

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

**ASSİT AYIRICI TANISINDA
ASSİT METABOLOM TAYİNİ İÇİN
SIVI KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Kim. Ozan KAPLAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2017**

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

**ASSİT AYIRICI TANISINDA
ASSİT METABOLOM TAYİNİ İÇİN
SIVI KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

Kim. Ozan KAPLAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER**

ANKARA

2017

ONAY SAYFASI**ASSİT AYIRICI TANISINDA ASSİT METABOLOM TAYİNİ İÇİN SIVI KROMATOĞRAFİSİ
KÜTLE SPEKTROMETRİSİ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ****Kim. Ozan Kaplan**

Bu çalışma 02.08.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sedef Kır
(Hacettepe Üniversitesi)

**Tez Danışmanı:**

Doç. Dr. Mustafa Çelebier
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:**

Prof. Dr. Sacide Altınöz
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:**

Doç. Dr. İncilay Süslü
(Hacettepe Üniversitesi)

**Üye:**

Doç. Dr. İsmail Murat Palabıyık
(Ankara Üniversitesi)



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

Tarih 11 Ağustos 2017



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir 4 cm kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumuntarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

X Tezimin/Raporumun **01/01/2020** tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

14 / 08 / 2017

Kim. Ozan Kaplan



ETİK BEYAN

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

Kim. Ozan Kaplan



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı olanaklarla bana sürekli destek olan, bilgi birikimi ve yol göstericiliğiyle ufkumu genişleten çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Mustafa Çelebier'e,

Eğitimim boyunca gösterdiği destek ve öğrettikleri için Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sacide Altınöz'e,

Tez çalışmama sağladığı katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. İncilay Süslü ve çalışma arkadaşlarım Dr. Kim. Engin Koçak ve Ecz. Merve Nenni'ye,

Analitik Kimya eğitimim boyunca teorik ve pratik derslerde aktardıkları eşsiz bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, gösterdikleri yakınlık ve yardımlarından dolayı tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca bana destek olan sevgili annem ve sevgili abime ve etkisini üzerimde hep hissettiğim babama sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Kaplan, O. Assit Ayırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini İçin Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemi Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017. Peritoneal boşluk içinde toplanan patolojik sıvıya assit sıvısı denilmektedir. Assit ayırıcı tanı kavramı, bu sıvıdan yola çıkarak assit oluşumuna sebep olan hastalığa tanı koyma işlemidir. Bu tez çalışması kapsamında malign nedene bağlı olmadan assit oluşumu gösteren assit numuneleri (C grubu) ile, malign nedene bağlı olarak assit oluşumu gösteren assit numuneleri arasında (T grubu) sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC/MS Q-TOF) yöntemi ile metabolomik çalışmalar yapılarak metabolom düzeyinde assit ayırıcı tanı için kullanılabilir biyobelirteçler bulunmaya çalışılmıştır. Çalışmalar, analitik yöntem geliştirme, metabolit profillemeye ve hedeflenmiş metabolomik olmak üzere üç ana deneysel kısımdan oluşmaktadır. Yöntem geliştirme basamağında ultrafiltrasyon ve metanolla çöktürme olmak üzere iki farklı numune hazırlama yöntemi, HILIC ve C18 kolonlar ile ayırım olmak üzere iki farklı ayırım metodu, pozitif ve negatif MS modları olmak üzere iki farklı MS modu denenmiştir. Ultrafiltrasyon tekniği, HILIC kolon ve pozitif mod MS yöntemleri en fazla pik sayısını veren yöntem olarak belirlenmiş ve çalışma bu yöntemle devam ettirilmiştir. Geliştirilen yöntemle metabolit profillemeye çalışmaları yapılmış ve iki grup arasında 141 adet miktarı en az iki kat farklılaşan pik bulunmuştur. Bu piklerden 6 tanesi hedeflenmiş metabolomik çalışmalarında tanımlanmış ve kimyasal yapıları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metabolomik, assit, sıvı kromatografisi, kütle spektrometrisi

ABSTRACT

Kaplan, O, Analytical Method Development on Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Metabolom Analyze at Differential Diagnosis of Ascites, Hacettepe University Institute of Health Sciences Analytical Chemistry Master Thesis, Ankara, 2017. Pathological fluid collected in the peritoneal cavity is called ascitic fluid. The concept of the differential diagnosis of ascites is process of diagnosing the disease that causes ascites formation. In this thesis, metabolomic studies were performed by liquid chromatography / mass spectrometry (LC/MS Q-TOF) between non malignant ascitic samples (group C) and malignant ascitic samples (group T). Study text consist of three main experimental parts: analytical method development, metabolite profiling and targeted metabolomics. In the method development step, two different sample preparation methods, ultrafiltration and methanol precipitation, two different chromatography columns, HILIC and C18 columns, two different MS modes, positive and negative MS modes, were tried and compared. Ultrafiltration technique, HILIC column and positive mode MS methods were determined as the method giving the maximum number of peaks and study was continued with this method. Metabolite profiling studies were carried out with the developed method and between two groups 141 peaks were found as minimum two times differentiating. Six of these peaks were identified in targeted metabolomic studies and chemical structures were characterized.

Keywords: Metabolomics, ascites, liquid chromatography, mass spectrometry

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Metabolit, Metabolom ve Metabolomik Kavramları	5
2.2. Metabolomik Çalışmaların Tarihsel Gelişimi	6
2.3. Metabolomik Çalışmalar ve Uygulamaları	8
2.4. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Analitik Yöntemler	10
2.5. Kromatografi	11
2.5.1. Sıvı Kromatografisinin Tarihsel Gelişimi	12
2.5.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemleri	13
2.5.3. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan HPLC Kolonları	14
2.5.4. Kromatografi Parametreleri	15
2.6. Kütle Spektroskopisi	16
2.6.1. Kütle Spektrometre Cihazlarının Genel Yapısı	16
2.6.2. Elektrosprey İyonlaştırıcı (ESI)	18
2.6.3. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF)	19
2.7. Metabolomik Çalışmalar için Numune Hazırlama Yöntemleri	20
2.7.1. Ultrafiltrasyon Yöntemi	21
2.7.2. Metanolle Çöktürme Yöntemi	22
2.8. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği	22

2.8.1. XCMS	23
2.9. Metabolomik Çalışmalarda DeneY Tasarımında Uygulanan Yaklaşımlar	25
2.9.1. Karışım Numuneleri Kullanımı	26
2.9.2. Kalite Kontrol Yaklaşımı	26
2.9.3. İç Standart Kullanımı	27
2.9.4. Dilüsyon Serisi Yöntemi	27
2.9.5. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu	28
2.9.6. Pik Şiddetlerinin Normalizasyonu	30
2.10. Assit Sıvısı ve Assit Ayırıcı Tanı	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmalar	32
3.1.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar	34
3.1.2. Assit Sıvısı Numunelerinin Toplanması ve Saklanması	35
3.1.3. Hasta ve Kontrol Grupları Oluşturulması	36
3.1.4. LC/MS Q-TOF Analizlerinde Uygulanan Metodoloji	36
3.2. Yöntem Geliştirme Çalışmaları	38
3.2.1. Karışım Numuneleri Hazırlanması	39
3.2.2. Metabolitlerin Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Yöntemler	40
3.2.3. Metabolitlerin Ayırımı İçin Kullanılan Kolon Denemeleri	40
3.2.4. Pozitif ve Negatif Mod Denemeleri	42
3.3. Metabolit Profilleme Çalışmaları	42
3.3.1. Karışım Numuneleri ve İç Standart Eklenmesi	42
3.3.2. Kalite Kontrol Numuneleri	42
3.3.3. Dilüsyon Serisi Hazırlama	43
3.4. Veri Değerlendirme Çalışmaları	44
3.4.1. Ham Data Dosyalarının XCMS'e Uygun Olarak Dönüştürülmesi	44
3.4.2. XCMS Programının Kurulumu	44
3.4.3. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu	44
3.4.4. XCMS Analizleri	45
3.4.5. Veri Değerlendirilmesinde Kullanılan Yaklaşımlar	45
3.6. Sistem Uygunluk Testi	46
3.7. Validasyon Çalışmaları	46

3.7.1. Özgünlük	47
3.7.2. Doğruluk	47
3.7.3. Kesinlik	47
3.7.4. Doğrusallık	47
3.8. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları	47
4. BULGULAR	49
4.1. Yöntem Geliştirme Basamağına Ait Bulgulara Genel Bakış	49
4.1.1. Numune Hazırlama Basamağına Ait Bulgular	58
4.1.2. Farklı Kolon Denemelerine Ait Bulgular	58
4.1.3. Pozitif ve Negatif MS Modlarına Ait Bulgular	58
4.2. Metabolit Profilleme Basamağına Ait Bulgular	59
4.2.1. XCMS Optimizasyonuna Ait Bulgular	59
4.2.2. Regresyon Analizine Ait Bulgular	60
4.2.3. Kalite Kontrol Numunelerine Ait Bulgular	61
4.2.4. İç Standart Sonuçlarına Ait Bulgular	61
4.2.5. Metabolit Profillemede Veri Değerlendirme Sonuçlarına Ait Bulgular	63
4.3. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları	80
4.4. Sistem Uygunluk Çalışması	91
4.5. Validasyon Çalışmaları	91
4.5.1. Özgünlük	91
4.5.2. Doğruluk	92
4.5.3. Kesinlik	93
4.5.4. Doğrusallık	94
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	99
5.1. Yöntem Geliştirme Çalışmaları	99
5.2. Metabolit Profilleme Çalışmaları	101
5.3. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları	104
5.3.1. Metabolomik Yolak İncelemeleri	104
5.3.2. Kreatinin	104
5.3.3. DL-Fenilalanin	106
5.3.4. Betain	107
5.3.5. L-Histidin	108

5.3.6. L-Arginin	109
5.3.7. Oksindol	110
5.4. Validasyon Çalışmaları	111
5.4.1. Özgünlük	111
5.4.2. Doğruluk	111
5.4.3. Kesinlik	112
5.4.4. Doğrusallık	112
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	113
7. KAYNAKLAR	115
8. EKLER	125
Ek 1. Etik Kurul Onay Sayfası	125
Ek 2. XCMS kurulumu için kullanılan kod.	126
Ek 3. IPO yazılımı için kullanılan kod.	126
Ek 4. IPO optimizasyon kodu.	126
Ek 5. Kullanılan XCMS kodu.	127
9. ÖZGEÇMİŞ	128

SİMGELER ve KISALTMALAR

BSS	Bağıl Standart Sapma
CE	Kapiler Elektroforez
Dak	Dakika
ESI	Elektrosprey iyon kaynağı
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
m/z	Kütlenin yüke oranı
MS/MS	Tandem kütle spektroskopisi
MS	Kütle Spektrometrisi
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
Q	Kuadropol
RT	Alıkonma zamanı
TOF/MS	Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Üre Tekerleği, Ullrich Pinder, “ <i>Epiphanie Medicorum</i> ” isimli kitabından, 1506.	7
2.2.	Williams, R. J. ve arkadaşlarının 1951 yılında yayınladıkları metabolit profilleme diagramı.	8
2.3.	HPLC cihaz şeması.	13
2.4.	Kütle spektrometrelerinin genel şeması.	17
2.5.	Elektrosprey İyonlaştırıcı (ESI) başlığı.	18
2.6.	Q-TOF/MS cihazların genel şematik gösterimi.	19
2.7.	Ultrafiltrasyon kartuşları.	21
2.8.	XCMS çalışma algoritması.	24
2.9.	Örnek XCMS kromatogram çıktısı.	25
2.10.	Metabolomik çalışmalarda iş akışı.	26
2.11.	Kalite kontrol numunesi kullanımına ait örnek diagram.	27
2.12.	Normalizasyon öncesi pik yoğunlukları (sol sütun) ve normalizasyon sonrası pik yoğunlukları (sağ sütun).	31
3.1.	Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar.	33
3.2.	Agilent 6530 LC/MS Q-TOF görseli.	38
3.3.	Yöntem geliştirme basamağına dair çalışmaları gösteren şema.	39
3.4.	Yöntem geliştirme basamağında yapılan enjeksiyon sayıları.	39
3.5.	Ultrafiltrasyon kartuşu.	40
3.6.	ProteoWizard yazılımı.	44
3.7.	Örnek XCMS excel çıktısı.	45
3.8.	Örnek normalize pik şiddetleri tablosu.	46
4.1.	C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, HILIC kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	50
4.2.	C ve T grubunun, metanolla çöktürme, HILIC kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	51
4.3.	C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, HILIC kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	52

4.4.	C ve T grubunun, metanolle çöktürme, HILIC kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	53
4.5.	C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, C18 kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	54
4.6.	C ve T grubunun, metanolle çöktürme, C18 kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	55
4.7.	C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, C18 kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	56
4.8.	C ve T grubunun, metanolle çöktürme, C18 kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.	57
4.9.	Kalite kontrol numunesine ait temel pik kromatogramı.	61
4.10.	Daidzein maddesinin ayrılmış iyon kromatogramı.	62
4.11.	Daidzein maddesinin enjeksiyonlar arasındaki pik şiddetleri ve alıkonma zamanları.	62
4.12.	Pik sayılarının değişimini gösteren grafik.	63
4.13.	Normalizasyon sonuçlarını gösteren görsel. Sol sütun normalizasyon işlemi olmadan pik yoğunluklarını, sağ sütun ise normalize işleminden sonraki pik yoğunluklarını göstermektedir.	65
4.14.	C ve T gruplarının temel bileşenler analizi sonuçlarını gösteren grafik.	66
4.15.	Miktarı 2 kattan fazla değişen ve $p < 0.05$ olan piklerin grafiği.	67
4.16.	Kreatinin metabolitinin kimyasal yapısı.	81
4.17.	Kreatinin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	81
4.18.	Kreatinin metabolitine ait MS spektrumu.	82
4.19.	Kreatinin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Kreatinin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	82
4.20.	DL-Fenilalanin metabolitinin kimyasal yapısı.	83
4.21.	DL-Fenilalanin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	83
4.22.	DL-Fenilalanin metabolitine ait MS spektrumu.	83
4.23.	DL-Fenilalanin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve DL-Fenilalanin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	84
4.24.	Betain metabolitinin kimyasal yapısı.	84
4.25.	Betain metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	85

4.26.	Betain metabolitine ait MS spekturumu.	85
4.27.	Betain metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Betain metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	85
4.28.	L-Histidin metabolitinin kimyasal yapısı.	86
4.29.	L-Histidin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	86
4.30.	L-Histidin metabolitine ait MS spektrumu.	87
4.31.	L-Histidin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve L-Histidin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	87
4.32.	L-Arginin metabolitinin kimyasal yapısı.	88
4.33.	L-Arginin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	88
4.34.	L-Arginin metabolitine ait MS spektrumu.	88
4.35.	L-Arginin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve L-Arginin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	89
4.36.	Oksindol metabolitinin kimyasal yapısı.	89
4.37.	Oksindol metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.	90
4.38.	Oksindol metabolitine ait MS spektrumu.	90
4.39.	Oksindol metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Oksindol metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)	90
4.40.	Kör çözelti (kırmızı) ve numune (mavi) enjeksiyonlarını gösteren temel pik kromatogramları.	92
4.41.	Alıkonma zamanlarının bağıl standart sapmasını gösteren grafik.	94
4.42.	m/z değerlerinin bağıl standart sapmasını gösteren grafik.	94
4.43.	Pik şiddetleri doğrusallık grafiği.	95
4.44.	Kreatinin metabolitine ait doğrusallık grafiği.	96
4.45.	DL-Fenilalanin metabolitine ait doğrusallık grafiği.	96
4.46.	Betain metabolitine ait doğrusallık grafiği.	97
4.47.	L-Histidin metabolitine ait doğrusallık grafiği.	97
4.48.	L-Arginin metabolitine ait doğrusallık grafiği.	98
4.49.	Oksindol metabolitine ait doğrusallık grafiği.	98
5.1.	Kreatinin metabolizması.	106
5.2.	DL-Fenilalanin metabolizması.	107
5.3.	Betain metabolizması.	108

5.4.	Histidin metabolizması.	109
5.5.	L-Arginin metabolizması.	110

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
1.1.	Başlıca omik dalları ve araştırma alanları. 1
2.1.	Metabolomik çalışmalarda kullanılan terimler ve anlamları. 5
2.2.	Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması. 12
2.3.	Metabolomik çalışmalarda kullanılan yazılımlar. 23
2.4.	XCMS varsayılan değerler. 29
3.1.	Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar. 34
3.2.	Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar. 35
3.3.	Hasta ve kontrol grupları numune listesi. 36
3.4.	LC/MS Q-TOF parametreleri. 38
3.5.	C18 kolon için kullanılan gradient programı. 41
3.6.	HILIC kolon için kullanılan gradient programı. 41
3.7.	Kullanılan kalite kontrol numunesinin içeriği. 43
3.8.	Dilüsyon serisi hazırlama yöntemi. 43
4.1.	Yöntem geliştirme çalışmalarına ait toplu sonuçlar. 58
4.2.	Optimize XCMS değerleri tablosu. 60
4.3.	Profilleme basamağında kullanılan numuneler ve pik sayıları. 64
4.4.	Miktarı iki kattan fazla farklılaşan pikler listesi. 68
4.5.	HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi. 71
4.6.	Kreatinin metabolitine ait bilgiler. 81
4.7.	DL-Fenilalanin metabolitine ait bilgiler. 82
4.8.	Betain Metabolitine Ait Bilgiler. 84
4.9.	L-Histidin metabolitine ait bilgiler. 86
4.10.	L-Arginin metabolitine ait bilgiler. 87
4.11.	Oksindol metabolitine ait bilgiler. 89
4.12.	Sistem uygunluğu parametrelerine dair bulgular. 91
4.13.	İç standartın bulunan ve teorik m/z değerlerinin yüzde bağıl hata tablosu. 92

1. GİRİŞ

1953'te Nature dergisinde J. D. Watson ve ark. tarafından yayınlanan “*Nükleik Asitlerin Moleküler Yapısı: Deoksiriboz Nükleik Asit İçin Bir Yapı*” ismiyle yayınlanan çalışma sayesinde DNA'nın çift sarmal yapısı hakkında ilk bilgilere ulaşılmıştır (1). 1990'lı yıllara gelindiğinde başlatılan “*İnsan Genom Projesi*” ile insan genomunun tüm haritası çıkarılmaya çalışılmış, hastalıkların genom dizilimleri ile bağlantıları araştırılmaya başlanmıştır (2). 2003 yılında sonlanan proje ile “*post genomik çağ*” denilen; genlerin translasyonu, genom-proteom ilişkileri, genom-metabolom ilişkilerini inceleyen yeni bir dönem açılmıştır (3). Bugün bu çalışmalar sonucu ile ortaya çıkan ve “*Sistem Biyolojisi*” olarak adlandırılan biyoinformatik dalı ile birden fazla omik çalışma arasında bağlantılar kurulup, anlamlı sonuçlara ulaşılabilmektedir (4). Tablo 1.1.'de başlıca omik dalları ve çalışma alanları verilmiştir.

Tablo 1.1. Başlıca omik dalları ve araştırma alanları.

Omik Dalı	Araştırma Alanı
Genomik	Genom dizisinin ortaya çıkarılması ve gen fonksiyonlarının aydınlatılması çalışmalarıdır.
Transkriptomik	Hücre genomunda oluşan translasyon sonrası, mRNA transkriptlerini inceler.
Proteomik	Proteinlerin miktarını, hücredeki işlevlerini, translasyon sonrası modifikasyonlarını ve proteinlerin diğer makromoleküllerle etkileşimlerini inceler.
Metabolomik	Metabolitlerin saptanması, tanımlanması, miktarının belirlenmesi ve diğer makromoleküllerle etkileşimlerinin incelenmesi çalışmalarıdır.

Metabolitler; oligonükleotidler, şekerler, peptitler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, lipitler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar gibi kimyasal bileşiklerdir ve molekül ağırlıkları genellikle 1.500 Da'un altındadır (5). Bu bileşikler metabolik yollar vasıtası ile hücrel reaksiyonlara

katılır veya ürün olarak çıkarlar. Metabolitler ve metabolitlerin oluşturduğu metabolom, genomun aksine beslenme, cinsiyet, yaş ve hastalık gibi çevresel değişkenlerden anlık olarak etkilenir.

Metabolomik çalışmalar, bir hücre veya dokuda bulunan metabolitlerin miktarlarının ölçülmesi, tanımlanması ve çalışma kapsamında belirlenen değişkenler üzerinden birbiri ile karşılaştırılmasıdır (6). Tanı ve tedavi amaçlı olarak metabolit analizleri uzun süredir uygulanmasına rağmen, metabolit profillemeye çalışmaları ile hücre içinde veya fizyolojik sıvılarda var olan çok sayıda metabolitin analiz edilmesi ve profillenmesi sonucu, çeşitli hastalıkların moleküler düzeyde etki mekanizmalarını aydınlatmaya ve dolayısıyla metabolom düzeyinde hastalık süreçleriyle ilgili biyobelirteçleri bulmaya yönelik çalışmalar yeni yeni artmaktadır (7-11).

Biyobelirteç, bir hastalığın tanı, teşhis ve tedavisini takip etmeye yarayan biyomoleküllere verilen genel addır (12). Örnek olarak; BRCA₁ gen mutasyonları göğüs kanseri riskini belirlemede kullanılan bir genetik biyobelirteçtir (13). Glukoz metaboliti diabet hastalığında, kreatinin ise böbrek fonksiyonlarını ölçmede biyobelirteç olarak kullanılan metabolitlerdendir (14). Klinik metabolomik çalışmalarda nihai hedef, biyobelirteç olarak kullanılacak metabolitlerin tespit edilmesidir.

Metabolomik çalışmalar en genel anlamıyla ‘metabolit profillemeye’ ve ‘hedeflenmiş metabolomik’ olmak üzere iki ana başlığa ayrılırlar. Metabolit profillemeye basamağı, belirlenen bir değişken (örnek olarak; bir hastalık durumu) üzerinden tanımlanan gruplar arasında, metabolom düzeyindeki olası farklılıkları gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır. Metabolit profillemeye basamağından elde edilen verilerle, seçilen metabolitleri tanımlamak, yapılarını aydınlatmak ve miktarlarını belirlemek amacıyla hedeflenmiş metabolomik çalışmaları yapılır (15).

Hastalık durumunda hangi metabolitlerin ve metabolik yolların etkilendiğini bulmak, miktarında değişim gösteren metabolitleri gözden kaçırmamak için metabolit profillemeye basamağında en çok sayıda metaboliti aynı anda analiz edebilmek hedeflenir. Bunun yolu da, öncelikle numuneden mümkün olan en fazla metabolitin elde edilmesi, devamında hazırlanan bu numunelerin optimum verimle analiz edilmesi ve verilerin başarılı istatistiksel dönüşümlere uğratılmasından geçmektedir.

Metabolitlerin fiziksel ve kimyasal özellik bakımından çeşitlilik göstermeleri, numune hazırlama, kromatografik ayırım, metabolit piklerinin belirlenmesi ve veri değerlendirmesi basamaklarında hangi yöntemin diğerine üstünlük göstereceğinin önceden bilinmesini olanaksız kılar.

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışması kapsamında assit sıvısından metabolomik çalışmalar yapmak amacıyla ilk önce optimum verim verecek bir analitik metodoloji oluşturulmaya çalışılmıştır. Assit sıvısı, karaciğer, kalp veya pankreas kökenli çeşitli hastalık durumları sonucu oluşabilen, karın boşluğunda toplanan patolojik sıvıya verilen addır. Numuneden en fazla metabolit ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla metabolomik çalışmalarda sıklıkla kullanılan metanolla çöktürme yöntemi ve metabolomik çalışmalar için daha yeni bir yöntem olan ultrafiltrasyon yöntemleri denenmiştir. HILIC ve C18 kolonlar kromatografik ayırım için karşılaştırılmış, pozitif ve negatif kütle spektrometri çalışma modları denenmiştir. Bu yöntemler arasından en iyi performans gösterenler seçilmiş ve çalışmanın geri kalanı bu yöntem üzerinden yürütülmüştür.

Çalışmada ikinci olarak, seçilen yöntem ile metabolit profilleme işlemleri yapılmıştır. Veriler, metin içerisinde detayları verilen metodlarla istatistiksel dönüşümlere tabi tutulmuş ve kontrol ile hasta grupları arasında istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı anlamlı olarak değişen pikler belirlenmiştir. Son olarak hedeflenmiş metabolomik çalışmalar kapsamında bu pikler MS/MS yöntemiyle tanımlanmaya çalışılmış ve metabolit yolak incelemeleri ile hastalık durumu ile arasındaki bağlantılara yorum getirilmeye çalışılmıştır.

Assit ayırıcı tanı, assit sıvısından yola çıkılarak hastalığa tanı koyma işlemidir (16). Metabolitler vücudun her bölgesinde ve sıvısında bulunurlar ancak özellikle hastalık dokusuna yakın bölgelerden veya doğrudan hastalık sonucu oluşan doku ya da sıvılardan toplanan numunelerin, hastalıkla bağlantılı metabolitlerce daha zengin olduğu kabul edilmektedir (17). Bu açıdan assit sıvısı farklı hastalıklarda, farklı metabolitlerin yoğunlukta olduğu ve potansiyel biyobelirteçlerin bulunduğu bir sıvı olarak düşünülmektedir.

Ressom ve ark. 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında hepatosellüler karsinom ve sirozlu hastaların erken teşhisinde ve tedavisinde kullanılabilecek olası

biyobelirteçleri kan plazmasından LC/MS yöntemiyle gerçekleştirdikleri analizlerle ortaya koymuşlardır (18). Tokushige ve ark. ise 2013 yılında yayınladıkları çalışmalarında alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığında fibrozis ile ilişkili 28 metaboliti serumdan tespit etmişlerdir (19). Son yıllarda karaciğer hastalıkları ile ilgili daha bir çok metabolomik çalışma yayınlamıştır (20-22). Bu çalışmalar karaciğer rahatsızlıkları ile ilgili olarak metabolomik çalışmalar ile umut verici sonuçlar elde edebileceğini gösterirken, kaynaklarda asit sıvısından LC/MS yöntemi ile metabolomik çalışmaya rastlanmamıştır, tez çalışması bu anlamıyla özgündür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolit, Metabolom ve Metabolomik Kavramları

Hücre tarafından sentezlenen veya enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerin her biri “*metabolit*” olarak adlandırılır. Hücredeki metabolitlerin tamamına ise bir bütün olarak “*metabolom*” denilmektedir. Yunanca kökenli omik eki, metabolom terimine eklenerek ‘metabolomla ilgilenen’ anlamına gelen “*metabolomik*” terimini türetir (23). Metabolomik, en genel tanımı ile bir hücrede belirli bir zamanda bulunan metabolitlerin, yani tüm metabolomun yüksek hassasiyetli analitik teknikler kullanılarak tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi çalışmalarıdır (24). Tablo 2.1.’de metabolomik çalışmalarda kullanılan terimler ve anlamları verilmiştir.

Tablo 2.1. Metabolomik çalışmalarda kullanılan terimler ve anlamları.

Terim Adı	Kullanım Amacı
Metabolit Profilleme	Bir örnekte aynı anda birden fazla metabolitin analiz edilme işlemidir. Analitik yöntem, metabolit gruplarına göre özelleştirilebilir. Örnek olarak sadece karbonhidrat veya amino asit grubu metabolitler profillenebilir veya mümkün olan en çok metabolit amaçlanabilir. Metabolit profilleme çalışmaları genellikle yarı kantitatif olarak gerçekleştirilir.
Hedeflenmiş Metabolomik	Metabolom içinde önceden belirlenmiş, bir veya birden fazla metabolitin yapısını aydınlatmak ve miktarını kesin olarak belirleyebilmek için kullanılan yöntemdir.
Metabolomik Parmak İzi	Metabolomik parmakizi endometabolitlerin ¹ hücre içinde girdiği reaksiyonları ve etkilediği metabolit yollarını inceler.
Metabolomik Ayak İzi	Metabolomik ayakizi, hücreye dışardan gelen ekzometabolitlerin ² girdiği reaksiyonları ve etkilediği metabolit yollarını inceler.

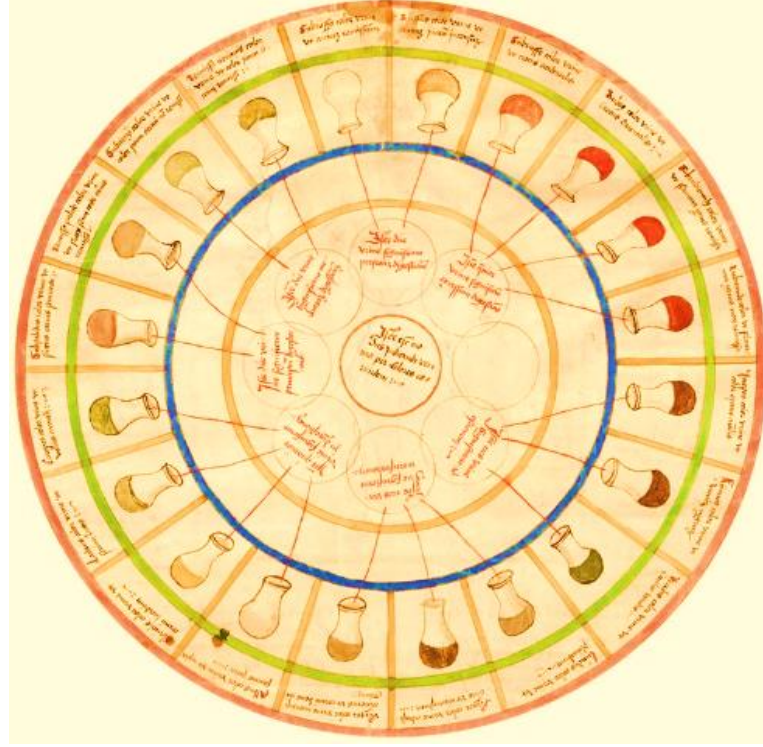
¹ Endometabolit, hücre tarafından sentezlenen metabolitleri ifade eder.

² Ekzometabolit, hücreye dışardan giren metabolitleri ifade eder.

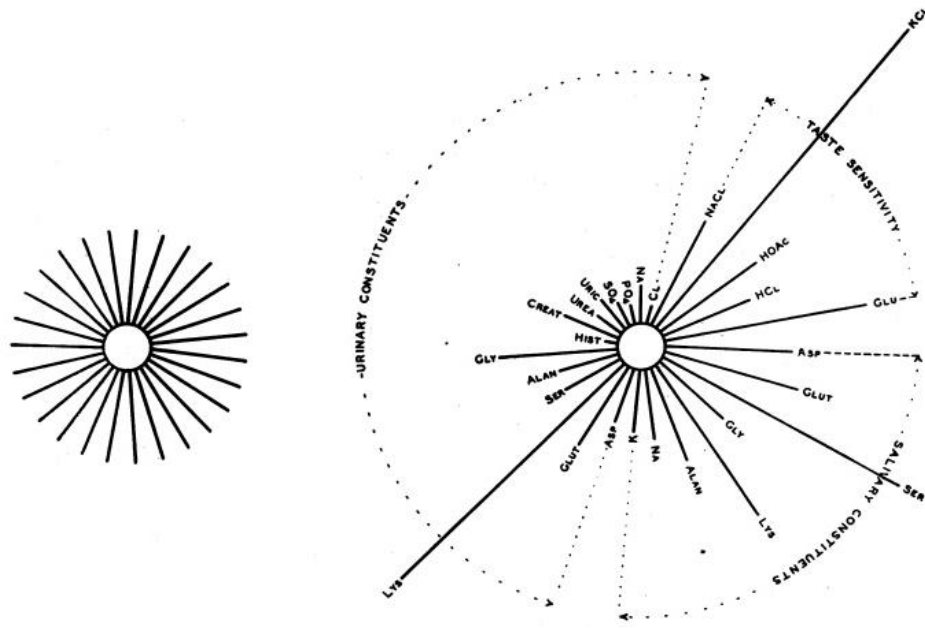
2.2. Metabolomik Çalışmaların Tarihsel Gelişimi

Omik bilimler ve metabolomik görece yeni alanlar olmasına karşın, bugün metabolit olarak tanımladığımız vücuttaki bazı kimyasal bileşiklerin çeşitli vücut sıvılarından analizi ile tanı ve teşhis amacıyla kullanılması eskilere dayanır (25). Modern metabolomik çalışmalar geçmiş birkaç on yıla bakılarak takip edilebilirken, kökenleri ise antik çağlara uzanan ilkel analitik yöntemlere kadar varabilmektedir. Tarihte bilinen en eski örneklerden birisi, M.Ö. 2000 yıllarında antik Çin uygarlığında diabetes tanısı koymak amacıyla uygulanan ve karıncaların idrar numunelerine ilgisine göre değerlendirilen ilkel bir analiz tekniği ve tanı koyma yöntemidir (26). Orta çağ döneminde Ullrich Pinder, Şekil 2.1.'de sunulan "üre tekerleği" adını verdiği bir renk tayfi modellemesi ile bazı hastalıklara teşhis ve tanı koymaya çalışmıştır. Modern metabolomik çalışmaların başlangıcı ise Williams, R. J. ve ark. tarafından 1950'lerin başında gerçekleştirilen çalışma olarak kabul edilebilir (27). Williams bu çalışmada alkolikler, şizofreni hastaları, mental bozukluk ve daha bir çok hastalık gruplarından örnekler toplayarak 200.000'den fazla kağıt kromatografisi analizi gerçekleştirmiş ve sonuçları hastalık gruplarına göre ayırarak ilk profillemeye çalışmasını yapmıştır. Şekil 2.2.'de bu çalışma sonucu ortaya çıkarılan metabolit profillemeye diagramı sunulmuştur. Williams'ın çalışmaları umut verici sonuçlar vermesine karşın, yöntem ve uygulamadaki zorluklar yeni çalışmaları geciktirmiş, benzer araştırmaların devam etmesi 1970'leri bulmuştur. Bu tarihlerde Gaz Kromatografisinde oluşan bilimsel ve teknolojik ilerlemeler sonucu çalışmalar çeşitlenmeye ve hız kazanmaya başlamıştır (28). 1971'deki gaz kromatografisi temelli çalışmasında E.C. Hornings, 'metabolit profillemeye' terimini kaynaklarda ilk kullanan araştırmacı olarak göze çarpmaktadır (29). 1980'ler metabolomik çalışmalarda iki yeni analitik tekniğin kullanılmaya başlandığı yıllar olarak dikkat çekmektedir. Games D.E. ve ark. tarafından 1984 yılında gerçekleştirilen ve karabiber bileşenlerini inceleyen araştırma 'Sıvı Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (LC/MS)' cihazıyla yapılan ilk metabolomik çalışmalardandır (30). 1989'da ise Bell J.D. ve ark. vücut sıvılarından metabolit profillemeye deneyleri yaparak, 'Nükleer Magnetik Rezonans (NMR)' cihazını metabolomik çalışmalara katan ilk grup olmuşlardır (31). LC/MS ve NMR yöntemlerinin de katılımıyla beraber 1990'lı yıllar her gelişen analitik ve biyoinformatik teknolojinin metabolomik çalışmalara da entegre edilmeye başladığı

yıllar olmuştur. Yine 1990'lı yıllarda 'Kapiler Elektroferez (CE)' ve 'Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)' ile yapılan profillemeye araştırmaları da metabolomik çalışmalar kaynaklarına girmeye başlamıştır (32, 33). O. Fiehn 2002, yılında yayınladığı makalesinde 'metabolom' terimini ilk kez kullanmıştır (24).



Şekil 2.1. Üre Tekerleği, Ullrich Pinder, "*Epiphanie Medicorum*" isimli kitabından, 1506.



Şekil 2.2. Williams, R. J. ve arkadaşlarının 1951 yılında yayınladıkları metabolit profilleme diagramı.

2.3. Metabolomik Çalışmalar ve Uygulamaları

Metabolomik çalışmalar ve diğer omik dalları, ‘sistemler biyolojisi’ adı verilen biyoinformatik yöntem etrafına kurulmuştur (34). Yöntem temel olarak, analitik verinin biyoinformatik veriye, biyoinformatik verinin de biyolojik bilgiye dönüştürülmesi çalışmalarıdır.

Genotip, genom tarafından oluşturulur ve çevresel etkenlerden bağımsızdır. Fenotip ise çevresel etkenlere bağlıdır ve metabolom ile doğrudan ilişkilidir. Genomik ve transkriptomik çalışmalar genotip ile ilgilenir ve ‘ne olabileceğini’ söylerken, proteomik ve metabolomik çalışmalar fenotip ile ilgililenirler ve ‘ne olduğunu’ söylerler (35). Anlık bilgiye ulaşabilmek; belirlenen değişkenin, örneğin bir hastalık durumunun, metabolizmada ne gibi değişikliklere yol açtığını gözlemleyebilme olanağı sağlar. Güncel örneklerden birisi, 2017 yılında başlayan ve Amerikan Ulusal Uzay Ajansı (NASA) tarafından yürütülen, ikizi olan astronotların dünyadaki ikizlerinden ve uzay ortamında bulunan ikizlerinden alınan kan örneklerinde proteom ve metabolom düzeyindeki farklılıkları araştıran çalışmadır. İkizlerin genotipleri aynıdır, ancak fenotipleri farklıdır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, uzay ortamının

fenotipleri ne kadar etkilediğini ve gelecekte dünya dışında insanoğlunun sağlıklı bir metabolizma ile yaşayıp yaşayamayacağına dair bulgular bulmayı ummaktadır (36).

Bir hücredeki metabolitin miktarı, onu sentezleyen tüm hücre enzimleriyle ilişkili olarak değişebilir. Bu enzimler metabolomda meydana gelen değişiklikleri gösterebileceği gibi, doğrudan genom, transkriptom veya proteom ile de ilgili olabilirler. Borodina ve Nielsen'in 2005 yılında yayınladıkları bir araştırma, metabolitlerin % 67'den fazlasının sadece bir metabolit yolakta görev aldığını göstermiştir (37). Bu durum, vücutta hastalıktan kaynaklı meydana gelecek bir değişimin, metabolomda ve metabolitlerde de özgün farklılıklar doğuracağını gösterir. Teorik olarak; beslenme, yaş, cinsiyet gibi fenotipten kaynaklı değişkenleri homojenize edebilecek ve iki grup arasında sadece hastalıktan kaynaklı farklılıkları gösterebilecek bir örneklem oluşturulabilirse, diğer bir deyişle iki grup arasında tüm değişkenler sabit tutulup, tek bir değişkene indirilebilirse, iki örneklem arasındaki fark sadece bu değişkenden, yani hastalıktan kaynaklı olmalıdır. Metabolomik çalışmalar, bir dizi biyoinformatik ve istatistiksel dönüşüm ile bu aradaki farkı bulmayı amaçlar.

Metabolomik çalışmaların çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Gıda ve beslenme alışkanlıkları ile ilgili çalışmalar (38), bitkiler üzerine yapılan metabolomik araştırmalar (39), ilaç araştırma ve geliştirme ile ilgili metabolomik çalışmalar (40), çevre kirliliği araştırmaları (41), toksisite araştırmaları (42) ve klinik çalışmalar (43) gibi çok çeşitli alanlarda metabolomik çalışmalara rastlanır. Klinik araştırmalar hastalıkların tanı, teşhis, seyir ve tedavileri üzerine yapılan araştırmaların yanısıra, kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarını içerir.

Kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları, kişinin genotip ve fenotipine özgü tedavi yöntemleri geliştirilmesi ve uygulanması çalışmalarıdır. Bugün kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında karşılaşılan en önemli sorun, henüz yeterli sayıda özgün biyobelirtecin bulunamamış olmasıdır (44). Metabolomik çalışmalar, fenotipe ait sundukları anlık bilgilerle hastalığın patolojisini ve mekanizmasını aydınlatmaya çalışarak, olası biyobelirteç keşiflerine olanak sağlar.

Metabolik çalışmaların en geniş kapsamlılarından birisi, 2005 yılında başlatılan 'İnsan Metabolom Projesi (HUSERMET)' çalışmasıdır (45). Bu projenin sonuçlarından oluşturulan 'Human Metabolome Database (HMDB)' veri bankası en

gelişmiş metabolit veri bankalarından birisi olarak araştırmacılara hizmet vermektedir. Proje geniş kapsamlı ve uzun soluklu bir çalışmadır ve temel hedefi insan serumunun global metabolit profilini çıkartmaktır. Global metabolom profiline ulaşabilmek metabolomik çalışmalar için kritik bir eşiktir çünkü; metabolitlerin miktarındaki sapmaları belirleyebilmek için referans bir değer gereklidir. Metabolomik çalışmalar genellikle iki gruptan bir tanesini referans kabul ederek yürütülür ve metabolit miktarlarındaki değerler bu kontrol grubu ile karşılaştırılır. Eğer 'normal' olarak kabul edilebilecek global bir referans değer ortaya konabilirse, geleneksel klinik patolojinin aksine daha hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılabilecek yöntemler geliştirilebilecek ve bu durum da erken tanı ve tedaviyi önemli ölçüde kolaylaştıracaktır.

2.4. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan Analitik Yöntemler

Genomik ve transkriptomik çalışmalarda 4 nükleotit türünden, proteomik çalışmalarda ise 22 amino asit türünden dizilene biyomoleküller birbirlerine yakın kimyasal ve fiziksel özellikler gösterirler. Yıllar içerisinde bu çalışmalar için özel olarak optimum verim veren analitik yöntemler geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Metabolitler ise birbirlerinden çok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (24). Bu yüzden diğer omik çalışmaların aksine, metabolomik çalışmalarda kullanılan analitik yöntemlerde çeşitlilik gözlenir. Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC), Kapiler Elektroz (CE), Kütle Spektrometrisi (MS), Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) yöntemleri metabolomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerdir (46). Kullanılan yöntemlerin birbirine karşı üstünlükleri ve dezavantajları bulunmaktadır. NMR bazlı çalışmalar hız ve tekrarlanabilirlik açısından üstünlük gösterirken, MS bazlı çalışmalar hassasiyet yönünden daha iyi sonuçlar vermektedir. GC/MS cihazları uçucu olmayan bileşikler için türevlendirme işlemine ihtiyaç duyarken, gelişmiş veri bankaları sayesinde metabolit tanımlama işleminde öne çıkarlar. LC/MS bazlı sistemler ise, numunelerin türevlendirme gibi ön işlemleri gerektirmemesi ve kimyasal bileşikler için sağladığı daha geniş ölçekli çalışma aralığı ile dikkat çekmektedir (46).

Metabolomik Çalışmalarda LC/MS Kullanımı

Metabolomik çalışmaların ilk yıllarında daha çok NMR temelli çalışmalara rastlanmakla beraber, LC/MS cihazları gelişen teknolojileri ile beraber son yıllarda metabolomik çalışmalarda öne çıkan analitik yöntem olmuştur (11). Yöntemin temeli sıvı kromatografisi ile kütle spektrometresinin kombine olarak çalışmasıdır. Sıvı kromatografisi, dedeksiyon öncesi ayırımı gerçekleştirir. Özellikle klinik çalışmalarda, numune matrislerinin girişim yapmasını engellemek için kromatografik ayırma ihtiyacı duyulur. Ayrıca ayırım kütle spektrometresinin metabolitleri daha hassas ve seçici olarak ölçebilmesini sağlar. (11, 47).

Metabolomik çalışmalar ile ilgili kaynaklarda çeşitli LC/MS türleri ile yapılmış çalışmalara rast gelmek mümkündür (48-50). LC/MS sistemleri hem metabolit profillemeye basamağında hem de MS/MS (tandem MS) yöntemi ile hedeflenmiş çalışmalarda kullanılabilir. HMDB ve METLIN gibi sık kullanılan metabolit veri bankaları, tanımlanmış metabolitlerin MS/MS spektrumlarını da paylaşarak nitel analiz uygulamaları için kullanıma sunmuştur.

2.5. Kromatografi

Kromatografi, karışım halindeki maddelerin hareketli faz yardımı ile sabit faz üzerinden hareket etmesi, bu hareket sürecinde kullanılan kromatografik yönteme bağlı olarak sabit faz ile fizikokimyasal etkileşimlere girmesi ve göç hızları farkına dayanarak birbirinden ayrıştırılması prensibine dayanır (51).

Rus botanikçi Mikhail Tswet, 1903 yılında yayınladığı makalesinde bitki pigmentlerini bileşenlerine ayırmayı başarmış ve yönteme Yunanca 'renk yazıcı' anlamına gelen 'kromatografi' adını vermiştir (52). Kromatografik sistemler hareketli faz (mobil faz) ve sabit faz adı verilen iki fazdan oluşur. Analit hareketli faz yardımı ile kolonda sürüklenirken sabit fazla etkileşime geçer. Maddeler kullanılan kromatografik yönteme bağlı olarak kendi kimyasal veya fiziksel özelliklerine göre sabit faz ile daha fazla veya daha az etkileşim oluştururlar. Aradaki bu fark sayesinde maddeler birbirleri ile ayrıştırılır ve analiz edilir. Kromatografik yöntemler, faz tiplerine, uygulama biçimlerine ve ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Tablo 2.2.'de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.

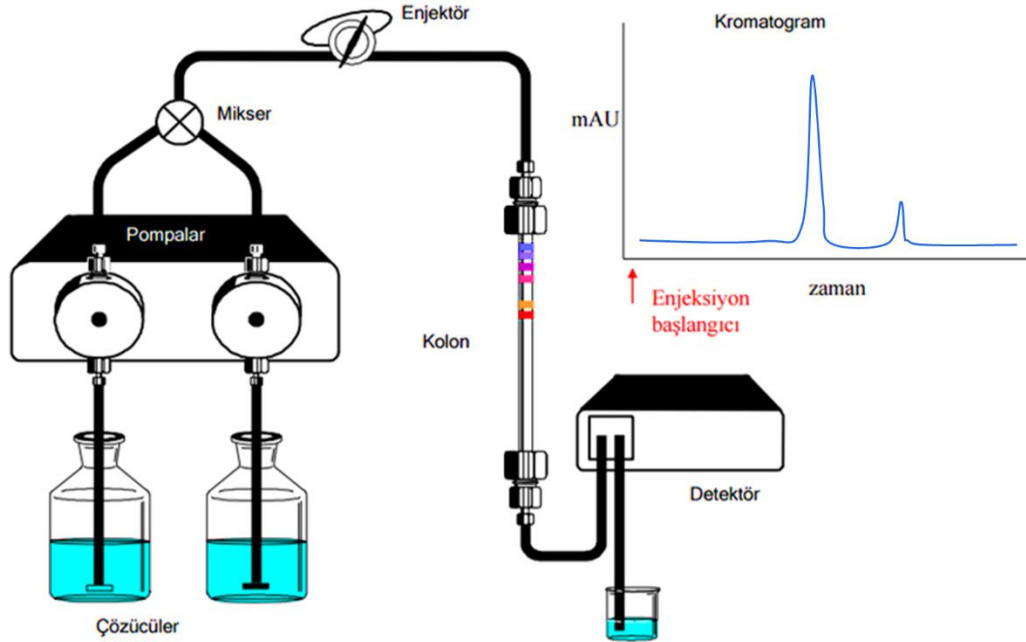
2.5.1. Sıvı Kromatografisinin Tarihsel Gelişimi

Sıvı kromatografisi, hareketli fazın sıvı olduğu yöntemdir ve adını buradan alır. Sabit fazın katı olması durumunda sıvı-katı kromatografisi, sıvı olması durumunda ise sıvı-sıvı kromatografisi olarak adlandırılır. Mikhail Tswet'in ilk uygulaması da sıvı kromatografisi yöntemi ile olmuştur. Tswet bir cam silindiri absorbant ile doldurmuş ve analiti çözücüsü ile beraber silindire yüklemiştir. Analit yerçekiminin etkisiyle kolonda ilerlerken sabit faz ile etkileşerek bileşenlerine ayrılmıştır (52). Tswet ilk uygulamasını sıvı kromatografisi yöntemi ile yapmasına rağmen, yöntemin uygulama zorluğu yüzünden çok yaygınlaşmamış, sıvı kromatografisinin tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanması 1940'ları bulmuştur. Bu yıllarda sıvı kromatografisinin daha basit bir uygulama şekli olan kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi geliştirilmiştir (53). A.J.P. Martin 1941'de yayınladığı bir çalışmada, sıvı kromatografisinin gelişiminin yüksek basınç dayanıklı kolon teknikleri ve bu basınç altında çalışabilecek akış sistemleri geliştirilmesine bağlı olduğunu söylemiştir (54). 1960'larda bu amaçla yola çıkan iki çalışma grubundan Amerika'da Csaba Horvath ve Avrupa'da Josef Huber'in birbirinden bağımsız yürüttüğü çalışmalar sonucunda, ilk ticari 'Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)' cihazları piyasaya

sürülmüştür (53). 1966'da Horvath'ın Nature dergisinde yayınlanan makalesi, kaynaklardaki ilk HPLC makalesi olarak göze çarpmaktadır (55).

2.5.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Sistemleri

Mikhail Tswet'in ilk kromatografik çalışmasından beri yüz yıldan fazla zaman geçmiş olmasına rağmen, modern HPLC cihazları halen 'hareketli fazla birlikte sürüklenen analitin sabit fazla etkileşimi' prensibine dayalı olarak çalışmaktadır. HPLC cihazları bugün kromatografik yöntemlerde en yaygın olarak kullanılan analitik cihazdır. Bir HPLC cihazı Şekil 2.3.'de belirtilen kısımlardan oluşur.



Şekil 2.3. HPLC cihaz şeması.

Hareketli Faz Rezarvuarları; Hareketli faz için kullanılan kimyasal ve çözeltilerin bulunduğu, degazer ve ön filtrasyon ekipmanları da eklenebilen cihaz kısmıdır.

Pompa; Kolondan gerekli akışı sağlamak için kullanılan parçadır. Modern HPLC pompaları farklı rezarvuarlardan farklı oranlarda çözeltiyi alıp, kolona akışı sağlayabilmek üzere tasarlanmaktadır. 600 bar değerindeki geri basınç altında çalışabilen pompa türleri vardır.

Enjektör Sistemi; Analitin numune kabından alınıp, HPLC sistemine aktarılmasını sağlayan bölümdür. Otomatik enjektörler farklı numune kaplarından farklı oranlarda alıp, sisteme enjeksiyon gerçekleştirebilirler.

Kolon; HPLC sisteminde kromatografik ayırımın gerçekleştiği kısımdır. Kullanılacak yöntem göre çok çeşitli partikül boyutlarına, kolon boyutlarına ve dolgu maddelerine sahip kolonlar kullanılabilir.

Dedeksiyon Sistemi; Kolondaki kromatografik ayırımdan gelen maddeler, sistemin dedeksiyon kısmına gelirler. Kullanılacak yöntem göre dedektör tipleri değişirken, en yaygın kullanılan “görünür bölge dizi diyot dedektördür (UV-DAD)”. Kolondan gelen akış, dedektörden kesintisiz bir geçiş yapar, analit dedeksiyon bloğuna ulaştığında, konsantrasyonuna bağlı olarak absorpsiyon yapar ve dedektör bu işlemin sinyalini okur.

2.5.3. Metabolomik Çalışmalarda Kullanılan HPLC Kolonları

C18 Kolonlar: Ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC), sabit fazın apolar hareketli fazın polar bileşenlerden oluştuğu sistemlerdir. C18 kolonlar, ters faz sıvı kromatografisinde en yaygın olarak kullanılan kolonlardır (56). Silika bazlı taşıyıcı partiküller üzerine tutturulan C18 ligandları, özellikle düşük ve orta polaritedeki bileşiklerin ayırımında iyi sonuçlar vermektedir.

C18 kolonlar hemen her boyutta ve partikül çapında ticari olarak temin edilebilmektedir. Ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan hareketli fazlar, normal faz sıvı kromatografisine göre daha az toksik ve daha ucuzdur. Metabolomik çalışmalarda da, C18 kolonlar sıklıkla kullanılmaktadır (57).

Hidrofilik Etkileşimli Sıvı Kromatografisi (HILIC) Kolonlar: Normal faz sıvı kromatografisi (NP-HPLC), sabit fazın polar hareketli fazın apolar bileşenlerden oluştuğu sistemlerdir. HILIC kolonlar kullanıma girdikleri ilk yıllarda normal faz sıvı kromatografisinin bir türü olarak görülmekle beraber, ayırma mekanizması farklı çalışmaktadır. HILIC kolonlarda, NP-HPLC sistemlerinde olduğu gibi polar sabit faz kullanılırken, hareketli fazlar RP-HPLC sistemlerinde kullanılan kimyasallardır. Hareketli faz sabit faz ile kolonun iç yüzeyinde bir katman oluştururken, analit bu ikili katman arasından hareket eder (58).

C18 kolonlar orta ve düşük polaritedeki maddeler için iyi sonuçlar gösterirken, yüksek polariteye sahip, hidrofilik bileşiklerde aynı performansı gösteremezler (59). Bu gibi durumlarda, ters faz kromatografi yerine, normal faz sıvı kromatografisi kullanılması gündeme gelir. Ne var ki, normal faz sıvı kromatografisinde kullanılan hareketli faz çözeltileri, kütle spektrometresinde iyonlaştırma basamağında verim kaybına yol açar (60). HILIC kolonların sabit fazının normal faz sıvı kromatografisi yapısında olması polar bileşiklerin ayırımını sağlarken, hareketli fazın ters faz sıvı kromatografisi yapısında olması kütle spektrometrelerinde iyonlaştırma işleminin daha iyi olmasını sağlar. HILIC kolonların metabolomik çalışmalarda ilk kullanımı, 2002 yılında yayınlanan, bazı bitki yapraklarında amino asit ve şeker gibi polar bileşiklerin LC/MS ile incelendiği çalışmadır (61). Idborg ve ark. 2005 yılında HILIC kolonları üre numunelerinde ilk kez denemiştir (62). Kaynaklarda HILIC kolon kullanılarak yapılan bir çok metabolomik çalışmaya rastlamak mümkündür (63-65). HILIC ve C18 kolonlar metabolomik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen iki kolon türü olmakla birlikte hangisinin diğerinden daha iyi performans göstereceği numunede bulunan metabolitlerin yapısı ve deney koşullarına göre değişebilmektedir.

2.5.4. Kromatografi Parametreleri

Alıkonma Zamanı; Analitin enjeksiyondan dedektöre ulaşana kadar geçen zamana ‘alıkonma zamanı (t_R)’ adı verilir. Alıkonma zamanı maddenin kolonla etkileşimine göre belli olur ve kullanılan yöntemle paralel olarak maddenin kimyasal özellikleriyle ilgilidir. Hareketli fazın alıkonma zamanına ‘ölü hacim (t_0)’ denir.

Kapasite Faktörü; Denge durumunda analitin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılımını ifade eden orana ‘kapasite faktörü (k')’ denir. Kapasite faktörü sabit veya hareketli fazın bileşimlerinin değişmesiyle artar veya azalır. Hareketli faz bileşimlerini değiştirerek kapasite faktörünü istenen aralığa getirmek mümkündür. Kapasite faktörü aşağıdaki eşitlikle (Eşitlik 2.1) hesaplanır.

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

Seçicilik; İki maddenin kapasite faktörlerinin oranı ‘seçicilik (α)’ olarak tanımlanır. Aşağıdaki (Eşitlik 2.2) eşitlikle hesaplanır.

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

Kolon Etkinliği; Kolon etkinliği, pik şeklinin matematiksel ifadelerinden birisidir. Eşdeğer ‘teorik tabaka sayısı (N)’ ile ifade edilir ve aşağıdaki (Eşitlik 2.3) eşitlikle hesaplanır. Bu eşitlikte w, pikin zeminden %10 ykseklikteki genişliğini ifade eder.

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

Ayırıcılık; Ayırıcılık cözücü ve kolon etkinliğinin ortak gösterimi olarak ifade edilir ve ‘R_s’ şeklinde gösterilir. Aşağıdaki (Eşitlik 2.4) eşitlik yardımıyla hesaplanır.

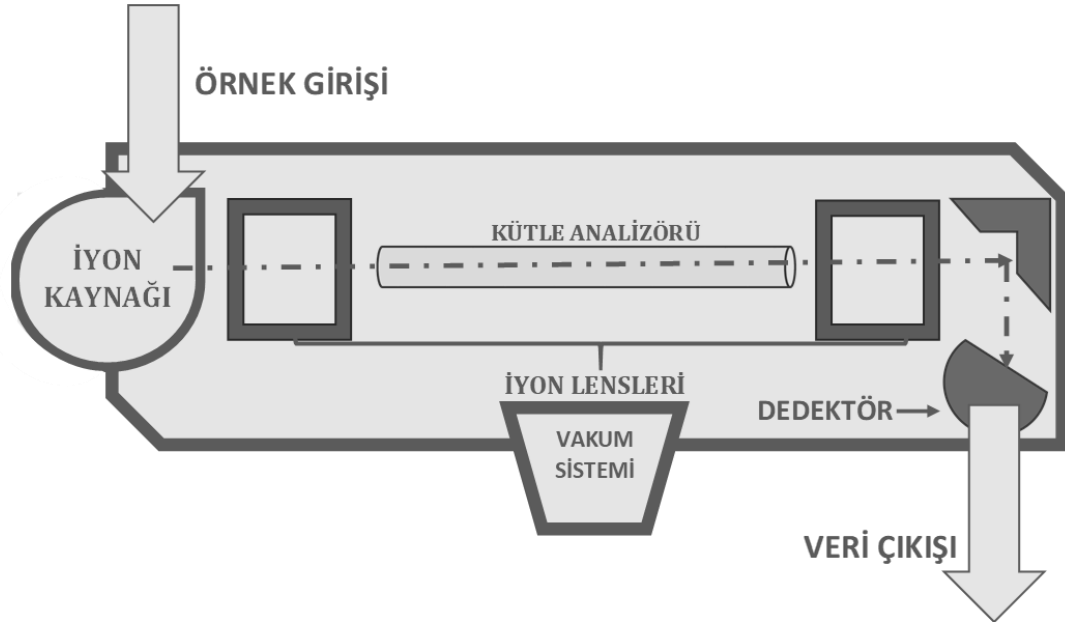
$$R_s = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.4)$$

2.6. Ktle Spektroskopisi

Ktle spektrometre (MS) cihazları hem başlı başına bir analitik platform, hem de kromatografik bir cihazla kombine edilerek etkili bir dedektör olarak kullanılabilir (50). 1990’lı yıllarda Nklear Magnetik Rezonans temelli metabolomik calışmalar ağırlıktayken, gelişen MS teknolojisi ile genelde tüm biyomoleküllerin analizinde, özelde ise metabolomik calışmalarda ktle spektroskopisinin ağırlığını artırmıştır (66). Ktle spektroskopisi temel olarak, iyonlaşan moleküllerin ktle/yük oranlarına (m/z) göre belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. 2000’li yılların başından beri özellikle iyonlaşma basamağı ve ktle analizöründe yaşanan bilimsel ve teknolojik gelişmeler sonucu, MS cihazları geniş yelpazede moleküllerin analizini sağlayabilir hale gelmiştir.

2.6.1. Ktle Spektrometre Cihazlarının Genel Yapısı

Ktle spektrometreleri, kromatografik bir ayırmadan veya direk enjeksiyon sonucu gelen analitin, iyon kaynağında iyonlaştırılıp gaz fazına geçirilen, ardından genellikle ykklü bir kapiler aracılığıyla ktle analizörüne taşınan, ktle analizöründen de dedektöre ulaşan, yksek vakum altında calışan analitik cihazlardır. şekil 2.4.’te bir ktle spektrometre cihazının şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Kütle spektrometrelerinin genel şeması.

İyon Kaynağı: İyon kaynağı, moleküllerin iyonlaştırma işlemi ile yüklü hale getirilerek elektrik alanda hareket etmesini sağlar. Gaz kromatografisinde numune doğrudan iyonlaştırılırken, sıvı kromatografisinde hareketli faz ile beraber gelen analit hem iyonlaştırılır hem de gaz fazına geçirilir.

Elektron iyonlaştırma, kimyasal iyonlaştırma, lazer iyonlaştırma, sprey iyonlaştırma gibi çeşitli çalışma prensipleri bulunan farklı iyon kaynağı türleri bulunmaktadır. Bölüm 2.6.2.'de incelenen elektrosprey iyonlaştırma, biyomolekül analizlerinde en sık kullanılan iyonlaştırma türlerindedir (67).

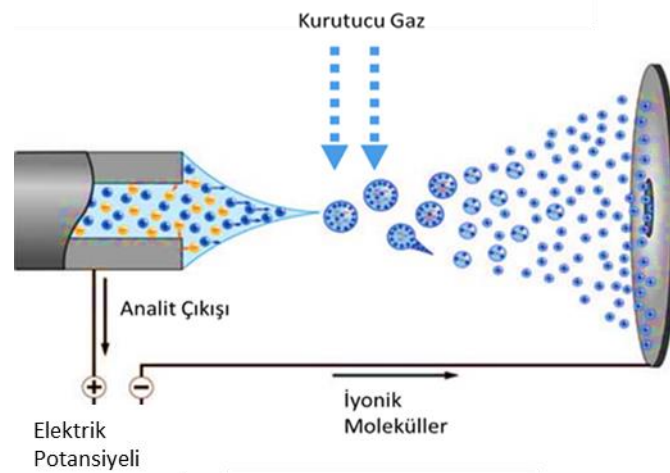
Kütle Analizörü: İyonlaşan moleküllerin kütlesinin yüke yani m/z oranlarına göre sinyallerinin ölçüldüğü kısımdır. Kütle analizörleri magnetik sektörlü, kuadropol, uçuş zamanlı, iyon tuzaklı gibi çok çeşitli çalışma prensipleri ve türleri olan bir modüldür (68). Kütle analizörleri yüksek vakum altında (10^{-6} ile 10^{-9} arasında) çalışır.

Dedektör: Kütle analizöründen gelen iyonlar dedektöre çarparlar, bu çarpışmadan doğan elektrik akımı veya iyonun uçuş zamanı ölçülür. Kütle analizörünün ölçtüğü m/z değeri değiştikçe, dedektörde buna bağımlı bir fonksiyonla ölçüm yapmış olur.

Diğer Cihaz Bileşenleri: MS cihazları kullanılan yöntemlere göre numune enjeksiyon sistemleri barındırırlar. Kromatografik bir cihazla kombine veya manuel ya da otomatik enjeksiyon sistemleri bulundurabilirler. İyonlaşma kaynağının çalışma prensibine bağlı olarak helyum veya azot jeneratörleri kurutucu gaz olarak kullanılabilir. MS cihazları yüksek vakum altında çalıştıkları için, cihaza bağlı vakum sistemleri kullanılır.

2.6.2. Elektrosprey İyonlaştırıcı (ESI)

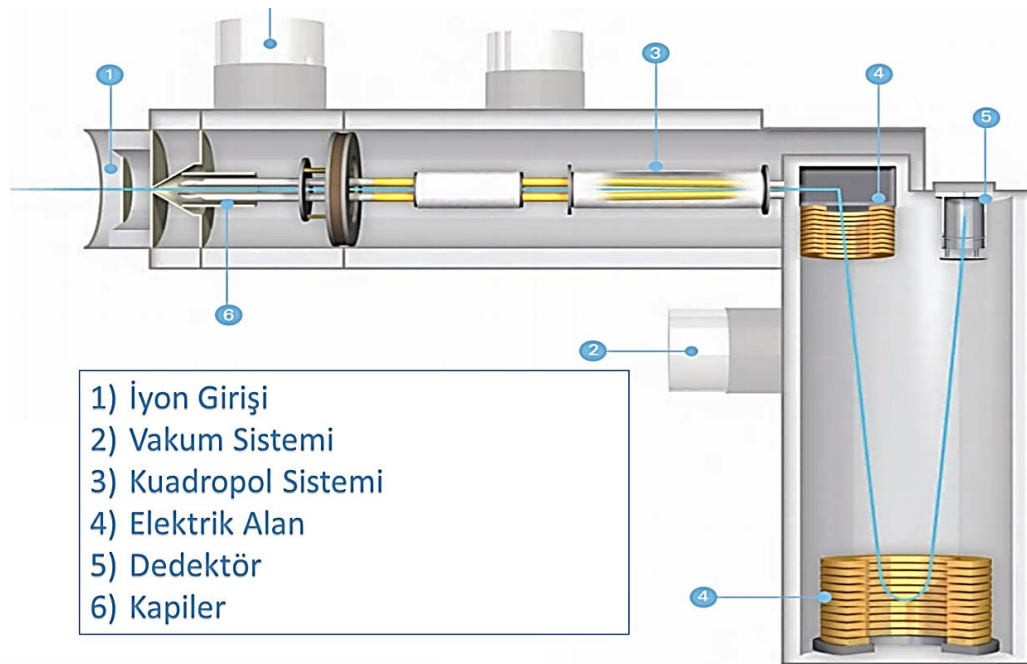
Elektrosprey iyonlaşma tekniğinin kaynaklardaki ilk uygulaması, Dole ve ark. tarafından 1960'ların sonlarına doğru polistren polimerlerini yüklü bileşikler olarak gaz fazına transferini gerçekleştirdikleri çalışmadır (69). 1980'li yıllarda Fenn ve ark. ise ESI başlıkları kütle spektrometrelerine uygun hale getirerek, ESI-MS yöntemini geliştirmişlerdir (70). Elektrosprey iyonlaştırıcılar, tercihen polar bir çözücünde çözülmüş analitin, 3-4 kV elektrik potansiyeli uygulanan kapiler bir spreynen püskürtülerek iyonlaştırılması esasına dayanır (68). Püskürtme işleminde analit ile aynı anda geçirilen ve sıcaklığı 300 °C ile 450 °C arasında değişen azot gazı sayesinde çözücü buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılır. ESI-MS yöntemi özellikle polar bileşikler için iyi sonuç vermekle birlikte, çok geniş sayıda molekül yapısının iyonlaşmasını gerçekleştirebilmektedir. Şekil 2.5.'de ESI başlığının çalışma prensibi ile ilgili görsel sunulmuştur.



Şekil 2.5. Elektrosprey İyonlaştırıcı (ESI) başlığı.

2.6.3. Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (TOF)

Uçuş zamanlı kütle spektrometre cihazları, iyonların elektrik alan altında kinetik enerji ile yüklenerek, uçuş sürelerinden kütleleri arasındaki farka ulaşan sistemlerdir. Aynı elektrik alan altında aynı yüke sahip iyonlar, kütlelerindeki farktan dolayı farklı kinetik enerjilere ulaşırlar. Bu kinetik enerjilerindeki fark uçuş sürelerini belirler (71). TOF cihazları 1950'lerden beri ticari olarak üretilmesine karşın kullanımı ilk yıllarda oldukça sınırlı durumda kalmıştır. Bunun sebebi ise o yıllarda uçuş zamanını yeteri kadar hassas ölçebilecek dedeksiyon sistemlerinin bulunmamasıdır. Gelişen teknoloji ile mikrosaniye düzeyinde ölçüm yapabilen TOF dedektörleri sayesinde hassasiyeti oldukça artan TOF-MS cihazları, bugün biyoanalitik yöntemlerde sıklıkla kullanılmaktadır (72). Kuadrapol ile birleştirilerek hibrid MS denilen, iki kütle analizörünün kombine kullanıldığı Q-TOF/MS cihazları da mevcuttur. Bu cihazlarda kuadrapol sistemi belirlenen m/z aralığında çalışarak diğer maddelerin dedektöre ulaşmasını engeller, ayrıca MS/MS yöntemi için gerekli çarpışma enerjisini kullanarak maddeleri fragmentlerine ayırır. Q-TOF/MS cihazları bu sayede TOF/MS cihazlara göre daha iyi seçicilik ve hassasiyet sonuçları vermektedir. Şekil 2.6. Q-TOF/MS sistemlerinin bölümlerini göstermek amacıyla sunulmuştur.



Şekil 2.6. Q-TOF/MS cihazların genel şematik gösterimi.

Pozitif ve Negatif Mod MS

Kütle Spektrometrelerinde moleküller iyonlaşma basamağında pozitif veya negatif yüklü olarak iyonlaşabilirler. Hangi maddenin pozitif, hangi maddenin negatif olarak iyonlaşabileceğinin tam olarak bilinmesi zordur. Maddeler iyon kaynağı türüne göre pozitif veya negatif iyonlaşabilirler. Hatta bazı maddeler hem pozitif hem negatif olarak dahi iyonlaşabilirler (73). İyonlaşan moleküller MS sistemine yüklü bir kapiler aracılığıyla aktarılırken, kapilerin pozitif ya da negatif yüklü olmasına göre sistemin içine alınırlar. Kapilerin negatif yüklü olup, sisteme pozitif yüklü iyonların alınması 'pozitif mod', kapilerin pozitif yüklü olup sisteme negatif yüklü iyonların alınması 'negatif mod' olarak adlandırılır.

2.7. Metabolomik Çalışmalar için Numune Hazırlama Yöntemleri

Optimum metabolit sayısına ulaşmak için ilk adım, numuneden optimum metabolit ekstraksiyonunu sağlayabilmektir. Biyolojik numunelerden metabolit fazının toplanması amacıyla katı faz ekstraksiyonu, sıvı faz ekstraksiyonu, filtrasyon ve çöktürme temelli yöntemler olmak üzere bir çok yöntem bulunmaktadır (74). Katı faz ekstraksiyonu temelli numune hazırlama yöntemleri, özellikle numune matriksinin ayrılmasında iyi sonuçlar verdiği için sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir (75). Yöntem, numunenin katı faz ile kimyasal etkileşimlere girip tutunması ve daha sonra uygun bir çözücüyle metabolit fazının alınması esasına dayanır. Çok çeşitli yapılarda katı faz ekstraksiyon kartuşları ticari olarak temin edilebilmektedir. Sıvı faz ekstraksiyon yöntemi, metabolit fraksiyonu eldesinde kullanılan bir başka yöntemdir. Özellikle dokulardan metabolit eldesi yöntemi için kullanılır. Genel olarak, uygun bir çözücüde dokuyu karıştırıcı yardımıyla çalkalamak ve dokudaki metabolitlerin sıvı fraksiyona geçmesini sağlamak prensibi ile çalışır (76).

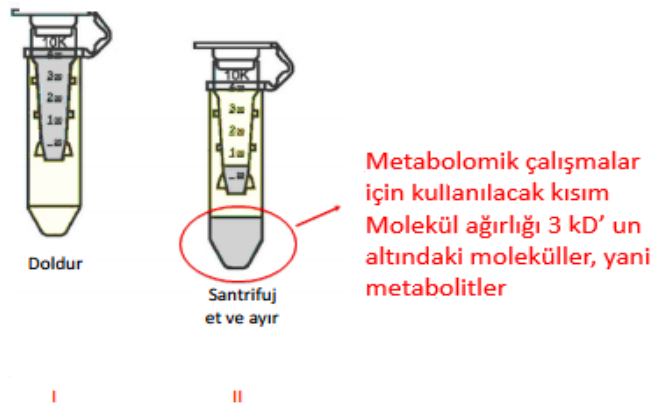
Bu yöntemler çalışılacak analitik yönteme ve metabolitlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre birbirine üstünlük göstermekte olup çalışmalarda standart olmuş bir prosedür bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında metabolomik çalışmalara görece yeni katılan ultrafiltrasyon yöntemi ile daha geleneksel bir yöntem olan metanolla çöktürme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bölüm 2.7.1. ve 2.7.2.'de bu yöntemler incelenmiştir.

2.7.1. Ultrafiltrasyon Yöntemi

Ultrafiltrasyon kartuşları, numuneyi mikrogözenekli filtreler yardımıyla süzerek, filtrenin boyutuna göre belirlenen molekül ağırlığına bağlı fraksiyonlara ayırır. Piyasada ticari olarak 3000 ile 30000 kDa arasında değişen boyutlarda gözenekleri olan ultrafiltrasyon kartuşları temin edilebilmektedir.

Ultrafiltrasyon kartuşlarında, ilk olarak örnek kartuşa koyulur ve santrifüj edilir. Filtrenin üzerinde yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonlar, altında düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlar toplanır. Çalışmanın amacına göre numuneler vakum ortamında kurutulurak derişik veya seyreltik hale getirilebilirler. Şekil 2.7.'de ultrafiltrasyon kartuşlarına ait görsel sunulmuştur.

Kaynaklarda ultrafiltrasyon yöntemiyle yapılmış bir çok metabolomik çalışmaya rastlamak mümkündür (77-79). Yöntem aslında ilk olarak proteomik çalışmalar için protein eldesi etmek amacıyla uygulanmıştır, ancak zaman içinde metabolomik çalışmalar için de kullanılmaya başlanmıştır (80). Ultrafiltrasyon yönteminin özellikle tekrarlanabilirlik açısından diğer yöntemlere üstünlük gösterdiğini belirten çalışmalar yapılmıştır (81).



Şekil 2.7. Ultrafiltrasyon kartuşları.

2.7.2. Metanolle Çöktürme Yöntemi

Metabolit konsantrasyonunun vücut sıvılarında proteinlerle yaklaşık eşit miktarlarda bulunduğu düşünülmektedir (82). Bir organik çözücü yardımıyla proteinleri çöktürmek ve çözeltiden metabolit fraksiyonunu elde etmek, biyoanalitik uygulamalarda sıklıkla kullanılır (56). Metabolitlerin geneli vücut sıvısında serbest halde bulunurken, bir kısmı ise proteinlere bağlanmış durumdadır. Proteinler çökerken, proteinlere bağlı durumdaki metabolitler ayrılır ve serbest hale geçerler.

Organik çözücüler ortama eklendiğinde, protein yapılarıyla etkileşime geçerek çözünürlüklerini düşürür ve çökmelerine sebep olurlar (83). Asetonitril ve metanol gibi organik çözücüler bu amaçla sıklıkla tercih edilen kimyasallardır (56). 2006 yılında yayınlanan bir araştırmada metanolün diğer organik çözücülere göre daha efektif olduğu gösterilmiştir (84). Numuneye ne kadar organik faz ekleneceğine dair kesin bir tanım olmamakla birlikte, en az bire bir oranda çözelti eklenmesi gerektiği kabul edilmektedir (85). Organik faz eklenmesiyle birlikte numune santrifüj edilir ve çözelti ve çökelek birbirinden ayrılır. Santrifüj işleminin ardından toplanan çözelti metabolit fraksiyonunu oluşturur. Çalışmanın amacına göre numuneler vakum ortamında kurutularak derişik veya seyreltik hale getirilebilirler.

2.8. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veri Bankası Desteği

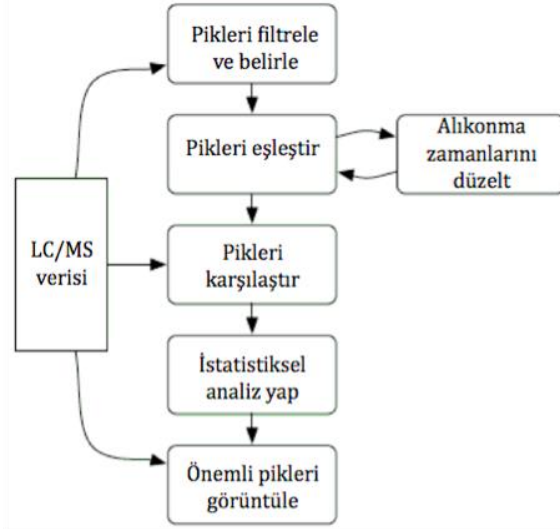
Metabolomik çalışmalar; biyolojik temelli hipotezin deneysel verilere dönüşmesi, deneysel verilerin matematiksel modellemeye çevrilmesi, matematiksel modellemeden de biyolojik bilgiye ulaşmayı hedefler. Metabolomik deneyler yoğun data çıktısı olan çalışmalardır. Bu dataların matematiksel verilere dönüştürülmesi işleminde, yazılım desteği kullanmak bir nevi zorunluluk haline gelmiştir. Metabolit olduğu düşünülen piklerin belirlenmesi, farklı numune setleriyle bu piklerin eşleştirilmesi, yoğunluklarının karşılaştırılması, metabolitlerin ve metabolit yollarının tanımlanması gibi işlemlerde yazılım ve veri bankaları desteğine ihtiyaç duyulur (86). Metabolomik çalışmalar için çok sayıda ticari ve açık erişimli yazılım geliştirilmiştir. Tablo 2.3.'de metabolomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan yazılım ve veri bankalarından bazıları verilmiştir.

Tablo 2.3. Metabolomik çalışmalarda kullanılan yazılımlar.

Yazılım	Kullanım Amacı	Analitik Platform
XCMS (87)	Pik belirleme, eşleştirme, yoğunluklarını karşılaştırma, istatistiksel testler	LC/MS, GC/MS
MzMine (88)	Pik belirleme, eşleştirme, yoğunluklarını karşılaştırma, istatistiksel testler	LC/MS, GC/MS
MetaboloAnalyst (89)	İstatistiksel testler, metabolit tanımlama, yolak analizleri	Tüm platformlar
MetaboMiner (90)	Pik eşleştirme, metabolit tanımlama	NMR
MetPA (91)	Metabolit yolak analizi	Tüm platformlar
MetaboLights (92)	Metabolit veri bankası	Tüm platformlar
METLIN (93)	Metabolit veri bankası	Tüm platformlar
HMDB (94)	Metabolit veri bankası	Tüm platformlar

2.8.1. XCMS

XCMS metabolomik çalışmalarda için geliştirilen, 'R' istatistik yazılımı tabanlı, açık kaynak kodlu bir yazılımdır. XCMS, girilen parametreler doğrultusunda ham datayı matematiksel modellemelere çevirir. XCMS, piklerin belirlenmesi, örnek setindeki diğer numunelerdeki piklerle eşleştirilmesi, pik şiddetlerinin karşılaştırılması, istatistiksel testler ve ayrılmış iyon kromatogramlarını elde etmede kullanılır (87). Şekil 2.8.'de XCMS'in çalışma algoritmasının şematize hali verilmiştir.



Şekil 2.8. XCMS çalışma algoritması.

Ham datanın XCMS'e uygun hale getirilmesi; XCMS'te ilk adım analitik platformdan alınan veri dosyalarını XCMS'e uygun dosya formatına dönüştürmektir. Analitik cihazlar kendi ticari yazılımlarını kullanırlar ve bu uzantılar 'ProteoWizard' gibi dosya dönüştürücü yazılımlar aracılığıyla dosya formatı XCMS'e uygun hale (.mzXML formatı) getirilir.

Pikleri Belirleme ve Filtreleme; XCMS yazılımı bu basamakta kendisine yüklenen dosyalardaki her piki ayrılmış kütle spektrumları (EIC) şeklinde ayırır ve belirlenen gürültü değerinin altındaki pikleri filtreler.

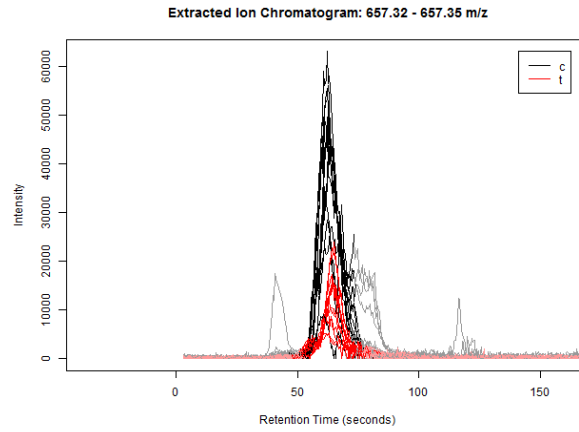
Pikleri Eşleştirme; Bir önceki aşamada ayrıştırılmış pikler, örnek setleri boyunca taranır m/z ve alıkonma zamanına göre birbiri ile eşleştirilir. XCMS bu basamakta 'centwave' ve 'matchfilter' adı verilen iki farklı istatistiksel modellemenin birisini kullanır. Bu seçim kullanıcıya aittir. Pikler birbiri ile eşleştirilirken m/z ve alıkonma zamanlarının hata aralıkları kullanıcı tarafından seçilir.

Pikleri Karşılaştırma; Birbiri ile eşleştirilmiş pikler, aynı maddenin pikleri olarak farklı örnek setleri ile karşılaştırılır. Bu sayede pik şiddetindeki değişimler gözlenir.

İstatistiksel Analizler; XCMS yazılımı 't testi', 'normalizasyon dönüşümleri' gibi işlemleri kullanıcının seçimi doğrultusunda sonuçlara uygular.

Ayrılmış İyon Kromatogramları; XCMS belirlenen her pike ait, örnek setindeki tüm numunelerden oluşturulmuş bir kromatogram verir. Şekil 2.9.'da XCMS'in çıktısı olarak örnek bir ayrılmış iyon kromatogramı sunulmuştur.

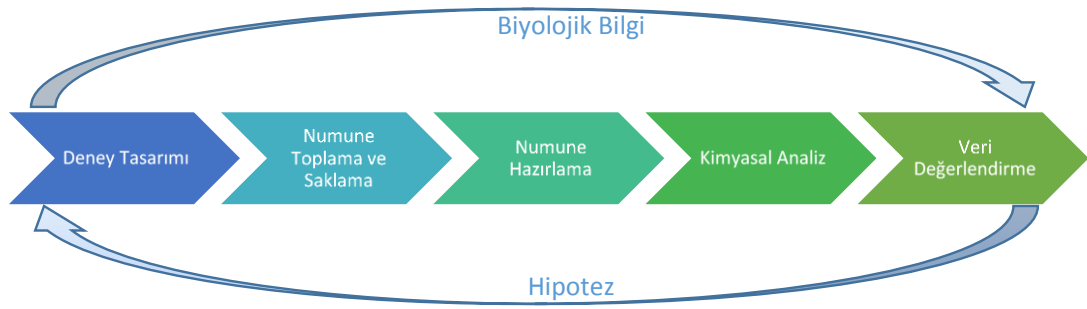
Sonuç Tablosu; Tüm bu işlemlerin ardından XCMS tüm ham datanın ve istatistiksel dönüşüme uğramış datanın sonuçlarını excel formatında her örnek grubu için ayrı ayrı verir.



Şekil 2.9. Örnek XCMS kromatogram çıktısı.

2.9. Metabolomik Çalışmalarda Deney Tasarımında Uygulanan Yaklaşımlar

Sistemler Biyolojisi yaklaşımında, karşılaştırılan gruplar arasında ilgilenilen değişken dışında kalan diğer tüm değişkenleri sabit tutmayı, böylece gruplar arasında gözlenen farklılığın sadece ilgilenilen değişkene ait olması istenir (95). Gözlenen farklılığın deneysel bir sistematik veya sistematik olmayan bir hatadan mı, yoksa biyolojik farklılığın kendisinden mi kaynaklandığını anlamak için numune hazırlamadan başlayarak veri analizi çalışmalarına kadar bir dizi optimizasyon ve kalite kontrol stratejisi uygulamaları bulunmaktadır. Metabolomik çalışmalar kurulan hipotezin deneysel çalışmalarla biyolojik bilgiye dönüşmesi ve bu biyolojik bilginin hipotez üzerinden test edilmesidir. Şekil 2.10. bir metabolomik çalışmada ana hatlarıyla izlenen yolu şematize etmektedir.



Şekil 2.10. Metabolomik çalışmalarda iş akışı.

2.9.1. Karışım Numuneleri Kullanımı

Karışım numuneleri, bir gruptaki örneklerden aynı miktarda alınarak homojen bir karışım oluşturulmasıdır. Bu karışım sayesinde aynı gruptaki örnekler arasındaki farklılıklar minimize edilmiş olur. Özellikle klinik çalışmalarda ve vücut sıvısı ile çalışılırken, cinsiyet, yaş, beslenme alışkanlıkları gibi fenotipe bağlı değişkenler literatürde *'false positive'* veya *'false negative'* denilen pozitif veya negatif hatalara sebep olabilir. Karışım numuneleri örneklemin tamamından oluşturulabileceği gibi, örneklemin istatistiksel olarak yansıtmaya yeterli sayıda, rastgele seçilmiş numunelerden de oluşabilir (80).

2.9.2. Kalite Kontrol Yaklaşımı

Metabolomik çalışmalar uzun zaman periyotlarına ulaşabilir, bu zaman aralıklarında kullanılan sarf malzemelerinde veya cihazda bakım onarım sebebiyle değişiklikler olması söz konusu olabilir. İlk büyük ölçekli metabolomik çalışmalardan olan 'İnsan Metabolom Projesi (HUSERMET)' çalışmasında metabolit profillemeye çalışmaları üç yıldan fazla sürmüştür (45). Bu uzun süreler özellikle kullanılan analitik yöntemin performansını takip etme gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla oluşturulan kalite kontrol numuneleri, metabolomik çalışmalarda periyodik aralıklarla ölçülerek yöntemin performansını takip etmeye olanak sağlar (96). Örnek vermek gerekirse; sıvı kromatografisinde aynı analiz bloğunda dahi, ilk enjeksiyon ve sonuncu enjeksiyon arasında alıkonma zamanları arasında değişiklik gözlemlenebilir. Bu değişiklikleri takip edebilmek, yani farklı zamanlarda, farklı numunelerden benzer sonuçlar alabilmek için, yöntemin ve cihazın performansından emin olunması gerekir.

Kalite kontrol numuneleri, içeriği kesin olarak bilinen örneklerdir. Bu örnekler genellikle numuneyi küçük ölçekli olarak yansıttığı düşünülen metabolit karışımlarından oluşturulur. Örnek bir kalite kontrol numunesi kullanımı Şekil 2.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Kalite kontrol numunesi kullanımına ait örnek diagram.

2.9.3. İç Standart Kullanımı

İç standartlar, numunelere eklenen derişimi kesin olarak bilinen kimyasallardır. Metabolomik çalışmalarda iç standart özellikle numune hazırlama basamağının performansını takip etmede kullanılır. İki örnek arasında sistematik veya sistematik olmayan bir hatadan dolayı farklılık gözlemlenebilir. Bu hatanın kaynağı numune hazırlama basamağında ise, iki örnek arasındaki farklılık iç standart maddesine de yansıtacaktır. Bu sayede numune hazırlama basamağının performansı takip edilmiş olur (97). Ayrıca iç standart numuneleri veri değerlendirme aşamalarında normalizasyon referansı olarak da kullanılabilir (98).

2.9.4. Dilüsyon Serisi Yöntemi

Dilüsyon serisi yaklaşımı metabolomik çalışmalarda iki amaçla kullanılır, bunlardan birincisi kütle spektroskopisi temelli metabolomik çalışmalarda karşılaşılan bir problem olan gürültü veya kirlilikten kaynaklı olabilecek piklerin metabolit piki zannedilmesinin önüne geçmek ve ikinci olarak da metabolit profillemeye basamağının performansını takip etmektir.

Yöntemde, numuneler bir dilüsyon serisi oluşturacak şekilde hazırlanır ve analizler bu şekilde yapılır. Veri analizi basamağında, bu serinin regresyon analizi

yapılır ve belirlenen regresyon değerinin üzerinde olan piklerin numuneden geldiği kabul edilir ve bu değer altında kalan diğer pikler hesaplamalardan çıkarılır (99).

2.9.5. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu

XCMS metabolitleri eşleştirirken, analizden kaynaklı varyasyonları düzeltebilmek amacıyla, alıkonma zamanı, m/z değerleri, pik genişliği, pik simetrisi gibi değişkenleri belli aralık limitlerinde birbirleri ile eşleştirir, pikler bu limitlerin içinde kalıyorsa anlamlı kabul eder. Bu aralıkları geniş tutmak küçük piklerin kaybolmasına, dar tutmak ise büyük piklerin gözden kaçmasına sebep olur (100). Bu parametreler deney koşullarına bağımlı parametrelerdir ve her çalışma için özgün olarak belirlenmelidir. Bu sebeple XCMS parametrelerinin optimizasyonu, optimum metabolit sayısına ulaşmaktaki en önemli basamaklardandır. Aşağıda bu parametrelerin isimleri ve işlevleri açıklanmıştır.

peakwidth; bir pikin geçerli sayılabilmesi için saniye bazında olması gereken en küçük ve en büyük aralıkları ifade eder. XCMS yazılımında varsayılan değerler en az 5 en fazla 12 saniyedir. Buna göre bir pikin geçerli sayılabilmesi için en az 5 saniye en fazla 12 saniye aralıklarında MS dedektöründe sinyal vermesi gerekmektedir.

ppm; yukarıda anlatılan peakwidth aralığına düşen her sinyalin m/z değerinin aynı maddeden geldiğini kabul etmesi için gereken sapma aralığıdır. Yani dedektöre ulaşan bir m/z değeri, en fazla 10 ppm düşük veya yüksek olması halinde aynı madde kabul edilir.

prefilter; bu parametre iki ayrı parametrenin kombinasyonu olarak çalışır. İlk değer, bir pikin geçerli sayılabilmesi için minimum kaç MS taramasında görünmesi gerektiğini belirler. İkinci değer ise bir sinyalin geçerli sayılabilmesi için olması gereken en az şiddeti belirler. Yazılımın varsayılan değerleri (2, 20000)'dir yani bir madde en az 2 MS taramasında görülmezse ve en az 20000 şiddetinde sinyal vermezse değerlendirmeye alınmaz.

mzdiff; İki ayrı maddenin aynı alıkonma zamanı ile gelmesi durumunda (overlap durumu), birbirlerinden farklı maddeler olarak kabul edebilmek için gereken en düşük m/z değerini belirtir. Ppm parametresinden farkı, bu değer için maddelerin aynı peakwidth aralığına düşmesi zorunluluğu bulunmamasıdır.

bw; piklerin ulaşabileceği maksimum pik genişliği değerini ifade eder.

mzwid; m/z değeri üzerinden iki maddeyi birbirinden ayırmak için kullanılan peakwidth, ppm ve mzdiff gibi parametreleri sağlasa bile, mzwid parametresi bu iki maddeyi aynı kabul edebilmek için belirlenen üst sınırı ifade eder. Varsayılan değer 0.025 m/z'dir ve buna göre diğer tüm koşullar sağlansa bir maddenin m/z değerinde ölçümden kaynaklı 0.025 m/z değerinde bir farktan fazla olamaz.

minfrag; Bir pikin geçerli sayılabilmesi için tüm örneklemin minimum ne kadarında görülmesi gerektiğini belirler. Varsayılan değer 0.50'dir ve buna göre bir pik tüm örneklemin en az % 50'sinde bulunmuyorsa hesaba katılmaz ve sonuçlardan çıkarılır.

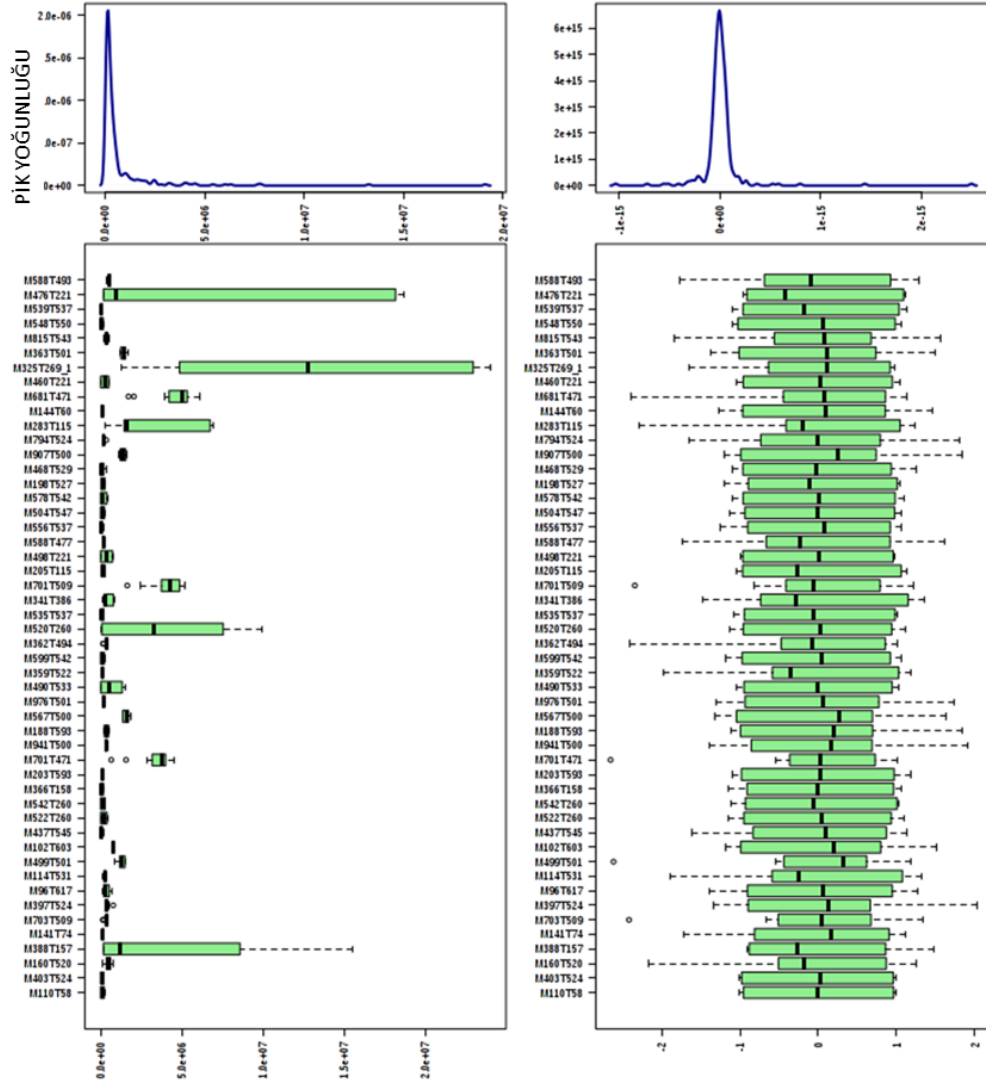
XCMS bu parametrelerin kombine haliyle çalışır. Bu parametrelerin optimum değerini önceden kestirmek olanaksızdır. Bu değerler IPO adı verilen yardımcı bir yazılım aracılığıyla belirlenir. IPO, XCMS'e eklenti yazılım olarak kurulur ve analiz sonuçları XCMS ile değerlendirmeden önce IPO ile optimum parametreler belirlenir (101). IPO yüklenen dosyaları değişik değerlerde tarar ve optimum sonuçların alınabileceği değerleri belirler. Tablo 2.4. bu parametrelerin varsayılan değerlerini göstermektedir.

Tablo 2.4. XCMS varsayılan değerler.

Parametre	Varsayılan Değer
peakwidth	(5,12)
ppm	(10)
prefilter	(2, 20000)
mzdiff	-
bw	(5)
mzwid	(0.025)
minfrag	(0.5)

2.9.6. Pik Şiddetlerinin Normalizasyonu

Metabolitler buldukları doku ve hücrelerde çok çeşitli konsantrasyonlarda bulunabilirler (102). Metabolomik çalışmalar metabolit konsantrasyonlarında güvenilir bir artış veya azalış arama çalışmalarıdır. Örnek vermek gerekirse; A metabolitinin konsantrasyonundaki 10 katlık bir azalışın anlamlı bir değişim olması için, bu örnekteki diğer (A metaboliti dışında kalan) metabolitlerin ‘genelinde’ bu azalışın gözlenmemesi gerekir. Bu değişimleri gözleyebilmek için pik şiddetleri belirlenen değerler üzerinden istatistiksel dönüşümlere uğratarak pikler ‘normalize’ edilir. Metabolomik çalışmalarda kullanılan bir çok normalizasyon yöntemi bulunmaktadır (103). Pik ortalamasına göre normalize etme, pik ortanca değerine göre normalize etme, iç standartta göre normalize etme, standart sapmaya göre normalize etme bu yöntemlerden sıklıkla kullanılanlarıdır. Şekil 2.12. normalizasyon işleminin nasıl bir dönüşüm sağladığını örneklemek amacıyla sunulmuştur. Sol sütun normalizasyon işlemi öncesi, sağ sütun ise normalizasyon işlemi sonrası pik yoğunluklarını göstermektedir. Yatay sütun grafiklerin her biri, bir adet piki temsil etmektedir. Şekilden de görüleceği üzere, pik şiddetleri arasındaki büyük fark, normalizasyon işlemi olmadan piklerin artma veya azalma eğilimi belirlemenin çok mümkün olmamasına sebep olur. Sağ sütunda normalizasyon işlemi sonrası aynı düzlemde buluşabilen pikler ise, karşılaştırma yapmaya çok daha uygun hale gelmiştir.



Şekil 2.12. Normalizasyon öncesi pik yoğunlukları (sol sütun) ve normalizasyon sonrası pik yoğunlukları (sağ sütun).

2.10. Assit Sıvısı ve Assit Ayırıcı Tanı

Assit sıvısı karaciğer, kalp, pankreas ve diğer bazı hastalıklar sonucu oluşabilen, peritoneal boşlukta toplanan patolojik sıvıya verilen genel addır (104). Assit oluşumu gözlenen hastaların % 80'lik bölümü kriptojenik siroz hastalarından oluşmaktadır (105). Assit ayırıcı tanı ise assit oluşumuna sebep olan hastalığın belirlenmesi işlemidir. Assit ayırıcı tanı işlemiyle, assit oluşumuna sebep olan hastalığın kaynağı incelenir. Rutin olarak kullanılan assit sıvısından patolojik analizler bulunmakla beraber, tanı ancak hastalığa özgü diğer tanı koyma yöntemleriyle kesinleştirilebilmektedir (106).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmalar

Bu tez çalışması, 114S306 numaralı ‘Assit Ayırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini’ başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Proje ‘T.C. Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ tarafından 26 Mart 2014 tarihinde 16969557-358 sayılı yazı ile Go 14/187 kayıt numaralı ve ‘Assit Ayırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini’ başlıklı dosya ile etik kurul izni almıştır. İlgili etik kurul onay sayfası Ek 1’de sunulmuştur.

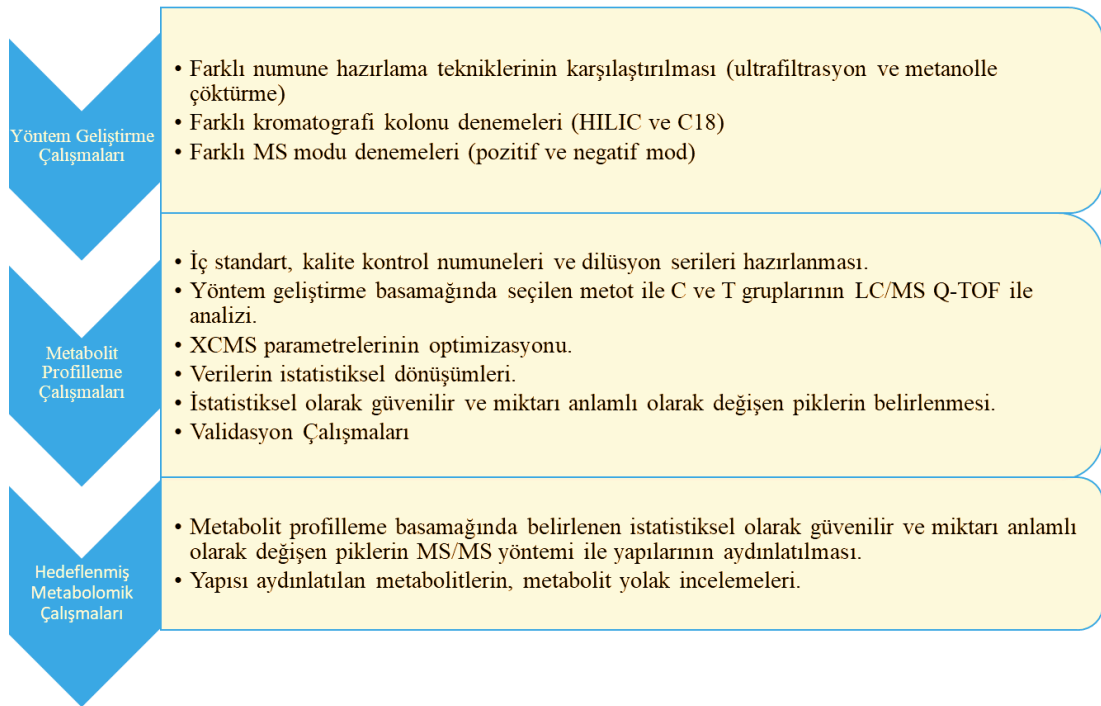
Bu tez çalışması kapsamında, malign nedene bağlı assit sıvısı oluşumu gösteren ve malign olmayan nedenlerden assit sıvısı oluşumu gösteren hasta grupları arasında LC/MS Q-TOF yöntemi ile metabolomik çalışmalar gerçekleştirmek amacıyla yöntem geliştirme, geliştirilen yöntemle metabolit profillemeye ve hedeflenmiş metabolomik olmak üzere üç ana başlıkta çalışmalar yapılmıştır. Hasta grupları, malign nedene bağlı olmayan assit sıvıları numuneleri için ‘kriptojenik siroz’ tanısı koyulmuş hastalardan (C; kontrol grubu), malign nedene bağlı assit sıvıları numuneleri için ise ‘pankreas kanseri’ tanısı koyulmuş hastalardan (T; hasta grubu) oluşturulmuştur.

Çalışmanın ilk aşamasında, yöntem geliştirme basamağı için iki grupta 6’şar numuneden eşit miktarda alınarak karışım numuneleri oluşturulmuş, bu numuneler 6’şarlı setler halinde 2 tekrarlı olarak; metanolla çöktürme ve ultrafiltrasyon olmak üzere iki farklı numune hazırlama tekniği, HILIC ve C18 kolonları ile iki farklı kromatografi kolonu, pozitif ve negatif olarak iki farklı MS modu ile ayrı ayrı analiz edilmiş ve XCMS yazılımı ile veriler değerlendirilmiştir. Bu üç yönteme ait 2’şer farklı metod denemeleri ile, her yöntem için ayrı ayrı olmak üzere ve toplamda 8 tane farklı yöntemin karşılaştırılması sonucunda en fazla pik sayısına ulaşan yöntem belirlenerek, çalışmanın geri kalanı için kullanılacak analitik metod belirlenmiştir.

Çalışmaların ikinci aşaması, yöntem geliştirme basamağında belirlenen analitik metod kullanılarak, C ve T gruplarında metabolit profillemeye çalışması yapmak olmuştur. Bu aşamada hazırlanan karışım numunelerine iç standart eklenmiş ve numuneler ilgili bölümde anlatılan dilüsyon serisi yöntemine göre hazırlanmıştır. Veri değerlendirme basamağında kullanılan XCMS yazılımının İPO yazılımı aracılığı ile

parametreleri optimize edilmiş ve ilgili bölümlerde anlatılan istatistiksel dönüşümler sonucu miktarı anlamlı olarak değişen ve istatistiksel olarak güvenilir pikler belirlenmiştir. Bu pikler metabolit veri bankalarında taranarak olası metabolitler belirlenmiştir. Bu bölümde yöntemin validasyon çalışmaları da yapılarak, sonuçların güvenilirliği incelenmeye çalışılmıştır.

Çalışmaların son bölümünde, metabolit profillemeye basamağında belirlenen miktarı anlamlı olarak değişen ve istatistiksel olarak güvenilir 141 pikin yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Pikler MS/MS yöntemi ile fragmentlerine ayrılmış ve veri bankalarında taranarak sonuçlar incelenmiştir. Yapısı aydınlatılabilen metabolitlerin metabolit yolak incelemeleri ve kaynak taramaları ile hastalık ile bağlantıları araştırılmıştır. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara ait iş akışını gösteren şema Şekil 3.1.'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar.

3.1.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan kimyasal, sarf ve cihazlar Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka	Kullanım amacı
Asetonitril (LC/MS Grade)	Sigma	LC/MS hareketli fazı
Su (%0,1 Formik Asit)	Sigma	LC/MS hareketli fazı
Metanol (HPLC Grade)	Sigma	Metabolit ekstraksiyonu
Amicon Ultrafiltrasyon Kartuşu (3 kDa)	Merck	Metabolit ekstraksiyonu
Formik Asit (LC/MS Grade)	Sigma	LC/MS hareketli faz tamponu hazırlama
Amonyum Format (LC/MS Grade)	Sigma	LC/MS hareketli faz tamponu hazırlama
Daidzein standartı	Waters	İç standart
MS QC referans karışımı (186006963)	Waters	Kalite kontrol numunesi karışımı
G1969-85000 ESI-TOF Tuning Mix	Agilent	MS tune çözeltisi

Tablo 3.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.

Cihaz, Yazılım ve Sarf Malzemeleri	Marka	Kullanım Amacı
Q-TOF/MS	Agilent 6530	Metabolit profillemeye, hedeflenmiş metabolomik
UPLC	Agilent 1260 Infinity	Metabolit profillemeye, hedeflenmiş metabolomik
Mass Hunter	Agilent	LC/MS Q-TOF kontrol yazılımı
XCMS	Ücretsiz Yazılım	Metabolit eşleştirme ve profillemeye
ProteoWizard	Ücretsiz Yazılım	MS dosya uzantısı dönüştürücü
'R' istatistik programı	Ücretsiz Yazılım	XCMS programının çalışması için kullanılan yazılım
Vakum santrifüj	Labconco Refrigerated CentriVap Concentrator	Numune ve çözeltilerin uçurulması
Zorbax HILIC Plus (2.1 x 50 mm, 1.8-Micron)	Agilent	HPLC Kolonu
X Select C18 (4.6 x 100 mm, 3.5-Micron)	Waters	HPLC Kolonu

3.1.2. Assit Sıvısı Numunelerinin Toplanması ve Saklanması

Numuneler TÜBİTAK 114S306 projesi kapsamında, ilgili projede görevli Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroentoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri tarafından steril şartlarda karın hazırlığı yapıldıktan sonra, ultrasonografi eşliğinde karın sol alt kadrandan steril enjektörle en az 10 ml olacak şekilde alınmıştır. 2 farklı 5 ml'lik santrifüj tüpüne toplanan numuneler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra santrifüj alınmıştır. Assit numuneleri hastalık, yaş ve cinsiyetine göre kayıt

altına alınarak numaralandırılmış ve numune hazırlama prosedürlerine geçene kadar - 80 °C’ de 1 mL’lik kısımlar halinde ependorf tüplerde bekletilmiştir.

3.1.3. Hasta ve Kontrol Grupları Oluşturulması

Hasta ve kontrol grupları assit nedeni kesinleştirilmiş ve yeterli kayıt verilerinin bulunduğu assit sıvısı numunesinin alındığı hastalar arasından oluşturulmuştur. Kontrol grubu olarak ‘Kriptojenik Siroz’ hastalarından oluşturulan C grubu, hasta grubu olarak ise ‘Pankreas Kanseri’ hastalarından oluşturulan T grubu seçilmiştir. Tablo 3.3.’de karışım numuneleri oluşturulmak amacıyla kullanılan örneklerin listesi sunulmuştur.

Tablo 3.3. Hasta ve kontrol grupları numune listesi.

Grup	Hastalık	Yaş	Cinsiyet
C-1	Kriptojenik Siroz	51	K
C-2	Kriptojenik Siroz	60	E
C-3	Kriptojenik Siroz	62	E
C-4	Kriptojenik Siroz	55	E
C-5	Kriptojenik Siroz	69	E
C-6	Kriptojenik Siroz	66	K
T-1	Pankreas Kanseri	69	E
T-2	Pankreas Kanseri	72	K
T-3	Pankreas Kanseri	80	E
T-4	Pankreas Kanseri	78	E
T-5	Pankreas Kanseri	65	K
T-6	Pankreas Kanseri	84	E

3.1.4. LC/MS Q-TOF Analizlerinde Uygulanan Metodoloji

Analizler, Agilent 1260 Infinity Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazı ve yine Agilent 6530 Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Q-TOF/MS) cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz firmanın ‘Agilent MassHunter’ isimli ticari yazılımı aracılığıyla kontrol edilmektedir. 1260 Infinity UPLC sistemi, otomatik pompalı ve otomatik enjektörlü bir sistemdir. Kolon fırını sıcaklığı yazılım aracılığıyla

kontrol edilebilmektedir. UPLC sistemi, kütle spektrometre cihazı ile bağlantıyı aynı zamanda iyonlaştırıcı olarak çalışan elektrosprey iyonlaştırıcı (ESI) başlığı aracılığı ile gerçekleştirir. Sistem kurutucu gaz olarak azot gazını kullanır, bu amaçla cihaza bağlı bir azot jeneratörü bulunmaktadır. LC/MS Q-TOF sistemi için gerekli vakum ortamını sağlayabilmek amacıyla, birisi kaba vakum denilen ön vakum cihazı, ikinci olarak da yüksek vakum için bir başka vakum sistemi daha kullanılmaktadır. Şekil 3.2.'de çalışmalarda kullanılan LC/MS Q-TOF cihazına ait görsel verilmiştir.

- 1) LC/MS Q-TOF analizleri için yapılan ilk işlem gerekli kimyasalları ve çözeltileri hazırlamaktır. Sıvı kromatografisi hareketli fazı olarak C18 kolon için % 0.1 formik asit içeren asetonytril ve yine % 0.1 formik asit içeren su tamponları hazırlanmıştır. Çözeltiler, 1 litre asetonytril ve 1 litre su içerisine ayrı ayrı 1'er mL formik asit eklenerek hazırlanmıştır. HILIC kolon için ise asetonytril ve pH=5 amonyum asetat tamponu kullanılmıştır. Amonyum asetat tamponu 10 mM olarak hazırlanmıştır. 77.08 mg amonyum asetat önce bir miktar suda çözülmüş daha sonra çözelti 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra fosforik asit kullanılarak çözeltinin pH'ı 5 olarak ayarlanmıştır. Q-TOF/MS cihazı için referans ve kalibrasyon çözeltileri Agilent firmasından temin edilmiştir.
- 2) LC/MS Q-TOF cihazı her açıldığında bir saat kadar hareketli faz geçişi ile yıkamaya bırakılmıştır. Bir saat sonunda cihazın vakum, kurutucu gaz ve kapiler voltajı değerleri kontrol edildikten sonra, cihazın kütle analizörünü kalibre ettiği 'autotune' işlemi denilen basamağa geçilir. Cihaz autotune işleminde firmadan temin edilen tune çözeltisine göre kendisini otomatik olarak kalibre eder. Cihaz kalibrasyon işleminin sonunda 'Tune Raporu' isimli bir dosya oluşturur ve kalibrasyon işleminin değerlerini verir. Eğer bu değerler 0.1 ppm'lik sapmanın altında ise cihazın kalibrasyonunun başarılı olduğu kabul edilir.
- 3) Kalibrasyon işleminin ardından, kullanılacak kromatografik kolona uygun kolon ve hareketli faz takılarak, kolonun şartlanması amacıyla 1 saat kadar hareketli faz geçirilmiştir. Tablo 3.4.'de cihaz parametreleri sunulmuştur.

- 4) Kalite kontrol numuneleri, her analiz başında ve sonunda üç tekrarlı ve her altı numune enjeksiyonunda bir kalite kontrol numunesi enjeksiyonu olacak şekilde yapılmıştır.
- 5) Vialler aynı anda hazırlanmış ve analiz sırasından kaynaklı varyasyonların engellenmesi amacıyla karışık sıralamada enjeksiyonu yapılmıştır.

Tablo 3.4. LC/MS Q-TOF parametreleri.

Enjeksiyon Hacmi	10 μ L
MS Tarama Aralığı	100-1700 m/z
Kurutucu Gaz Sıcaklığı	350 $^{\circ}$ C
Kurutucu Gaz Akışı	10 L/dakika
Kurutucu Gaz Basıncı	45 psi
Kapiler Voltajı	4000 V
Kolon Sıcaklığı	25 $^{\circ}$ C
Akış Hızı	0.2 mL/dakika

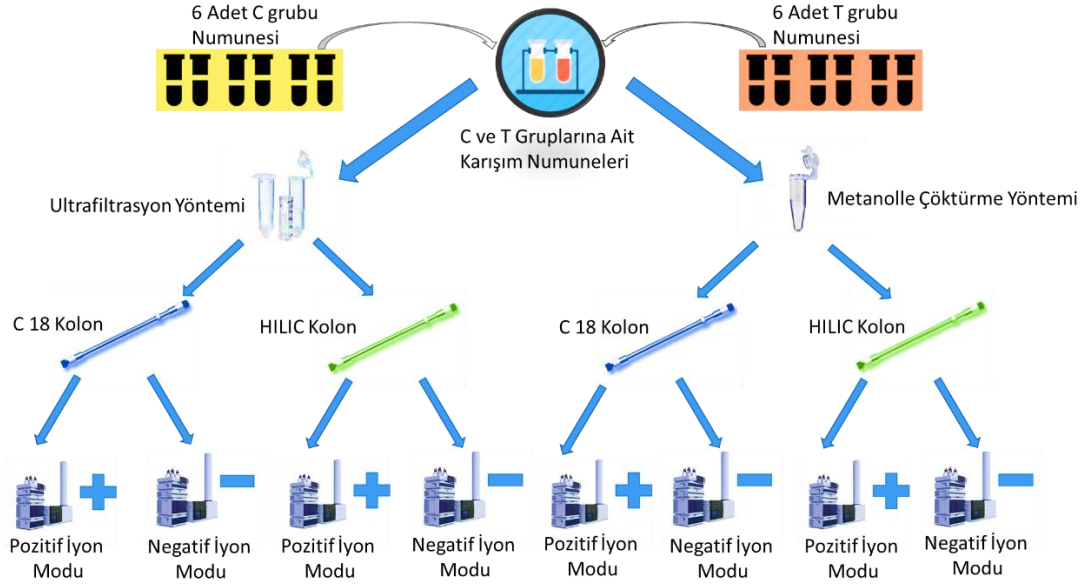


Şekil 3.2. Agilent 6530 LC/MS Q-TOF görseli.

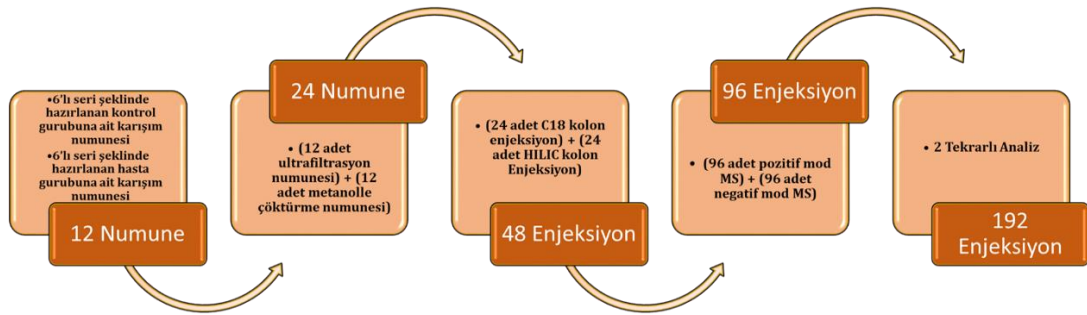
3.2. Yöntem Geliştirme Çalışmaları

Yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında, ultrafiltrasyon ve metanolle çöktürme olmak üzere iki farklı numune hazırlama tekniği, HILIC ve C18 kolonlar ile iki farklı kromatografi kolon ve pozitif ve negatif MS modları ile iki farklı MS çalışma modu denenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında hedef en yüksek pik sayısına ulaşan

yöntemi belirleyerek, metabolit profillemeye basamağında kullanılacak metodolojiyi seçmektir. Şekil 3.3.'te yöntem geliştirme çalışmalarında izlenen yolu gösterebilmek amacıyla şematezize edilen görsel sunulmuştur. Şekil 3.4. ise bu çalışmalar kapsamında yapılan LC/MS enjeksiyon sayılarını ifade etmektedir.



Şekil 3.3. Yöntem geliştirme basamağına dair çalışmaları gösteren şema.



Şekil 3.4. Yöntem geliştirme basamağında yapılan enjeksiyon sayıları.

3.2.1. Karışım Numuneleri Hazırlanması

Karışım numuneleri seçilen 6 adet C ve 6 adet T grubu numunelerinden ayrı ayrı oluşturulmuştur. Her örnekten 2 mL alınarak toplanmış ve karıştırıcı yardımı ile homojen karışım oluşturulmuştur. Karışım numuneleri 1 mL'lik porsiyonlar haline getirilerek analiz edilene kadar -20°C de saklanmıştır.

3.2.2. Metabolitlerin Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Yöntemler

Ultrafiltrasyon Yöntemi

Ultrafiltrasyon yöntemi için Merck firmasının ticari ürünü olan Amicon 3 kDa ultrasantrifüj kartuşları kullanılmıştır. Karışım numuneleri 2 grup için 6'şar tekrarlı olarak toplam 12 kartuşa, her birinde 300 µl numune olacak şekilde eklenmiştir. Kartuşlar filtrasyon işleminin tamamlanabilmesi amacıyla 16000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Kartuşun alt kısmında toplanan metabolit fraksiyonu vakum santrifüj cihazında 25 °C'de 60 dakika uçurulmuş daha sonra 300 µL asetonitrilde çözülmüştür. Şekil 3.5.'te kullanılan ultrafiltrasyon kartuşunun görseli verilmiştir.



Şekil 3.5. Ultrafiltrasyon kartuşu.

Metanolle Çöktürme Yöntemi

Metanolle çöktürme işlemi için, her 2 gruptan 6'şar olmak üzere toplam 12 adet ependorf tüpe alınan her biri 300 µL numune örneğinin, üzerine eklenen 300 µL metanol ile proteinler çöktürülmüştür. -20 °C'de 2 saat bekletilen bu çözelti sonra 16000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Çözelti kısmı yeni bir ependorf tüpe alınmış ve çökelti atılmıştır. Alınan çözelti kısmı, vakum santrifüj cihazı ile 25 °C de 60 dakika işleme tabi tutulmuş ve solvent kısmı buharlaştırılmıştır. Katı faz 300 µL asetonitril ile çözülmüştür.

3.2.3. Metabolitlerin Ayrımı İçin Kullanılan Kolon Denemeleri

C18 Kolon Denemeleri

C18 kolon denemeleri Bölüm 3.1.4.'de anlatılan LC/MS Q-TOF analizleri için uygulanan metodoloji ve Tablo 3.5.'de verilen gradient elüsyon programı kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlar iki tekrarlı olarak yapılmıştır. C18 kolon denemeleri tez metodolojisine uygun olarak ultrafiltrasyon ve metanolle çöktürme yöntemi ile hazırlanan numunelerde, pozitif ve negatif MS modlarında hepsi için ayrı ayrı çalışılmıştır.

Tablo 3.5. C18 kolon için kullanılan gradient programı.

Dakika	Asetonitril (% 0.1 Formik asit)	Su (% 0.1 Formik asit)
1	% 10	% 90
12	% 90	% 10
13	% 90	% 10
20	% 10	% 90
25	% 10	% 90

HILIC Kolon Denemeleri

HILIC kolon denemeleri Bölüm 3.1.4.'de anlatılan LC/MS Q-TOF analizleri için uygulanan metodoloji ve Tablo 3.6.'da verilen gradient elüsyon programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlar iki tekrarlı olarak yapılmıştır. HILIC kolon denemeleri tez metodolojisine uygun olarak ultrafiltrasyon ve metanolle çöktürme yöntemi ile hazırlanan numunelerde, pozitif ve negatif MS modlarında hepsi için ayrı ayrı çalışılmıştır.

Tablo 3.6. HILIC kolon için kullanılan gradient programı.

Dakika	Asetonitril	pH=5 Amonyum asetat tamponu
1	% 90	% 10
12	% 10	% 90
13	% 10	% 90
20	% 90	% 10
25	% 90	% 10

3.2.4. Pozitif ve Negatif Mod Denemeleri

Örnekler Bölüm 3.2.2. ve Bölüm 3.2.3.'te anlatılan farklı ekstraksiyon ve farklı kolon denemelerinde, pozitif ve negatif MS iyonlaşma modlarında ayrı ayrı her yöntem için analiz edilmiştir.

3.3. Metabolit Profillemeye Çalışmaları

Metabolit profillemeye çalışmalarında Bölüm 3.2.'de anlatılan metodoloji ile geliştirilen yöntem ve değerlendirilen sonuçlara göre ultrafiltrasyon numune hazırlama tekniği, HILIC kolon ve pozitif modda çalışılmıştır.

3.3.1. Karışım Numuneleri ve İç Standart Eklenmesi

Karışım numuneleri seçilen 6 adet kontrol ve 6 adet hasta grubu numunelerinden ayrı ayrı oluşturulmuştur. Her örnekten 2 mL alınarak toplanmış ve karıştırıcı yardımı ile homojen karışım oluşturulmuştur. Karışım numunelerine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde daidzein maddesi iç standart olarak eklenmiştir. Karışım numuneleri 1 mL'lik porsiyonlar haline getirilerek analiz edilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.2. Kalite Kontrol Numuneleri

Çalışmalarda, Waters firmasının (186006963) kodlu LC-MS QC referans çözeltisi kullanılmıştır. Son derişimi 0.5 ppm olacak şekilde hareketli faz ile (70:30 Asetonitril:Su) seyreltilen kalite kontrol numuneleri, her analizin başında 3 tekrarlı enjeksiyon, her 6 numunede bir enjeksiyon ve analiz sonunda 3 tekrarlı enjeksiyon olacak şekilde kullanılmış ve sonuçları takip edilmiştir. Kullanılan kalite kontrol numunesinin içeriği Tablo 3.7.'de sunulmuştur.

Tablo 3.7. Kullanılan kalite kontrol numunesinin içeriği.

Madde Adı	m/z Değeri	Miktar ($\mu\text{g/mL}$)
Asetaminofen	152.0712	10
Kafein	195.0882	1.5
Sulfaguanidin	215.0603	5
Sulfametoksin	311.0814	1
Verapamil	455.2910	0.2
Rezerpin	609.2812	0.6

3.3.3. Dilüsyon Serisi Hazırlama

Dilüsyon serisi 6'lı setler halinde hazırlanmıştır. 6 vialden 3 tanesi tekrarlanabilirliği ölçebilmek için aynı derişimde, kalan 3 tanesi ise regresyon analizi için azalan derişimlerde hazırlanmıştır. Dilüsyon serisi hazırlamada kullanılan yöntem Tablo 3.8.'de sunulmuştur.

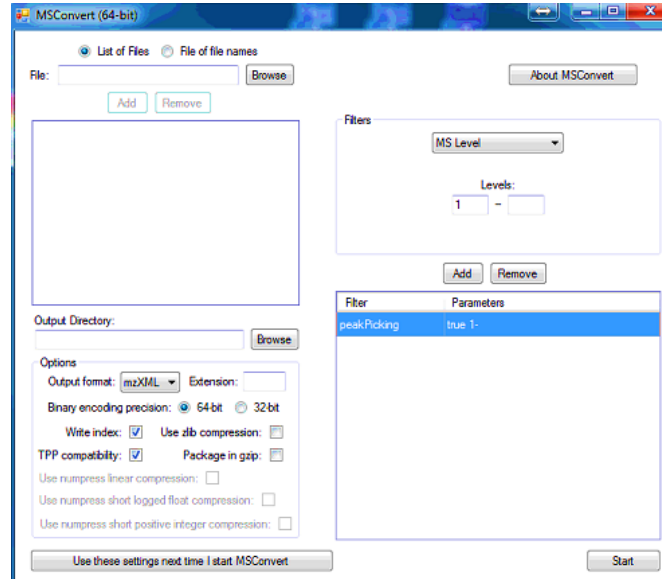
Tablo 3.8. Dilüsyon serisi hazırlama yöntemi.

Vial	Örnek Miktarı	Hareketli Faz Miktarı (70:30 Asetonitril:Su)	Örnek / Toplam miktar oranı
Vial 1	40 μL	40 μL	4/8
Vial 2	40 μL	40 μL	4/8
Vial 3	40 μL	40 μL	4/8
Vial 4	30 μL	50 μL	3/8
Vial 5	20 μL	60 μL	2/8
Vial 6	10 μL	70 μL	1/8

3.4. Veri Değerlendirme Çalışmaları

3.4.1. Ham Data Dosyalarının XCMS'e Uygun Olarak Dönüştürülmesi

LC/MS Q-TOF analizleri sonrası cihazdan alınan “.d ” uzantılı data dosyaları “ProteoWizard” yazılımı aracılığıyla ‘.mzXML’ uzantılı dosyalara dönüştürülmüştür. Şekil 3.6. yazılımda seçilen parametreleri ve yazılımın arayüzünü göstermektedir.



Şekil 3.6. ProteoWizard yazılımı.

3.4.2. XCMS Programının Kurulumu

XCMS programı ‘R’ istatistik yazılımının altında çalışan bir programdır. R programı kurulduktan sonra Ek 2.’de verilen kodlar aracılığı ile XCMS yazılımı kurulmuştur.

3.4.3. XCMS Parametrelerinin Optimizasyonu

XCMS yazılımı Bölüm 2.9.5.’de belirtildiği üzere bir dizi parametrenin kombinasyonu ile çalışmaktadır. Bu parametrelerin optimizasyonu için ‘IPO’ yardımcı yazılımı kullanılır. Bu yazılım Ek 3.’de verilen kod aracılığı ile XCMS yazılımının altına kurulmuştur.

IPO kurulumu yapıldıktan sonra optimize edilecek deney verilerine ait dosyalar seçilir ve Ek 3.'de verilen kod aracılığı ile parametreler yazılım tarafından denenerak optimum değerler bulunur.

3.4.4. XCMS Analizleri

Bölüm 3.4.3.'te anlatılan yöntemle optimize edilen XCMS parametreleri doğrultusunda oluşturulan kod kullanılarak, dosyalar her yöntem için ayrı ayrı analiz edilmiş ve ayrılmış iyon kromatogramları ve sonuçları gösteren excel tablosu elde edilmiştir. Kullanılan XCMS kodu Ek 4.'de sunulmuştur.

3.4.5. Veri Değerlendirilmesinde Kullanılan Yaklaşımlar

XCMS yazılımından sonuçlar eşleştirilmiş piklerin m/z, alıkonma zamanları, pik şiddetlerini veren bir excel dosyası halinde alınır. Şekil 3.7. bu çıktıya örnek olarak excel tablosunun bir kısmını içeren şekilde sunulmuştur. Şekilde name kolonu; her pik için program tarafından oluşturulan kimliği, fold; normalizasyon öncesi pik şiddetindeki değişimleri, t stat; t testi sonucunu, p value; t testi sonucunda bulunan p değerini, mzmed; o pikin tüm örnekleme bulunan m/z değerlerinin ortalamasını, mzmin; o pikin tüm örnekleme bulunan en küçük m/z değerini, mzmax; o pikin tüm örnekleme bulunan en büyük m/z değerini, rtmed; alıkonma zamanlarının ortalamasını, rtmin; alıkonma zamanlarının en küçük değerini, rtmax; alıkonma zamanlarının en büyük değerini, npeaks; pikin tüm örneklemin kaç tanesinde görüldüğünü, C ve T sütunları; pikin grupların içinde kaç numunede görüldüğünü, en sağdaki sütun ise pikin şiddetini ifade etmektedir.

	name	fold	tstat	pvalue	mzmed	mzmin	mzmax	rtmed	rtmin	rtmax	RT (M)	npeaks	C	T	metlin	assit_kf_hilicpos_1
1	M477T221	90,91481	284,9426	3,49E-12	477,31	477,3099	477,3101	220,92	215,811	227,097	3,78495	13	0	6	http://me	44371,6163
2	M478T221	84,18341	213,6707	2,20E-11	478,312	478,3119	478,3121	220,946	219,902	221,421	3,69035	6	0	6	http://me	9738,410066
10	M564T340	122,0821	89,34493	8,31E-10	564,359	564,3589	564,359	339,602	335,048	342,994	5,716567	6	0	6	http://me	7777,122926
11	M205T58	3,191793	-60,7816	8,42E-10	205,0708	205,0706	205,0709	57,804	57,095	58,149	0,96915	6	6	0	http://me	118579,1098

Şekil 3.7. Örnek XCMS excel çıktısı.

- Alınan ham verilerde ilk işlem, hazırlanan dilüsyon serisi numunelerinde regresyon analizi işlemidir. Excel kullanılarak regresyon analizi uygulanır ve $r < 0.90$ değerinde olan pikler değerlendirme dışı bırakılır.

- Analizler sırasında, kaynağı tespit edilemeyen sebeplerden dolayı bazı pikler bazı numunelerde görülemeyebilir. XCMS eşleştirilen pikin analiz setinin kaç tanesinde görüldüğünü belirten bir sonuç kolonu verir. Veri işleminde ikinci basamak numune setlerinde % 50'sinden fazla kayıp pik olan değerleri sonuçlardan çıkartılmıştır.
- Örnekler iki tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Üçüncü basamakta tekrarlı analizlerde pik şiddetlerinin ortalaması alınmıştır.
- Dördüncü işlem basamağında pikler normalizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Normalizasyon işlemi, pikin enjeksiyondaki tüm piklerin ortalamasına bölünmesi şeklinde olmuştur.
- Bu aşamadan Şekil 3.8.'dekine benzer normalize edilmiş pikler tablosu elde edilmiştir. Bu değerler C ve T grupları seçilerek birbiri ile 't istatistik testi' ile karşılaştırılmış ve $p < 0.05$ güven aralığında miktarı iki kattan fazla değişen pikler tespit edilmiştir.

C1 A	C2A	C3A	C4A	C5A	C6A	T1A	T2A	T3A	T4A	T5A	T6A
0,091654	0,077844	0,072492	0,078838	0,083159	0,099445	5,870553	4,750274	4,965404	4,940366	4,720197	4,788967
0,020116	0,014753	0,016334	0,017543	0,019086	0,020361	1,156012	0,941965	0,990132	0,990507	0,937906	0,956761
0,016064	0,017784	0,033374	0,081002	0,065205	0,096647	4,746151	4,003698	4,256676	4,342845	3,927942	3,991346
0,244938	0,200169	0,200054	0,21613	0,200484	0,212223	0,051387	0,039565	0,043378	0,043355	0,042763	0,04101
0,297289	0,25537	0,250593	0,257857	0,222184	0,233366	0,03656	0,032706	0,027187	0,029449	0,022593	0,023455

Şekil 3.8. Örnek normalize pik şiddetleri tablosu.

3.6. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluğu testi kapsamında enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, ayırıcılık ve teorik tabaka sayıları incelenmiştir. Bu değerler içeriği Tablo 3.7.'de verilen kalite kontrol numunelerinin 6 tekrarlı enjeksiyon sonuçlarının ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

3.7. Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin validasyonu amacıyla özgünlük, kesinlik, doğruluk ve doğrusallık çalışmaları yapılmıştır (107).

3.7.1. Özgünlük

Özgünlük çalışmaları kapsamında hareketli faz enjeksiyonu ile numune enjeksiyonları karşılaştırılmıştır. Hareketli faz enjeksiyonu sonuçları XCMS ile analiz edilmiş, bulunan piklerin numune sonuçlarında olup olmadığı karşılaştırılmıştır.

3.7.2. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında, iç standart olarak kullanılan daidzein metabolitinin, profillemeye basamağındaki 24 enjeksiyonda bulunan molekül ağırlığı değerleri, daidzein molekülünün teorik molekül ağırlığı değerleri ile karşılaştırılmış, yüzde bağıl hata hesabı yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

3.7.3. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları için, profillemeye basamağında analiz edilen tüm örnekleme, istatistiksel olarak anlamlı ve miktarı iki kattan fazla değişen piklerin, bulunan m/z değerleri ve alıkonma zamanları arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır. Minimum m/z ve alıkonma zamanları, maksimum m/z ve alıkonma zamanları arasında standart sapma değerlerine bakılmış ve grafiğe geçirilmiştir.

3.7.4. Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları için, profillemeye basamağında analiz edilen tüm örnekleme istatistiksel olarak anlamlı ve miktarı iki kattan fazla değişen 141 adet pikin tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değerleri hesaplanmış ve bu değerler baz alınarak hesaplanan teorik pik yoğunluklarına karşı gözlenen pik yoğunlukları grafiği oluşturulmuştur.

3.8. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları

Hedeflenmiş metabolomik çalışmalarında, metabolit profillemeye çalışmaları sonucunda bulunan istatistiksel olarak anlamlı ve miktarı en az iki kat değişen 141 pikin karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır.

Maddeler önce MS/MS yöntemiyle 10V, 20V ve 40V'luk üç farklı çarpışma enerjisi ile fragmentlerine ayrılmış, daha sonra bu sonuçlar MS/MS veri bankalarında taranarak metabolitler karakterize edilmeye çalışılmıştır.

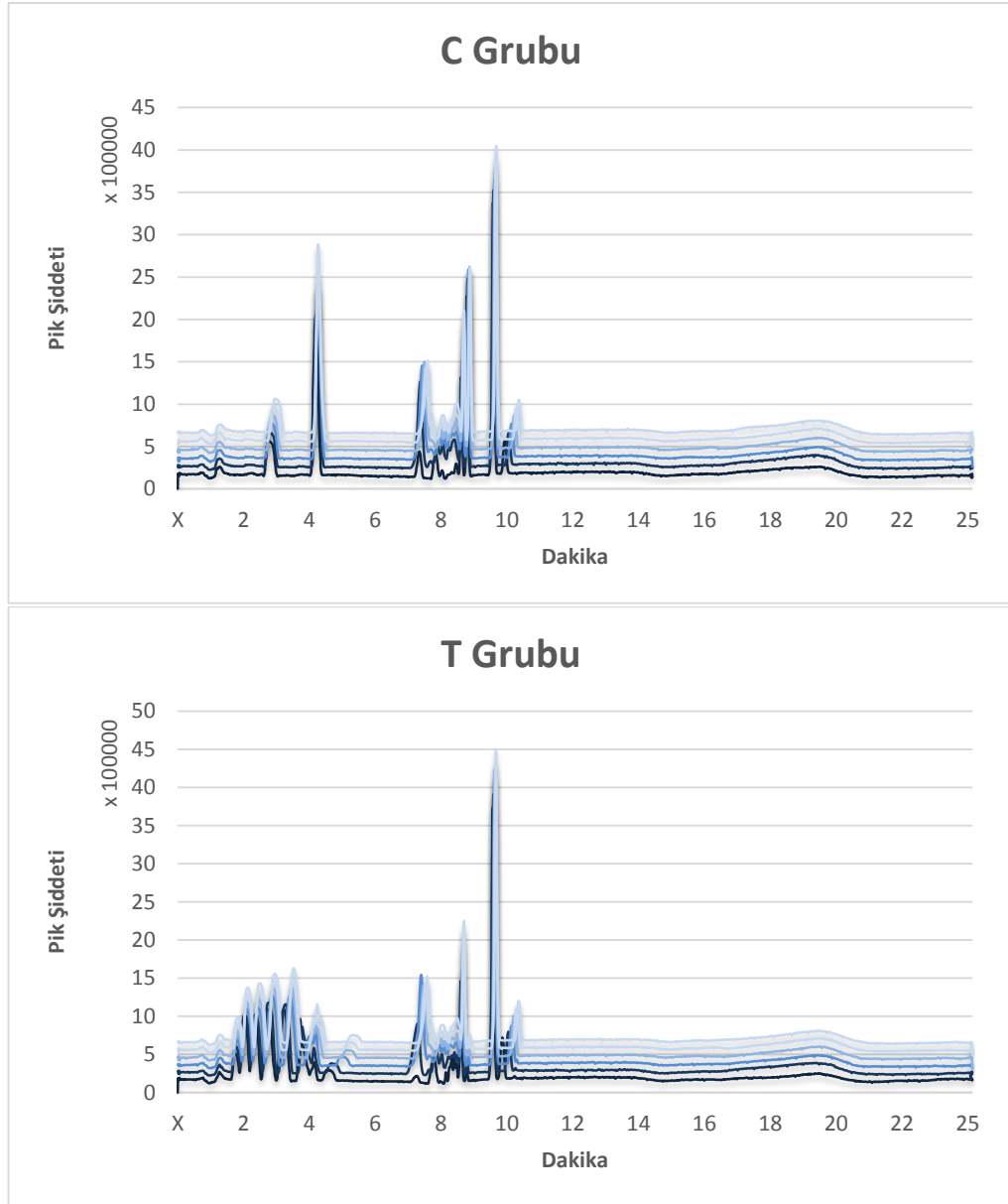
4. BULGULAR

4.1. Yöntem Geliştirme Basamağına Ait Bulgulara Genel Bakış

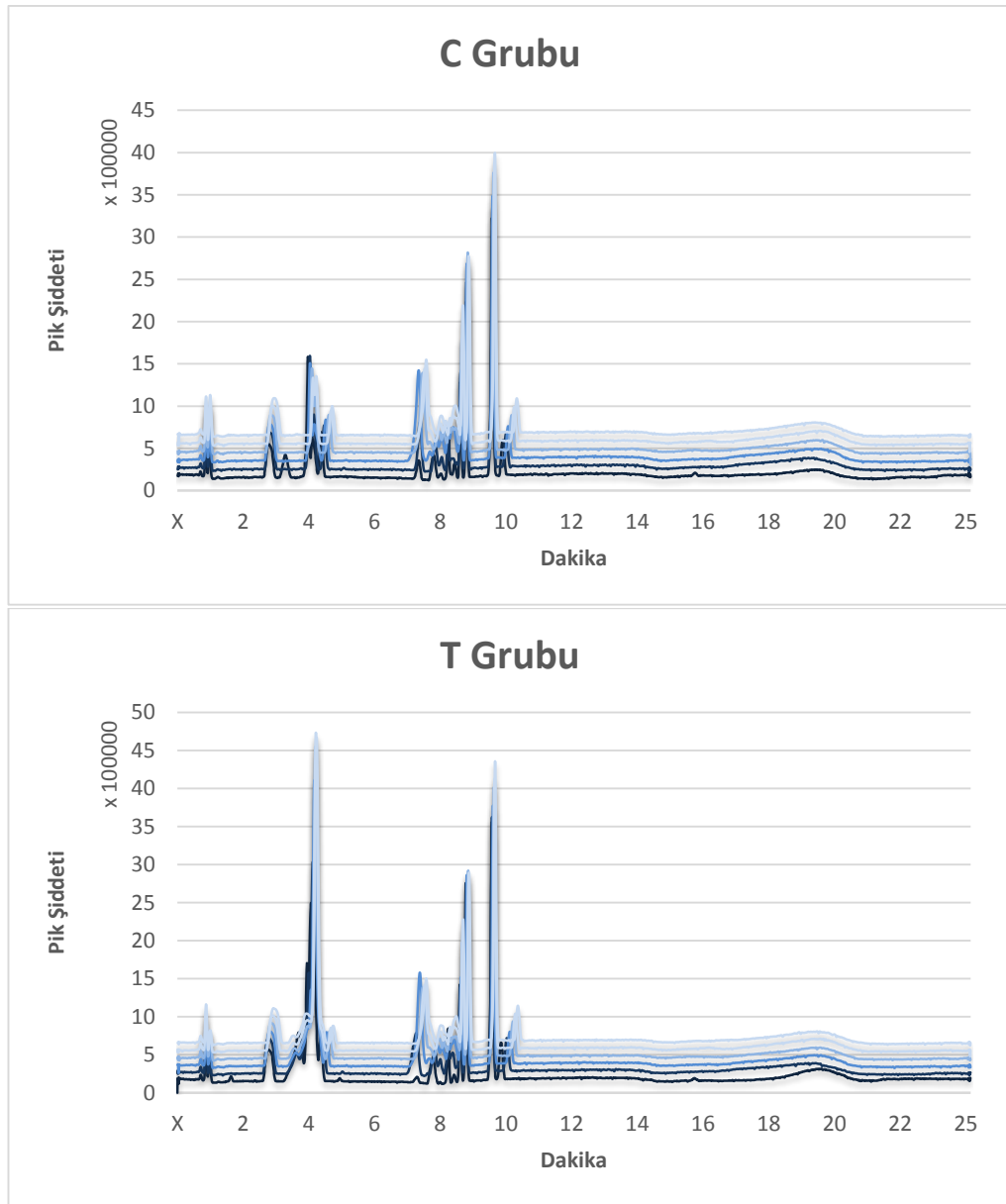
Yöntem geliştirme basamağında ayrıntıları Bölüm 3.1.4.'de verilen LC/MS Q-TOF analizlerine dair metodoloji kullanılarak, iki farklı numune hazırlama yöntemi (metanolla çöktürme ve ultrafiltrasyon), iki farklı kromatografi kolunu (HILIC ve C18), iki farklı MS çalışma modu (pozitif ve negatif mod) olmak üzere toplam 8 farklı metod denenmiştir.

Yöntemler arasında karşılaştırma yapabilmek ve en iyi sonucu veren metodu belirleyebilmek için diğer değişkenler sabit tutulup sadece yönteme ait değişkenin takip edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla sıvı kromatografisinde ve kütle spektrometresinde kütle tarama aralıkları, kolon sıcaklığı, kurutucu gaz basıncı, kapiler voltajı değerleri tüm yöntemlerde aynı değerlerde kullanılmış, sadece kromatografi kolonları arasında, kolon yapısına uygun olarak formik asit ve amonyum asetat tamponları değiştirilmiştir. HILIC kolon ve C18 kolon için kullanılan gradient programları da birbirinin simetriği olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 3.5. ve Tablo 3.6.).

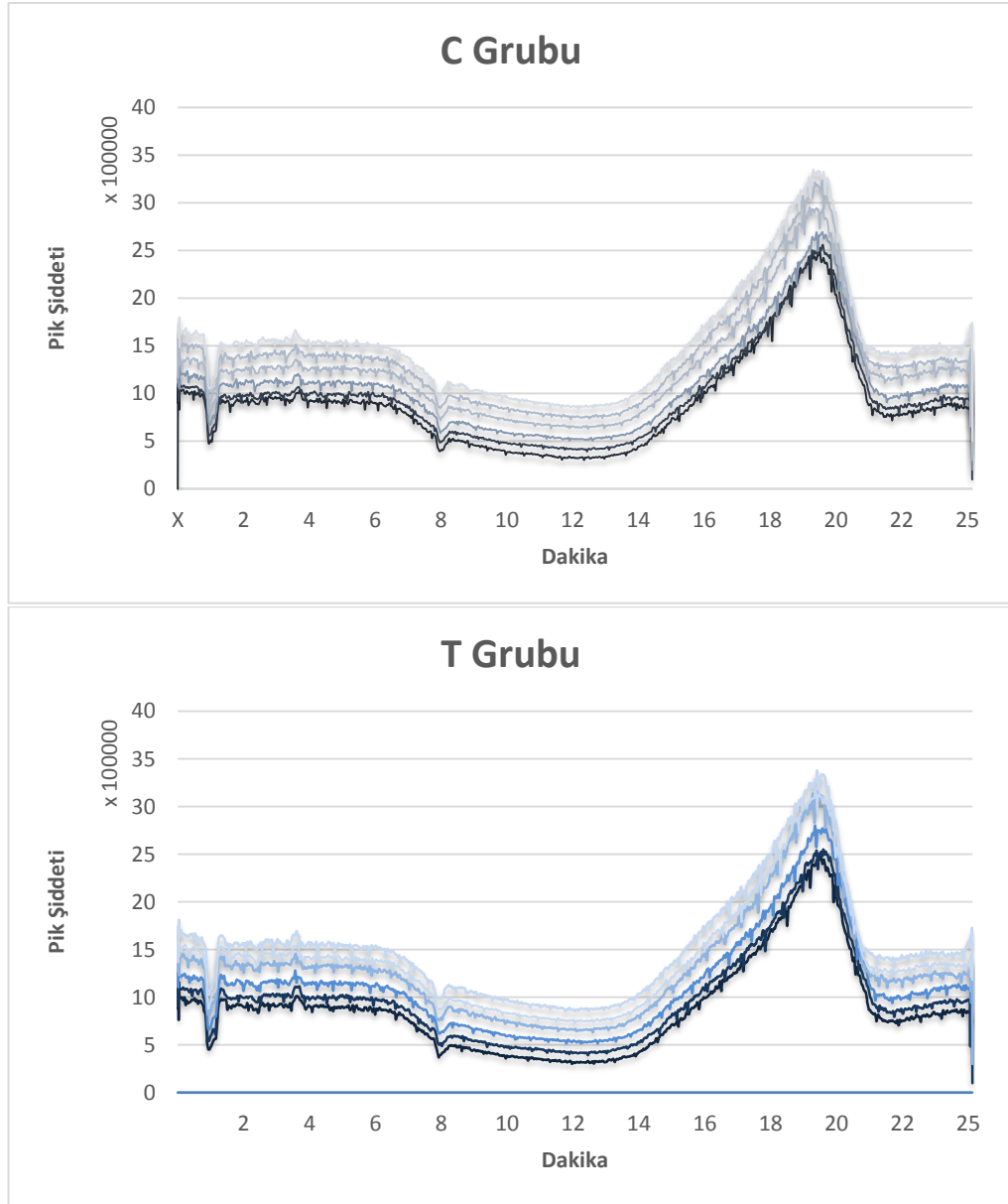
Yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında denenilen toplam 8 farklı yönteme dair temel pik kromatogramları Şekil 4.1. – 4.8.'de sunulmuştur.



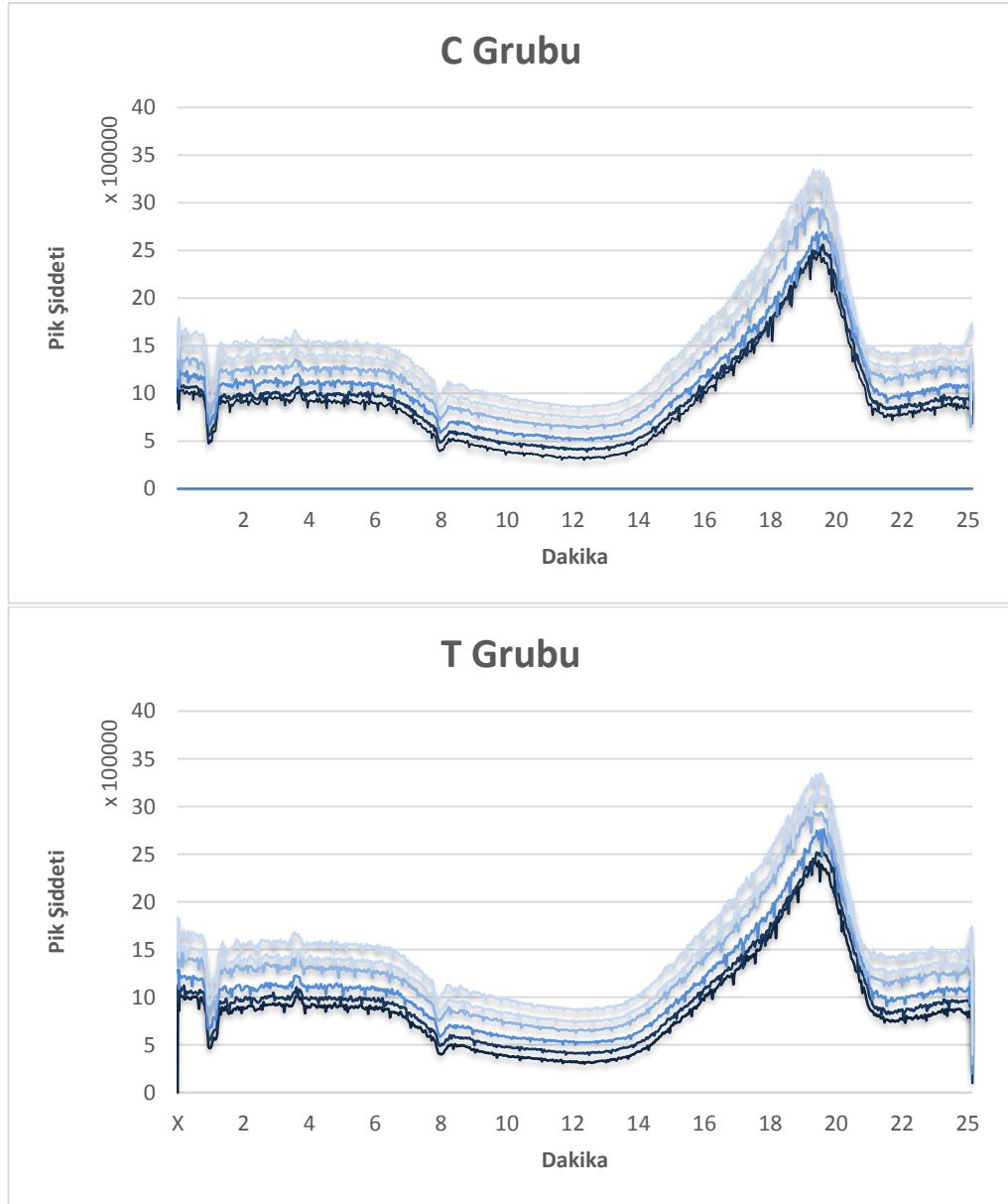
Şekil 4.1. C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, HILIC kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



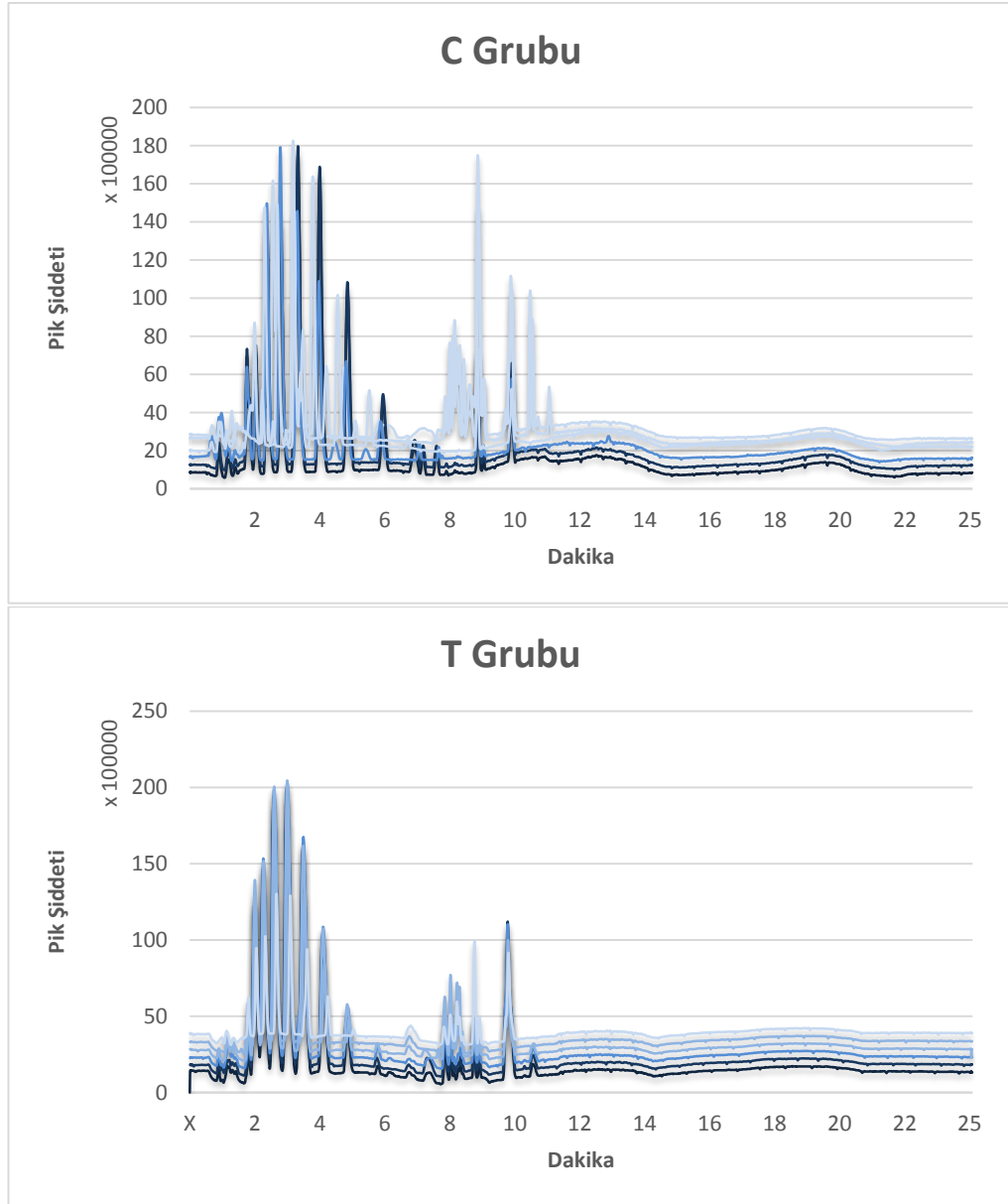
Şekil 4.2. C ve T grubunun, metanolla çöktürme, HILIC kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



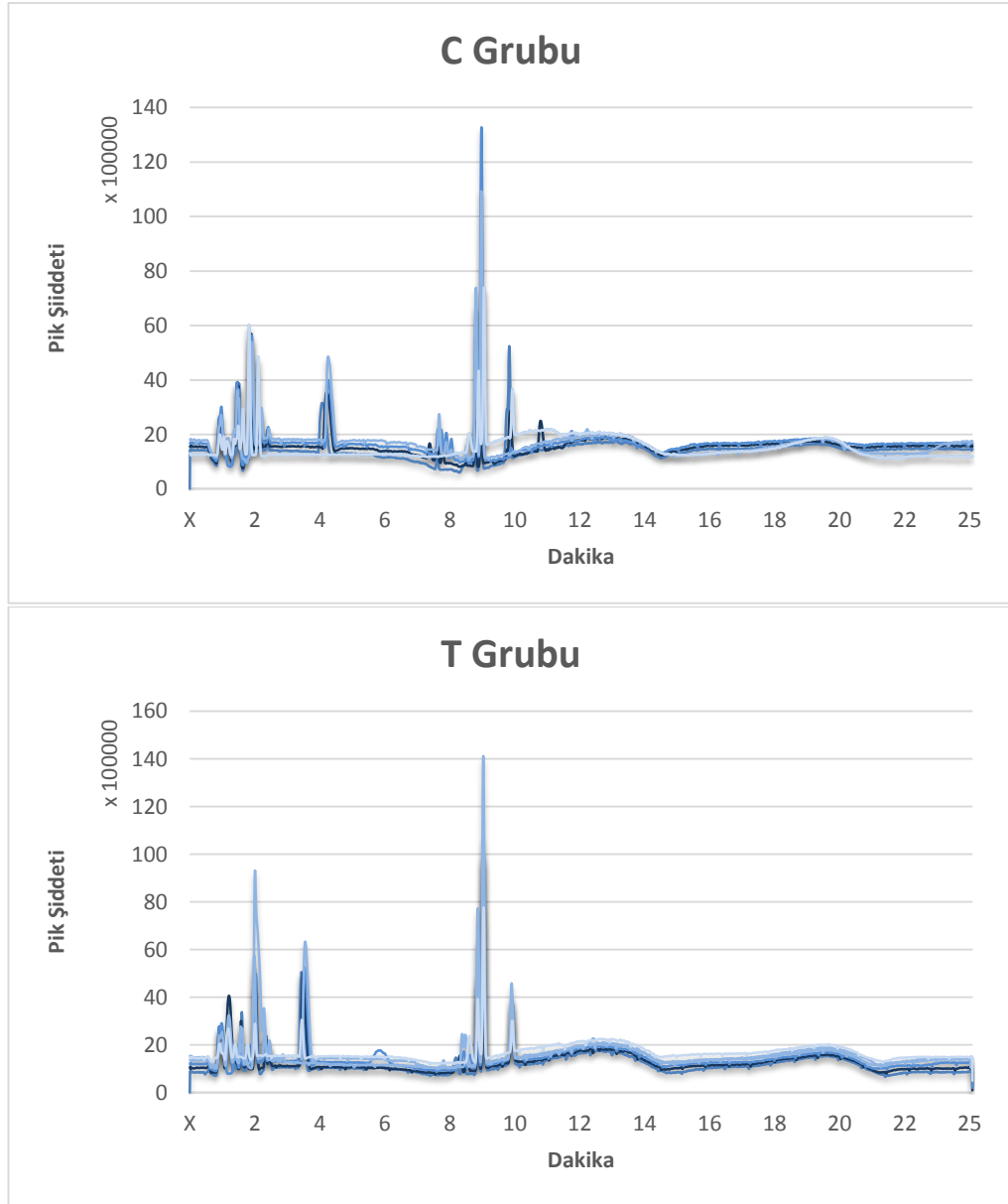
Şekil 4.3. C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, HILIC kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



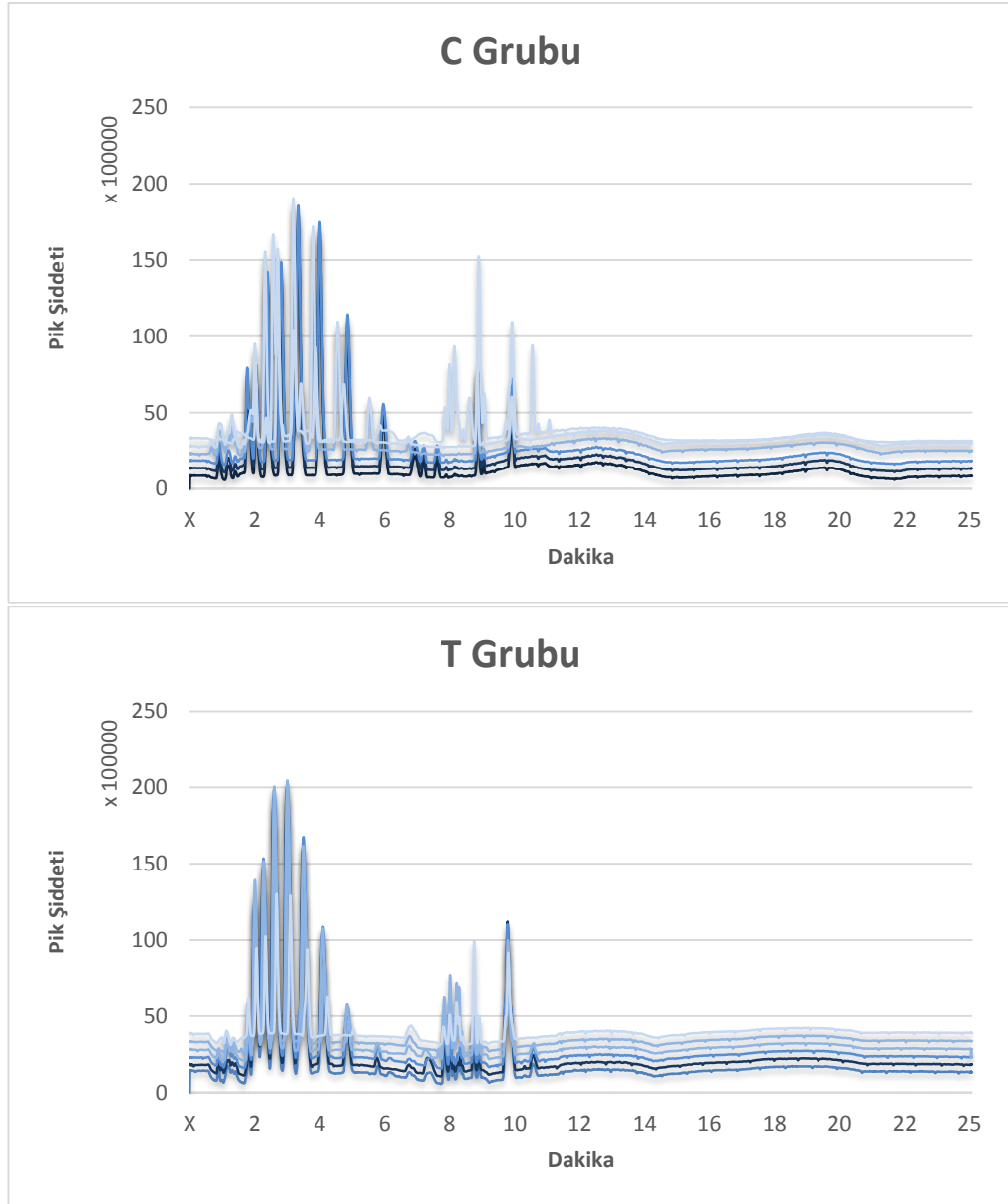
Şekil 4.4. C ve T grubunun, metanolla çöktürme, HILIC kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



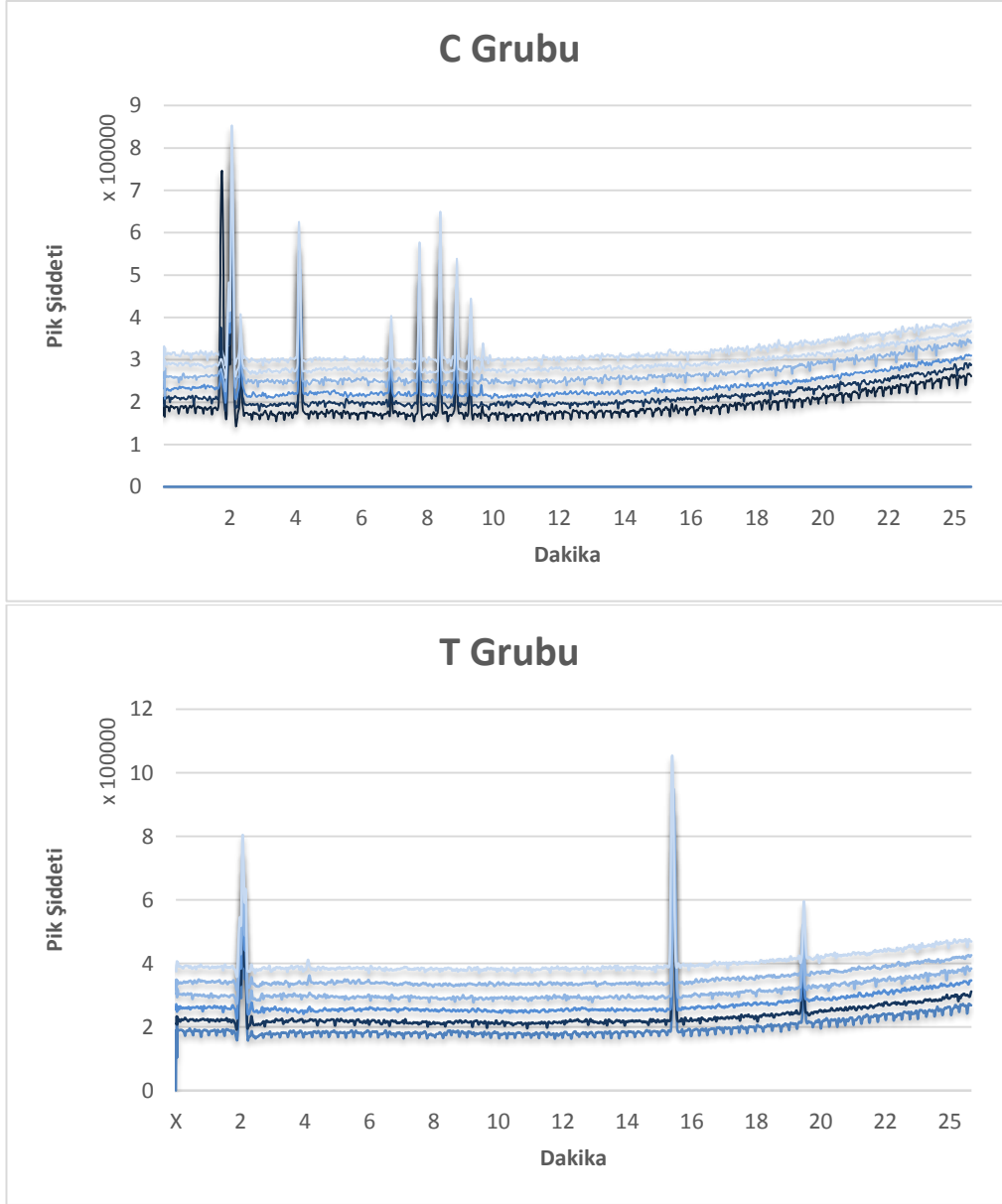
Şekil 4.5. C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, C18 kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



Şekil 4.6. C ve T grubunun, metanolla çöktürme, C18 kolon, pozitif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



Şekil 4.7. C ve T grubunun, ultrafiltrasyon, C18 kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.



Şekil 4.8. C ve T grubunun, metanolla çöktürme, C18 kolon, negatif mod yöntemi ile yapılan enjeksiyonların temel pik kromatogramları.

Tablo 4.1. yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda her yöntem için bulunan pik sayılarını göstermektedir. Bu rakamlar altı kontrol ve altı hasta grubu numunelerinde birbiri ile eşleştirilen pik sayılarını ifade etmektedir.

Tablo 4.1. Yöntem geliştirme çalışmalarına ait toplu sonuçlar.

Kolon	HILIC				C18			
MS Modu	POZİTİF		NEGATİF		POZİTİF		NEGATİF	
Numune hazırlama yöntemi	MeOH	Ultra filtrasyon	MeOH	Ultrafilt rasyon	MeOH	Ultrafilt rasyon	MeOH	Ultrafilt rasyon
Toplam Pik (XCMS ile bulunan)	487	519	387	188	168	246	81	83

4.1.1. Numune Hazırlama Basmağına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.2.'de ayrıntıları ve metodolojisi verildiği üzere, metabolit ekstraksiyonlarını elde etmede iki farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Toplam 8 farklı analitik yöntem denemesinden 4 tanesi ultrafiltrasyon yöntemiyle, 4 tanesi metanolle çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. Tablo 4.1.'deki sonuçlara göre ultrafiltrasyon yöntemi ile hazırlanan 4 numune, metanolle çöktürme yöntemi ile hazırlanan diğer 4 numuneden her yöntemde daha fazla pik sayısı vermiştir.

4.1.2. Farklı Kolon Denemelerine Ait Bulgular

Farklı kolon denemelerinde Bölüm 3.2.3.'de verilen metodoloji doğrultusunda, HILIC ve C18 kolonlar karşılaştırılmıştır. Toplam 8 farklı analitik yöntem denemelerinden 4 tanesi C18 kolonla, 4 tanesi HILIC kolonla gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.1.'deki sonuçlara göre HILIC kolon, C18 kolona göre tüm yöntemlerde daha fazla pik sayısına ulaşılmıştır.

4.1.3. Pozitif ve Negatif MS Modlarına Ait Bulgular

Farklı MS mod denemeleri Bölüm 3.2.4.'te verilen metodoloji doğrultusunda, pozitif ve negatif MS modlarında analizler yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Toplam 8 farklı analitik yöntem denemesinden 4 tanesi pozitif iyonlaşma modunda, 4 tanesi negatif iyonlaşma modunda gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.1.'deki sonuçlara göre

pozitif MS modu kullanılarak yapılan 4 enjeksiyonda, negatif MS modu kullanılarak yapılan diğer 4 enjeksiyona göre tüm yöntemlerde daha fazla pik sayısına ulaşılmıştır.

4.2. Metabolit Profillemeye Basamağına Ait Bulgular

Metabolit profillemeye basamağında yapılan işlemler, deneysel çalışmalar ve veri değerlendirme çalışmaları olmak üzere iki ana başlığa ayrılır. Deneysel çalışmalar yöntem geliştirme basamağında belirlenen ve en çok pik sayısına ulaşılan ultrafiltrasyon tekniği, HILIC kolon ve pozitif MS modları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel kısımda yöntem geliştirme basamağında kullanılmayan kalite kontrol numuneleri ve iç standart maddesi yöntemin performansını takip etmede kullanılmıştır.

Veri değerlendirme çalışmaları ise, XCMS optimizasyonu, profillemeye işlemi için kullanılan normalizasyon istatistik dönüşümler ve bu işlemlerin sonunda istatistik olarak güvenilir ve miktarı iki grup arasında anlamlı olarak değişen piklerin belirlenmesi basamaklarını içermektedir.

4.2.1. XCMS Optimizasyonuna Ait Bulgular

XCMS parametreleri Bölüm 3.4.3.'te anlatılan yöntem kullanılarak optimize edilmiştir. Optimize değerlere göre minimum pik genişliği değeri 5 saniyeden 11.5 saniyeye maksimum pik genişliği 12 saniyeden 34 saniyeye çıkmıştır. Pikler 34.25 ppm sapmalılık değerlerle birbiri ile eşleştirilmiştir. Prefilter parametresi iki değerden oluşur, ilk değer bir maddenin pik sayılabilmesi için minimum kaç MS taramasında görülmesi gerektiğini belirtir. İkinci değer ise bir pikin zemin gürültüsünden ayrılması için en az ne kadarlık bir pik şiddetine sahip olması gerektiğini söyler. XCMS'in varsayılan değerlerinde minimum tarama değeri 2 iken optimize değerlerde bu 3'e çıkmıştır. En az pik şiddeti değeri ise 20000'den 100'e düşürülmüştür. Mzdiff değeri, iki maddenin aynı alıkonma zamanında gelmesi durumunda (overlap), maddeleri birbirinden farklılaştırabilmek için gereken en düşük m/z değeri farkını ifade eder. Mzwid değeri m/z değerlerinde kabul edilecek en geniş aralığı ifade eder. Bu değer 0.025'den 0.0186'ya düşmüştür. Bw değeri pikin ulaşabileceği maksimum genişliği ifade eder ve bu değer 12.4 saniye olarak belirlenmiştir. Minfrag değeri ise, bir pikin tüm setle eşleştirilebilmesi için, örneklemin ne kadarında bulunması gerektiğini söyler.

0.748 değeri, bir m/z değerinin tüm örneklemin en az %74,8'inde görülmesi durumunda sonuçlara kabul edileceğini söylemektedir. Tablo 4.2. XCMS optimizasyonu sonrası varsayılan değer ile optimize değerler arasındaki değişimleri göstermektedir.

Tablo 4.2. Optimize XCMS değerleri tablosu.

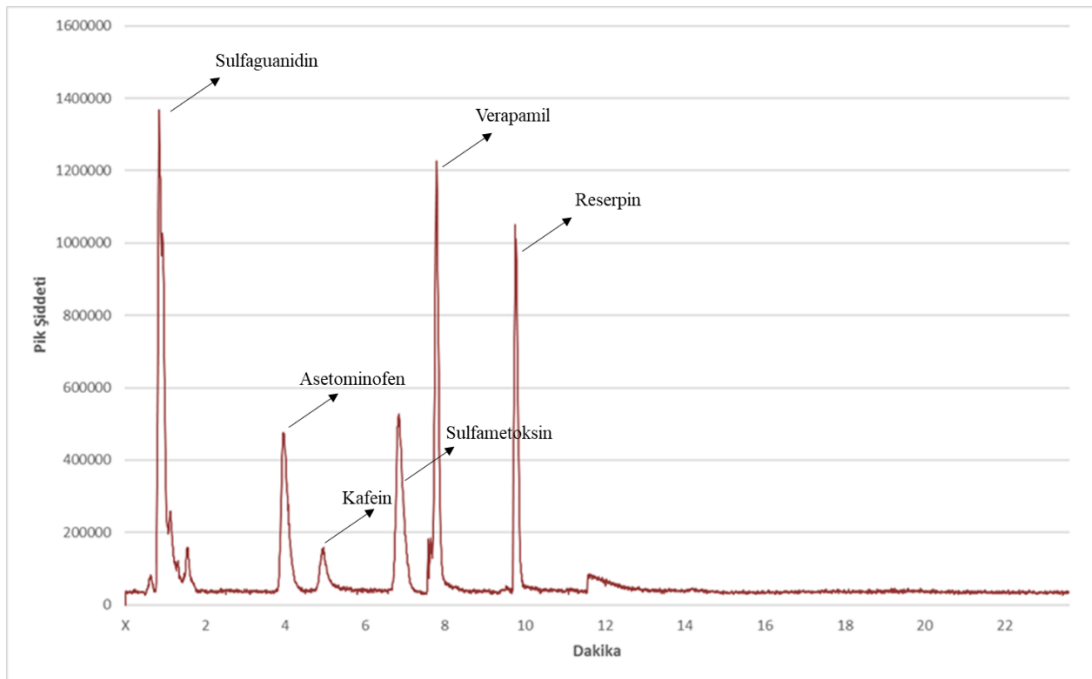
Parametre	Varsayılan Değer	Optimize Değer
peakwidth	(5,12)	(11.5, 34)
ppm	(10)	(34.25)
prefilter	(2, 20000)	(3, 100)
mzdiff	-	(0.0045)
bw	(5)	(12.4)
mzwid	(0.025)	(0.0186)
minfrag	(0.5)	(0.748)

4.2.2. Regresyon Analizine Ait Bulgular

Regresyon analizleri Bölüm 3.3.3.'de anlatılan metodoloji doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon numune hazırlama yöntemi, HILIC kolon ve pozitif MS modu için varsayılan değerlerle yapılan XCMS sonuçları 519 pik iken, Bölüm 4.2.1.'de sonuçları verilen optimizasyon sonucu yeni değerlerle yapılan XCMS analizinde pik sayısı 1071'e çıkmıştır. Bu sayı herhangi bir istatistiksel dönüşüme uğramadan örneklerde birbiri ile eşleştirilen toplam pik sayısını göstermektedir. Bu bölümde regresyon analizi ile $r > 0.90$ regresyon değeri olan pikler dışında kalan pikler filtrelenmiş; böylece zemin gürültüsünden ayrılarak, numuneden gelen pikler belirlenmeye çalışılmıştır. Regresyon analizi öncesi 1071 olan pik sayısı, regresyon analizi sonrası 340 pike düşmüştür. Bu 340 pik metabolit profillemeye basamağında kullanılan, olası metabolitlere ait olduğu düşünülen numuneden gelen pik sayısını ifade etmektedir.

4.2.3. Kalite Kontrol Numunelerine Ait Bulgular

Kalite kontrol numuneleri Bölüm 3.3.2.'de anlatılan metodoloji doğrultusunda periyodik olarak enjekte edilmiş ve sonuçları günlük olarak takip edilmiştir. Sonuçlar için kabul edilen sınır değerler alıkonma zamanı ve pik şiddetleri için en fazla % 5 sapma olacak şekilde belirlenmiştir. Sonuçlarda sınır değerden fazla sapma gösteren enjeksiyon bloğu sonuçlardan çıkarılmış ve tekrar enjeksiyon yapılmıştır. Şekil 4.9. içeriği Tablo 3.7.'de verilen kalite kontrol numunelerinden alınan temel pik kromatogramına örnek olarak sunulmuştur. Bu kromatogram cihaz koşulları Tablo 3.4.'de verilen ultrafiltrasyon tekniği, HILIC kolon ve pozitif mod yönteminde enjeksiyonu yapılan numuneye aittir.

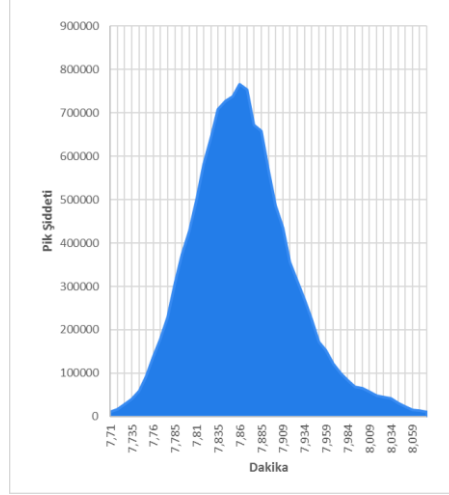


Şekil 4.9. Kalite kontrol numunesine ait temel pik kromatogramı.

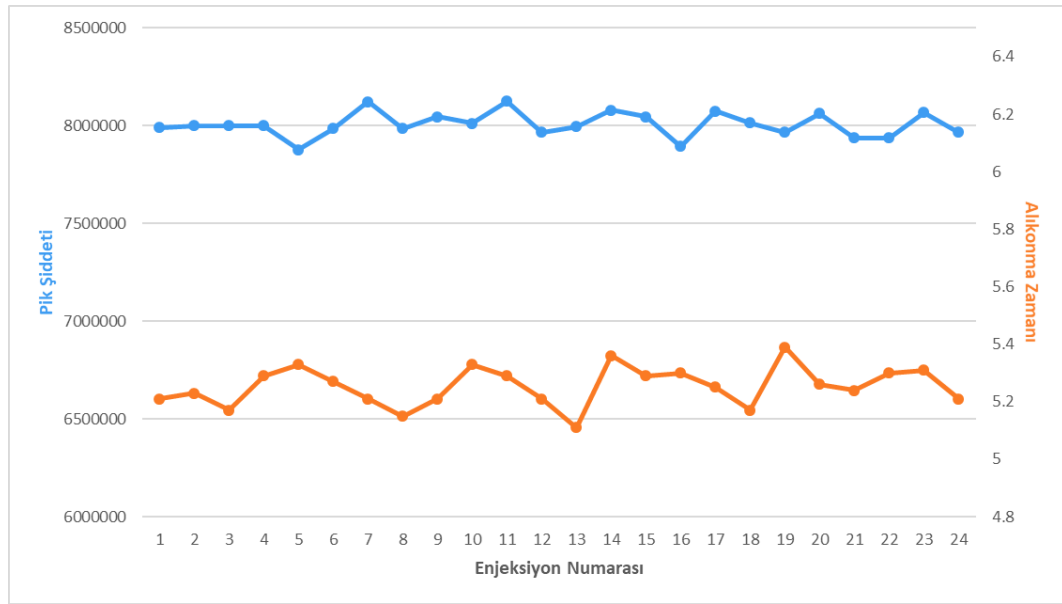
4.2.4. İç Standart Sonuçlarına Ait Bulgular

İç standart olarak kullanılan daidzein maddesi, yöntem geliştirme basamağında belirlenen, ultrafiltrasyon tekniği, metabolit profillemeye çalışmaları HILIC kolon ve pozitif MS modlarında yapılan 24 enjeksiyonda kullanılmıştır. İç standart maddesine ait ayrılmış iyon kromatogramı Şekil 4.10.'da sunulmuştur. Şekil 4.11. ise yapılan 24 enjeksiyonda iç standarta ait pik şiddetlerini ve alıkonma zamanlarını göstermektedir.

Enjeksiyonlar arasında pik şiddetlerinin bağıl standart sapması 0.02178 bulunmuştur. Alıkonma zamanlarının standart sapması ise 0.1225 olarak bulunmuştur. Grafikte mavi sütun pik şiddetlerini, turuncu sütun ise alıkonma zamanlarını belirtmektedir.



Şekil 4.10. Daidzein maddesinin ayrılmış iyon kromatogramı.

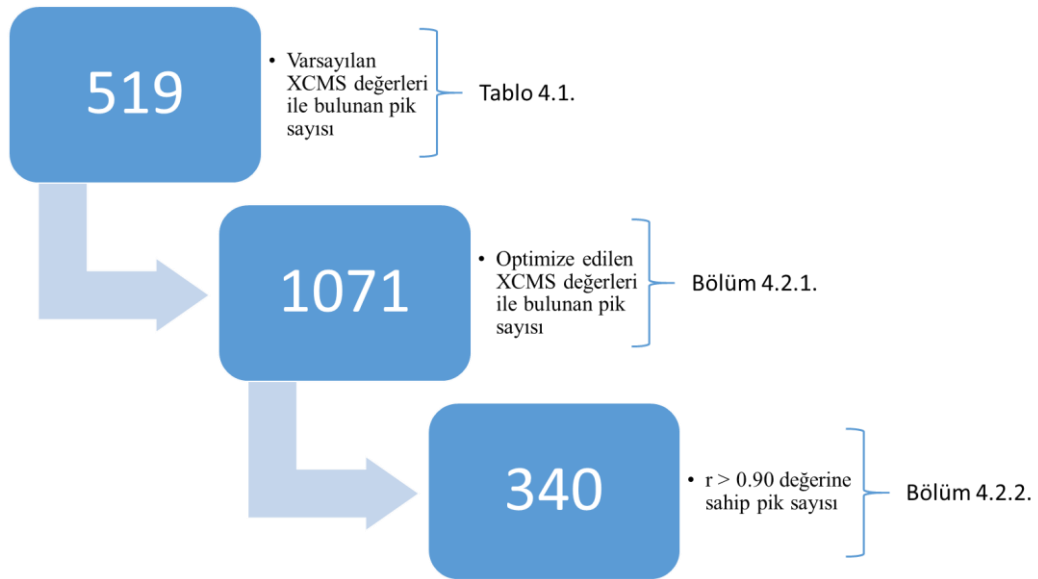


Şekil 4.11. Daidzein maddesinin enjeksiyonlar arasındaki pik şiddetleri ve alıkonma zamanları.

4.2.5. Metabolit Profillemeye Veri Değerlendirme Sonuçlarına Ait

Bulgular

Metabolit profillemeye çalışmaları ultrafiltrasyon yöntemi, HILIC kolon ve pozitif MS modunda gerçekleştirilmiştir. LC/MS Q-TOF analizleri Bölüm 3.1.4.'te verilen metodolojiye göre gerçekleştirilmiştir. Numuneler 2 gruptan 6'lı seriler halinde 2 tekrarlı olarak enjeksiyon edilmiştir. Ham datalar optimize edilen XCMS parametreleri ile değerlendirilmiştir. Bölüm 4.2.'de ayrıntıları verilen regresyon analizi işlemi sonrası; 340 adet zemin gürültüsünden ayrılmış, numuneden geldiği kabul edilen piklere ulaşılmıştır. Bu 340 pik metabolit profillemeye çalışmalarının geri kalanında kullanılan piklerdir. Bu pikler metabolit profillemeye basamağında önce normalizasyon işlemine tabi tutulmuş, daha sonra iki grup arasında miktarı en az iki kat değişen pikler belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 4.13. metabolit profillemeye çalışmaları aşamasına gelene kadar elde edilen pik sayılarındaki değişimi göstermektedir.



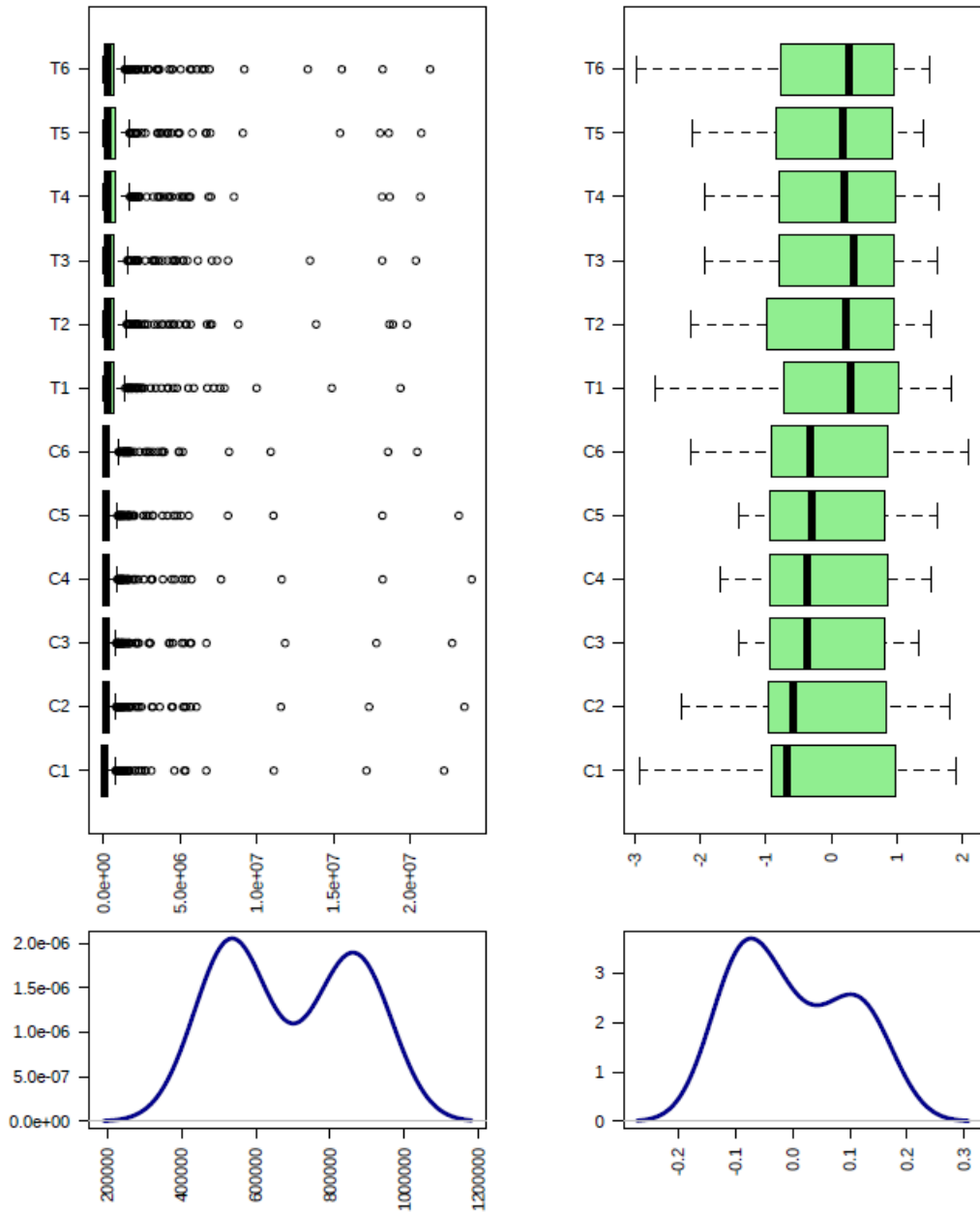
Şekil 4.12. Pik sayılarının değişimini gösteren grafik.

Tablo 4.3. profillemeye işleminde kullanılan 6 adet C ve 6 adet T grubuna ait metabolit profillemeye çalışmalarında kullanılan pik listelerini göstermektedir. Kayıp pik ifadesi, örneklemin genelinde görülen ama o örnekte tespit edilemeyen pikleri ifade etmektedir. Toplam 340 eşleşmiş pik metabolit profillemeye işleminde kullanılmıştır.

Tablo 4.3. Profillemeye basamağında kullanılan numuneler ve pik sayıları.

Numune adı	Eşleşmiş Pik Sayısı	Kayıp Pik Sayısı
C1	336	4
C2	338	2
C3	339	1
C4	338	2
C5	339	1
C6	339	1
T1	340	0
T2	339	1
T3	339	1
T4	339	1
T5	339	1
T6	338	2

Pikler, Bölüm 3.4.5.'de anlatıldığı üzere vial ortalamasına göre normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi, elde edilen pik şiddetlerinde uygulanan ilk istatistiksel dönüşümdür. Şekil 4.13. gerçekleştirilen normalizasyon sonuçlarını göstermek üzere sunulmuştur. İlgili şekilde sol sütun normalizasyon işlemine tabi olmadan önceki pik yoğunluklarını, sağ sütun ise normalizasyon işlemi sonucundaki pik yoğunluklarını göstermektedir. Sol sütunda normalizasyon işlemi olmadan alınan sonuçlar, birbiri ile karşılaştırılmayacak şekilde 10^4 değerinde farklılıklara ulaşabilen pik şiddetleri göstermektedir. Normalizasyon işlemi ile her numune, kendi enjeksiyonundaki $r > 0.90$ değerine sahip 340 pikin ortalamasına göre normalize edilmiş ve sağ sütunda bulunan birbiri ile karşılaştırılabilir normalize değerlere ulaşılmıştır.

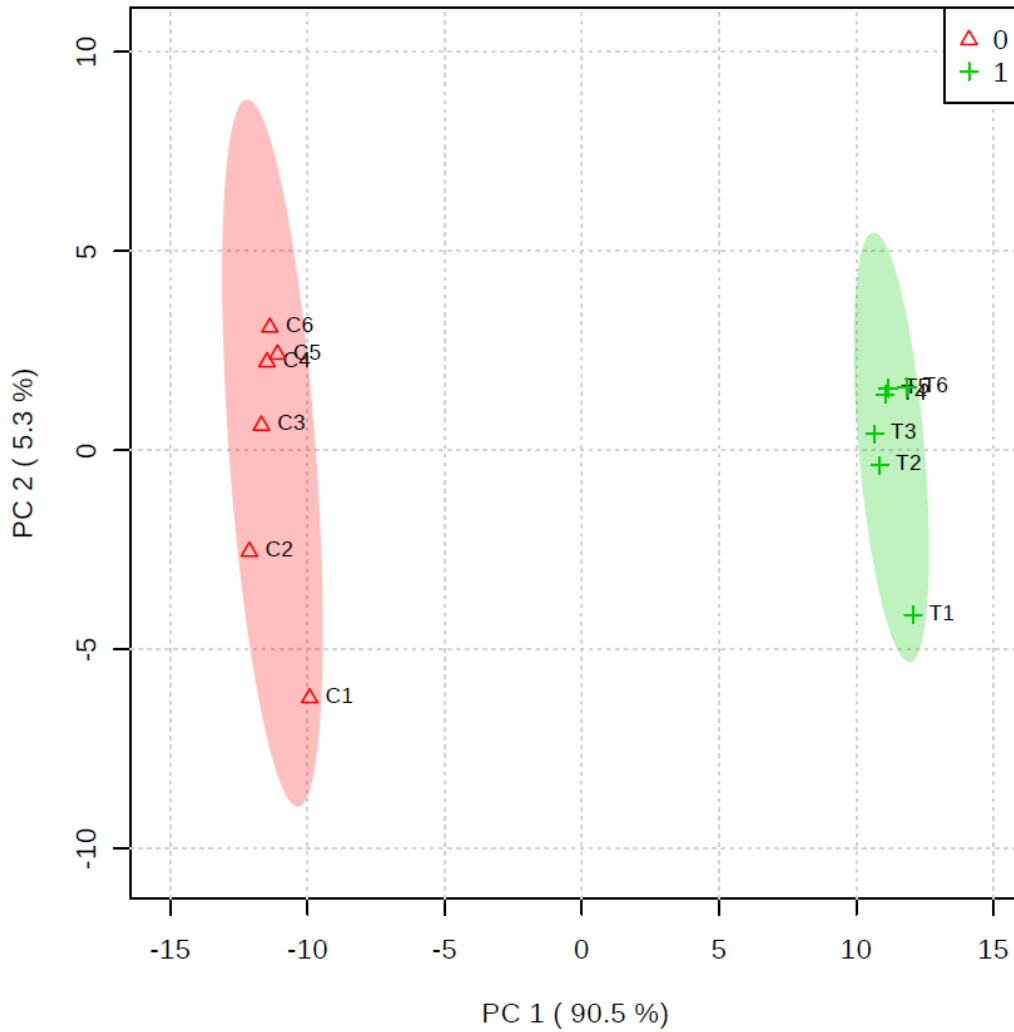


Şekil 4.13. Normalizasyon sonuçlarını gösteren görsel. Sol sütun normalizasyon işlemi olmadan pik yoğunluklarını, sağ sütun ise normalize işleminden sonraki pik yoğunluklarını göstermektedir.

Metabolit profillemeye çalışmalarında yapılan ikinci işlem normalize edilen pikleri ‘Temel Bileşenler Analizi (PCA)’ matematiksel modelleme işlemine tabi tutmak olmuştur. Temel bileşenler analizi, iki gruba ait m/z değerleri ve pik şiddetlerini baz alarak iki grubun birbirinden istatistiksel olarak farklılaşmış

farklılaşmadığını gösterir. İki grup arasında miktarında değişim gösteren pikleri belirleyebilmek için, iki grubun birbirinden istatistiksel olarak farklılaşması gerekir.

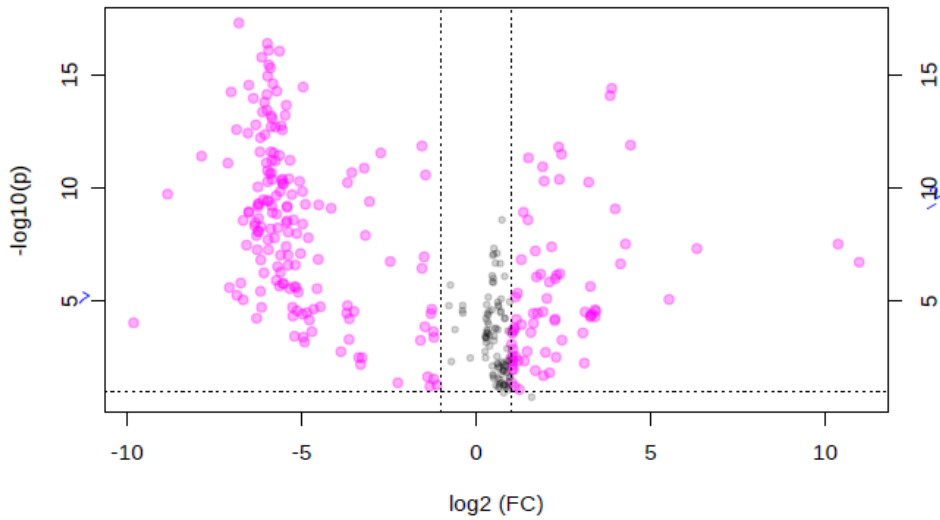
Şekil 4.14. metabolit profillemeye basamağında kullanılan 6 C ve 6 T olmak üzere toplam 12 karışım numunesinin temel bileşenler analizi sonuçlarını göstermektedir. Grafikte x eksenini birinci temel bileşeni, y eksenini ise ikinci temel bileşeni ifade eder. Bu iki bileşen, pik şiddetlerinin matematiksel modelleme dönüşümü ile ortaya çıkan, istatistiksel olarak iki grup arasındaki farklılığın yüzdesel gösterimidir. Grafik üzerindeki kümelenmeler ise, iki gruba ait numuneleri göstermektedir. Temel bileşenler analizi sonuçlarında, iki gruba ait numunelerin birbirinden ayrı yerlerde kümelenmesi gerekirken, gruplar içindeki numunelerin ise kendi içlerinde yakın noktalarda olması istenir.



Şekil 4.14. C ve T gruplarının temel bileşenler analizi sonuçlarını gösteren grafik.

Metabolit profillemeye çalışmalarında, temel bileşenler analizi sonrası sıradaki işlem, seçilen 340 pikten içinden istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı en az iki kat değişen pikleri belirlemektir. Miktarı en az iki kat değişen pikleri belirleyebilmek amacıyla normalize edilmiş pik şiddetleri birbiri ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak güvenilir pikleri belirlemek amacıyla ise t testi sonucu % 95 güven aralığında kalan pikler belirlenmiştir. Bu iki işlem sonucu, metabolit profillemeye basamağında kullanılan 340 pikten 141 tanesinin miktarının en az iki kat değiştiği ve istatistiksel olarak güvenilir ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.16. miktarı iki kattan fazla değişen ve t testi sonucu $p < 0.05$ olan piklerin grafiksel gösterimidir. Grafiğin x eksenini; piklerin gruplar arasındaki değişim miktarının logaritmik dönüşümünü, y eksenini ise; t testi sonucu bulunan p değerinin logaritmik dönüşümünü ifade eder. Grafik üzerindeki kesik çizgiler miktar değişimi için belirlenen en az iki katlık farkı ve $p < 0.05$ sınır değerlerini belirtmektedir. Grafikte gri olan noktalar, kullanılan 340 pikten miktarı anlamlı olarak değişmeyen pikleri ifade ederken, pembe renkli noktalar, miktarı en az iki kat değişen ve $p < 0.05$ olan 141 adet piki göstermektedir.



Şekil 4.15. Miktarı 2 kattan fazla değişen ve $p < 0.05$ olan piklerin grafiği.

Şekil 4.15.'de verilen istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı iki grup arasında en az iki kat farklılaşan piklerin m/z değerleri, alıkonma zamanları ve değişim miktarları Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Miktarı iki kattan fazla farklılaşan pikler listesi.

Pik No	m/z Değeri	Alıkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı	Pik No	m/z Değeri	Alıkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı
1	103.0525	0.77	2.83	71	478.4863	1.8	42.79
2	108.045	3.25	6.79	72	487.2964	7.23	2.62
3	109.0529	1.19	8.13	73	488.3046	0.99	45.69
4	110.06	0.77	11.85	74	492.1431	8.24	5.50
5	114.0663	1.18	38.44	75	504.3228	8.72	2.57
6	118.0865	8.82	8.85	76	515.262	0.99	2.38
7	126.0206	0.74	43.33	77	517.2225	3.7	2.24
8	128.0452	5.32	20.30	78	521.5189	7.41	24.68
9	134.0602	1.13	4.16	79	523.5252	8.24	9.71
10	136.0752	2.15	31.99	80	535.9017	7.39	4.82
11	144.0404	6.34	11.79	81	541.2616	9.09	11.69
12	148.0035	1.54	22.44	82	542.2651	7.76	11.61
13	152.0704	7.01	22.41	83	543.2633	2.43	5.58
14	156.0769	10.39	2.44	84	547.332	7.77	13.99
15	162.0498	1.52	20.84	85	548.3352	8.24	5.21
16	166.0704	8.18	51.12	86	549.3383	3.62	4.38
17	166.0851	7.37	2.25	87	549.9172	2.14	12.65
18	173.0808	0.98	7.60	88	550.3403	1.05	3.07
19	175.1188	10.43	2.12	89	557.9153	3.78	14.47
20	181.097	1.88	14.12	90	561.1169	1.05	4.77
21	182.0813	9.02	4.33	91	561.2488	1.05	2.75
22	190.0173	0.98	15.38	92	563.3337	1.08	2.11
23	201.0217	1.22	6.87	93	564.3582	8.14	2.16
24	202.216	4.46	4.12	94	564.5476	1.09	13.90

Tablo 4.4. (Devam) Miktarı iki kattan fazla farklılaşan pikler listesi.

Pik No	m/z Değeri	Alkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı	Pik No	m/z Değeri	Alkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı
25	205.0707	8.97	54.73	95	565.3617	7.96	2.17
26	230.2472	2.99	3.67	96	565.5524	1.61	3.16
27	232.0272	7.4	6.99	97	566.3643	5.07	2.24
28	233.0299	2.55	9.14	98	567.3666	1.07	10.52
29	233.1591	2.54	5.22	99	568.3694	6.06	7.38
30	234.0255	2.23	3.15	100	581.2418	10.22	2.18
31	246.0768	0.77	22.48	101	582.2462	4.46	2.19
32	246.2423	2.77	31.60	102	585.2877	7.46	2.17
33	258.1171	0.76	27.92	103	586.2915	4.46	2.16
34	262.0115	3.77	15.00	104	587.2904	1.06	3.91
35	262.0396	0.78	4.69	105	596.5075	3.78	10.62
36	263.0441	4.77	5.75	106	634.2521	3.78	33.74
37	274.2735	0.77	7.43	107	635.2569	9.29	5.23
38	275.2768	5.76	27.00	108	636.252	1.06	36.12
39	281.1383	1.06	8.05	109	654.3306	1.06	20.67
40	282.1417	1.02	9.31	110	655.3328	1.06	6.66
41	285.0599	3.23	6.58	111	656.3347	6.53	3.48
42	295.1186	6.98	13.22	112	657.3353	0.89	5.54
43	336.0988	3.79	2.65	113	689.4919	0.88	3.39
44	338.2303	7.98	14.72	114	689.9929	0.7	2.38
45	348.1029	1.96	20.68	115	697.4401	3.79	9.85
46	348.7225	8.98	2.02	116	698.4424	4.46	7.55
47	365.1671	9.98	3.30	117	699.4457	7.46	2.61
48	371.2273	2.97	4.58	118	703.5078	8.46	2.91
49	387.3075	2.77	24.33	119	704.0089	4.46	3.74
50	390.3566	2.97	25.15	120	728.5863	9.46	2.72
51	393.087	3.98	4.64	121	781.9957	4.46	6.98
52	407.1883	2.97	4.97	122	803.8752	5.46	3.85
53	408.1919	3.23	4.49	123	821.8863	6.46	5.67

Tablo 4.4. (Devam) Miktarı iki kattan fazla farklılaşan pikler listesi.

Pik No	m/z Değeri	Alkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı	Pik No	m/z Değeri	Alkonma Zamanı (dk)	Değişim Miktarı
54	409.1933	2.79	24.77	124	822.8891	7.47	7.75
55	412.2413	2.94	3.91	125	832.6338	8.7	4.27
56	412.2841	4.77	2.00	126	838.9131	1.06	15.05
57	413.2556	2.27	7.82	127	856.3452	8.05	5.96
58	415.2107	6.34	3.64	128	857.3504	1.02	6.07
59	416.2144	2.34	7.08	129	858.3457	2.32	2.85
60	416.422	9.79	27.92	130	876.6603	2.3	11.09
61	417.2175	9.8	6.87	131	916.5591	1.02	20.60
62	428.2298	2.49	2.48	132	917.5627	9.02	17.59
63	430.2945	5.88	15.01	133	946.9007	1.56	2.72
64	432.2381	2.34	11.93	134	966.5601	1.06	6.74
65	433.2426	6.51	2.73	135	967.5618	4.05	4.11
66	437.1933	2.55	6.16	136	1185.985	3.3	16.22
67	438.1972	2.23	3.60	137	1273.599	8.61	2.95
68	448.3076	3.06	41.13	138	1274.603	7.81	23.16
69	459.4531	1.06	40.62	139	1290.627	7.81	2.73
70	466.3164	7.39	27.44	140	1291.63	2.51	25.51
				141	1292.633	7.76	19.42

İstatistiksel olarak güvenilir ve miktarı anlamlı olarak değişim gösteren 141 adet pik, m/z değerleri baz alınarak HMDB metabolit veri bankasında taranmıştır. Tarama, bulunan m/z değerleri için 10 ppm hata payı içerisinde yapılmıştır. Sonuçlar m/z değerleri ile eşleşen bütün metabolitleri göstermektedir. Aynı m/z değerinde birden fazla metabolit bulunabilmektedir ve sadece m/z değeri bu metabolitleri karakterize etmek için yeterli değildir. Örnek olarak 134.0602 m/z değerinde 7 adet olası metabolit görünmektedir, bu metabolitin bu 7 adaydan hangisi olduğunu tam olarak ortaya çıkarabilmek ancak hedeflenmiş analizlerle mümkün olur. Tablo 4.5. yukarda Tablo 4.4.'de sunulan pik listesinin bu çerçevede yapılan HMDB taramasına ait sonuçları göstermektedir.

Tablo 4.5. HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
103.0525	Cycloserine	C08057	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	102.04
103.0525	3-amino-2-Oxazolidinone	-	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	102.04
108.045	alpha-fluoro-beta-Alanine	C16632	C ₃ H ₆ FNO ₂	107.04
110.06	1-methyl-2-pyrrolicarboxaldehyde	-	C ₆ H ₇ NO	109.05
110.06	2-acetylpyrrole	-	C ₆ H ₇ NO	109.05
110.06	4-aminophenol	C02372	C ₆ H ₇ NO	109.05
114.0662	Creatinine	C00791	C ₄ H ₇ N ₃ O	113.05
118.0863	N-Methyl-a-aminoisobutyric acid	C00431	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.07
118.0863	Betaine	C00719	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.07
126.0206	Taurine	C00245	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125.01
128.0452	1-Methyl-4-nitroimidazole	C16621	C ₄ H ₅ N ₃ O ₂	127.04
134.0602	Oksindole	C12312	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	(R)-Mandelonitrile	C00561	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	5-Hydroxyindole	-	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	4-Hydroxyphenylacetoneitrile	C03766	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	2-Methyl-4,5-benzoxazole	-	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	Indoxyl	C05658	C ₈ H ₇ NO	133.05
134.0602	Mandelonitrile	-	C ₈ H ₇ NO	133.05

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
136.0752	5-acetyl-2-methylpyridine	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	N-acetylarylamine	C07565	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2-phenylacetamide	C02505	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2-acetyl-4-methylpyridine	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	4-acetyl-2-methylpyridine	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2-acetyl-5-methylpyridine	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	1-(3-Methylpyridin-4-yl)ethanone	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2-Acetyl-6-methylpyridine	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2-Aminoacetophenone	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2'-Aminoacetophenone	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	5-(2-Furanyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrole	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
136.0752	2,3-dihydro-1H-Pyrrolizine-5-carboxaldehyde	-	C ₈ H ₉ NO	135.07
152.0704	Leukoaminochrome	C17756	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	3alpha,4,7,7alpha-tetrahydro-1H-Isoindole-1,3(2H)-dione	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	2-(methylamino)Benzoic acid	C03005	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	Ethyl nicotinate	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	Methyl 2-aminobenzoate	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	Dopamine quinone	C17755	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	2-phenylglycine	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	2-amino-3-Methylbenzoate	C16571	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	Oxime-, methoxy-phenyl	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	2-Acetamidophenol	-	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
152.0704	Acetaminophen	C06804	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06
153.0739	L-2-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-butanetrol	-	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.07

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
153.0739	D-xylitol	C00379	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.07
153.0739	L-arabitol	C00532	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.07
153.0739	D-arabitol	C01904	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.07
153.0739	Ribitol	C00474	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.07
156.0768	L-Histidine	C00135	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.06
166.0704	N2-methylguanine	C04153	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.07
166.0704	1-methylguanine	C04152	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.07
166.0704	3-methylguanine	C02230	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.07
166.0704	7-methylguanine	C02242	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.07
166.0863	DL-Phenylalanine	C00079	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.18
166.0863	Norsalsolinol	C07527	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.18
173.0808	2-octenedioic acid	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
173.0808	Cis-4-octenedioic acid	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
173.0808	Ethyl 2,4-dioxohexanoate	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
173.0808	Diethyl fumarate	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
173.0808	3-Isopropenylpentanedioic acid	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
173.0808	Trans-3-octenedioic acid	-	C ₈ H ₁₂ O ₄	172.07
174.1117	L-Arginine	C00062	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.11
174.1117	D-Arginine	C00792	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.11
181.097	3-Hydroxykynurenamine	C05636	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
181.097	5-hydroxykynurenamine	C05638	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
181.097	(s)-3-ethylidenehexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	-	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
181.097	2-amino-3-(4-Aminophenyl)propanoic acid	-	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
181.097	(4-Ethoxyphenyl)urea	C19415	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
181.097	Tyrosinamide	-	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂	180.09
182.0813	L-tyrosine	C00082	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
182.0813	Meta-tyrosine	-	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
182.0813	4-hydroxy-4-(3-pyridyl)-butanoic acid	C19579	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
182.0813	L-threo-3-phenylserine	-	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
182.0813	Beta-tyrosine	C04368	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
182.0813	O-tyrosine	-	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
182.0813	1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-4,6,7-triol	-	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07
190.0173	Lanthionine ketimine	-	C ₆ H ₇ NO ₄ S	189.01
190.0173	2-Aminophenyl hydrogen sulfate	-	C ₆ H ₇ NO ₄ S	189.01
201.0217	D-erythrose 4-phosphate	C00279	C ₄ H ₉ O ₇ P	200.01
205.0707	3,5,6-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methoxy-2-cyclohexen-1-one	-	C ₈ H ₁₂ O ₆	204.06
205.0707	Eupolauridine	-	C ₁₄ H ₈ N ₂	204.07
232.0272	Paracetamol sulfate	-	C ₈ H ₉ NO ₅ S	231.02
232.0272	SCHEMBL17318163	-	C ₈ H ₉ NO ₅ S	231.02
233.0299	CTK6a1480	-	C ₈ H ₈ O ₈	232.02
233.0299	Chrycolide	-	C ₁₂ H ₈ O ₃ S	232.02
233.1591	3-mercaptohexyl hexanoate	-	C ₁₂ H ₂₄ O ₂ S	232.15
233.1591	Isoalantolactone	C09484	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	1,3,11(13)-eudesmatrien-12-oic acid	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Collybial	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	10,11-epidioxycalamene	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Alpha-amylcinnamyl formate	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	(e)-9-(3-furanyl)-2,6-dimethyl-2,6-nonadien-4-one	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	(s)-bilobanone	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	(z)-8-decene-4,6-diy-1-yl 3-methylbutanoate	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	1(10),11-eremophiladiene-2,9-dione	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Turmeronol b	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	(7b,10a)-3-hydroxy-1,3,5-cadinatrien-9-one	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
233.1591	5,8a-Dimethyl-3-methylidene-5,6,7,8,9,9a-hexahydro-3ah-benzo[F][1]benzofuran-2-one	C09289	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Germacrone-13-al	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Alloalantolactone	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	6-[(3,4-Methylenedioxy)phenyl]-3,3-dimethyl-1-hexene	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Turmeronol a	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Pterosin O	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Costunolide	C09382	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Furanogermenone	C17488	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Furoeremophilone 1	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.15
233.1591	Norfentanyl	-	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232.16
233.1591	15883-20-2	-	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232.16
233.1591	Tymazoline	-	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	232.16
258.1171	4a-hydroxytetrahydrobiopterin	C15522	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₄	257.11
258.1171	Tetrahydroneopterin	-	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₄	257.11
258.1171	Tolmetin	C07149	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	257.11
258.1171	Glycerophosphocholine	C00670	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	257.10
262.0396	Dehydrogenated ticlopidine	-	C ₁₄ H ₁₂ C ₁ NS	261.04
263.0441	4-(4-nitrosobenzenesulfonyl)aniline	-	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	262.04
263.0441	AC1NX501	-	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃ S ₂	262.04
275.2768	Isodigeranyl	-	C ₂₀ H ₃₄	274.27
275.2768	(6Z,10E)-2,6,11,15-Tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraene	-	C ₂₀ H ₃₄	274.27
281.1383	(1beta,4alpha,5alpha,6beta,8alpha,10b)-1,10:4,5-diepoxy-6-hydroxy-7(11)-germacren-12,8-olide	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	Dihydromarasmone	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
281.1383	Artabsinolide a	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	8-deoxy-11,13-dihydroxygrosheimin	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	13-hydroxyabscisic acid	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	Nigelllic acid	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	Vulgarolide	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
281.1383	Crispolide	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280.13
282.1417	SCHEMBL1695354	-	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	281.14
282.1417	Floribundine	-	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	281.14
285.0599	THIOINOSINE	-	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄ S	284.06
295.1186	Cyclocalopin f	-	C ₁₅ H ₁₈ O ₆	294.11
295.1186	Distichonic acid a	-	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₈	294.11
295.1186	Distichonic acid b	-	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₈	294.11
348.1029	Cephalexin	C06895	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	347.09
365.1671	Gibberellin a50	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	Gibberellin a72	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	(7r*,8r*)-3-methoxy-3',4,7,9,9'-pentahydroxy-8,4'-oxyneolignan	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	Gibberellin a49	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	Gibberellin a55	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	Gibberellin a91	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	heptadecane-9-carboxylic acid	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
365.1671	Gibberellin a76	-	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	364.15
407.1883	Albanin D	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Licocoumarin a	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Mammea a/ab	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Gancaonin q	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Mammea a/bb	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Kanzonol z	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Mammea a/ba	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Mammeisin	C09275	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Rubraflavone a	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Honyucitrin	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Xanthohumol e	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	(s)-cajaflavanone	-	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.18
407.1883	Carvedilol	C06875	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	406.19
409.1933	3-Hydroxyglabrol	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
409.1933	(e)-2',4,4',6'-tetrahydroxy-3',5'-diprenylchalcone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	Kuwanol D	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-[8-hydroxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-2h-1-benzopyran-5-yl]-1-propanone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	3'-geranyl-2',3,4,4'-tetrahydroxychalcone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	3'-geranyl-2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	(e)-2'-geranyl-3',4',7-trihydroxyflavanone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	1-hydroxy-3,5-dimethoxy-2,4-diprenylxanthone	-	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.19
409.1933	3-o-methylniveusin a	-	C ₂₁ H ₂₈ O ₈	408.18
409.1933	(1R,2S,8R,13R,14R,15S,17S)-1-fluoro-8,14,17-trihydroxy-14-(2-hydroxyacetyl)-2,13,15-trimethyltetracyclo	-	C ₂₂ H ₂₉ FO ₆	408.19
412.2841	Fesoterodine	-	C ₂₆ H ₃₇ NO ₃	411.28
413.2556	Lysopc(10:0)	-	C ₁₈ H ₃₉ NO ₇ P	412.25
413.2556	Trandolapril diketopiperazine	-	C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₄	412.24
415.2107	Eplerenone	C12512	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.20
415.2107	Clausarinol	-	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.20
415.2107	Armillaripin	-	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.20
415.2107	2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate	-	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.20
415.2107	Armillarin	-	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414.20
417.2175	Ethyl 7-epi-12-hydroxyjasmonate glucoside	-	C ₂₀ H ₃₂ O ₉	416.20
417.2175	Spironolactone	C07310	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ S	416.20
417.2175	Desonide	-	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416.22
417.2175	Armillyl everninate	-	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416.22

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
417.2175	Citreoviridin D	-	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416.22
417.2175	Diasarone 2	-	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416.22
417.2175	Heterotropan	-	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416.22
433.2426	Glucosyl (2e,6e,10x)-10,11-dihydroxy-2,6-farnesadienoate	-	C ₂₁ H ₃₆ O ₉	432.24
433.2426	Buclizine	C07777	C ₂₈ H ₃₃ C ₁ N ₂	432.23
437.1933	Artocarpin	-	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	436.19
437.1933	2'-O-Methylcajanone	-	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	436.19
437.1933	Kanzonol k	-	C ₂₆ H ₂₈ O ₆	436.19
437.1933	Flupenthixol	-	C ₂₃ H ₂₇ F ₃ N ₂ O S	436.18
466.3164	Sodium glycocholate	-	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.31
466.3164	3a,7b,12a-trihydroxyoxocholanyl-glycine	-	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.31
466.3164	Glycocholic acid	C01921	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465.31
487.2964	Pa(20:4(5z,8z,11z,14z)e/2:0)	-	C ₂₅ H ₄₃ O ₇ P	486.27
504.3228	Lysope(0:0/20:3(8z,11z,14z))	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
504.3228	Lysope(0:0/20:3(11z,14z,17z))	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
504.3228	Lysope(20:3(11z,14z,17z)/0:0)	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
504.3228	Lysope(20:3(8z,11z,14z)/0:0)	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
504.3228	Lysope(20:3(5z,8z,11z)/0:0)	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
504.3228	Lysope(0:0/20:3(5z,8z,11z))	-	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	503.30
515.262	Glycinoeclepin c	-	C ₂₉ H ₃₈ O ₈	514.26
515.262	4-(12-Acetyloxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-3,7,11,15-tetraoxo-2,5,6,12,16,17-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid	-	C ₂₉ H ₃₈ O ₈	514.26
541.2616	Tetrahydroaldosterone-3-glucuronide	-	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₁	540.26

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
542.2651	Mandrax	-	$C_{33}H_{36}C_1N_3O_2$	541.25
543.2633	Physagulin c	-	$C_{30}H_{38}O_9$	542.25
561.2488	Isomorellic acid	-	$C_{33}H_{36}O_8$	560.24
564.5476	Ceramide (d18:1/9z-18:1)	C00195	$C_{36}H_{69}NO_3$	563.53
564.5476	Cer(d18:1/18:1(11z))	-	$C_{36}H_{69}NO_3$	563.53
568.3694	Pe(10:0(3-oh)/12:0)	-	$C_{27}H_{54}NO_9P$	567.35
568.3694	Pe(12:0(3-oh)/10:0)	-	$C_{27}H_{54}NO_9P$	567.35
568.3694	Pe(10:0/12:0(3-oh))	-	$C_{27}H_{54}NO_9P$	567.35
568.3694	Pe(12:0/10:0(3-oh))	-	$C_{27}H_{54}NO_9P$	567.35
585.2877	Ouabain	C01443	$C_{29}H_{44}O_{12}$	584.28
585.2877	Glycosides	C01443	$C_{29}H_{44}O_{12}$	584.28
585.2877	Bilirubin	C00486	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	584.26
585.2877	4e,15z-bilirubin	-	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	584.26
586.2915	Amikacin	C06820	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$	585.29
586.2915	Tigecycline	C12012	$C_{29}H_{39}N_5O_8$	585.28
587.2904	Irinotecan	C16641	$C_{33}H_{38}N_4O_6$	586.28
635.2569	Myricanene a 5-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]	-	$C_{32}H_{42}O_{13}$	634.26
635.2569	Myricanene b 5-[arabinosyl-(1->6)-glucoside]	-	$C_{32}H_{42}O_{13}$	634.26
635.2569	Lactodifucotetraose	-	$C_{24}H_{42}O_{19}$	634.23
655.3328	Argenteane	-	$C_{40}H_{46}O_8$	654.32
699.4457	(2,3-dihydroxypropoxy)phosphinic acid	-	$C_{34}H_{67}O_{12}P$	698.44
699.4457	Cyclopassifloside x	-	$C_{37}H_{62}O_{12}$	698.42
699.4457	Cyclopassifloside i	-	$C_{37}H_{62}O_{12}$	698.42
699.4457	Cyclopassifloside iv	-	$C_{37}H_{62}O_{12}$	698.42
728.5863	Cerp(d18:1/24:1(15z))	-	$C_{42}H_{82}NO_6P$	727.59
728.5863	Glucosylceramide (d18:1/18:0)	C01190	$C_{42}H_{81}NO_8$	727.60
728.5863	Galactosylceramide (d18:1/18:0)	C02686	$C_{42}H_{81}NO_8$	727.60
728.5863	Cerebroside b	-	$C_{41}H_{77}NO_9$	727.56
821.8863	Iohecol	-	$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$	820.88
876.6603	HMDB09641	-	$C_{51}H_{90}NO_8P$	875.64
876.6603	HMDB09770	-	$C_{51}H_{90}NO_8P$	875.64

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

Tablo 4.5. (Devam) HMDB taraması sonucu olası metabolitler listesi.

Aranan m/z Değeri	Metabolit Adı	Kegg* Numarası	Kimyasal Formülü	Molekül Ağırlığı
876.6603	HMDB09769	-	C ₅₁ H ₉₀ NO ₈ P	875.64
876.6603	HMDB09738	-	C ₅₁ H ₉₀ NO ₈ P	875.64
876.6603	HMDB09706	-	C ₅₁ H ₉₀ NO ₈ P	875.64
876.6603	HMDB09674	-	C ₅₁ H ₉₀ NO ₈ P	875.64
876.6603	Pc(o-22:0/22:6(4z,7z,10z,13z,16z,19z))	-	C ₅₂ H ₉₄ NO ₇ P	875.68
876.6603	Pc(o-22:3(10z,13z,16z)/22:3(10z,13z,16z))	-	C ₅₂ H ₉₄ NO ₇ P	875.68
917.5627	Notoginsenoside fe	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
917.5627	Maduramicin	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
917.5627	Gynosaponin i	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
917.5627	Vinaginsenoside r17	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
917.5627	Vinaginsenoside r16	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
917.5627	Protopanaxadiol 3-glucoside 20-[arabinosyl-(1->2)-glucoside]	-	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.54
1273.599	Assamsaponin b	-	C ₆₁ H ₉₂ O ₂₈	1,272.58

4.3. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları

Hedeflenmiş metabolomik çalışmaları kapsamında Tablo 4.4.'de verilen miktarı iki kattan fazla değişen ve istatistiksel olarak güvenilir pikler listesindeki m/z ve alıkonma zamanları baz alınarak metabolit karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır.

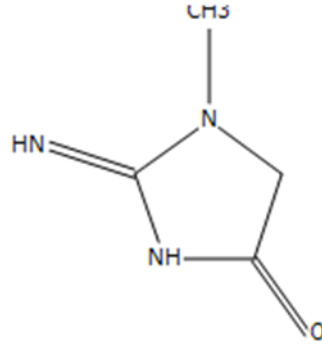
MS/MS yönteminde her pik, ayrı ayrı 10V, 20V ve 40V çarpışma enerjileri ile fragmentlerine ayrılmış, alınan sonuçlar MS/MS veri bankalarında taranarak metabolitler karakterize edilmeye çalışılmıştır. MS/MS yöntemi sonucu kimyasal yapısı aydınlatılabilen metabolitlere ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

* Kegg veri bankasına ait metabolit numarası

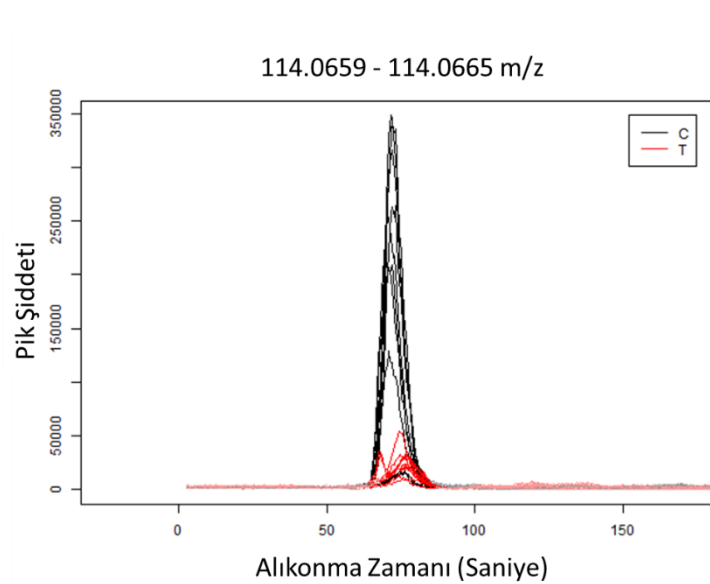
Tablo 4.6. ve Şekiller 4.16. - 4.19.'da 114.0665 m/z değerine ve 1.18 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 38 kattan fazla değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.6. Kreatinin metabolitine ait bilgiler.

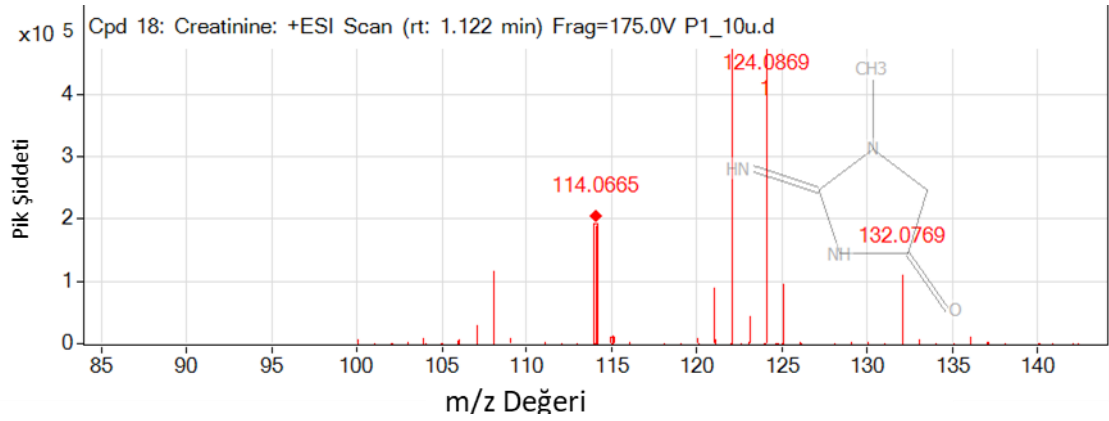
Metabolit Adı	Teorik m/z Değeri	RT (dk)	Teorik Kütle	Miktar Değişim Oranı C/T
Kreatinin	114.0662	1.18	113.0589	38.44



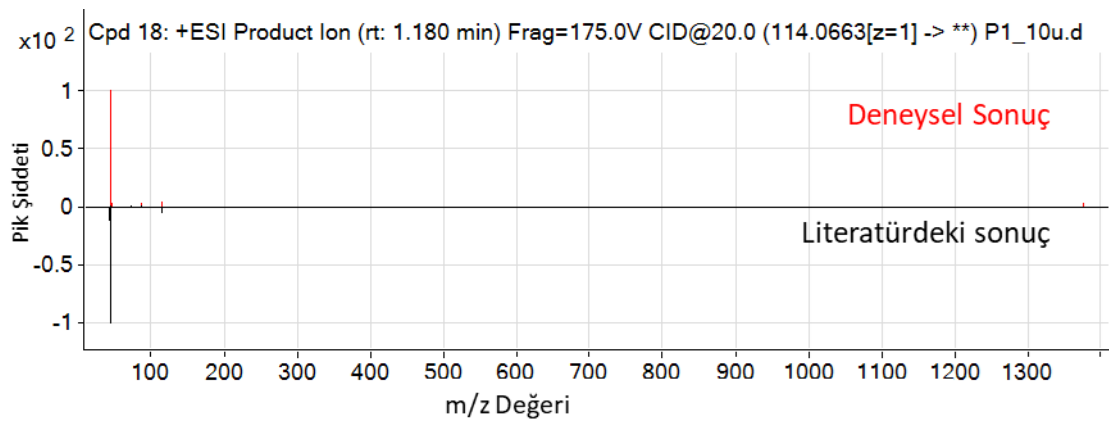
Şekil 4.16. Kreatinin metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.17. Kreatinin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.18. Kreatinin metabolitine ait MS spektrumu.

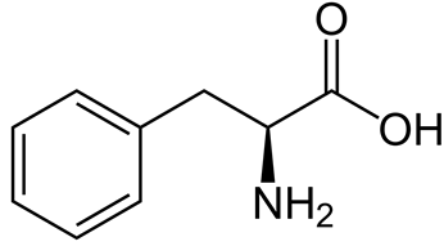


Şekil 4.19. Kreatinin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Kreatinin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

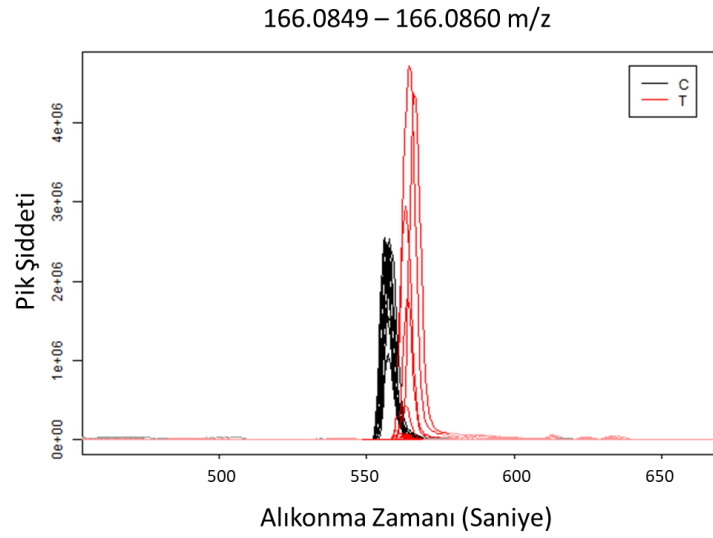
Tablo 4.7. ve Şekiller 4.20. - 4.23.'de 166.0859 m/z değerine ve 7.36 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 2.25 kat değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.7. DL-Fenilalanin metabolitine ait bilgiler.

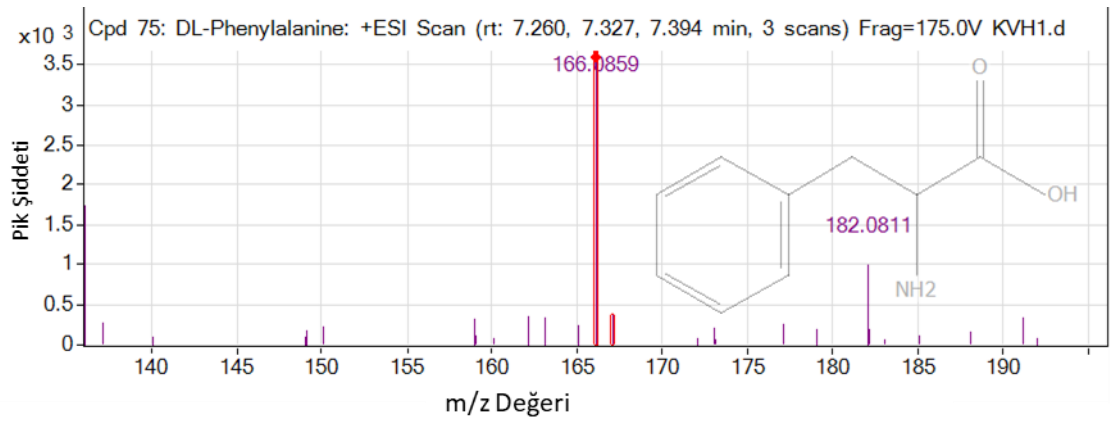
Metabolit Adı	Teorik m/z Değeri	RT (dk)	Teorik Kütle	Miktar Değişim Oranı C/T
DL-Fenilalanin	166.0863	7.36	165.1886	2.25



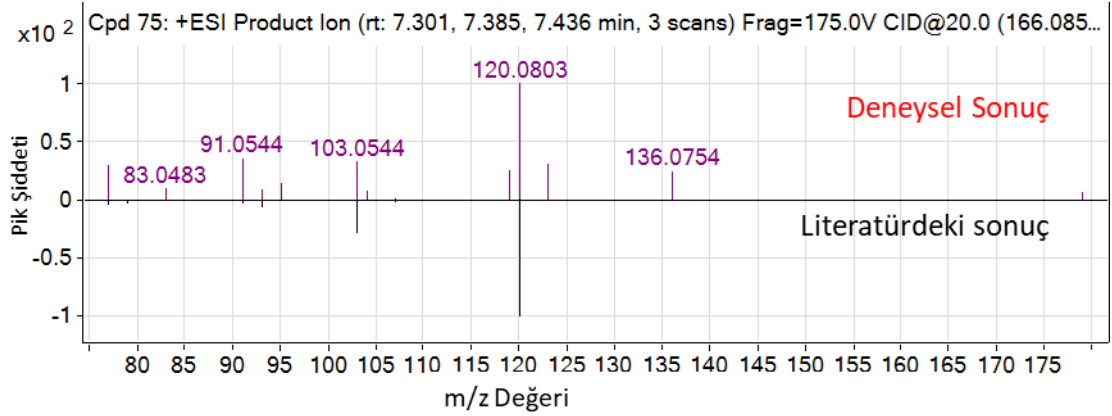
Şekil 4.20. DL-Fenilalanin metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.21. DL-Fenilalanin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.22. DL-Fenilalanin metabolitine ait MS spektrumu.

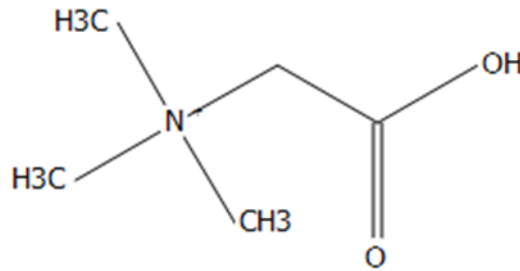


Şekil 4.23. DL-Fenilalanin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve DL-Fenilalanin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

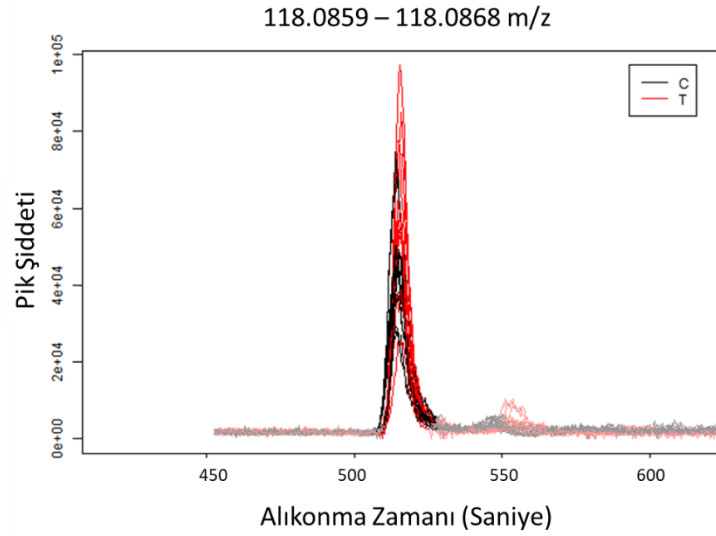
Tablo 4. 8. ve Şekiller 4.24. - 4.27.'de 118.0865 m/z değerine ve 8.87 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 8.85 kat değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.8. Betain Metabolitine Ait Bilgiler.

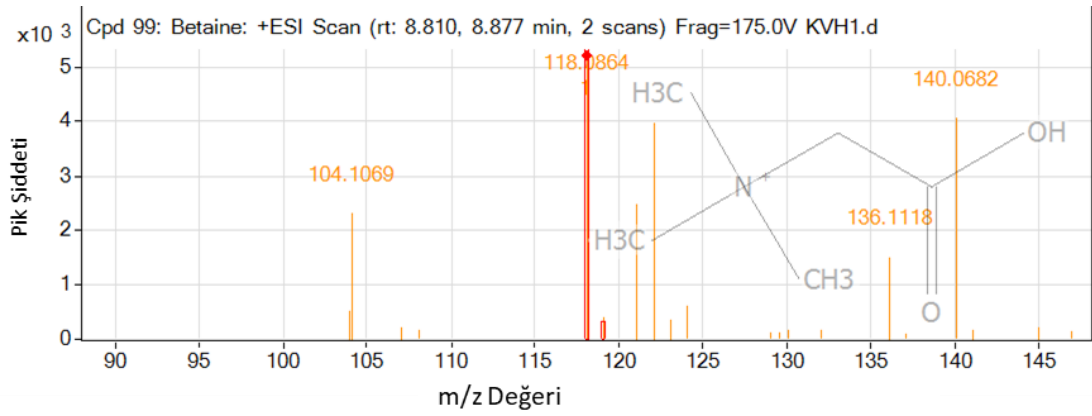
Metabolit Adı	m/z Değeri	RT (dk)	Kütlesi	Miktar Değişim Oranı C/T
Betain	118.0863	8.87	117.0790	8.85



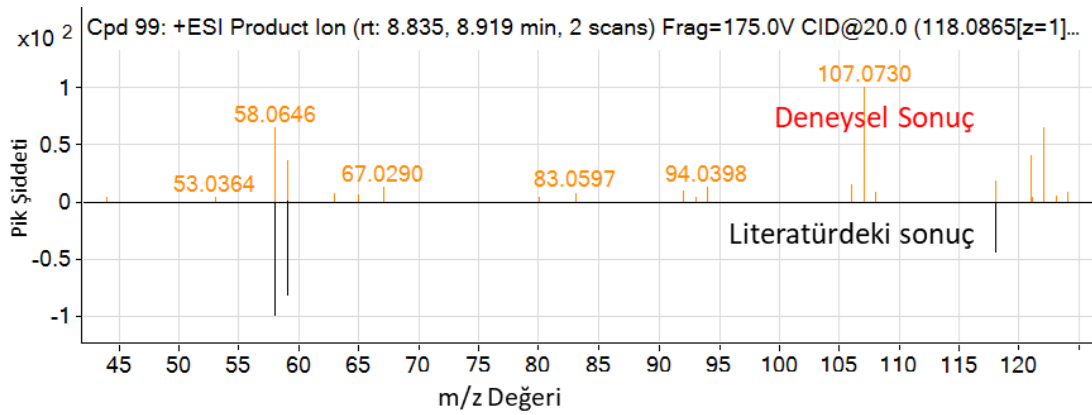
Şekil 4.24. Betain metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.25. Betain metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.26. Betain metabolitine ait MS spektrumu.

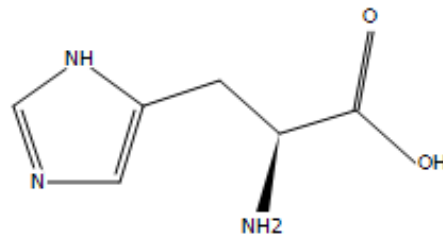


Şekil 4.27. Betain metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Betain metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

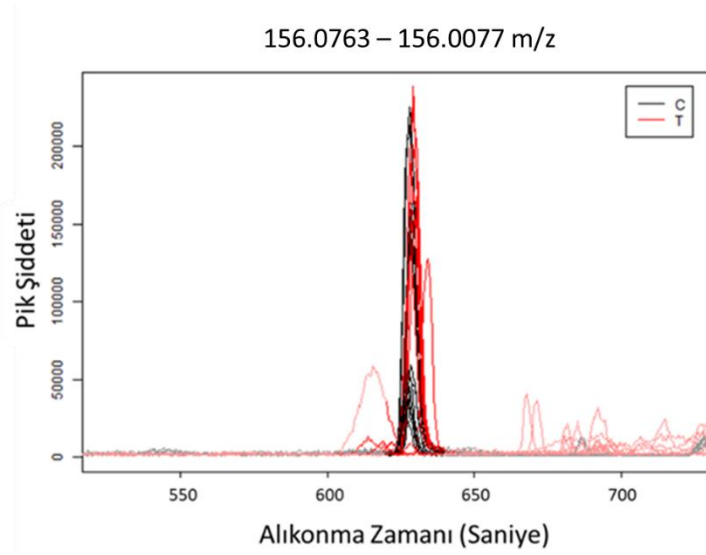
Tablo 4.9. ve Şekiller 4.28. - 4.31.'de 156.0769 m/z değerine ve 10.40 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 2.44 kat değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.9. L-Histidin metabolitine ait bilgiler.

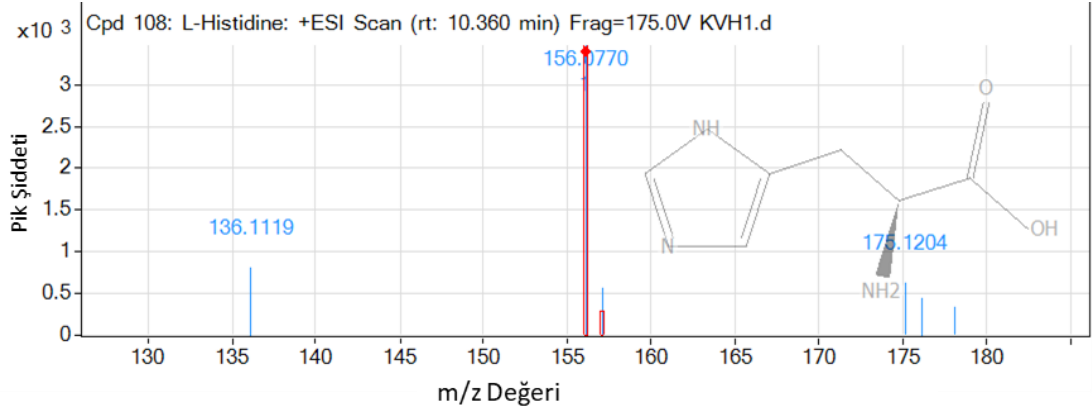
Metabolit Adı	Teorik m/z Değeri	RT (dk)	Teorik Kütle	Miktar Artış Oranı C/T
L-Histidin	156.0768	10.40	155.0698	2.44



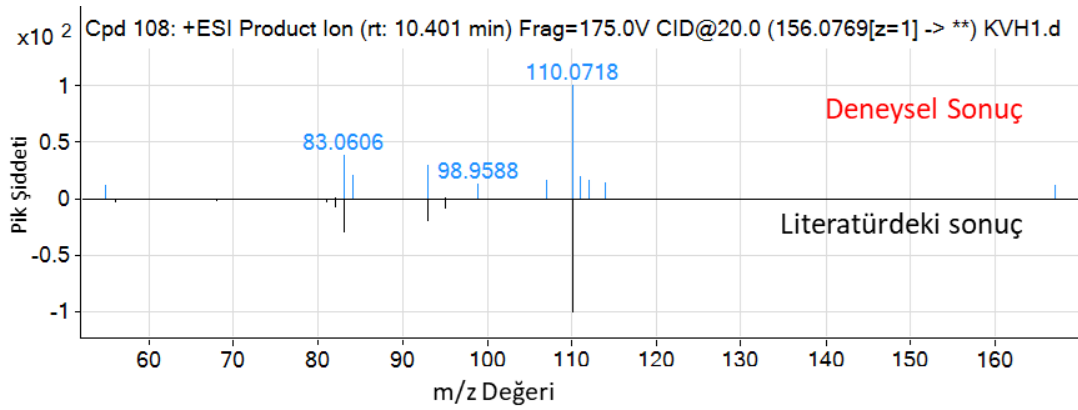
Şekil 4.28. L-Histidin metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.29. L-Histidin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.30. L-Histidin metabolitine ait MS spektrumu.

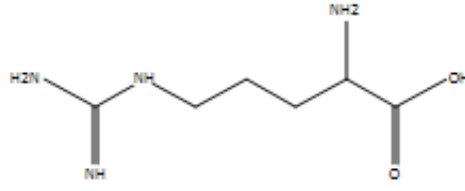


Şekil 4.31. L-Histidin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve L-Histidin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

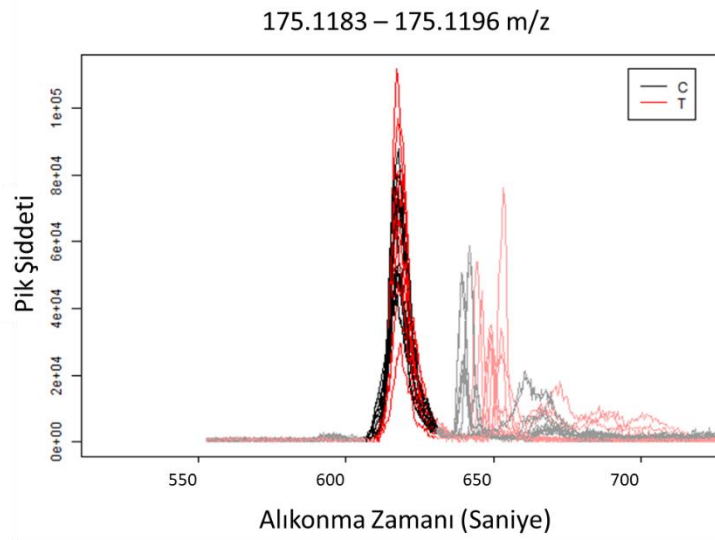
Tablo 4.10. ve Şekiller 4.32. - 4.35.'de 175.1188 m/z değerine ve 10.43 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 0.47 kat değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.10. L-Arginin metabolitine ait bilgiler.

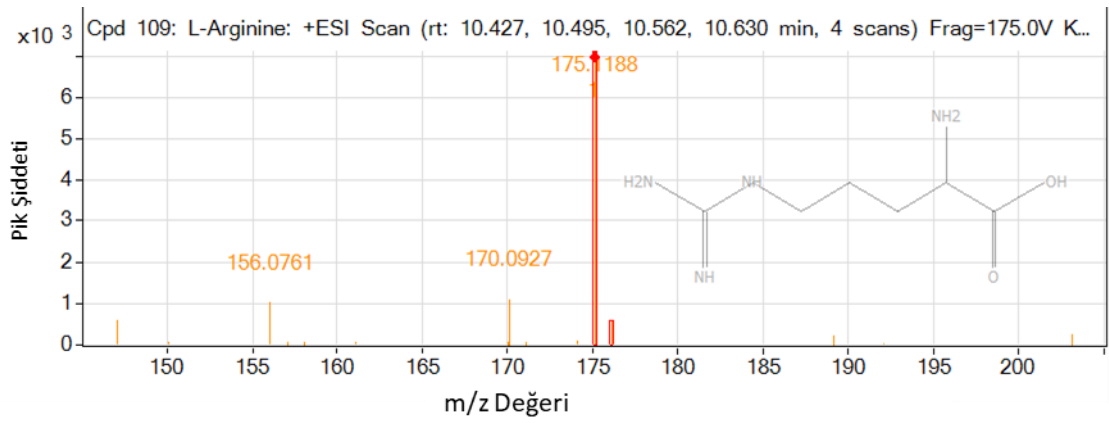
Metabolit Adı	Teorik m/z Değeri	RT (dk)	Kütlesi	Miktar Değişim Oranı C/T
L-Arginin	175.1117	10.55	174.1111	0.47



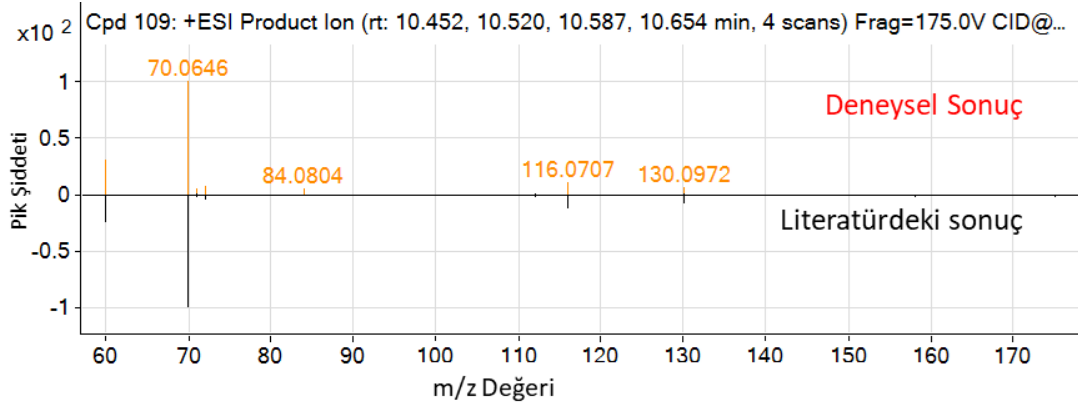
Şekil 4.32. L-Arginin metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.33. L-Arginin metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.34. L-Arginin metabolitine ait MS spektrumu.

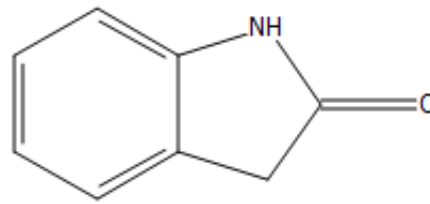


Şekil 4.35. L-Arginin metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve L-Arginin metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

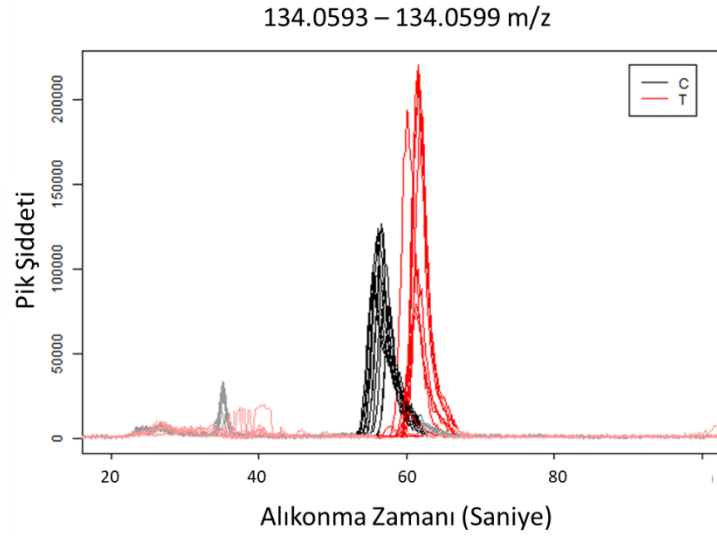
Tablo 4.11. ve Şekiller 4.36. - 4.39.'da 134.0602 m/z değerine ve 0.82 dakika alıkonma zamanına sahip ve miktarı iki grup arasında 4.16 kat değişen pikin MS/MS çalışmalarına ait veriler verilmiştir.

Tablo 4.11. Oksindol metabolitine ait bilgiler

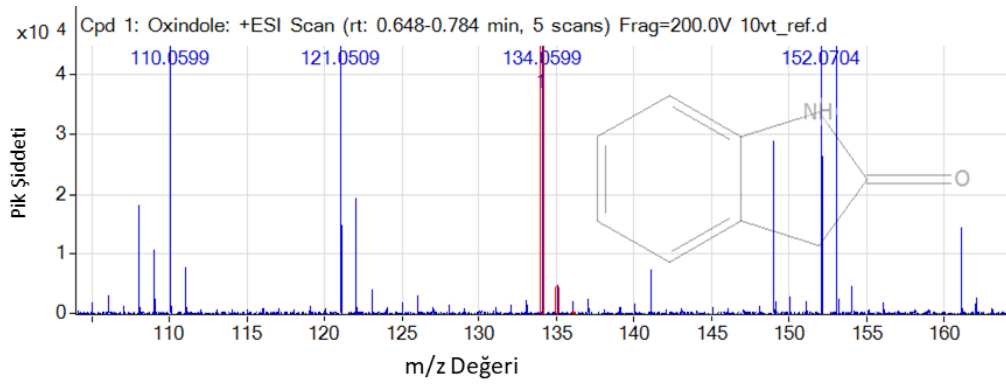
Metabolit Adı	m/z Değeri	RT (dk)	Kütlesi	Miktar Artış Oranı C/T
Oksindol	134.0602	0.82	133.0525	4.16



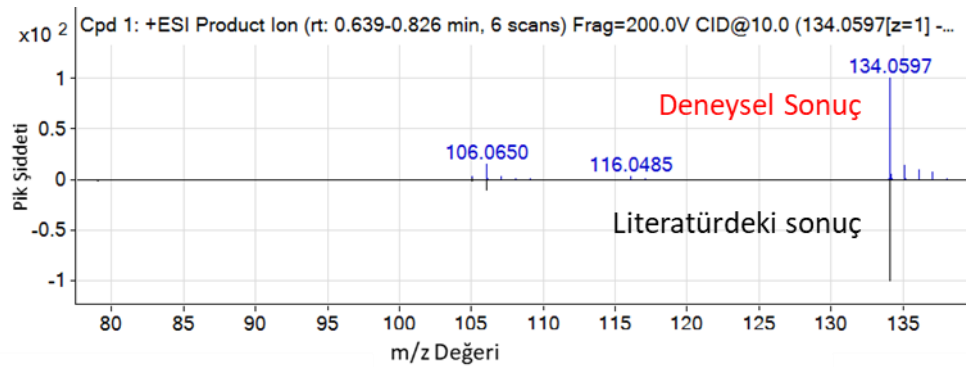
Şekil 4.36. Oksindol metabolitinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.37. Oksindol metabolitine ait ayrılmış iyon kromatogramı.



Şekil 4.38. Oksindol metabolitine ait MS spektrumu.



Şekil 4.39. Oksindol metabolitine ait MS/MS spektrumu (üstte) ve Oksindol metabolitine ait literatürdeki spektrum (altta)

4.4. Sistem Uygunluk Çalışması

Sistem uygunluk çalışmaları içeriği Tablo 3.7.'de verilen kalite kontrol numunelerinin 6 tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.12. bu enjeksiyon sonuçlarına ait alıkonma zamanları, tekrarlanabilirlik, kapasite faktörü, ayırıcılık ve teorik tabaka sayısı değerlerini göstermektedir.

Tablo 4.12. Sistem uygunluğu parametrelerine dair bulgular.

	Sulfaguanidin	Asetaminofen	Kafein	Sulfametoksin	Verapamil	Reserpin
Alıkonma Zamanı (dk)	1.43	4.01	4.97	6.88	7.92	9.90
Tekrarlanabilirlik*	0.55	0.17	0.19	0.05	0.34	0.26
Kapasite Faktörü	2.01	4.72	6.10	8.83	10.31	13.14
Ayırıcılık**	-	2.06	1.63	3.77	2.01	2.94
Teorik Tabaka Sayısı	3216	4412	2521	4716	3541	4985

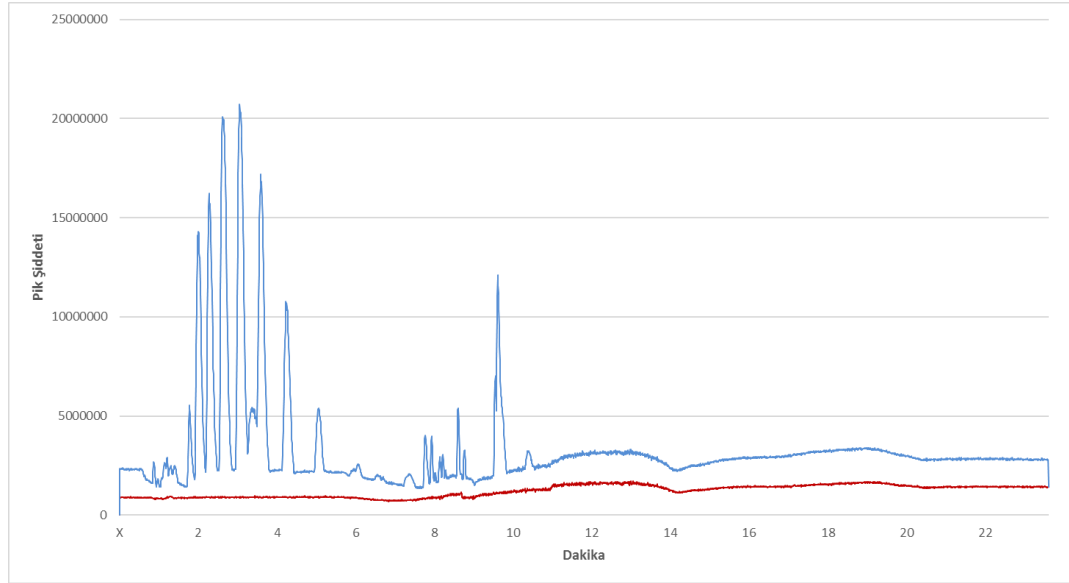
*Alıkonma zamanları arasındaki % BSS değerleri verilmiştir.

** Komşu pikler arasındaki (bir önceki pike göre) değerlerdir.

4.5. Validasyon Çalışmaları

4.5.1. Özgünlük

Özgünlük çalışmaları kapsamında Bölüm 3.7.1.'de anlatılan metodoloji doğrultusunda kör çözelti ile numune enjeksiyonları karşılaştırılmıştır. Kör çözelti enjeksiyonu örneklerde kullanılan tüm kimyasalların olduğu ancak örneğin eklenmediği enjeksiyonlardır. Kör çözelti enjeksiyonları metabolit profillemeye basamağında kullanılan HILIC kolon ve pozitif MS modlarında yapılmıştır. Şekil 4.40.'da kör çözelti ve numune enjeksiyonlarının temel pik kromatogramları verilmiştir. Kromatogramda kırmızı renk kör çözeltiliye, mavi renk ise numune enjeksiyonuna aittir. Sonuçlar numune için optimize edilen veri değerlendirme yöntemi ile değerlendirilerek, numuneye girişim yapan pik olup olmadığı kontrol edilmiştir. Metabolit profillemeye basamağında kullanılan 340 adet pik, kör çözelti sonuçlarında bulunmamıştır.



Şekil 4.40. Kör çözelti (kırmızı) ve numune (mavi) enjeksiyonlarını gösteren temel pik kromatogramları.

4.5.2. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları kapsamında Bölüm 3.7.2.'de anlatılan metodoloji doğrultusunda iç standart olarak kullanılan daidzein maddesinin veri bankasına kayıtlı teorik m/z değeri ile enjeksiyonlarda bulunan m/z değeri karşılaştırılarak yüzde bağıl hata değerleri bulunmuştur. Tablo 4.13. bulunan yüzde bağıl hata değerlerini göstermektedir. İlgili sonuçlarda en yüksek hata onbinde altı civarında gözlenmiştir.

Tablo 4.13. İç standartın bulunan ve teorik m/z değerlerinin yüzde bağıl hata tablosu.

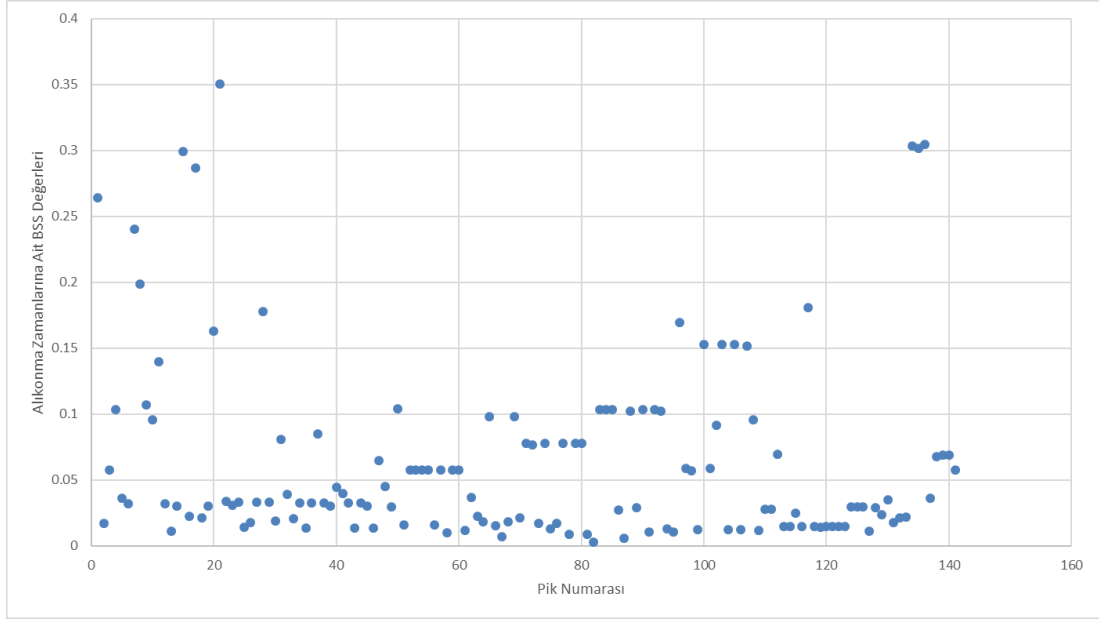
Enjeksiyon Numarası	Bulunan m/z Değeri	Teorik m/z Değeri	Yüzde Bağıl Hata
1	255.0728	255.0729	% 0.0039
2	255.0742	255.0729	% 0.0588
3	255,0714	255.0729	% 0.0666
4	255.0730	255.0729	% 0.0078
5	255.0730	255.0729	% 0.0039
6	255.0726	255.0729	% 0.0196
7	255.0724	255.0729	% 0.0274
8	255.0728	255.0729	% 0.0039
9	255.0741	255.0729	% 0.0548
10	255.0738	255.0729	% 0.0431

Tablo 4.13. (Devam) İç standartın bulunan ve teorik m/z değerlerinin yüzde bağıl hata tablosu.

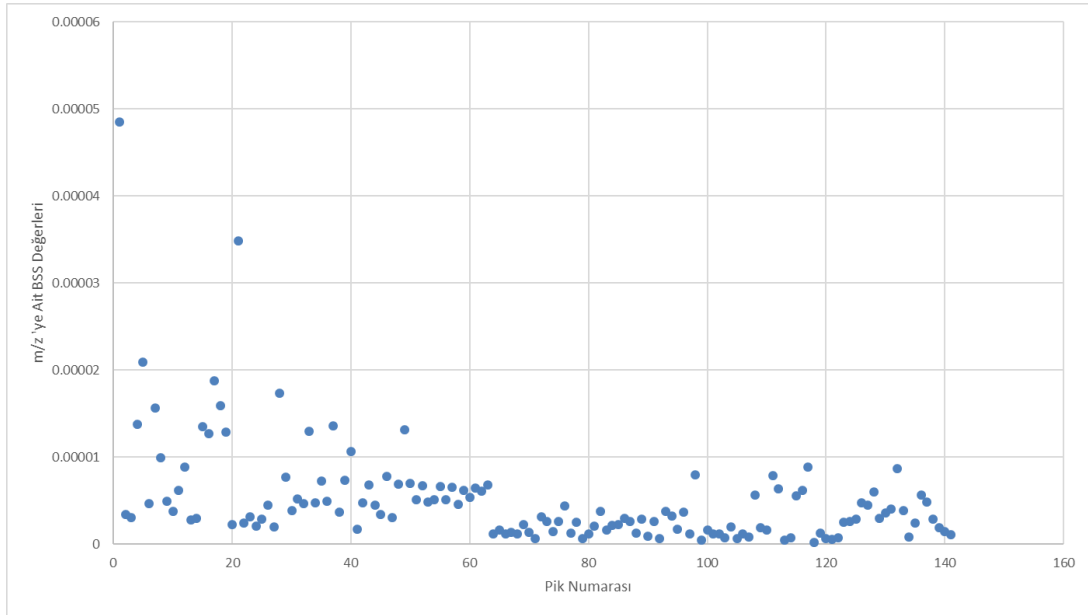
Enjeksiyon Numarası	Bulunan m/z Değeri	Teorik m/z Değeri	Yüzde Bağıl Hata
11	255.0731	255.0729	% 0.0078
12	255.0737	255.0729	% 0.0392
13	255.0732	255.0729	% 0.0156
14	255.0726	255.0729	% 0.0196
15	255.0735	255.0729	% 0.0313
16	255.0732	255.0729	% 0.0117
17	255.0742	255.0729	% 0.0627
18	255.0740	255.0729	% 0.0588
19	255.0722	255.0729	% 0.0392
20	255.0723	255.0729	% 0.0313
21	255.0733	255.0729	% 0.0196
22	255.0724	255.0729	% 0.0196
23	255.0736	255.0729	% 0.0352
24	255.0726	255.0729	% 0.0117

4.5.3. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları kapsamında Bölüm 3.7.3.'de anlatılan metodoloji doğrultusunda, metabolit profilleme basamağında kullanılan istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı en az iki kat farklılaşan 141 pik'e ait (Tablo 4.4.) tüm örnekleme bulunan en küçük ve en büyük alıkonma zamanları ve yine bulunan en küçük ve en büyük m/z değerlerinin bağıl standart sapmaları (BSS) bulunmuştur. Şekil 4.41. ve Şekil 4.42. bu sonuçlara ait grafiklerdir. Alıkonma zamanlarının bağıl standart sapma değerleri grafiğinden de görüleceği üzere, piklerin % 80.5'lik kısmı binde bir BSS değerinin altındadır. 21 numaralı pik en fazla BSS değeriyle (0.35) en fazla sapma gösteren pik olarak görülmektedir. Şekil 4.42. ise, m/z değerlerinin BSS sonuçlarını göstermektedir. Piklerin tamamı binde beş BSS değerinin altındadır. Bu durum m/z değerlerinde en fazla 5 ppm'lik bir sapmaya işaret eder ve böylece Tablo 4.5.'de sunulan HMDB taramasına ait sonuçlarda kullanılan 10 ppm'lik sapmanın deney koşulları içerisinde oluşabilecek sapmaları içine alabildiği görülmüştür.



Şekil 4.41. Alıkonma zamanlarının bağıl standart sapmasını gösteren grafik.

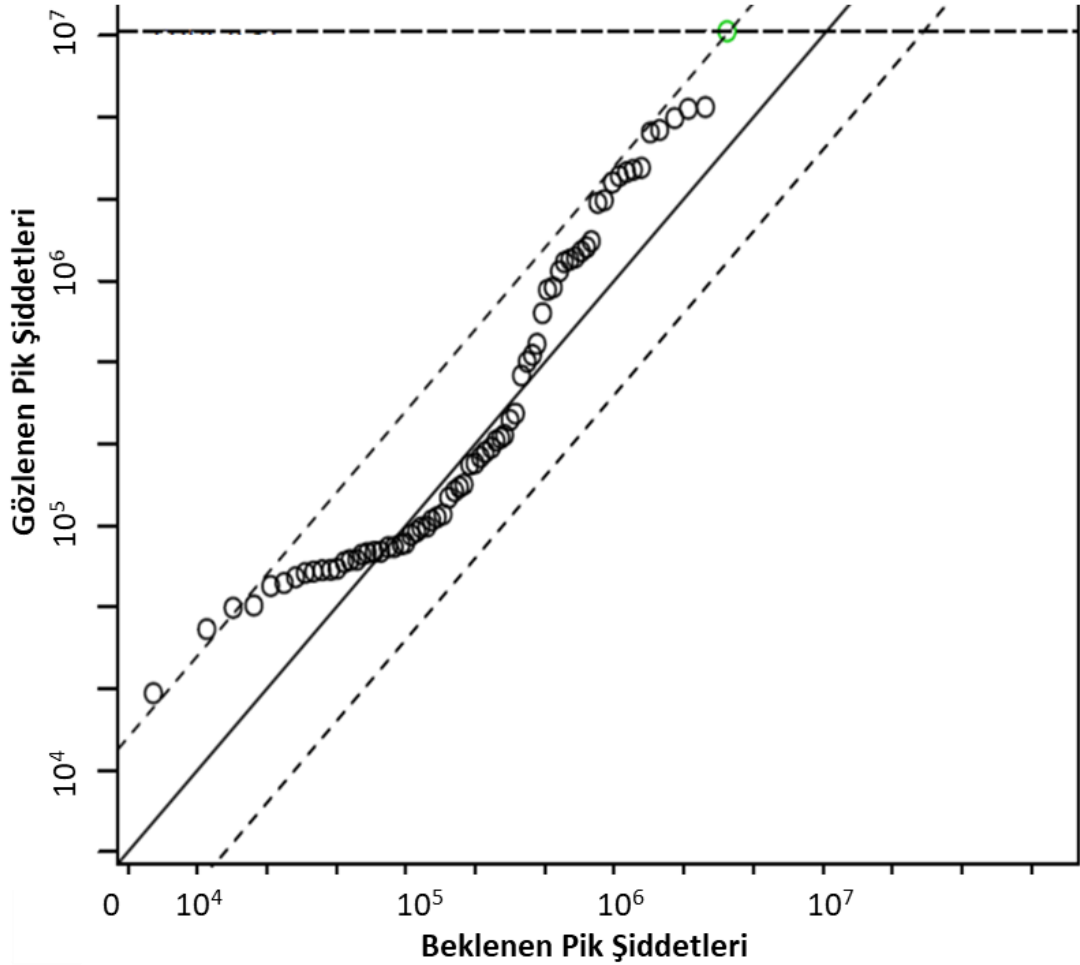


Şekil 4.42. m/z değerlerinin bağıl standart sapmasını gösteren grafik.

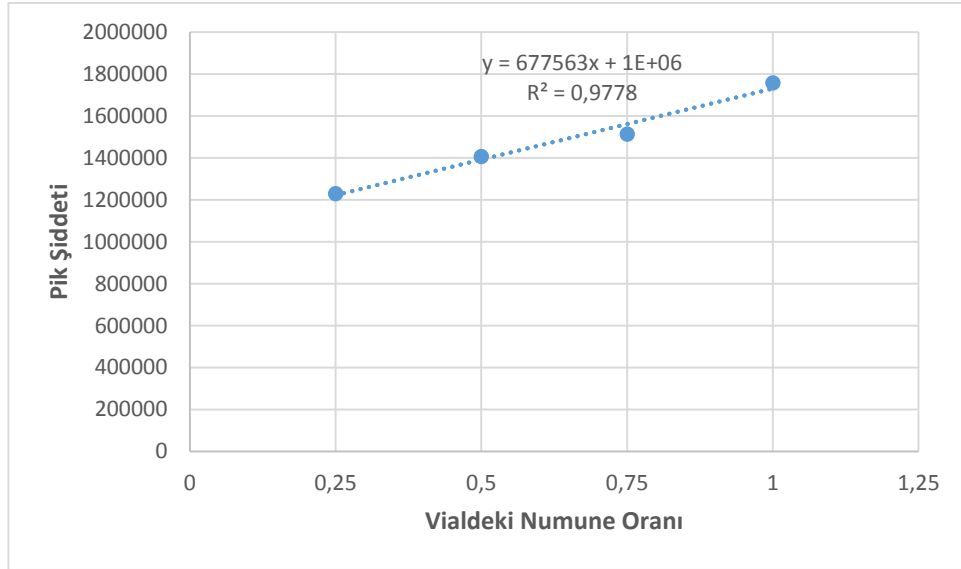
4.5.4. Doğrusallık

Bölüm 3.7.4.'te metodolojisi anlatılan regresyon analizi sonuçları validasyon çalışmaları kapsamında doğrusallık verileri olarak kullanılmıştır. Şekil 4.43. pik şiddetlerinin R^2 değerlerinden oluşturulan, olması gereken pik şiddetlerine karşılık,

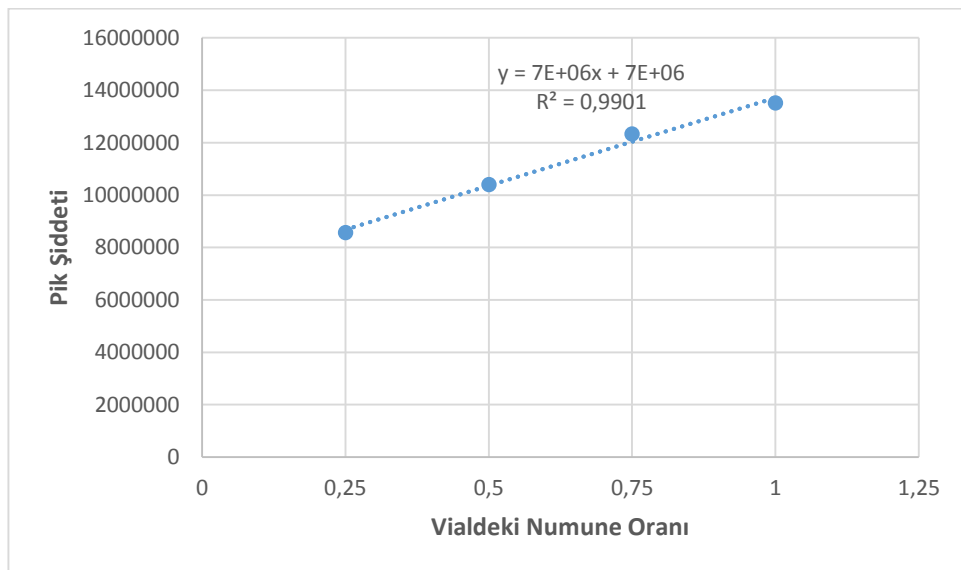
gözlenen pik şiddetleri grafiğidir. Grafikte x eksenini her pikin regresyon analizinde hazırlanan dilüsyon serisinden elde edilen (R^2) değerleri baz alınarak hesaplanan, olması beklenen pik şiddetlerini ifade eder. Y eksenini ise, bu piklerin analizde ölçülen gerçek pik şiddetleri değerleridir. Grafikteki kesikli çizgiler ise % 5 değerindeki sapma aralığını ifade etmektedir. Şekil 4.44. – 4.50. hedeflenmiş metabolomik çalışmalarında tanımlanan 6 metabolite ait doğrusallık grafikleridir.



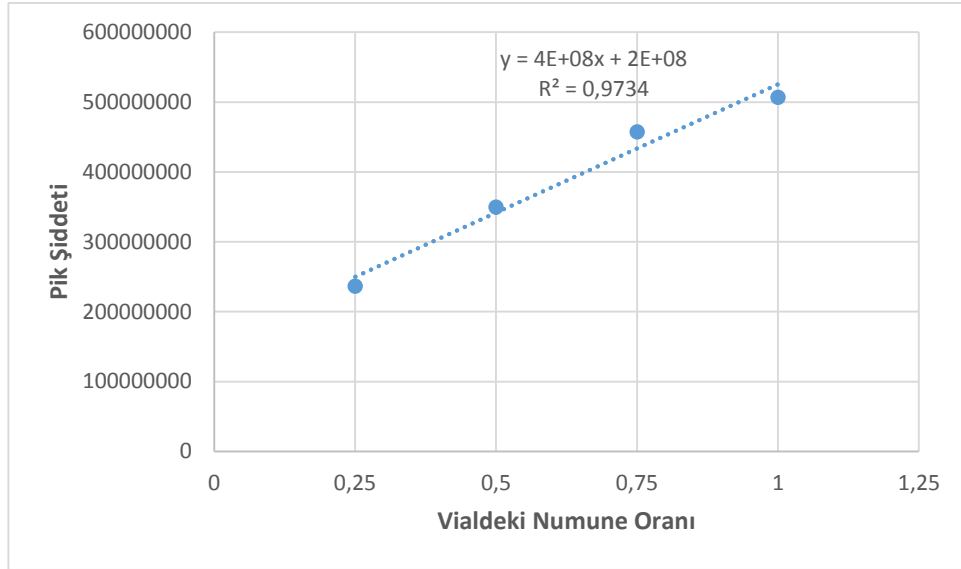
Şekil 4.43. Pik şiddetleri doğrusallık grafiği.



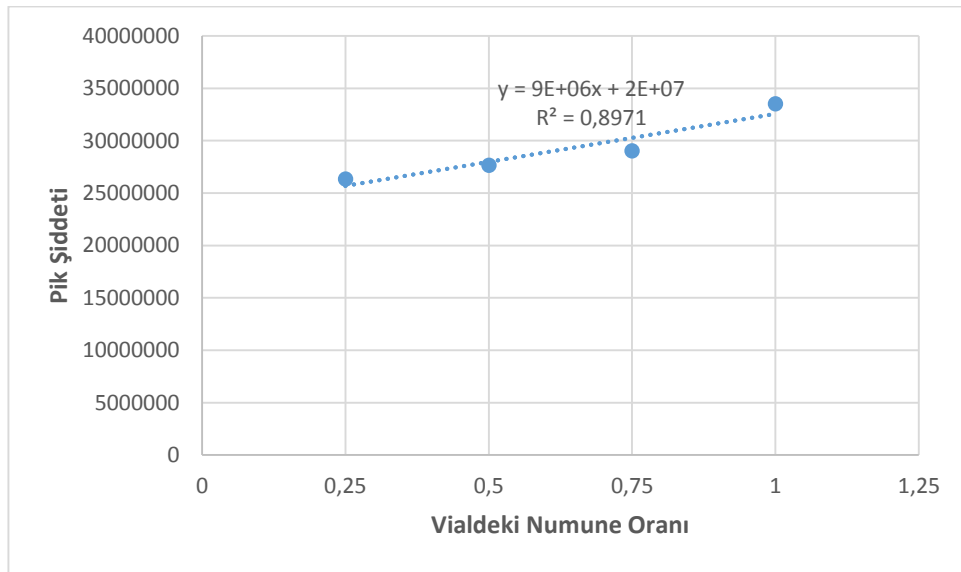
Şekil 4.44. Kreatinin metabolitine ait doğrusallık grafiği.



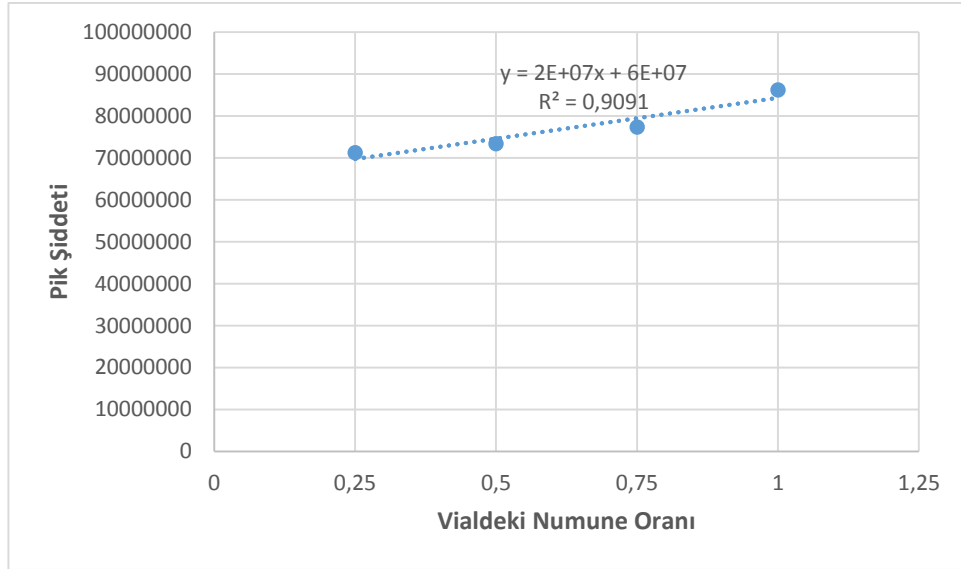
Şekil 4.45. DL-Fenilalanin metabolitine ait doğrusallık grafiği.



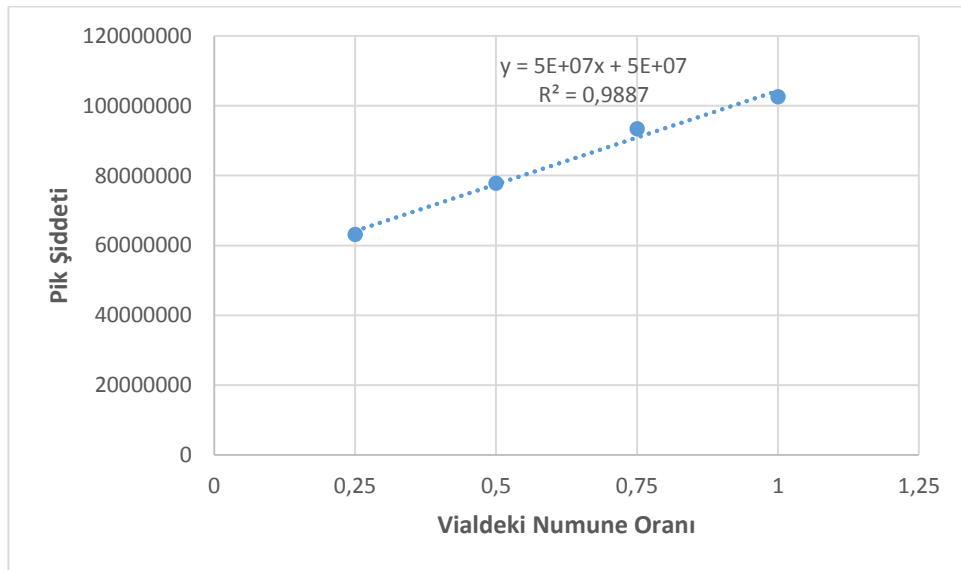
Şekil 4.46. Betain metabolitine ait doğrusallık grafiği.



Şekil 4.47. L-Histidin metabolitine ait doğrusallık grafiği.



Şekil 4.48. L-Arginin metabolitine ait doğrusallık grafiği.



Şekil 4.49. Oksindol metabolitine ait doğrusallık grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Klinik metabolomik çalışmalar, çalışmanın başlangıcında kurulan hipotezler etrafında şekillenirler. Çalışmalar boyunca analitik veriler biyoinformatik verilere, biyoinformatik veriler ise biyolojik bilgilere dönüştürülür. Çalışma sonunda elde edilen biyolojik bilgi sayesinde, çalışmanın başında kurulan hipotezin geçerliliği değerlendirilebilir hale gelir. Bu çalışmada başlangıçta; ‘birbirinden farklı iki hastalık durumunda, metabolizmada gerçekleşen değişimler de farklı olmalıdır. Buna paralel olarak malign nedene bağlı bir hastalık sonucu oluşan assit sıvısı ile malign nedene bağlı olmayan bir hastalık sonucu oluşan assit sıvısı arasında metabolom düzeyinde farklılıklar olması gerekir’ hipotezi etrafında kurulmuş ve bu farklılığı ortaya çıkarmayı hedeflemiştir.

Assit sıvısı hastalık sonucu oluşan patolojik bir sıvıdır. Doğrudan hastalık sonucu oluşmuş olması sebebiyle, hastalıklarla alakalı biyomoleküllerin bulunma olasılığı fazladır. Buna rağmen klasik patolojik ve morfolojik yöntemler için assit sıvısının kullanımı sınırlıdır. Assit sıvısında metabolom düzeyinde farklılıkları gözlemlemek ve tanımlamak yeni tanı, teşhis ve tedavi yöntemlerinin doğmasına sebebiyet verebilecektir. Bu amaçla bu tez kapsamında assit sıvısında metabolomik analizler yapmak amacıyla yöntem geliştirme, metabolit profillemeye ve hedeflenmiş metabolomik olmak üzere üç ana bölüm için deneysel çalışmalar yapılmıştır.

5.1. Yöntem Geliştirme Çalışmaları

Yöntem geliştirme çalışmaları, tez kapsamında gerçekleştirilen ilk deneysel kısımdır. Bu çalışmalarda amaç mümkün olan en çok metabolit sayısına ulaşabilmek ve böylece çalışmaların diğer bölümlerinde uygulanacak analitik yöntemi belirlemektir. Metabolomik çalışmalar için halihazırda evrensel bir analitik prosedür yoktur. Kaldı ki assit sıvısından LC/MS yöntemi ile yapılmış bir hasta-kontrol çalışması da kaynaklarda bulunmamıştır, yani referans olarak kullanılacak bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple bu çalışmanın ilk basamağı olarak optimum verim alınabilecek bir analitik yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Analitik yöntem basamağında hedef optimum verim elde edilebilecek bir analitik yöntem oluşturabilmektir. Optimum verim tanımı bu tez kapsamında yöntem

geliştirme aşaması için mümkün olan en çok metaboliti aynı anda analiz edebilmek olarak tanımlanmıştır. Yöntem geliştirme basamağında ultrafiltrasyon tekniği ve metanolla çöktürme olmak üzere iki farklı numune hazırlama tekniği, HILIC ve C18 olmak üzere iki farklı kromatografik kolon, pozitif ve negatif MS modları olmak üzere iki farklı MS modu denenmiştir. Yöntemleri birbiri arasında karşılaştırırken baz alınan veri, yöntem sonunda en fazla kaç pik elde edilebildiği olmuştur. En fazla pik sayısı tek başına değerli bir veri olarak görünmeyebilir, çünkü bu piklerin ne kadar anlamlı olduğu bilinmemektedir. Ayrıca düşük sayıda pik veren bir yöntemde, spesifik bir metabolit için en iyi yöntem olabilir. Yani hastalık için önemli olarak bulunabilecek ve sadece o yöntemle analiz edilebilecek bir metabolit, pik sayısının azlığı sebebiyle gözden kaçabilir. Bunlar olası olmakla beraber, iki yöntemi birbiri ile karşılaştırmak için de bir parametre gereklidir ve olası en sağlıklı parametrenin pik sayıları üzerinden olabileceği düşünülmüştür. En nihayetinde en fazla pik sayısı gösteren yöntemde en fazla metaboliti bulmak daha olasıdır ve en fazla metabolitin olduğu durumda da önemli metabolitlerin gözden kaçma ihtimali azalmaktadır. Bu sebeple yöntem geliştirme basamağının performansı temel olarak pik sayılarının karşılaştırılması ile ölçülmüştür.

Yöntem geliştirme basamağında, denenen metod dışında kalan parametreler sabit tutulmuştur. Bu sayede gözlenen değişimin sadece denenen metoda ait olması hedeflenmiştir. Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisine ait cihaz parametreleri değiştirilmemiş, sadece HILIC ve C18 kolon denemeleri için gerekli tampon çözeltiler ve gradient elüsyon programı değiştirilmiştir. Şekiller 4.1. – 4.8. yöntem geliştirme basamağındaki metodların temel pik kromatogramları olarak sunulmuştur.

Ultrafiltrasyon yöntemi ve metanolla çöktürme yöntemlerinin denendiği numune hazırlama basamağında, sonuçları Tablo 4.1.'den de görüleceği üzere ultrafiltrasyon yöntemi ile hazırlanan numunelerde, metanolla çöktürme yöntemi ile hazırlanan yönteme göre her iki kolon ve MS modunda da daha fazla pik sayısı gözlenmiştir. 4 yöntemin 4'ünde de ultrafiltrasyon pikleri sayısı metanolla çöktürme yöntemine göre fazla iken toplamda ise ultrafiltrasyon numunelerinde 1235 pike ulaşmıştır. Metanolla çöktürme yönteminde dört yöntemde bulunan toplam pik sayısı ise 924'tür. Metabolit ekstraksiyonu için denenen iki yöntemden ilki olan ultrafiltrasyon yöntemi, esasında proteomik çalışmalar için geliştirilen ultrafiltrasyon

kartuşun, metabolomik çalışmalar için uyarlanmasıdır. Yöntem geleneksel metanolle çöktürme yöntemine göre daha iyi sonuçlar vermiş ve çalışmanın geri kalanı bu yöntem üzerinden devam etmiştir.

Farklı kolon denemeleri kapsamında HILIC kolon ve C18 kolonlar karşılaştırılmıştır. İki farklı numune hazırlama tekniği ve iki farklı MS modunda denenen kolonlarda Tablo 4.1.'de verilen sonuçlarda görülebileceği üzere, HILIC kolon 4 yöntemde de C18 kolona göre daha fazla pik sayısı göstermiştir. 4 yöntemin toplamında HILIC kolonda 1581 pik bulunurken C18 kolonda bu sayı 578'te kalmıştır. Aradaki 3 kata yakınlık fark, yöntemimiz için HILIC kolonun daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Kromatografik kolon denemelerinde, C18 kolon ve HILIC kolon arasındaki performans farkı numunenin yapısından kaynaklı olmalıdır. Bu çalışmada HILIC kolonun daha iyi sonuçlar vermesi, numune matriksinin HILIC kolona daha uygun olan polar metabolitler açısından zengin olduğunun göstergesidir.

Pozitif ve negatif MS modlarının denendiği aşamada ise Tablo 4.1.'deki sonuçlardan görülebileceği üzere pozitif mod MS, 4 yöntemde de negatif moda üstünlük sağlamıştır. Metabolitlerin hangi yükte iyonlaşacağını çalışma öncesi kestirmek güçtür; ancak çoğunluğunun pozitif modda daha kolay iyonlaştığı bilinmektedir. Toplamda pozitif modda bulunan pik sayısı 1420 iken, negatif modda bulunan pik sayısı ise 739'tur.

Bu sonuçlar kapsamında metabolit profillemeye ve hedeflenmiş metabolomik çalışmaları için, Tablo 4.1.'den de görülebileceği üzere ultrafiltrasyon numune hazırlama yöntemi, HILIC kolon ve pozitif MS modu 519 pik ile optimum pik sayısını veren yöntem olmuştur. Çalışmanın geri kalanında metabolit profillemeye ve hedeflenmiş analizler bu yöntem üzerinden yürütülmüştür.

5.2. Metabolit Profillemeye Çalışmaları

Metabolit profillemeye çalışmaları Bölüm 5.1.'de açıklandığı üzere geliştirilen ultrafiltrasyon tekniği, HILIC kolon ve pozitif mod MS çalışmaları ile yürütülmüştür.

Metabolit profillemeye çalışmalarında deneysel kısımda analitik yöntemin performansını takip etmek amacıyla çeşitli yaklaşımlarda bulunulmuştur. Bu yaklaşımlardan ilki kalite kontrol numuneleri aracılığı ile LC/MS cihazının

performansını ve tekrar edilebilirliğini takip etmek olmuştur. İçeriği Tablo 3.7.'de verilen kalite kontrol numunelerinin her analiz bloğunda, yani hazırlanıp enjeksiyon yapılmak üzere cihaza yerleştirilen her numune setinde, numune analizi başlamadan 3 kere, ardından her 6 numunede bir ve en son olarak da numune analizi bittiğinde 3 kere olmak üzere periyodik olarak enjeksiyonu yapılmıştır. Kalite kontrol numuneleri günlük olarak takip edilmiş ve -eğer varsa- sonuçlarında tutarsızlık gösteren kalite kontrol numunelerinden başlayarak diğer örneklerin tekrar olarak enjeksiyonu yapılmıştır. Şekil 4.9.'da kalite kontrol numunelerine ait temel pik kromatogramı sunulmuştur. Çalışmalarda uygulanan ikinci yaklaşım ise hazırlanan numunelere iç standart maddesi eklenerek, yöntemin özellikle numune hazırlama basamağında sistematik olmayan bir hataya maruz kalıp kalmadığı ölçülmeye çalışılmıştır. Şekil 4.11. de grafiği verilen enjeksiyonlar arasında pik şiddetlerinin bağıl standart sapması 0.02178 bulunmuştur. Aynı grafikte sunulan alıkonma zamanlarının standart sapması ise 0.1225 olarak bulunmuştur. Böylece iç standart olarak kullanılan daidzein maddesinin pik şiddetleri ve alıkonma zamanları incelenmiş ve enjeksiyonlar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Yöntem ayrıca sistem uygunluk testi ve validasyon çalışmaları ile doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik ve özgünlük açısından incelenmiştir.

Profilleme çalışmalarında deneysel kısmın ardından veri değerlendirme aşamaları gelmektedir. Metabolomik çalışmalar yoğun data çıktısı olan çalışmalardır, sonuçların teker teker incelenip tüm örnekleme birbiri ile eşleştirilmesi ancak bu amaçla geliştirilen yazılımlar sayesinde olabilmektedir. XCMS yazılımı da bu sebeple sonuçları değerlendirmek için kullanılmıştır. Yazılım Bölüm 2.9.5.'de açıklanan birçok parametrenin kombinasyonu ile çalışır ve bu parametreler deney koşullarına özgüdür. Bu parametreler yardımcı yazılımlar kullanılarak optimize edilir ve veriler buna göre işlenir. Yöntem geliştirme basamağında optimizasyon öncesi 519 olan pik sayısı, optimizasyon işlemi sonucunda 1071'e ulaşmıştır. Bu rakam herhangi bir istatistiksel dönüşüme uğramamış ham veri değeridir. Bu aşamada yapılan ilk pik ayıklama işlemi Bölüm 2.9.4.'de anlatılan regresyon analizi ile olmuştur. Yöntem metabolomik çalışmalarda yeni kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir ve temelde seri halinde seyreltilen numunelerin regresyon değerlerine bakarak gürültü ve kirlilik piklerinden ayrılmasını sağlamak üzerine kuruludur. Bölüm 4.2.2.'de regresyon

analizi sayesinde numuneden gelen pikler seçilmiş ve diğer pikler sonuçlardan çıkarılmıştır. Bu aşamada 1071 olan ham verilerdeki pik sayısı regresyon analizi ile 340'a düşmüştür. Şekil 4.12. pik sayılarındaki değişimi göstermek amacıyla sunulmuştur.

Metabolit profillemeye çalışmalarında ikinci işlem bu 340 pikin istatistiksel olarak karşılaştırılabilir hale getirilmesi ve böylece miktarları arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla uygulanan dönüşümler olmuştur. Bu istatistiksel dönüşümler ilk olarak pikleri normalizasyona tabi tutmak işlemi ile başlamıştır. Çoğu metabolit için kabul edilen evrensel bir derişim aralığı yoktur ve profillemeye çalışmaları iki grubu birbiri ile karşılaştıran yarı nicel çalışmalar şeklinde yürütülür. Metabolitler vücutta birbirlerinden milyon kat mertebesinde farklılık gösterebilen derişimlerde bulunabilirler. Normalizasyon işlemi sayesinde, pikler ve doğal olarak bu piklerden tespit edilecek metabolitlerin miktarları birbiri ile karşılaştırılabilir hale gelir. Şekil 4.13.'de sonuçları sunulan normalizasyon işleminde, pikler vialdeki tüm piklerin ortalamasına bölünerek normalize edilmiştir. Bir sonraki adım profillemeye işleminde kullanılan 6 adet kontrol ve 6 adet hasta grubu numunesinin temel bileşenler analizi ile birbirinden istatistiksel olarak ayrılıp ayrılmadığını kontrol etmek olmuştur. Şekil 4.14.'de görüldüğü üzere iki grubun birbirinden ayrıldığı ve kendi içlerinde kümelenmeler haline geldiği belirlenmiştir. Metabolit profillemeye çalışmalarının son aşaması ise, istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı anlamlı olarak değişen pikleri belirlemektir. İstatistiksel olarak güvenilir demek, t testi sonucu $p < 0.05$ olan, yani % 95 güven seviyesindeki pikleri, miktarı anlamlı olarak değişen pikler ise pik şiddetleri iki grup arasında en az iki kat değişen pikleri ifade etmektedir. Şekil 4.15.'de sonuçların grafiksel gösterimi ile beraber, metabolit profillemeye basamağında kullanılan 340 pikten, 141 tanesi istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı iki grup arasında en az iki kat değişen pikler olarak bulunmuştur. Tablo 4.4.'de sunulan veri bu 141 adet pikin m/z, alıkonma zamanları ve iki grup arasında miktarlarının değişimlerinden oluşmaktadır. Bu 141 pik bu çalışmanın ana hedeflerinden birisi olan 'iki grup arasında farklılık gösteren olası metabolitleri bulma' aşamasına dair ulaşılan ilk önemli veridir. Bu dönüşümler sayesinde analitik verinin biyoinformatik veriye dönüşümü sağlanmış olmaktadır. Bu 141 adet pik, HMDB metabolit veri bankasında taranmış ve olası metabolitleri içeren Tablo 4.5. ilgili bölümde sunulmuştur.

5.3. Hedeflenmiş Metabolomik Çalışmaları

Çalışmanın üçüncü aşaması, hedeflenmiş metabolomik çalışmalar yaparak profilleme basamağında bulunan istatistiksel olarak güvenilir ve miktarı en az iki kat değişen 141 pikin nitel analizini yapmak, yani bu metabolitlerin kimyasal yapılarını aydınlatmak olmuştur. Bu çalışmalar MS/MS yöntemiyle 141 piki ayrı ayrı fragmentlerine ayırmak ve MS/MS veri bankalarından eşleştirmeye çalışmak şeklinde olmuştur. Her pik 10V, 20V ve 40V olmak üzere üç farklı çarpışma enerjisine tabi tutulmuş ve fragmentlerine ayrılmıştır. Bu MS/MS işlemi ile 6 adet metabolitin yapısı tayin edilebilmiştir. Bu sayı az görünmekle beraber metabolomik çalışmalarda evrensel olarak karşılaşılan bir sorundan yani metabolit veri bankalarının henüz yeterli seviyede olmamasından kaynaklıdır. Henüz insan metabolomuna ait tüm metabolitler bile belirlenebilmiş değildir ve belirlenen metabolitlerin büyük bir kısmı için MS/MS referans değerleri bulunmamaktadır. Sonuçlar yine de değerlidir çünkü metabolit veri bankaları her geçen gün gelişmektedir ve bu durum 141 pike ait elde edilmiş MS/MS verilerinin her geçen gün yeni bir metabolitle eşleşme olasılığını güncel tutmaktadır.

Hedeflenmiş metabolomik çalışmaları kapsamında yapılan ikinci işlem tespit edilen 6 metabolitin yolak incelemeleri olmuştur. Bu metabolitlerin hastalıklarla ilişkisi araştırılmış kaynaklardaki mevcut çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu işlem ayrıca yukarıda bahsedilen biyoinformatik verinin biyolojik veriye dönüşümünü ifade etmektedir.

5.3.1. Metabolomik Yolak İncelemeleri

5.3.2. Kreatinin

Kreatinin karaciğerde sentezlenen ve kaslarda en yüksek konsantrasyonuna ulaşan bir metabolittir (108). Şekil 4.16. kreatinin maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.17. kreatinin maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.18. maddenin MS spektrumunu, Şekil 4.19. ise maddenin deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir.

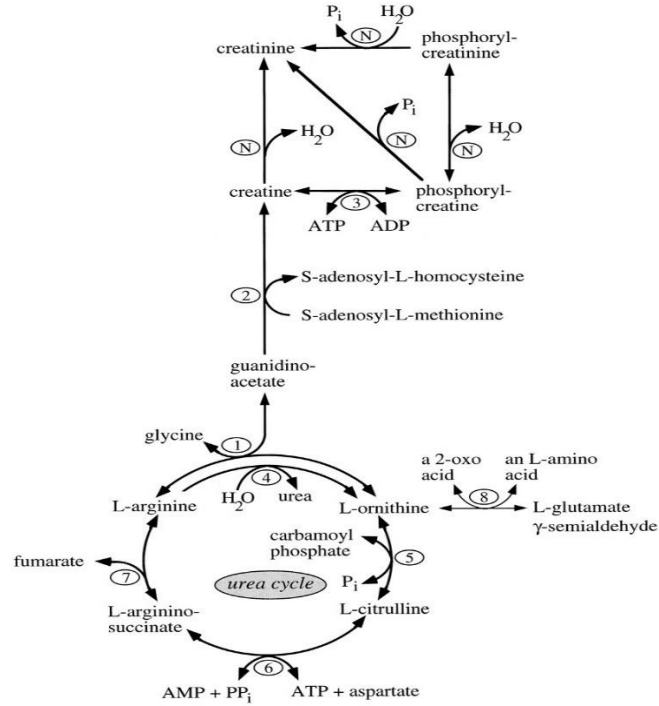
Kreatinin miktarının hastalığın tanı ve tedavi yönteminin belirlenmesinde kullanımına yönelik olarak çalışmalar mevcuttur. P. Woitas ve ark. tarafından yayınlanan çalışmasında, kreatinin miktarının siroza bağlı assiti olan hastalarda arttığını göstermiştir (109). 2004 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada ise, kreatinin miktarının, karaciğer rahatsızlıklarının belirlenmesinde kullanılması önerilmiştir (110).

“The Model for End-Stage Liver Disease (MELD)” puanı olarak bilinen karaciğer sirozunda, prognoz tayininde kullanılmak üzere bazı skorlama sisteminde kullanılan puan son dönem karaciğer hastalarında 3 aylık hayatta kalım süresinin tahmin edilmesinde ve karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların sıralanmasında kullanılır (111). Karaciğer transplantasyonu, MELD skoru 15 ve üzerinde olan hastalarda düşünülmektedir. MELD puanı serum kreatinin ve bilirubin seviyeleriyle doğrudan ilişkilidir (112). Kreatinin metabolizması Şekil 5.1.’de sunulmuştur.

Bizim çalışmamızda da, C ve T grupları arasında kreatinin miktarında yaklaşık 38 katlık bir değişim gözlenmiştir. Bu belirgin fark kreatinin assit ayırıcı tanı’da kullanımına dair kaynaklardaki ilk sonuçtur. Plazma kreatinin miktarı yanı sıra assit sıvısı içerisinde bulunan kreatinin miktarı da assit sıvısının kriptojenik siroz ile ilişkisini ortaya koymaktadır.

Dikkat çekici bir diğer veri ise pankreas kanseri ile kreatinin metabolizması arasındaki ilişkiye dair çalışmaların son yıllarda artmış olmasıdır (113, 114). OuYang ve ark. Tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada kreatinin serum düzeyinin pankreas kanserli hastalarda sağlıklılara göre arttığı bildirilmiştir (115). Bu artışa rağmen kriptojenik sirozlu hastalarda pankreas kanserli hastalara göre assit kreatinin düzeyi neredeyse 38 kat daha fazladır. Bu durum da kreatininin kriptojenik siroz için seçici bir marker olduğuna işaret niteliğindedir.

İşin bir diğer tarafı ise kreatinin metabolik yolağında (Şekil 5.1.) görülen L-arginin miktarındaki bir farklılaşmanın, kreatinin miktarı üzerine etkisidir. Kreatinin metabolik yolağındaki değişimin assit ayırıcı tanısındaki bir diğer dayanağı ise arginin miktarındaki değişimdir. Bu durum Bölüm 5.3.6.’da daha ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.



Şekil 5.1. Kreatinin metabolizması.

5.3.3. DL-Fenilalanin

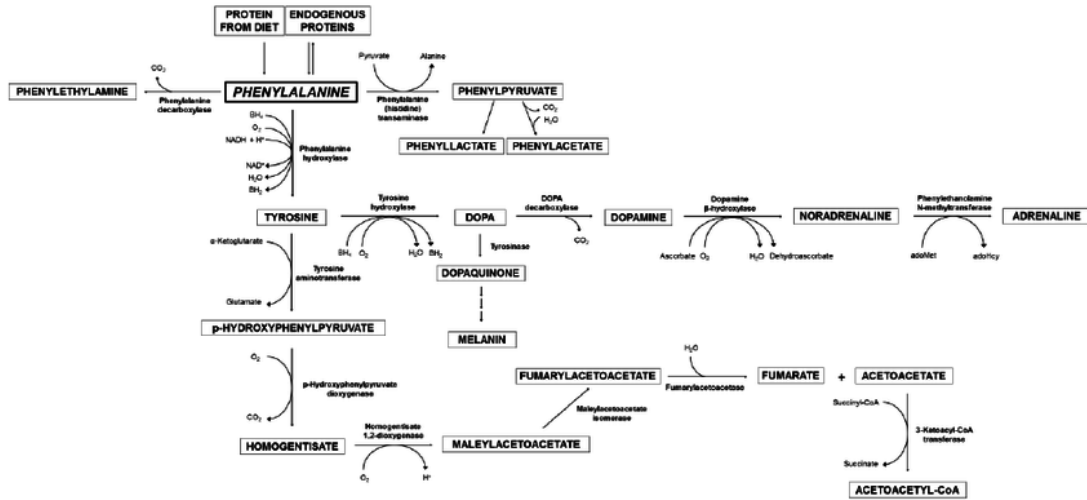
DL-Fenilalanin metaboliti, proteinlerin yapı taşı olarak vücutta üretilen bir maddedir (116). Parkinson ve depresyon hastalıkları tedavisinde, ayrıca ağrı kesici etkisi üzerine çalışmalar yayınlanmıştır (117). Şekil 4.20. DL-Fenilalanin maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.21. DL-Fenilalanin maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.22. maddenin MS spektrumunu, Şekil 4.23. ise maddenin deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir.

2006 yılında yayımlanan, Ranjan P. ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada karaciğer yaralanmalarında kan serumundaki DL-Fenilalanin miktarı sağlıklı bireylerle karşılaştırılmış ve karaciğer yaralanması geçiren hastalarda DL-Fenilalanin tespit edilirken, sağlıklı bireylerde tespit edilememiştir (118). 2010 yılında Tessari P. ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise siroz hastalarında DL-Fenilalanin ve Tirosin maddesi arasındaki etkileşimler incelenmiş ve DL-Fenilalanin ile Tirosin maddesinin miktarının korele olduğu çıkarımı yapılmıştır (119). Şekil 5.2.'deki metabolik yolakta da görüleceği üzere DL-Fenilalanin maddesi vücutta Tirosin maddesine

dönüşmektedir. Yine 2008 yılına ait bir başka çalışmada DL-Fenilalanin maddesinin siroz hastalarında miktarının arttığı tespit edilmiştir (120). Kaynaklarda benzer çok sayıda çalışma mevcut olup, DL-Fenilalanin miktarını asit sıvısı üzerinden birbiriyle karşılaştıran bir çalışma bulunamamıştır.

Bizim çalışmamızda da, kaynaklara paralel olarak, en yüksek miktarı kriptojenik siroz hastalarında görülmekle birlikte, malign grubu ile 2.25 katlık bir değişim gözlenmiştir.

Ayrıca eklemek gerekir ki, DL-Fenilalanin maddesi doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve besin yoluyla da vücuda girmektedir (120). Hastalığın evrelerine göre artış hızının değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (121). Bu değişkenler de göz önüne alınarak beslenme türleri ve hastalık evrelerini de inceleyen bir çalışma ile bulguların ilerletilmesi gerekmektedir.



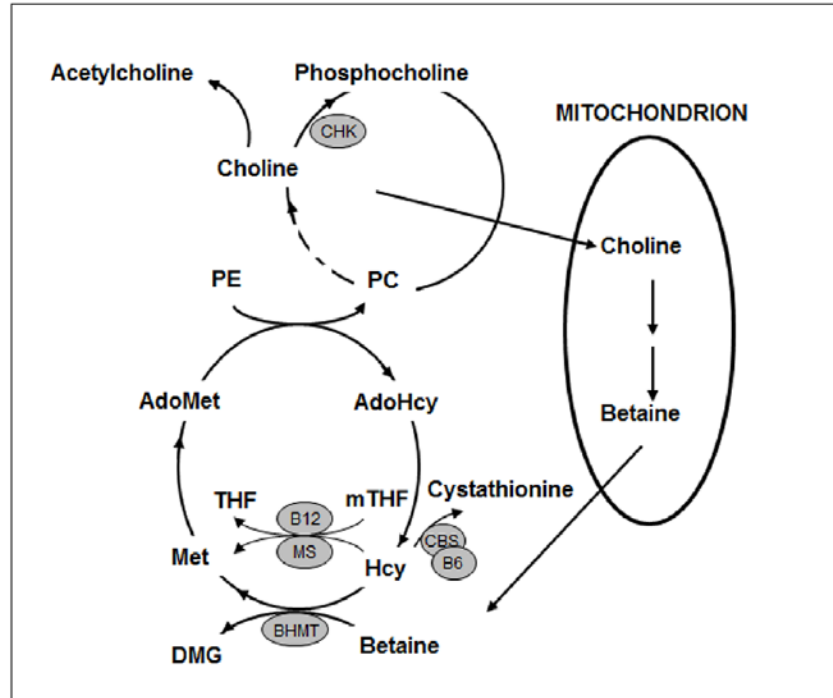
Şekil 5.2. DL-Fenilalanin metabolizması.

5.3.4. Betain

Betain metabolitinin, vücutta gerçekleşen trans-metillemeye reaksiyonlarında rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (116). Şekil 4.24. betain maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.25. betain maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.26. maddenin MS spektrumunu, Şekil 4.27. ise maddenin deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir.

Kaynaklarda dikkat çeken çalışmalardan birisi, 2010 yılında Ji Cheng ve arkadaşları tarafından yayımlanan makaledir (122). Buna göre kandaki betain miktarı ile bizim çalışmamızda da bahsedilen kreatinin miktarının oranının, bazı karaciğer rahatsızlıklarında belirteç olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmadır. 2000 yılında yayımlanan bir başka çalışmada ise betain maddesinin miktarının karaciğer rahatsızlıkları tedavisinde umut verici sonuçları gözlenmiştir (123).

Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasında betain miktarında 8 kattan fazla bir farklılaşma tespit edilmiştir. Bu 8 kartlık fark betain maddesinin asit ayırıcı tanı da kullanılabilmesine dair önemli bir işarettir.



Şekil 5.3. Betain metabolizması.

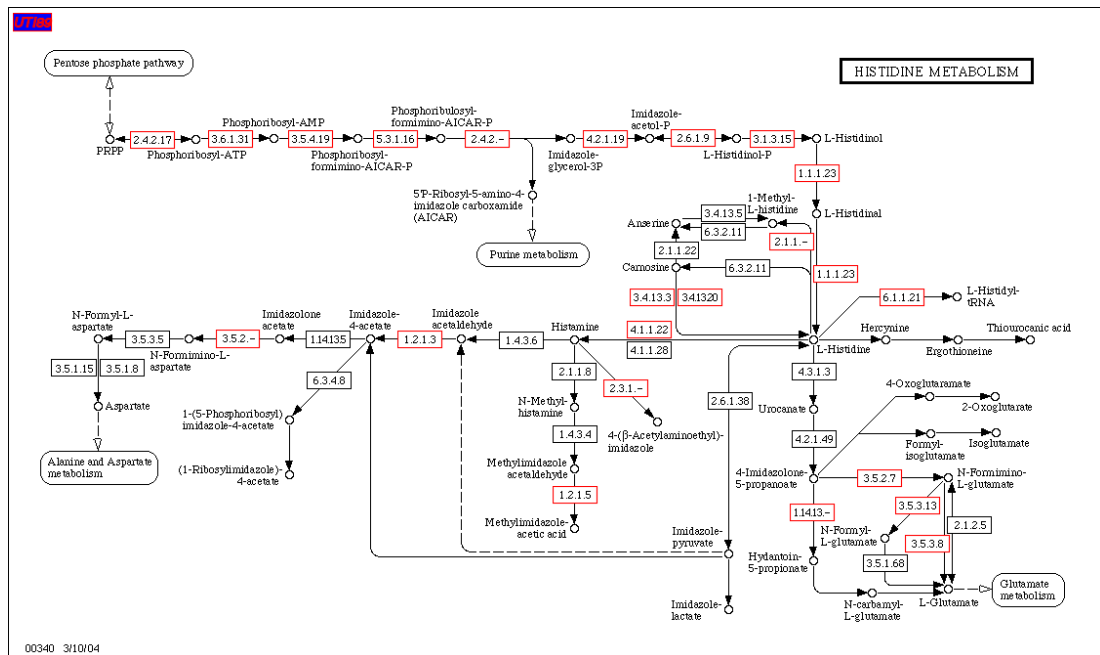
5.3.5. L-Histidin

Histidin, doğada en yaygın olarak bulunan aminoasitlerden birisidir (124). Histidin vücutta birden çok yolla etkilidir ve ayrıca besin yoluyla dışardan da alınmaktadır. Şekil 4.28. histidin maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.29. histidin maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.30. maddenin MS spektrumunu, Şekil 4.31. ise maddenin

deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir.

Kaynaklarda, karaciğerde histidince zengin glikoproteinlerin oluşumunun artmasına paralel olarak, siroz hastalarında histidin miktarının azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (125). Bizim çalışmamızda da bahsolunan kreatinin maddesiyle birlikte protein oluşumuna katılarak, siroz hastalarında histidin miktarında düşüş olduğunu gösteren çalışma dikkat çekicidir (126).

Kaynaklarda asit sıvılarındaki histidin miktarı üzerinden bir karşılaştırma bulunamamıştır. Çalışmalar sağlıklı bireylerle karşılaştırmaların üzerinedir. Bizim çalışmamızda da hasta ve kontrol grupları arasındaki yaklaşık 2.5 katlık fark L-Histidin maddesinin asit ayırıcı tanı da kullanımı için umut vadetmektedir.



Şekil 5.4. Histidin metabolizması.

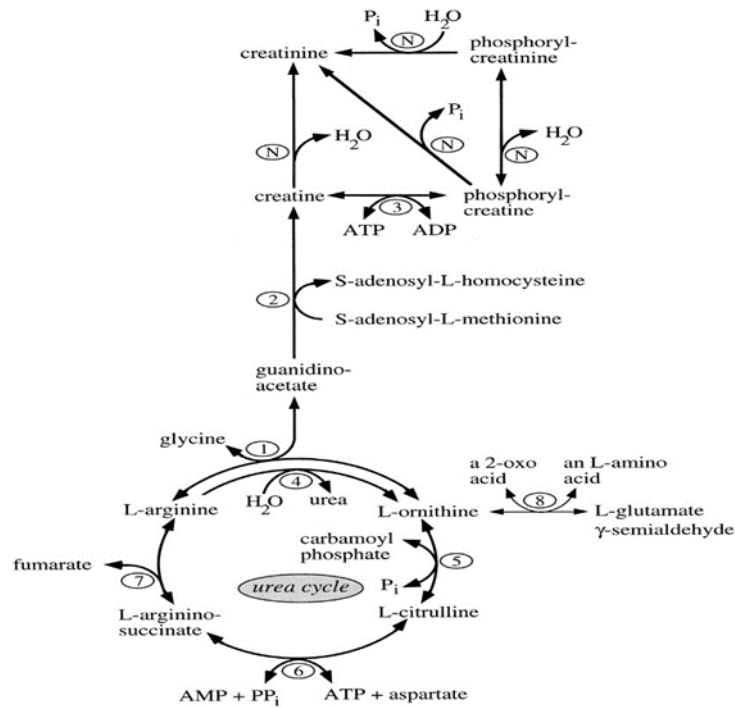
5.3.6. L-Arginin

Arginin doğada yaygın olarak bulunan aminoasitlerdendir ve vücutta birden fazla yolakta aktif olarak bulunmaktadır (127). Şekil 4.32. arginin maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.33. arginin maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.34. maddenin

MS spektrumunu, Şekil 4.35. ise maddenin deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir.

Arginin maddesinin karaciğer hastalıklarındaki rolü üzerine yapılan bir araştırmada, kreatinin maddesinin miktarıyla ilişkili olduğunu gösteren bulgular yayınlanmıştır (127). Bizim çalışmamızda da Şekil 5.1'de verilen Kreatinin metabolizmasında, kreatinin üretimine katılmaktadır. Tablo 4.10.'da verilen sonuçlara uyumlu olarak kreatinin miktarındaki artış ile arginin miktarındaki azalış birbiriyle ilintilidir.

Kaynaklarda bu bağlantıyı assit sıvısı numunelerinde gösteren bir yayın yoktur, mevcut yayınlar üre veya kan serumu numunelerinde çalışılmıştır. Bu çalışma bu anlamıyla bir ilktir.



Şekil 5.5. L-Arginin metabolizması.

5.3.7. Oksindol

Oksindol karaciğerde üretilen ve fazlası kas ve tansiyon bozukluklarına sebep olan bir metabolittir (128). Doğrudan karaciğerde üretiliyor olması dolayısıyla oksindol maddesi bu çalışmada bu anlamıyla ayrı bir önem teşkil etmektedir. Şekil 4.36. oksindol maddesinin kimyasal yapısını göstermektedir. Şekil 4.37. oksindol

maddesinin tüm örneklerdeki ayrılmış iyon kromatogramlarını gösteren XCMS çıktısıdır. Şekil 4.38. maddenin MS spektrumunu, Şekil 4.39. ise maddenin deneysel ve veri bankalarındaki MS/MS spektrumlarının karşılaştırılmasını göstermektedir. 1998 yılında yayınlanan bir araştırmada sirozlu hastalarda, sağlıklı bireylere göre miktarının arttığı tespit edilmiştir (129). Yine 2010 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada benzer sonuçlar vermiştir (130). Bizim çalışmamızda da oksindol miktarı 4 kata kadar ulaşan farklılaşma göstermiştir.

5.4. Validasyon Çalışmaları

5.4.1. Özgünlük

Özgünlük çalışmaları kapsamında yapılan hareketli faz enjeksiyonu numune hariç bütün kimyasalları içermektedir. Bu hareketli faz enjeksiyonları 'kör çözelti' olarak kullanılmıştır. Şekil 4.40. kör çözelti ve numune enjeksiyonlarının temel pik kromatogramlarını göstermektedir. Hareketli faz enjeksiyonu Bölüm 3.3.'de anlatılan metabolit profillemeye basamağında ilk üç ve son üç enjeksiyon olacak şekilde cihaza verilmiştir. Yöntemde kullanılan XCMS kodu ile bu kör çözeltiler veri analizine tabi tutulmuştur. Bu sonuçlar Tablo 4.4.'de verilen numune sonuçları ile karşılaştırılmış ve numune sonuçlarında olan herhangi bir pikin, kör çözeltide görülmediği bulunmuştur. Bu sonuç kör çözeltiden analize girişim olmadığını ve bulunan piklerin numuneden geldiğini göstermiştir.

5.4.2. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu hesaplamak amacıyla, iç standart olarak kullanılan daidzein metabolitinin deneysel olarak bulunan m/z değeri ile, teorik m/z değeri birbiri ile karşılaştırılmıştır. İki değer arasında yüzde bağıl hata hesabının yapıldığı çalışmada, en yüksek hata değeri yaklaşık onbinde altı gibi bir değer olmuştur (Tablo 4.13.). Bu değer en fazla 6 ppm'lik bir sapmayla ölçüm yapıldığını göstermektedir. Tablo 4.5.'de verilen HMDB taramasını 10 ppm hata payı çerçevesinde yapılmıştır ve bulunan en büyük sapma değeri 6 ppm ile bu değer içindedir. Bu sonuçlar yöntemimizin doğruluk derecesinin, metabolomik çalışmalar için yeterli olduğu sonucunu çıkartmaktadır.

5.4.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğini incelemek amacıyla piklerin alıkonma zamanları ve m/z değerleri olmak üzere iki farklı parametreye bakılmıştır. Bu amaçla, Tablo 4.4.'de verilen, miktarı anlamlı olarak değişen pikler listesinde bulunan metabolitlerin, tüm örnekleme'deki alıkonma zamanları ve m/z değerleri arasındaki bağıl standart sapma sonuçları Şekil 4.41. ve 4.42.'de incelenmiştir. Bu sonuçlar alıkonma zamanları için en yüksek değer 0.35 ve m/z değerleri için en yüksek değer 5 ppm olarak bulunmuştur.

5.4.4. Doğrusallık

Doğrusallık verileri regresyon analizi için de kullanılan ve Bölüm 3.3.3.'de anlatılan dilüsyon serisi yöntemi ve göre azalan derişimlerde hazırlanan viallerdeki analiz sonuçları baz alınarak yapılmıştır. Şekil 4.43. R^2 değerlerinden yola çıkarak oluşturulan, olması gereken pik şiddetlerine karşılık, gözlenen pik şiddetlerinin logaritmik dönüşüm grafiğidir. Doğrusallık için belirlenen $r > 0.90$ 'lık değer grafikte kesik çizgilerle ifade edilmiştir. Buna göre Tablo 4.4.'de verilen ve metabolit profilleme basamağı için kullanılan piklerin tamamı bu değer'in içinde doğrusallık göstermiştir. Şekil 4.44 – 4.50.'de hedeflenmiş metabolomik basamağında tanımlanan 6 metabolitin doğrusallık grafikleri verilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması iki farklı hastalık grubundan alınan assit sıvısından LC/MS yöntemiyle metabolomik çalışmalar yapılarak, assit ayırıcı tanıda kullanılmak üzere iki grup arasında metabolom düzeyinde farklılıkları bulmayı hedeflemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, iki grup arasında 141 adet pikin istatistiksel olarak güvenilir ve miktarında anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, farklı hastalıklar sonucu oluşan assit sıvısında, metabolom düzeyinde farklılıklar olduğu ve bu farklılıkların tez kapsamında geliştirilen yöntemle tespit edilebileceğini göstermektedir.

Kaynaklarda assit sıvısını kullanarak farklı hastalıkları metabolom düzeyinde karşılaştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışma bu açıdan özgün niteliktedir.

Hedeflenmiş metabolomik çalışmaları kapsamında 6 adet metabolitin yapısı belirlenmiştir. Kaynaklarda bu metabolitlerin sağlıklı bireylerle farklı vücut sıvılarından miktarlarını karşılaştıran çalışmalar olmakla beraber, assit sıvısından farklı hastalıklar üzerinden karşılaştıran bir çalışma bulunamamıştır. Kreatinin, DL-Fenilalanin, Betain, L-Histidin, L-Arginin ve Oksindol metabolitlerinin malign hastalık sonucu oluşan assit sıvısı ile malign olmayan hastalık sonucu oluşum gösteren assit sıvıları arasındaki miktar değişimlerinin belirlenmesi ilk olarak bu çalışma sonuçlarıyla ortaya konulmaktadır.

Yöntem geliştirme çalışmaları sırasında farklı numune hazırlama teknikleri, farklı kromatografi kolonu denemeleri ve farklı MS modları denenmiştir. Çalışmada en iyi sonuçları veren ultrafiltrasyon, HILIC kolon ve pozitif MS modları, numunede bulunan metabolitlerin çoğunluğunun daha polar yapıda metabolitler olduğu sonucunu göstermektedir. Ultrafiltrasyon ve HILIC kolonlar polar maddelerde daha iyi performans göstermektedir, buna karşılık metanolle çöktürme ve C18 kolonlar daha apolar maddeler için uygundur, pik sayılarındaki farklılığın temel sebebi bu olmalıdır. Metabolomik analizlerde daha fazla sayıda metaboliti aynı anda analiz edebilmek için metabolit ekstraksiyonu yöntemlerinde, metabolitleri alt gruplara ayırıp değişik fazlar şeklinde toplamak ve buna göre enjeksiyonlar yapmak verimi daha da arttırabilecektir.

Çalışma sonunda ulaşılan sonuçlar umut verici olmakla birlikte, kesin değildir. Tanımlanan metabolitlerin özellikle daha geniş sayılı örneklerde tekrarlanabilir sonuçlar vermesi gerekir. Bu sonuçların daha anlamlı bir değer olması ancak değişik yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıklarına sahip hastalardan oluşacak büyük ölçekli örneklerde tekrarlanabilir olması halinde olacaktır.

Assit sıvısı başlı başına hastalık sonucu oluşan patolojik bir sıvı olması sebebiyle, referans olarak kullanılan kontrol grubu hastaları da sirozlu hastalardan oluşturulmuştur. Aslında bu anlamda kontrol grubu da tam anlamıyla bir kontrol grubu değildir ve çalışma iki hastalık durumunu karşılaştırma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Assit sıvısı daha birçok hastalık sonucu oluşabilmektedir, ileride diğer hastalıklardan oluşturulan gruplarla da bu çalışmalar genişletilmeli ve diğer hastalık gruplarıyla birlikte sonuçlar tekrar değerlendirilmelidir.

Potansiyel biyobelirteç olarak belirlenen metabolitler henüz biyobelirteç sayılabilecek kadar sağlam verilerle desteklenmemiştir. Bu metabolitlerin görev aldığı yollarda bulunan metabolitlere özel çalışmalarla diğer metabolitlerin miktarlarındaki değişimler de takip edilmelidir. Ayrıca gerekli metabolit standartları temin edilerek, bu metabolitlerin assit sıvısındaki kesin derişimleri hesaplanmalıdır. Bu metabolitlerin plazma, üre gibi diğer vücut sıvılarında da benzer sonuçlar verip vermediği karşılaştırılabilir.

Bunun gibi bir çok biyobelirteç testini başarıyla geçebilen bir veya daha fazla metabolit olması durumunda, bu metabolitlerin analizi için geliştirilecek özel biyosensörler geliştirilebilir. Bu sensörlerin günlük kullanım amacıyla geliştirilen kitleri ile tanı ve teşhis uygulamaları yapılabilir, hastalığın seyri takip edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
2. Bentley DR. The Human Genome Project-an overview. *Medicinal research reviews*. 2000;20(3):189-96.
3. Jones P. Bioinformatics in the post-genomic age. *World Patent Information*. 2001;23(4):349-54.
4. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science*. 2002;25(5560):1662-4.
5. Başaran E, Aras S, Cansaran-Duman D. Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış Ve Uygulama Alanları. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*.85.
6. Griffiths W, Karu K, Hornshaw M, Woffendin G, Wang Y. Metabolomics and metabolite profiling: past heroes and future developments. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2007;13(1):45-50.
7. Becker S, Kortz L, Helmschrodt C, Ceglarek U. LC–MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *Journal of Chromatography B*. 2012;883:68-75.
8. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner HP. Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(32):5426-45.
9. Venter JC. A part of the human genome sequence. *Science*. vol. 299, no. 5610, 2003, p. 1183
10. Xiao JF, Varghese RS, Zhou B, Nezami Ranjbar MR, Zhao Y, Tsai T-H, et al. LC–MS based serum metabolomics for identification of hepatocellular carcinoma biomarkers in Egyptian cohort. *Journal of proteome research*. 2012;11(12):5914-23.
11. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Resson HW. LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*. 2012;8(2):470-81.
12. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(6):463.
13. BRCA SG. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266:7.
14. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going. *The Journal of urology*. 1999;162(2):293-306.
15. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):263.
16. Pedersen JS, Bendtsen F, Møller S. Management of cirrhotic ascites. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2015;6(3):124-37.
17. Raterink R-J, Lindenburg PW, Vreeken RJ, Ramautar R, Hankemeier T. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass

- spectrometry-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014;61:157-67.
18. Resson HW, Xiao JF, Tuli L, Varghese RS, Zhou B, Tsai T-H, et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Analytica chimica acta*. 2012;743:90-100.
 19. Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K, Tobar M, Matsushita N, Kogiso T, et al. Serum metabolomic profile and potential biomarkers for severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*. 2013;48(12):1392-400.
 20. Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet J-C, Beaugrand M, et al. Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *Journal of proteome research*. 2011;10(7):3239-45.
 21. Cao H, Huang H, Xu W, Chen D, Yu J, Li J, et al. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2011;691(1):68-75.
 22. Amathieu R, Triba MN, Nahon P, Bouchemal N, Kamoun W, Haouache H, et al. Serum ¹H-NMR metabolomic fingerprints of acute-on-chronic liver failure in intensive care unit patients with alcoholic cirrhosis. *PloS one*. 2014;9(2):e89230.
 23. Lederberg J. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words 2001 [Accessed from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/13313/title/-Ome-Sweet--Omics---A-Genealogical-Treasury-of-Words>]
 24. Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*. 2002;48(1-2):155-71.
 25. Rieder MJ, Uetrecht J, Shear NH, Cannon M, Miller M, Spielberg SP. Diagnosis of sulfonamide hypersensitivity reactions by in-vitro rechallenge with hydroxylamine metabolites. *Annals of Internal Medicine*. 1989;110(4):286-9.
 26. Van der Greef J, Smilde AK. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future. *Journal of Chemometrics*. 2005;19(5- 7):376-86.
 27. Institute UoTB, Research CFf. Individual Metabolic Patterns and Human Disease: An Exploratory Study Utilizing Predominantly Paper Chromatographic Methods, from the Biochemical Institute and the Dept. of Chemistry, the University of Texas, and the Clayton Foundation for Research, Austin: University of Texas; 1951.
 28. Gates SC, Sweeley CC. Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clinical chemistry*. 1978;24(10):1663-73.
 29. Horning EC, Horning M-G. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical chemistry*. 1971;17(8):802-9.

30. Games DE, Alcock NJ, van der Greef J, Nyssen LM, Maarse H, Ten MC, et al. Analysis of pepper and capsicum oleoresins by high-performance liquid chromatography—mass spectrometry and field desorption mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1984;294:269-79.
31. Bell JD, Brown JC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids. *NMR in Biomedicine*. 1989;2(5- 6):246-56.
32. Plumb R, Castro- Perez J, Granger J, Joncour K, Wright A. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole- orthogonal time-of- flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004;18(19):2331-7.
33. Soga T, Heiger DN. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2000;72(6):1236-41.
34. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: metabonomics. *Nature*. 2008;455(7216):1054-6.
35. Schmidt CW. Metabolomics: what's happening downstream of DNA. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(7):A410.
36. Differential Effects on Homozygous Twin Astronauts Associated with Differences in Exposure to Spaceflight Factors (Twins Study) 2016 [Accessed from: https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/1942.html.]
37. Borodina I, Nielsen J. From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005;16(3):350-5.
38. Wishart DS. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;19(9):482-93.
39. Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 2003;62(6):817-36.
40. Kell DB. Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006;11(23):1085-92.
41. Lin CY, Viant MR, Tjeerdema RS. Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *Journal of Pesticide Science*. 2006;31(3):245-51.
42. Robertson DG, Watkins PB, Reily MD. Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. *Toxicological Sciences*. 2010;120:S146-S70.
43. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*. 2013;9(2):280-99.
44. Hamburg MA, Collins FS. The path to personalized medicine. *N Engl J Med*. 2010;2010(363):301-4.

45. Cottingham K. HUSERMET researchers look to the metabolome for answers. ACS Publications; 2008.
46. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*. 2012;137(2):293-300.
47. Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, Marklund SL, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Analytical Chemistry*. 2005;77(24):8086-94.
48. Lemire SW, Busch KL. Calibration point for liquid secondary ion mass spectrometry tandem mass spectra measured with an hybrid mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry*. 1996;31(3):280-8.
49. Tolstikov VV, Lommen A, Nakanishi K, Tanaka N, Fiehn O. Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics. *Analytical chemistry*. 2003;75(23):6737-40.
50. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry- based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. 2007;26(1):51-78.
51. Guiochon G, Felinger A, Shirazi DG. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*: Academic Press; 2006.
52. Tswett M. O novoi kategorii adsorbtsionnykh yavlenii io primenenii ikh k biokhimicheskomu analizu (On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis). *Lecture at the March*. 1903;8:20-39.
53. Bayer E, Jennings WG, Majors RE, Kirkland JJ, Unger KK, Engelhardt H, et al. *History and Developments in Chromatographic Column Technology and Validation to 2001*. *Chromatography: A Science of Discovery*. 2010:199-267.
54. Martin A, Synge RM. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*. 1941;35(12):1358.
55. Horvath CG, Lipsky S. Use of liquid ion exchange chromatography for the separation of organic compounds. *Nature*. 1966;211:748-9.
56. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27(3):251-60.
57. Zhang T, Creek DJ, Barrett MP, Blackburn G, Watson DG. Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Analytical chemistry*. 2012;84(4):1994-2001.
58. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;402(1):231-47.

59. Tang DQ, Zou L, Yin XX, Ong CN. HILIC- MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC- MS. *Mass spectrometry reviews*. 2016;35(5):574-600.
60. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas- Oates J. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass spectrometry reviews*. 2010;29(5):671-84.
61. Tolstikov VV, Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2002;301(2):298-307.
62. Idborg H, Zamani L, Edlund P-O, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson SP. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005;828(1):9-13.
63. Fei F, Bowdish DM, McCarry BE. Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014;406(15):3723-33.
64. Arnaudguilhem C, Bierla K, Ouerdane L, Preud'homme H, Yiannikouris A, Lobinski R. Selenium metabolomics in yeast using complementary reversed-phase/hydrophilic ion interaction (HILIC) liquid chromatography–electrospray hybrid quadrupole trap/Orbitrap mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2012;757:26-38.
65. Contrepolis K, Jiang L, Snyder M. optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (hilic) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)–Mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(6):1684-95.
66. Cajka T, Fiehn O. Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Analytical chemistry*. 2015;88(1):524-45.
67. Villas- Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*. 2005;24(5):613-46.
68. 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.
69. Dole M, Mack L, Hines R, Mobley R, Ferguson L, Alice Md. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*. 1968;49(5):2240-9.
70. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984;88(20):4451-9.
71. Guilhaus M. Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *Physical and instrumental concepts*. *Journal of Mass Spectrometry*. 1995;30(11):1519-32.

72. Sriveena T, Srividya A, Ajitha A, Rao VUM. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. 2278 – 4357.
73. Xu C-F, Lu Y, Ma J, Mohammadi M, Neubert TA. Identification of phosphopeptides by MALDI Q-TOF MS in positive and negative ion modes after methyl esterification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005;4(6):809-18.
74. Villas- Bôas SG, Højer- Pedersen J, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*. 2005;22(14):1155-69.
75. Mitra S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*: John Wiley & Sons; 2004:1125.
76. Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal*. 2000;23(1):131-42.
77. Pesek JJ, Matyska MT, Loo JA, Fischer SM, Sana TR. Analysis of hydrophilic metabolites in physiological fluids by HPLC- MS using a silica hydride-based stationary phase. *Journal of separation science*. 2009;32(13):2200-8.
78. Courant F, Pinel G, Bichon E, Monteau F, Antignac J-P, Le Bizec B. Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst*. 2009;134(8):1637-46.
79. Myint KT, Uehara T, Aoshima K, Oda Y. Polar anionic metabolome analysis by nano-LC/MS with a metal chelating agent. *Analytical chemistry*. 2009;81(18):7766-72.
80. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(6):1523-48.
81. Tiziani S, Emwas A-H, Lodi A, Ludwig C, Bunce CM, Viant MR, et al. Optimized metabolite extraction from blood serum for ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical biochemistry*. 2008;377(1):16-23.
82. Chang MS, Ji Q, Zhang J, El- Shourbagy TA. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons. *Drug Development Research*. 2007;68(3):107-33.
83. Hagerman AE, Butler LG. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 1978;26(4):809-12.
84. Want EJ, O'Maille G, Smith CA, Brandon TR, Uritboonthai W, Qin C, et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2006;78(3):743-52.
85. Stoop MP, Coulier L, Rosenling T, Shi S, Smolinska AM, Buydens L, et al. Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human

- cerebrospinal fluid samples. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9(9):2063-75.
86. Çelebier M. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veritabanı Desteği: LC-MS Verilerinin Değerlendirilmesinde XCMS Kullanımı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2014;23(2).
 87. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*. 2006;78(3):779-87.
 88. Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*. 2006;22(5):634-6.
 89. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl 2):W652-W60.
 90. Xia J, Bjorndahl TC, Tang P, Wishart DS. MetaboMiner—semi-automated identification of metabolites from 2D NMR spectra of complex biofluids. *BMC bioinformatics*. 2008;9(1):507.
 91. Xia J, Wishart DS. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics*. 2010;26(18):2342-4.
 92. Haug K, Salek RM, Conesa P, Hastings J, de Matos P, Rijnbeek M, et al. MetaboLights—an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic acids research*. 2013;41(D1):D781-D6.
 93. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic drug monitoring*. 2005;27(6):747-51.
 94. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic acids research*. 2007;35(suppl_1):D521-D6.
 95. Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, et al. A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome research*. 2007;17(10):1537-45.
 96. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*. 2011;6(7):1060-83.
 97. Wu L, Mashego MR, van Dam JC, Proell AM, Vinke JL, Ras C, et al. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³C-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical biochemistry*. 2005;336(2):164-71.

98. Sysi-Aho M, Katajamaa M, Yetukuri L, Orešič M. Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC bioinformatics*. 2007;8(1):93.
99. Eliasson M, Rännar S, Madsen R, Donten MA, Marsden-Edwards E, Moritz T, et al. Strategy for optimizing LC-MS data processing in metabolomics: a design of experiments approach. *Analytical chemistry*. 2012;84(15):6869-76.
100. Yu T, Jones DP. Improving peak detection in high-resolution LC/MS metabolomics data using preexisting knowledge and machine learning approach. *Bioinformatics*. 2014;30(20):2941-8.
101. Libiseller G, Dvorzak M, Kleb U, Gander E, Eisenberg T, Madeo F, et al. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC bioinformatics*. 2015;16(1):118.
102. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine*. 1993;30(6):672-9.
103. De Livera AM, Dias DA, De Souza D, Rupasinghe T, Pyke J, Tull D, et al. Normalizing and integrating metabolomics data. *Analytical chemistry*. 2012;84(24):10768-76.
104. Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology*. 1996;23(1):164-76.
105. Ginès A, Escorsell A, Ginès P, Saló J, Jiménez W, Inglada L, et al. Incidence, predictive factors, and prognosis of the hepatorenal syndrome in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology*. 1993;105(1):229-36.
106. Karan Ma, Araz M, Erten N, Vatansever S, Taşçıoğlu C, Güler K, et al. Asit Ayırıcı Tanısında Asit Sıvısı Fibronektin Konsantrasyonunun Yeri. *Türkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology*. 1996;7(2):111-7.
107. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1.
108. Boyd E, Schmidt W. Performance Enhancing Drugs Overview.
109. Woitas RP, Stoffel-Wagner B, Flommersfeld S, Poege U, Schiedermaier P, Klehr H-U, et al. Correlation of serum concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in liver cirrhosis. *Clinical chemistry*. 2000;46(5):712-5.
110. Giannini E, Botta F, Fumagalli A, Malfatti F, Testa E, Chiarbonello B, et al. Can inclusion of serum creatinine values improve the Child–Turcotte–Pugh score and challenge the prognostic yield of the model for end- stage liver disease score in the short- term prognostic assessment of cirrhotic patients? *Liver international*. 2004;24(5):465-70.
111. Alessandria C, Ozdogan O, Guevara M, Restuccia T, Jiménez W, Arroyo V, et al. MELD score and clinical type predict prognosis in hepatorenal syndrome: relevance to liver transplantation. *Hepatology*. 2005;41(6):1282-9.

112. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124(1):91-6.
113. Zhang D-X, Dai Y-D, Yuan S-X, Tao L. Prognostic factors in patients with pancreatic cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;3(3):423-32.
114. Nguyen V, Hurton S, Ayloo S, Molinari M. Advances in Pancreatic Cancer: The Role of Metabolomics. *JOP Journal of the Pancreas*. 2015;16(3):244-8.
115. OuYang D, Xu J, Huang H, Chen Z. Metabolomic profiling of serum from human pancreatic cancer patients using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2011;165(1):148-54.
116. Knox W. Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary-adrenal system. *British journal of experimental pathology*. 1951;32(5):462.
117. Heller B, Fischer E, Martin R. Therapeutic action of D-phenylalanine in Parkinson's disease. *Arzneimittel-Forschung*. 1976;26(4):577.
118. Ranjan P, Gupta A, Kumar S, Gowda N, Ajjapa G, Ranjan A, et al. Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Liver International*. 2006;26(6):703-7.
119. Tessari P, Vettore M, Millionini R, Puricelli L, Orlando R. Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2010;13(1):81-6.
120. Tessari P, Kiwanuka E, Vettore M, Barazzoni R, Zanetti M, Cecchet D, et al. Phenylalanine and tyrosine kinetics in compensated liver cirrhosis: effects of meal ingestion. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;295(3):G598-G604.
121. Jagenburg R, Olsson R, Regårdh C-G, Rodjer S. Kinetics of intravenous administered L-phenylalanine in patients with cirrhosis of the liver. *Clinica Chimica Acta*. 1977;78(3):453-63.
122. Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1488-99.
123. Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(9):2711-7.
124. Fujimori K, Ohta D. Isolation and characterization of a histidine biosynthetic gene in *Arabidopsis* encoding a polypeptide with two separate domains for phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase and phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase. *Plant physiology*. 1998;118(1):275-83.
125. Saito H, Goodnough LT, Boyle JM, Heimburger N. Reduced histidine-rich glycoprotein levels in plasma of patients with advanced liver cirrhosis: Possible

implications for enhanced fibrinolysis. *The American journal of medicine*. 1982;73(2):179-82.

126. Zoli M, Marchesini G, Dondi C, Bianchi G, Pisi E. Myofibrillar protein catabolic rates in cirrhotic patients with and without muscle wasting. *Clinical Science*. 1982;62(6):683-6.
127. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids*. 2009;37(1):153-68.
128. Diaz GJ, Skordos KW, Yost GS, Squires EJ. Identification of phase I metabolites of 3-methylindole produced by pig liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*. 1999;27(10):1150-6.
129. Moroni F, Carpenedo R, Venturini I, Baraldi M, Zeneroli ML. Oxindole in pathogenesis of hepatic encephalopathy. *The Lancet*. 1998;351(9119):1861.
130. Riggio O, Mannaioni G, Ridola L, Angeloni S, Merli M, Carlà V, et al. Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients: a study on the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(6):1374-81.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Sayfası



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 358

26 Mart 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 19.03.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/05
Proje No : GO 14/187 (Değerlendirme Tarihi 19.03.2014)
Karar No : GO 14/187 - 26

Üniversitemiz Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Seyfettin KÖKLÜ'nün sorumlu araştırmacı olduğu Prof.Dr.Sacide ALTINÖZ, Doç.Dr.Inciley SÜSLÜ, Yrd.Doç.Dr.Mustafa ÇELEBİER, Uzm.Dr.Ömer ÖZTÜRK, Uzm.Dr.Cemil KAMILOV ve Dr.Mazhyd VEİSALOV ile birlikte çalışacakları GO 14/187 kayıt numaralı ve "Assit Ayrırıcı Tanısında Assit Metabolom Tayini" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1.Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)	9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye)
GÖREVLİ	GÖREVLİ
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)	10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye)
3. Prof. Dr. M. Madım Sara (Üye)	11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)	12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sokmensüer (Üye)	13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)	14. Prof. Dr Leyla Dinç (Üye)
7. Prof. Dr. Songül Vafzoğlu (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye)	16. Av. Meltem Onurlu (Üye)

Ek 2. XCMS kurulumu için kullanılan kod.

```
## try http:// if https:// URLs are not supported
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("xcms")
```

Ek 3. IPO yazılımı için kullanılan kod.

```
# try http:// if https:// URLs are not supported
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("IP0")
```

Ek 4. IPO optimizasyon kodu.

```
library(IP0)
peakpickingParameters <-
getDefaultXcmsSetStartingParams('matchedFilter')
#setting levels for step to 0.2 and 0.3 (hence 0.25 is the
center point)
peakpickingParameters$step <- c(0.2, 0.3)
peakpickingParameters$fwhm <- c(40, 50)
#setting only one value for steps therefore this parameter
is not optimized
peakpickingParameters$steps <- 2

time.xcmsSet <- system.time({ # measuring time
resultPeakpicking <-
optimizeXcmsSet(files = datafiles[],
params = peakpickingParameters,
nSlaves = 1,
```

```

subdir = NULL)

retcorGroupParameters                                     <-
getDefaultRetGroupStartingParams()

retcorGroupParameters$profStep <- 1

retcorGroupParameters$gapExtend <- 2.7

time.RetGroup <- system.time({ # measuring time

resultRetcorGroup <-

optimizeRetGroup(xset = optimizedXcmsSetObject,
params = retcorGroupParameters,
nSlaves = 1,
subdir = NULL)

writeRScript(resultPeakpicking$best_settings$parameters,
resultRetcorGroup$best_settings)

```

Ek 5. Kullanılan XCMS kodu.

```

xset <- xcmsSet(method="centWave", peakwidth=c(11.5, 34),
ppm=34.25, noise=0, snthresh=10, mzdiff=0.0045,
prefilter=c(3, 100), mzCenterFun="wMean", integrate=1,
fitgauss=FALSE, verbose.columns=FALSE, nSlaves=4)

xset <- retcor(xset, method="obiwarp", plottype="none",
distFunc="cor_opt", profStep=1, center=3, response=1,
gapInit=0.36, gapExtend=2.13, factorDiag=2, factorGap=1,
localAlignment=0)

xset <- group(xset, method="density", bw=12.4,
mzwid=0.0186, minfrac=0.748, minsamp=1, max=50)

```

9. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı Ankara doğumluyum. Liseyi İncirli Lisesinde okuduktan sonra 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Kimya bölümüne başladım, 2013 yılında mezun oldum. 2014 yılında yüksek lisans eğitimine başladığım Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda TÜBİTAK proje bursiyeri olarak çalışıyorum.