareler doğrusal regresyon analizi uygulanarak metabolit derişimine karşı metabolit alanının iç standart alanına oranı çizilerek oluşturulmuştur. Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler Tablo 4.6.'da sunulmuştur. Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları ve metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri sırasıyla Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.



Şekil 4.5. Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.

**Tablo 4.6.** Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler (n=8).

Metabolit adı	Aralık (µg/mL)	a	b	r	R <sup>2</sup>	p <sup>**</sup>	F <sup>***</sup>
Sistein	0,05-10	0,0412	0,0242	0,998	0,9904	0,067	3715,5
Sistin	0,05-10	0,0161	0,0038	0,9950	0,9993	0,356	870,7
Taurin	0,05-10	0,0043	0,0047	0,9990	0,9980	0,590	852,3
Hipotaurin	0,05-10	0,2008	0,0947	0,9990	0,9985	0,582	684,7
Glutasyon	0,05-10	0,9822	0,0189	0,9990	0,9984	0,533	3835,4
Sisteamin	0,05-10	0,0545	0,0788	0,9990	0,9978	0,062	2877,8
Serin	0,05-10	0,0246	0,0104	0,9980	0,9968	0,312	6095,7
Metiyonin	0,05-10	0,4043	0,2830	0,9991	0,9982	0,768	1464,9

\*y = ax+b; a: Eğim; b: Kesişim; x: Derişim (µg/mL); y: Pik alan oranı; r: Korelasyon katsayısı; R<sup>2</sup>: Tanımlayıcılık katsayısı; \*\*p: Kesişimin olasılık değeri, eğimin p değeri \*\*\*F: Korelasyon katsayısının F değeri, n: Enjeksiyon sayısı

#### 4.2.5 Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik çalışmaları için öncelikle 1 µg/mL'lik standart karışım çözeltisinden on iki enjeksiyon yapılmış ve cihaz tekrarlanabilirliği de gösterilmiştir.

Yöntemin kesinliği için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda doğrusallık aralığına giren üç derişim seviyesinde ve her derişim için üç ayrı çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda ayrı günlerde, üç derişimde taze hazırlanan çözeltiler kullanılarak analizler yapılmıştır. Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir.

**Tablo 4.7:** Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=3).

Der. µg/ mL		Sistein		Sistin		Taurin		Hipotaurin		Glutasyon		Sisteamin		Serin		Metiyonin	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
0,1	$\bar{X}$	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,09	0,11	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11
	SH	0,00	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01
	BSS <sup>a</sup>	3,38	3,94	6,52	14,64	6,24	13,77	4,13	2,94	4,64	12,57	6,29	3,44	1,90	8,34	7,76	9,84
	BH <sup>b</sup>	2,36	4,55	9,72	1,30	10,53	-6,02	6,35	5,97	2,62	-1,43	-0,95	-3,59	4,58	10,02	6,84	6,80
1	$\bar{X}$	1,03	1,00	1,11	1,03	1,14	1,07	1,07	1,10	1,01	0,98	1,09	1,10	1,12	1,08	1,04	0,93
	SH	0,05	0,08	0,05	0,08	0,12	0,04	0,03	0,02	0,06	0,09	0,01	0,11	0,05	0,07	0,07	0,10
	BSS <sup>a</sup>	5,20	8,04	4,59	7,43	10,25	3,41	2,70	2,16	5,53	8,96	0,90	9,63	4,78	6,49	6,72	10,68
	BH <sup>b</sup>	3,23	0,21	10,92	2,89	14,00	7,16	7,06	10,17	1,07	-2,48	9,15	10,07	11,54	7,62	3,89	-7,15
10	$\bar{X}$	9,81	9,89	9,82	10,08	10,00	9,74	9,84	9,81	10,06	9,91	9,74	9,80	9,74	9,82	9,81	9,70
	SH	0,10	0,19	0,18	0,15	0,12	0,30	0,09	0,05	0,61	0,07	0,19	0,10	0,19	0,14	0,06	0,12
	BSS <sup>a</sup>	1,01	1,89	1,87	1,49	1,21	3,11	0,94	0,54	6,10	0,71	1,96	1,01	1,96	1,37	0,58	1,22
	BH <sup>b</sup>	-1,9	-1,1	-1,8	0,8	-0,02	-2,63	-1,65	-1,91	0,6	-0,9	-2,64	-1,99	-2,64	-1,8	-1,88	-3,01

Der. Derişim,  $\bar{X}$ : Ortalama SH: Standart hata, a: BSS, Bağıl standart sapma, b: BH, Bağıl hata n: Enjeksiyon sayısı

#### 4.2.6 Matriks etkisi

Sülfür metabolitlerinin ve iç standardın iyonizasyonu üzerindeki matriks etkisi, numune matriksinin varlığında ve yokluğunda elde edilen pik alanı değerlerinin oranı olarak ifade edilmiştir (74). Bu amaçla, sülfür metabolitleri içeren 5 farklı derişimde çözelti (0,5, 1, 2, 5 ve 10 µg/mL) hücre kültüründen elde edilen boş matrikse ve hareketli faza eklenmiştir. Daha sonra geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiş ve matriks etkisini değerlendirmek için hücre kültüründen elde edilen ekstraktların oluşan çözelti ve hareketli faz çözeltilerinden oluşan kalibrasyon eğrilerinin oranları Tablo 4.8.'de sunulmuştur.

**Tablo 4.8.** Matriks etkisi.

	Sistein	Sistin	Taurin	Hipotaurin	Glutasyon	Sisteamin	Serin	Metiyonin
%Matriks etkisi*	103,29	87,23	110,53	107,27	116,20	105,00	101,86	110,73

\*%Matriks etkisi=  $[100 \times (\text{Boş matriks üzerine eklenen standartlar ile oluşturulan kalibrasyon doğrusunun eğimi}) / (\text{Hareketli faz üzerine eklenen standartlar ile oluşturulan kalibrasyon doğrusunun eğimi})]$



#### 4.2.7 Sağlamlık

Yöntemin faktörlere tepkisini test etmek için deneysel tasarım uygulanarak geliştirilen yöntemin sağlamlığı sistematik olarak araştırılmıştır. Bu amaçla, sudaki FA yüzdelinde (%0,09-0,11) ve asetonitrildeki FA yüzdesinde (%0,09-0,11), hareketli fazdaki organik çözücünün (asetonitril) yüzdesinde (%79-81), kolon sıcaklığı (29-31°C) ve akış hızı (0,345-0,355 mL/dk) aralıklarında değişiklikler yapılmıştır (Tablo 4.9.). Deney koşullarındaki küçük bir sapmanın elde edilen yanıtlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik üretip üretmediğini belirlemek için optimize edilmiş koşullar altında on üç aşamalı bir kesirli faktör tasarımı uygulanmıştır (Tablo 4.10.). Analiz sonuçları ANOVA testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve regresyon katsayısı ve regresyon denkleminin p değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.11.).

**Tablo 4.9.** Sağlamlık çalışması için parametreler ve seviyeleri.

Parametreler	Seviye		
	-1	0	+1
Sudaki FA yüzdesi	0,09	0,1	0,11
Asetonitrildeki FA yüzdesi	0,09	0,1	0,11
Organik çözücü yüzdesi	94	95	96
Kolon sıcaklığı (°C)	29	30	31
Akış hızı (mL/dk)	0,345	0,35	0,355

**Tablo 4.10.** Sağlamlık çalışması için deney tasarımı.

Deney No	Sudaki FA yüzdesi	Asetonitrildeki FA yüzdesi	Organik çözücü yüzdesi	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (mL/dk)
1	-1	1	1	-1	1
2	-1	-1	1	1	1
3	1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	-1	1
6	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	1	-1	1	1
9	-1	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	-1
12	1	1	1	-1	1
13	0	0	0	0	0

**Tablo 4.11.** Sülfür metabolitlerinin sağlamlık çalışmasından hesaplanan p değerleri.

Maddeler	p değeri						
	Sabit	Sudaki FA yüzdesi	Asetonitrildeki FA yüzdesi	Organik çözücü yüzdesi	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (dk/mL)	Model
<b>Sistein</b>	0,00	0,09	0,14	0,09	0,83	0,25	0,16
<b>Sistin</b>	0,00	0,13	0,48	0,65	0,18	0,88	0,31
<b>Sisteamin</b>	0,00	0,11	0,43	0,65	0,28	0,62	0,31
<b>Glutatyon</b>	0,00	0,52	0,79	0,71	0,91	0,91	0,98
<b>Serin</b>	0,00	0,07	0,51	0,24	0,58	0,62	0,27
<b>Metiyonin</b>	0,00	0,18	0,35	0,22	0,33	0,36	0,30
<b>Taurin</b>	0,00	0,89	0,90	0,66	0,30	0,52	0,84
<b>Hipotaurin</b>	0,00	0,52	0,21	0,88	0,80	0,83	0,70

#### 4.2.8 Tutarlılık

Standart çözelti karışımı (1,0 µg/mL) önerilen yöntemin sağlamlığını belirlemek için iki farklı analizci tarafından optimum deney koşulları altında altışar tekrar ile analiz edilmiş ve bulgular istatistiksel olarak (t-testi) ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.12.)

**Tablo 4.12.** Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri.

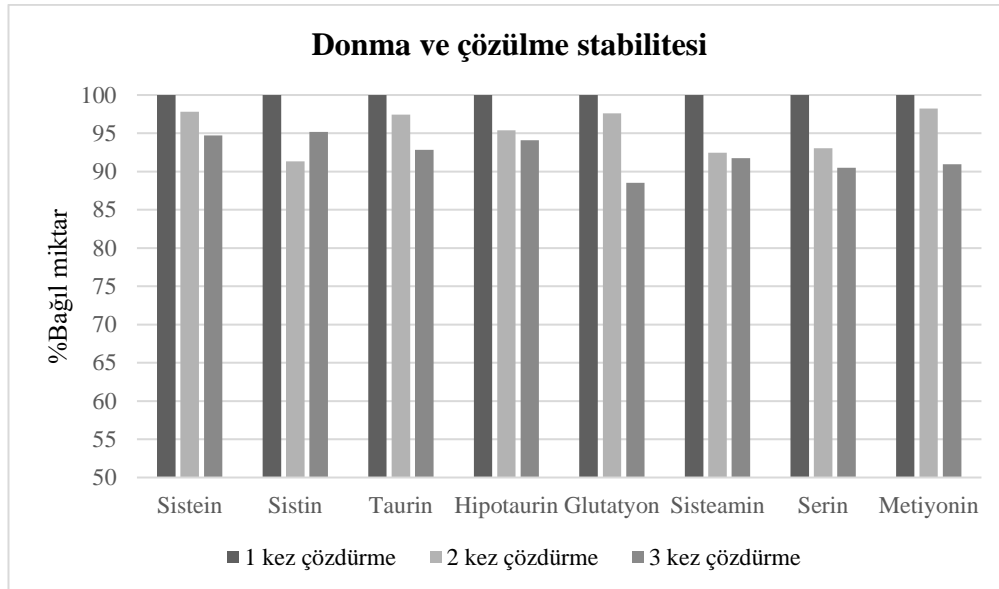
Maddeler	Alıkonma Zamanı (dk)					Metabolit Alanı/İS Alanı Oranı				
	Analizci 1		Analizci 2		p değeri	Analizci 1		Analizci 2		p değeri
	$\bar{X} \pm SH$	BSS	$\bar{X} \pm SH$	BSS		$\bar{X} \pm SH$	BSS	$\bar{X} \pm SH$	BSS	
<b>Sistein</b>	7,627±0,006	0,072	7,628±0,004	0,047	0,956	1,761±0,087	4,965	1,779±0,065	0,036	0,714
<b>Sistin</b>	8,040±0,003	0,038	8,038±0,004	0,055	0,355	0,022±0,001	6,814	0,023±0,001	0,045	0,170
<b>Taurin</b>	7,697±0,005	0,062	7,693±0,004	0,058	0,281	2,414±0,076	3,138	2,357±0,031	0,013	0,152
<b>Hipotaurin</b>	7,627±0,006	0,072	7,609±0,004	0,048	0,526	0,189±0,013	6,714	0,196±0,011	0,058	0,422
<b>Glutasyon</b>	7,697±0,005	0,059	7,694±0,004	0,054	0,415	0,176±0,011	5,983	0,177±0,010	0,059	0,878
<b>Sisteamin</b>	7,903±0,006	0,080	7,901±0,004	0,053	0,538	0,058±0,005	8,198	0,062±0,003	0,054	0,178
<b>Serin</b>	7,802±0,004	0,050	7,805±0,003	0,036	0,338	0,042±0,003	6,268	0,042±0,003	0,060	0,712
<b>Metiyonin</b>	7,156±0,005	0,075	7,370±0,004	0,049	0,684	0,441±0,026	5,816	0,465±0,017	0,036	0,103

$\bar{X} \pm SH$ : Ortalama, <sup>a</sup>:BSS, Bağlı standart sapma

#### 4.2.9 Stabilité

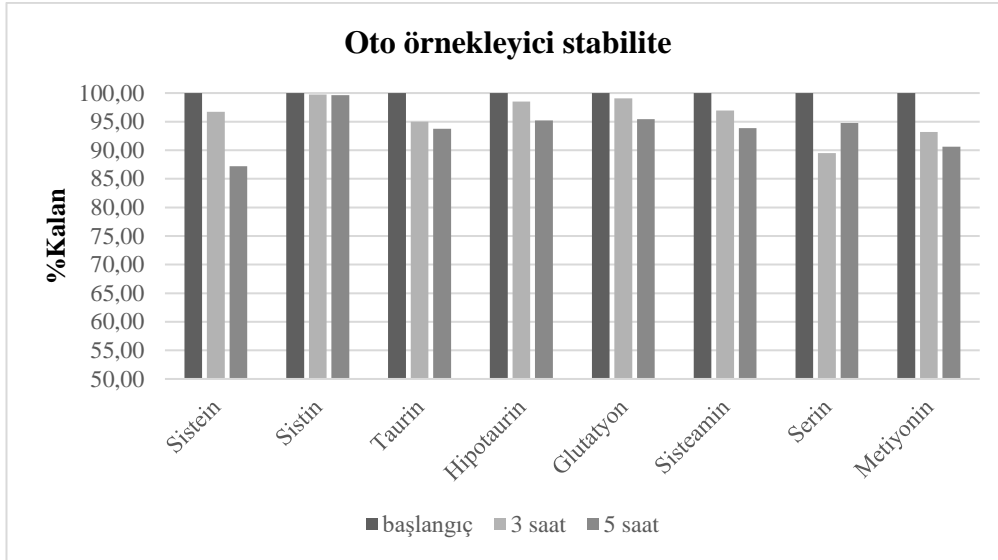
Sülfür metabolitlerinin stok çözeltileri ise en az 1 ay süreyle -20 °C’de kararlı bulunmuştur. Ayrıca her bir metabolitin kararlılığı oto örnekleyici (başlangıç, 3 saat, 5 saat) ve donma-çözülme döngüsündeki kararlılıkları incelenerek değerlendirilmiştir. Kararlılık çalışmalarında 1 µg/mL standart karışım çözeltisi kullanılmıştır.

Elde edilen analiz sonuçları oto örnekleyici ve donma-çözülme stabilitesi için taze hazırlanmış standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.’de verilmiştir.



**Şekil 4.6.** Donma-çözülme döngüsünün sülfür metabolitleri üzerindeki etkisi.

[% Bağlı Miktar= (Dondurulup çözündürme sonunda çözeltildeki metabolitin pik alanı/ Taze hazırlanmış çözeltildeki metabolitin pik alanı) x 100].

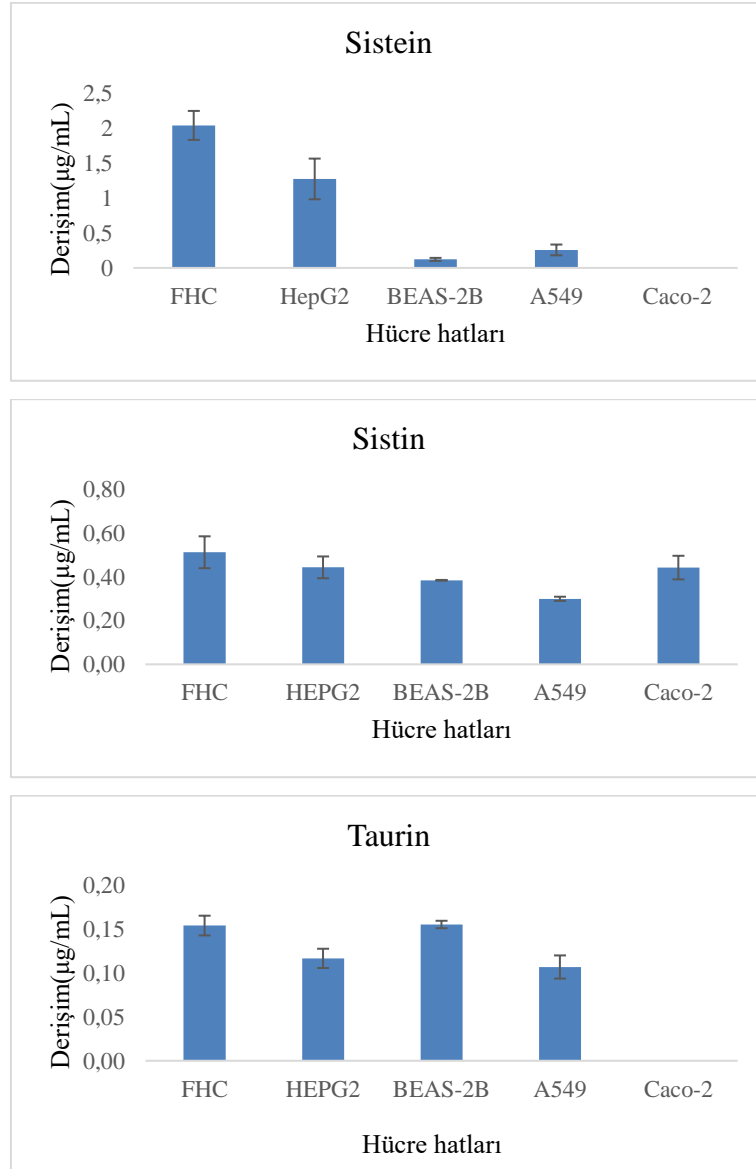


**Şekil 4.7.** Sülfür metabolitlerinin oto örnekleyicideki kararlılık çalışmaları.

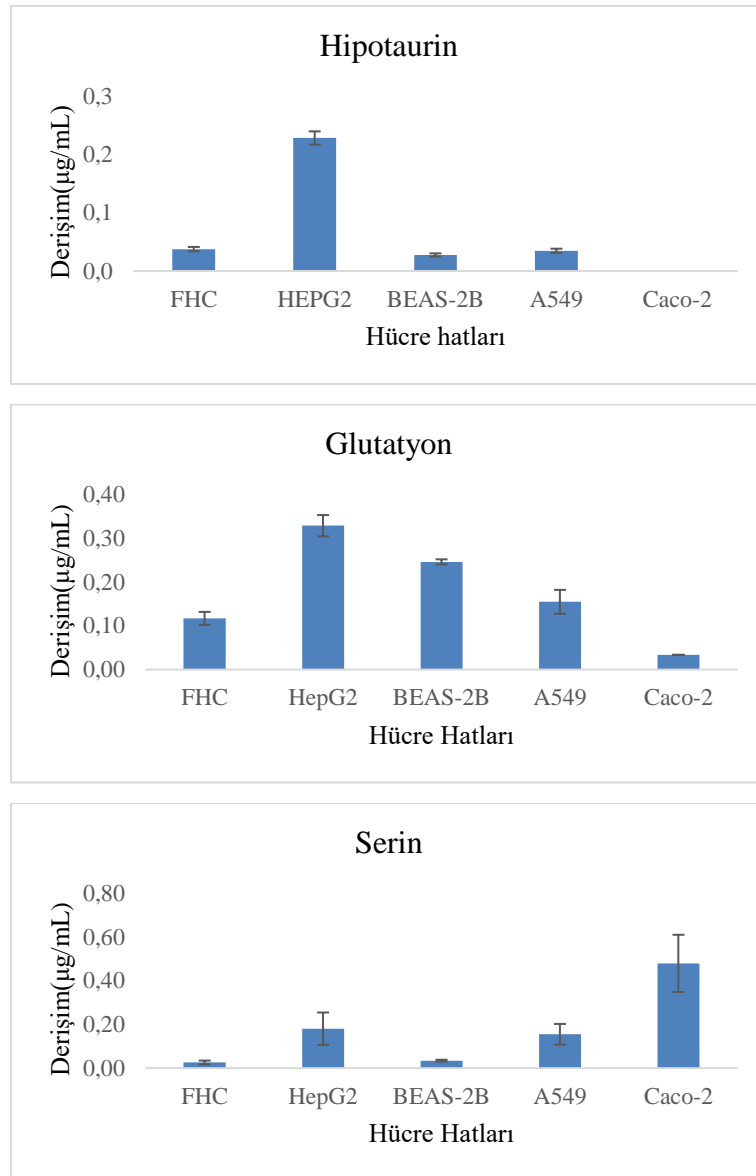
[% Bağlı Miktar = (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/ Taze hazırlanmış metabolitin pik alanı) x 100]

### 4.3 Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Geliştirilen yöntem, HepG2, A549, BEAS-2B, Caco-2 ve FHC hücre hatlarından elde edilen ekstraktlara uygulanarak sülfür metabolitlerinin miktarları belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.8.'de sunulmuştur.



**Şekil 4.8.** Sülfür metabolitlerinin farklı hücre hatlarındaki derişimleri.



**Şekil 4.8. (Devam)** Sülfür metabolitlerinin farklı hücre hatlarındaki derişimleri

## 5. TARTIŞMA

Sülfür metabolitleri canlı organizmalarda önemli roller oynar ve bir dizi biyolojik süreçte yer alır. Kanseri, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidirler. Vücutta anormal derişimde sülfür metabolitleri içeriği hastalıkların teşhisini sağlayabilir ve tedavisini etkileyebilir. Sülfür metabolitlerinin miktarı kanser tipine göre farklılık gösterebilir. Örneğin sisteyinin seviyesi meme kanserinde azaldığı prostat kanserinde ise arttığı belirtilmiştir (75).

Sülfür metabolitleri kanserin oluşumunu, gelişimini ve dönüşümünü etkiler. Bu nedenle, farklı kanser hücre hatlarından sülfür metabolitlerinin analizi, canlılarda sülfür metabolizmanın rolünün ve bu metabolitlerin dinamiklerinin daha iyi anlaşılması için esastır.

Kaynaklarda sülfür bileşiklerinin ölçümü için LC-MS/MS analiz yöntemleri bildirilmiş olsa da seçilen 8 metabolitin aynı anda analizin gerçekleştirildiği bir çalışma yoktur (Bkz. Tablo 2.2.).

Bu tez çalışmasında, sülfür metabolitlerinin eş zamanlı analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem farklı kanser hücre hatlarında uygulanmış ve miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

### **MS/MS Yönteminin Optimizasyonu**

Çalışmamızda seçilen sülfür bileşiklerinin eş zamanlı analiz için oldukça seçici ve hassas olan MRM modunda çalışan bir MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

LC-MS/MS cihazında nicel analiz gerçekleştirebilmek için MRM parametrelerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Optimizasyon çalışmaları metabolitlerin standart çözeltileri kullanılır. Standartlar, uygun derişimlere (50 ng/mL-2 µg/mL) seyreltikten sonra doğrudan MS sistemine enjekte edilerek MRM parametreleri optimize edilir. Bu amaçla ilk önce farklı iyonizasyon modlarında (pozitif ve negatif) metabolite ait öncü iyon taranır. Daha sonra farklı çarpışma enerjileri uygulayarak metabolitelere ait parçalanma ürünleri belirlenir.



Parçalanma ürünleri belirlendikten sonra her bir metabolite ait parçalanma iyonları için en yüksek sinyal şiddeti çarpışma enerjileri, dört kutuplu voltajları (Q1, Q3) ve bekleme süresi belirlenir. Bu amaçla her bir metabolit için 1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisi hazırlanılmış ve öncü iyonlar pozitif modda elde edilmiştir. Daha sonra her bir metabolit için iki tane parçalanma ürünü nicel ve doğrulama için belirlenerek en yüksek sinyal elde edebilmesi için MRM parametreleri optimize edilmiştir (Bkz. Tablo 4.1.).

### **Kromatografi Yöntemin Optimizasyonu**

Optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için farklı özellikte analitik kolonlar, hareketli fazlar ve gradiyent elüsyon programları denenmiş ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

Kromatografik ayırimda kullanılacak sabit fazın belirlenmesi amacıyla ilk olarak ters faz C18 (Inertsil ODS-4 C18 (50x2,1 mm, 3 µm)) kolon ile sistin ve sistein çözeltileri ayrı ayrı analiz edilmiştir. Analizden elde edilen kromatogramlar incelendiğinde sistin ve sisteinin kolonda tutunmadıkları görülmüştür (Şekil 4.2.). Sülfür metabolitleri oldukça polar maddelerdir ve apolar olan C18 sabit faz ile etkileşime girmeden kolondan ayrılması beklenen bir sonuçtur. Kromatografi yöntemin optimizasyonu için bu aşamadan sonra polar özellikteki kolonlara yönelinmiştir. Metabolitler farklı polarite ve partikül çapına sahip dört farklı polar kolon (MerckSeQuant ZIC-HILIC (4,6x150 mm, 5 µm), MerckSeQuant ZIC HILIC (4,6x100 mm, 5 µm), MerckSeQuant ZIC-HILIC (50x4,6 mm, 5 µm) ve Phenomenex Luna NH<sub>2</sub> (100x2 mm, 3 µm)) kullanılarak analiz edilmiştir. Bu kolonlar arasında diğerlerine kıyasla en iyi ayırımın ve pik şekillerinin elde edildiği zwitteriyonik yapıdaki sabit faz olan MerckSeQuant ZIC-HILIC (100x4,6 mm, 5 µm) optimizasyon çalışmasında kullanılacak analitik kolon olarak belirlenmiştir.

Hareketli fazdaki organik çözeltilerin tipi ve yüzdesi, maddelerin alıkonma zamanları üzerinde çok etkili olduklarından dolayı en önemli parametrelerden biridir. Asetonitril, çoğu HILIC uygulamasında en çok tercih edilen organik çözücüdür. Optimum hareketli faz bileşimini belirleyebilmek için asetonitril ile farklı sulu faz bileşimine sahip hareketli faz çözeltileri (A: 20 mM amonyum format-B: %0,1 formik asit içeren asetonitril; A: 20 mM amonyum asetat-B: %0,1 formik asit içeren

asetonitril; A: %5 asetonitril içinde %0,1 formik asit-B: %95 asetonitril içinde %0,1 formik asit; A: %0,1 formik asit çözeltisi-B: %0,1 formik asit içeren asetonitril) denemiştir. En iyi ayırımın %0,1 formik asit ve %0,1 formik asit içeren asetonitril karışımından oluşan hareketli faz ile sağlandığı görülmüştür.

Gradyent elüsyonu kromatografik çalışma sırasında mobil fazın bileşimini değiştirme tekniğini ifade eder. Gradyent elüsyon toplam ayırma süresinin azaltılması, belirli bileşikler arasında iyi bir ayırma sağlamayan bir ayırmada alıkonma sürelerinin değiştirilmesi ve kromatografik kolonun temizlenmesi ve/veya yenilenmesi için kullanılır (76). Optimum ayırma koşulunu oluşturabilmek için farklı gradyent koşulları denenmiştir. En uygun ayırımın seçilen hareketli fazda (hareketli faz A: %0,1 formik asit -B: asetonitril içinde %0,1 formik asit) (1 dk %95 B, 5 dk: %5 B, 9 dk %5 B, 10 dk %95 B, 12 dk %95 B) koşullarının olduğu görülmüştür.

Hareketli faz bileşimi ve uygun gradyent koşullar optimize edildikten sonra hareketli fazın akış hızının ve kolon sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Farklı hareketli faz akış hızı denemelerinden (0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk, 0,35 mL/dk) sonra akış hızı 0,35 mL/dk; farklı kolon sıcaklığı denemelerinden (25 °C, 30 °C, 40°C) ise 30°C seçilmiştir.

LC-MS/MS sisteminin geliştirilen yöntem için uygunluğu alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı esas alınarak değerlendirilmiştir. Sistem uygunluk testi için metabolitlerin 1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisinin 12 tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Elde edilen değerler (Bkz. Tablo 4.2.) belirtilen sınırlar [BSS (alıkonma zamanı) ≤ %1, kapasite faktörü >2, kuyruklanma faktörü ≤ 1,5 ve teorik tabaka sayısı >2000] içinde bulunmuş olup sistemin hedeflenen metabolitlerin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

### **Yöntem Validasyonu**

Yöntem validasyonu seçicilik, taşınma, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik ve doğruluk, matriks etkisi, sağlamlık ve tutarlılık validasyon parametreleri ölçümlerini içermektedir.

Herhangi bir metabolit pikinin başka bir metabolitin *m/z* değerinde görülmediği saptanmıştır. Ayrıca analiz süresince kullanılan hareketli faz çözeltisi de bu amaçla

analiz edilmiş ve metabolitlerin MRM koşullarında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Metabolite ait pikin başka bir metabolitin  $m/z$  değerinde görülmemesi ve hareketli faz çözeltisinin çalışılan MRM koşullarında herhangi bir girişim yapmamış olması yöntemin seçici olduğunu göstermektedir.

Taşınma, en yüksek derişimde (10  $\mu\text{g/mL}$ ) metabolit çözeltilerinin enjeksiyonlarını takiben boş solüsyonların enjeksiyonu ile tespit edilmiştir. Yöntemin taşınması, LLOQ değerlerinin %20'sinden daha düşük bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.4.). Enjektör yıkamalarının, numuneler arası herhangi bir taşınmayı önlemek için yeterli olduğu göstermiştir (22).

Metabolitlere ait LOD değeri sinyal/gürültü oranının yaklaşık 3 olduğu değerler olarak seçilmiştir. Bu değerler, sistin ve sistein için 0,0005  $\mu\text{g/mL}$ , serin, glutasyon, metiyonin ve hipotaurin için 0,005  $\mu\text{g/mL}$ , taurin ve Sisteamin için 0,01  $\mu\text{g/mL}$ 'dir. LLOQ değeri yeterli kesinlik ve doğruluğun sağlandığı (BH <% 15 ve BSS <% 15) 0,05  $\mu\text{g/mL}$  değeri belirlenmiştir.

Doğrusallık çalışmaları sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.5.'de, kalibrasyon eğrilerine ait bilgiler Tablo 4.6.'da verilmiştir. Analizi gerçekleştirilen metabolitlerin doğrusal olduğu çalışma aralığında korelasyon katsayısı değerlerinin 0,990-0,999 arasında bulunmuş olması yöntemin doğrusallığını göstermektedir. Ayrıca yöntem doğrusallığı kontrol grafikleri (Bkz. Şekil 4.5.) oluşturulmuş ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin 1'e yakın çıkması ve korelasyon katsayılarının 0,991-0,999 aralığında olması geliştirilen yöntemin 0,05-10  $\mu\text{g/mL}$  aralığında doğrusal olduğunu göstermiştir.

Üç farklı derişimde yapılan gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları sonucunda BSS ve BH değerlerinin %15'den küçük bulunması; geliştirilen yöntemin kesin ve doğru olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.7.) (22).

LC-MS sisteminde analitlerin tekrarlanabilirliğini ve miktar tayininin doğruluğunu etkileyebilecek önemli bir faktör, tespit edilmeyen matriks bileşiklerinin birlikte ayrıştırılmasının neden olduğu iyon baskılama ve iyon artışıdır. Bunlar tayin edilecek bileşiklerle aynı zamanlarda pik gösteren tayini istenmeyen bileşiklerdir. İyon bastırma, biyolojik matrikslerde daha az uçucu, endojen bileşiklerin varlığından kaynaklanır, bu da damlacık oluşumunun veya buharlaşmanın etkinliğini değiştirebilir

ve bu da kaynaktaki gaz fazındaki yüklü iyon miktarını değiştirir. Bu da analizin tekrarlanabilirlik parametresini etkiler.

Matriks etkisi numune temizleme prosedürlerini geliştirerek ve kromatografik koşulları değiştirerek en aza indirilebilir veya düzeltilebilir. Kalibrasyon numunelerinin matriksi ile gerçek örneklerin matriksinin aynı olması ve iç standart olarak kararlı izotopların kullanılması matriks etkisini azaltmanın geçerli bir yoludur (77).

LC-MS/MS analizlerde analit ile aynı kromatografik ve iyonlaşma etkinliğinde bulunan kararlı izotoplarının kullanılması yöntemin tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu arttırmaktadır. Normal koşullarda analizi yapılacak her bir madde için kararlı izotopun kullanılması gerekmektedir. Fakat maliyet ve erişebilirlikten dolayı her zaman mümkün olmamaktadır. Tezimizde iç standart olarak temin edilen sistin -  $1,1'-^{13}\text{C}_2$ , sistein- $1-^{13}\text{C}$  ve fenilalanin- $1-^{13}\text{C}$  kullanılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda sistin için sistin- $1,1'-^{13}\text{C}_2$ , sistein için sistein- $1-^{13}\text{C}$  diğer metabolitler için fenilalanin- $1-^{13}\text{C}$  iç standart olarak belirlenmiştir.

Matriks etkisi parametresi için artan derişimlerde (0,5, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) sülfür metabolitleri hücre kültüründen elde edilen ekstraktlara ve hareketli faza eklenmiş ve LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Her bir metabolit için, metabolit alanının İS alanına oranının eklenen standart metabolit derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur Elde edilen doğrularına ait regresyon denklemleri belirlenmiş olup eğim oranları karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin eğim oranı %87,23 ile %116,20 arasında olması matriks etkisinin olmadığı göstermiştir (22) (Bkz. Tablo 4.8.).

Deney koşullarındaki küçük bir sapmanın elde edilen yanıtlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik üretip üretmediğini belirlemek için optimize edilmiş koşullar altında on üç aşamalı bir kesirli faktör tasarımı uygulanmıştır (Bkz. Tablo 4.9.). Analiz sonuçları ANOVA testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve regresyon katsayısı ve regresyon denkleminin p değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.10. ve Tablo 4.11.). Sonuçlar arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ( $p \geq 0.05$ ). Bu nedenle küçük değişikliklerin sülfür metabolitlerinin iç standarta karşı pik alanı oranı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı ve geliştirilen analitik yöntemin sağlam olduğu gösterilmiştir.

1,0 µg/mL standart çözeltileri, önerilen yöntemin tutarlılığını belirlemek için iki farklı (analizci 1 ve analizci 2) tarafından optimum deney koşulları altında analiz edilmiş ve sülfür metabolitlerinin alıkonma zamanları ve pik alan oranları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.12.). t-testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark ( $p>0.05$ ) gözlenmemiş ve yöntem tutarlı bulunmuştur.

Stabilite çalışmalarında oto örnekleme ve donma çözülme döngüsü incelenmiştir. Taze hazırlanmış çözeltilerin analiz sonuçları ile karşılaştırma yapıldığında döngü sonucunda analit miktarlarının %80'inden fazla olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.7.-4.8.).

### **Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması**

Sülfür metabolitleri HepG2, A549, BEAS-2B, Caco-2 ve FHC hücre kültürlerinde analiz edilerek miktarları belirlenmiş ve Şekil 4.8.'de sunulmuştur. Serin metaboliti sonuçlarına bakıldığında kontrol hücre hatlarındaki (FHC ve BEAS-2B) derişimlerine kıyasla karsinom hücre hatlarındaki (A549 ve Caco-2) derişimlerin daha yüksek olduğu görülmüştür. A549 ve BEAS-2B hücre hatları için sistein ve hipotaurin metabolitleri derişimleri incelendiğinde kanser hücre hattındaki (A549) miktarları yüksek olduğu belirlenmiştir. Glutasyon, sistin ve taurinde ise tam tersi olarak kanser hücre hatlarındaki derişim kontrol gruplarındaki derişimden daha düşük bulunmuştur.

Glutasyonun sentezi büyük ölçüde üç amino asidin (glutamik asit, sistein ve glisin) derişimleri tarafından belirlenir. Bu üç aminoasitten sistein en önemli olanıdır (78). Glutasyon ve sisteinin akciğer kontrol hücre kültürü örnekleri ve akciğer kanser hücre kültürü örnekleri derişimlerinin arasındaki ilişkiye baktığımızda glutasyon derişiminin akciğer kanseri hücre kültüründe azalırken sistein derişiminin kanser hücre kültüründe miktarı arttığı görülmüştür.

HepG2 ve A549 hücre hatlarında sülfür metabolitleri incelendiğinde en yüksek derişimde HepG2 için sistein (1,27 µg/mL) ve sistin (0,44 µg/mL); A549 için de sistein (0,26 µg/mL) ve sistin (0,3 µg/mL) metabolitleri yer almıştır. Caco-2 hücre hattında ise serin (0,48 µg/mL) ve sistin (0,44 µg/mL) metabolitleri en yüksek derişimde bulunmaktadır. Metiyonin ve sisteamin ise analizi gerçekleştirilen hücre kültürlerindeki LOD derişimlerinden daha düşük olduğu için hücre hatlarında tespit edilememiştir.

Kaynaklarda yer alan sülfür metabolitlerinin analizinin gerçekleştirildiği hücre kültürü çalışmalarında doğrudan deriimlere bakılmamıtır (Bkz. Tablo 2.2). Yuan W. ve ark.(32)'nin yaptığı çalışmada kısa ve uzun süreli hipergliseminin sülfür metabolitleri üzerindeki derişimleri karılatırılmıtır. Xiao ve ark. (45)'nin yaptığı çalışmada oksidatif stres tedavisi öncesi ve sonrasında hücre kültürü örneklerinde sülfür metabolitleri derişiminin değişimleri karılatırılmıtır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sülfür metabolilerinin farklı kanser hücre hatlarından analizi ile sülfür metabolizmasının rolünün ve bu metabolitlerin dinamiklerinin daha iyi anlaşılması için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde sülfür metabolitlerinin analizinde C18 kolonunun sıklıkla tercih edildiği görülmektedir. Ancak sülfür metabolitleri oldukça polardır. Bu fizikokimyasal özelliği nedeniyle C18 kolonunda erken ayırım gerçekleşmektedir. Çalışmalarda pik şekillerini iyileştirmek ve alıkonma süreleri arttırabilmek için türevlendirme seçeneğine başvurmuşlardır (Bkz. Tablo 2.2.). Türevlendirme aşaması, çalışmalarda ayırma özelliklerini iyileştirmede, numune hazırlama aşamasına bir adım daha eklenmesi, hata olasılığını ortaya çıkarmakta ve hazırlama aşamasının süresini uzatmaktadır. Yürütülen tez çalışmasında, kromatografik koşulların optimize edilmesi sonucunda türevlendirme aşamasına gerek kalmadan sülfür metabolizmasında yer alan metabolitlerin eş zamanlı analizi ilk kez LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile kromatografik ayırımında MerckSeQuant ZIC-HILIC (100x4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Analizler %0,1 formik asit (A): %0,1 formik asit içeren asetonitril (B) karışımından oluşan hareketli faz sisteminde, 0,35 mL/dk akış hızında, 30°C kolon sıcaklığında gradiyent elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Gradiyent elüsyon) (1 dk %95 B, 5 dk: %5 B, 9 dk %5 B, 10 dk %95 B, 12 dk %95 B) şartlarında uygulanmıştır. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL ve analiz süresi 12 dk'dır. Her bir metabolit kendine özgü MRM koşullarında analiz edilmiştir.

Geliştirilen analiz yöntemi biyoanalitik validasyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde yöntemin sekiz metabolitin hücre kültüründen analizi için doğrusal, duyarlı, kesin, doğru ve seçici olduğu sonucuna varılmıştır.

Optimize edilen LC-MS/MS yöntemi kontrol hücre kültürleri ile (FHC ve BEAS-2B) ve karsinom hücre kültürlerinde (A549 ve Caco-2, HepG2) uygulanmıştır.

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi klinik laboratuvarlarda sülfür metabolitlerinin rutin analizlerinde kolaylıkla kullanılacak bir yöntemdir. Sülfür mekanizmasından kaynaklanan değişimler sonucunda sülfür metabolitlerinin miktarlarındaki yükselme veya düşüşlerin saptanabilmesinin hastalıkların tanısında ya da tedavi sırasında

klinisyenlere yol gösterici ve yardımcı olacağı ve bu durumun geliştirilen yöntemin kullanılma potansiyelini arttıracığı düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. Sulfur containing amino acids and human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2004;58(1):47-55.
2. Huseby N-E, Sundkvist E, Svineng G. Glutathione and sulfur containing amino acids: antioxidant and conjugation activities. *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease*, eds Masella R, Mazza G Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc. 2009:93-120.
3. Simińska E, Koba M. Amino acid profiling as a method of discovering biomarkers for early diagnosis of cancer. *Amino Acids*. 2016;48(6):1339-45.
4. Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2014;39(4):191-8.
5. Fujisawa T, Rubin B, Suzuki A, Patel PS, Gahl WA, Joshi BH, et al. Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e34437.
6. Daher B, Vučetić M, Pouysségur J. Cysteine depletion, a key action to challenge cancer cells to ferroptotic cell death. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:723.
7. Singh S, Sharma MP, Ahmad A. Construction and characterization of protein-based cysteine nanosensor for the real time measurement of cysteine level in living cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;143:273-84.
8. Raab A, Feldmann J. Biological sulphur-containing compounds—Analytical challenges. *Analytica chimica acta*. 2019;1079:20-9.
9. Nemitlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18 O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.
10. Kim SJ, Kim SH, Kim JH, Hwang S, Yoo HJ. Understanding metabolomics in biomedical research. *Endocrinology and metabolism*. 2016;31(1):7.
11. Menyhárt O, Györffy B. Multi-omics approaches in cancer research with applications in tumor subtyping, prognosis, and diagnosis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:949-60.
12. Manzoni C, Kia DA, Vandrovцова J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics*. 2016;19(2):286-302.
13. Debnath M, Prasad GB, Bisen PS. Omics technology. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*: Springer; 2010. p. 11-31.
14. Shah TR, Misra A. 8 - Proteomics. In: Misra A, editor. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*. London: Elsevier; 2011. p. 387-427.
15. Hixson KK, Lopez-Ferrer D, Robinson EW, Paša-Tolić L. Proteomics. In: Lindon JC, Tranter GE, Koppenaal DW, editors. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2017. p. 766-73.

16. Dudley E, Yousef M, Wang Y, Griffiths WJ. Targeted metabolomics and mass spectrometry. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2010;80:45-83.
17. Reçber T, Nemutlu E, Bekşac K, Aksoy S, Kır S. Optimization and validation of a HILIC-LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous analysis of targeted metabolites: Cross validation of untargeted metabolomic studies for early diagnosis of breast cancer. *Microchemical Journal.* 2020;159:105559.
18. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *J Mass Spectrom.* 2016;51(7):461-75.
19. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B.* 2008;871(2):236-42.
20. Vuckovic D. Sample preparation in global metabolomics of biological fluids and tissues. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery: Elsevier;* 2020. p. 53-83.
21. Dietmair S, Timmins NE, Gray PP, Nielsen LK, Krömer JO. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: development of a metabolite extraction protocol. *Analytical biochemistry.* 2010;404(2):155-64.
22. Guideline IH. Bioanalytical method validation M10. 2019.
23. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry 2018 [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 12 Haziran 2021]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
24. Zhou J, Yin Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst.* 2016;141(23):6362-73.
25. Song X, Yang Y, Ru J, Wang Y, Qiu F, Feng Y, et al. Highly specific monitoring and imaging of endogenous and exogenous cysteine in living cells. *Talanta.* 2019;204:561-8.
26. Palego L, Betti L, Giannaccini G. Sulfur metabolism and sulfur-containing amino acids: I-molecular effectors. *Biochemistry & Pharmacology.* 2015;4(7):1-8.
27. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition.* 2006;136(6):1636S-40S.
28. Vasdev S, Singal P, Gill V. The antihypertensive effect of cysteine. *The International journal of angiology: official publication of the International College of Angiology, Inc.* 2009;18(1):7.
29. Mates J, Segura J, Alonso F, Marquez J. Sulphur-containing non enzymatic antioxidants: Therapeutic tools against cancer. *Frontiers in bioscience (Scholar edition).* 2012;4:722-48.
30. The Human Metabolome Database 2019 [Internet]. 2019 [Erişim Tarihi 05 Haziran 2021]. Erişim adresi: <http://www.hmdb.ca/>.
31. PubChem [Internet]. 2021 [Erişim Tarihi 08 Mayıs 2021]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

32. Yuan W, Zhang § J, Li S, Edwards JL. Amine metabolomics of hyperglycemic endothelial cells using capillary LC–MS with isobaric tagging. *J Proteome Res.* 2011;10(11):5242-50.
33. Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan T. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2013;944C:166-74.
34. Jiang Y, Mistretta B, Elsea S, Sun Q. Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta.* 2016;464.
35. Guan X, Hoffman B, Dwivedi C, Matthees DP. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2003;31(2):251-61.
36. Rafii M, Elango R, Courtney-Martin G, House JD, Fisher L, Pencharz PB. High-throughput and simultaneous measurement of homocysteine and cysteine in human plasma and urine by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2007;371(1):71-81.
37. Camera E, Rinaldi M, Briganti S, Picardo M, Fanali S. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2001;757(1):69-78.
38. Seiwert B, Karst U. Simultaneous LC/MS/MS determination of thiols and disulfides in urine samples based on differential labeling with ferrocene-based maleimides. *Anal Chem.* 2007;79(18):7131-8.
39. Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan TM. A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). *Journal of Chromatography B.* 2014;944:166-74.
40. Forgacsova A, Galba J, Mojzisoava J, Mikus P, Piestansky J, Kovac A. Ultra-high performance hydrophilic interaction liquid chromatography–Triple quadrupole tandem mass spectrometry method for determination of cysteine, homocysteine, cysteinyl-glycine and glutathione in rat plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2019;164:442-51.
41. Zhang Y, Kang A, Deng H, Shi L, Su S, Yu L, et al. Simultaneous determination of sulfur compounds from the sulfur pathway in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to the study of the effect of Shao Fu Zhu Yu decoction. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(16):3743-55.
42. Bouligand J, Deroussent A, Paci A, Morizet J, Vassal G. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay of reduced and oxidized glutathione and main precursors in mice liver. *Journal of Chromatography B.* 2006;832(1):67-74.

43. Guiraud SP, Montoliu I, Da Silva L, Dayon L, Galindo AN, Corthésy J, et al. High-throughput and simultaneous quantitative analysis of homocysteine–methionine cycle metabolites and co-factors in blood plasma and cerebrospinal fluid by isotope dilution LC–MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(1):295-305.
44. Harwood DT, Kettle AJ, Brennan S, Winterbourn CC. Simultaneous determination of reduced glutathione, glutathione disulphide and glutathione sulphonamide in cells and physiological fluids by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2009;877(28):3393-9.
45. Xiao H-M, Wang X, Liao Q-L, Zhao S, Huang W-H, Feng Y-Q. Sensitive analysis of multiple low-molecular-weight thiols in a single human cervical cancer cell by chemical derivatization-liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst.* 2019;144(22):6578-85.
46. Weaving G, Rocks B, Iversen S, Titheradge M. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of clinical biochemistry.* 2006;43(6):474-80.
47. Prinsen HC, Schiebergen-Bronkhorst B, Roeleveld M, Jans J, De Sain-van der Velden M, Visser G, et al. Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry. *Journal of inherited metabolic disease.* 2016;39(5):651-60.
48. Xiaoyun F, Cate SA, Dominguez M, Osborn W, Tahsin Ö, Konkle BA, et al. Cysteine Disulfides (Cys-ss-X) as Sensitive Plasma Biomarkers of Oxidative Stress. *Scientific Reports (Nature Publisher Group).* 2019;9(1).
49. Jiang Z, Liang Q, Luo G, Hu P, Li P, Wang Y. HPLC–electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols: Application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta.* 2009;77(4):1279-84.
50. Suh JH, Kim R, Yavuz B, Lee D, Lal A, Ames BN, et al. Clinical assay of four thiol amino acid redox couples by LC–MS/MS: utility in thalassemia. *Journal of Chromatography B.* 2009;877(28):3418-27.
51. Pratima NA, Gadikar R. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences.* 2018;1(1):26-34.
52. Saibaba S, Kumar MS, Pandiyan PS. Mini review on LC/MS techniques. *World J Pharm Pharm Sci.* 2016;5:2381-95.
53. Eser B, Dinçel AS, Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi.* 2018;2(2):51-7.
54. Harris DC. *Quantitative chemical analysis: Macmillan; 2010.*
55. Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ, Abbott RW. Practical HPLC method development. *Analytica Chimica Acta.* 1991;245:287-8.
56. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews.* 2009;30(1):19.

57. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;402(1):231-47.
58. Zeki Ö C, Eylem CC, Reçber T, Kır S, Nemutlu E. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;190:113509.
59. Nemutlu E, Kır S. HILIC based LC/MS for metabolite analysis. *Novel Developments in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;2:98-130.
60. Greco G, Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(7):684-93.
61. Hoffmann E. Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000.
62. Annesley TM. Methanol-associated matrix effects in electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 2007;53(10):1827-34.
63. Baghel US, Singh A, Singh D, Sinha M. Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *Spectroscopic Analyses: Developments and Applications*. 2017:105.
64. Olshina MA, Sharon M. Mass spectrometry: a technique of many faces. *Quarterly reviews of biophysics*. 2016;49.
65. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook*: Springer Science & Business Media; 2006.
66. El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009;44(3):210-30.
67. Smith JS, Thakur RA. *Mass Spectrometry. Food Analysis*. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 457-70.
68. Interfaces for LC/MS. Shimadzu. [İnternet]. 2021 [Erişim Tarihi 06 Mayıs 2021]. Erişim adresi: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/interfaces\\_for\\_lcms.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/interfaces_for_lcms.html).
69. Maher S, Jjunju FP, Taylor S. Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. *Reviews of Modern Physics*. 2015;87(1):113.
70. Introduction to mass analyzers. Shimadzu. [İnternet]. 2021 [Erişim Tarihi 15 Mayıs 2021]. Erişim adresi: [https://www.shimadzu.co.kr/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.co.kr/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html).
71. Madeira PJA, Florêncio MH. Applications of tandem mass spectrometry: From structural analysis to fundamental studies. Birmingham, USA: InTech Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles. 2012;33(2):1-27.
72. Samanidou VF. Basic LC method development and optimization. *Analytical Separation Science*. 2015:25-42.

73. The United States Pharmacopeia, USP XXIV, United States Pharmacopeial Convention. Rockville 2002.
74. Oliveira FA, de Abreu AT, de Oliveira Nascimento N, Froes-Silva RES, Antonini Y, Nalini Jr HA, et al. Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula*–Jataí) by Q-ICP-MS. *Talanta*. 2017;162:488-94.
75. Kędzierska M, Głowacki R, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, et al. Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;372(1):47-55.
76. Moldoveanu SC, David V. Chapter 7 - Mobile Phases and Their Properties. In: Moldoveanu SC, David V, editors. *Essentials in Modern HPLC Separations*: Elsevier; 2013. p. 363-447.
77. Rafii M, Elango R, House JD, Courtney-Martin G, Darling P, Fisher L, et al. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(28):3282-91.
78. Kalinina E, Gavriliuk L. Glutathione synthesis in cancer cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(8):895-907.

## 8. EKLER

### **EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması** **Bağıl Standart Sapma Hesaplanması**

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

### **Bağıl Hata Hesaplanması**

$$\text{Bağıl Hata (BH)} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

### **Standart Hata Hesaplanması**


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

## EK 2. Orjinallik Raporu Örneği

ORIGINALITY REPORT			
<b>11%</b>	<b>10%</b>	<b>2%</b>	<b>5%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
<b>1</b>	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source		<b>3%</b>
<b>2</b>	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source		<b>3%</b>
<b>3</b>	Submitted to Hacettepe University Student Paper		<b>1%</b>
<b>4</b>	www.analitikkimya2018.com Internet Source		<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	Submitted to Ankara University Student Paper		<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	acervodigital.ufpr.br Internet Source		<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	www.scribd.com Internet Source		<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	acikerisim.ktu.edu.tr Internet Source		<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	cwww.intechopen.com Internet Source		<b>&lt;1%</b>



### EK 3. Dijital Makbuz

**turnitin** 

## 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:	Damla Gök
Assignment title:	Elif Damla Gök Tez
Submission title:	Tez-2
File name:	Elif_Damla_G_k_YL_tezi.docx
File size:	2.66M
Page count:	106
Word count:	17,695
Character count:	118,586
Submission date:	16-Aug-2021 12:30AM (UTC+0300)
Submission ID:	1631708820

TO:  
SULTAN MUHAMMAD RABIAH  
SULTAN MUHAMMAD RABIAH

SULTAN MUHAMMAD RABIAH SULTAN MUHAMMAD RABIAH  
SULTAN MUHAMMAD RABIAH SULTAN MUHAMMAD RABIAH  
SULTAN MUHAMMAD RABIAH SULTAN MUHAMMAD RABIAH

SULTAN MUHAMMAD RABIAH

SULTAN MUHAMMAD RABIAH

SULTAN MUHAMMAD RABIAH

Copyright 2021 Turnitin. All rights reserved.

## 9. ÖZGEÇMİŞ