

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

**MEME KANSERİNDE HEDEFLENMİŞ METABOLİTLERİN
LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE TAYİNLERİ**

Uzm. Kim. Tuba REÇBER

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2019

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

**MEME KANSERİNDE HEDEFLENMİŞ METABOLİTLERİN
LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE TAYİNLERİ**

Uzm. Kim. Tuba REÇBER

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sedef KIR**

**ANKARA
2019**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEME KANSERİNDE HEDEFLENMİŞ METABOLİTLERİN LC-MS/MS
YÖNTEMİ İLE TAYİNLERİ
Tuba REÇBER
Danışman: Prof. Dr. Sedef KIR

Bu tez çalışması 11.09.2019 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
(Ankara Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Nilgün GÜNDEM GÖĞER
(Gazi Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
(Hacettepe Üniversitesi)



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

16 Eylül 2019

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü



YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

16/09/2019


Tuba REÇBER

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

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

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

ETİK BEYAN

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



Uzm. Kim. Tuba REÇBER

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum için kendimi her zaman şanslı hissettiğim, kendisinden çok şey öğrendiğim, öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bilgisini, desteğini, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, titiz ve etik çalışma şeklini örnek aldığım, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedef KIR'a, verdiği tüm emeklerden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime başladığım ilk günden beri üzerimde emeği olan, bilgi ve deneyimlerini çömertce paylaşarak bana rehberlik eden ve tez izleme komitesinde de yer alarak katkılarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya özellikle tez sürecindeki tüm kaygılarımı sabırla dinlediği ve beni her konuda cesaretlendirdiği için teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEMEN GÖĞER'e teşekkür ederim.

Klinik çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Sercan AKSOY'a teşekkür ederim.

2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürü bir borç bilirim.

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma; yardımları ve gösterdikleri samimiyet için çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Akademik ve manevi konularda desteğini ve pratik önerilerini hiçbir zaman esirgemediği için Doç. Dr. Mustafa ÇELEBİER'e teşekkür ederim.

Anne ve babama bu günlere gelmemi sağladıkları ve yolun en başından beri beni yalnız bırakmadıkları için; kardeşim Ahmet'e yaşamımın her aşamasında yanımda olduğu ve arkadaşlığı için çok teşekkür ediyorum.

ÖZET

Reçber, T., Meme Kanserinde Hedeflenmiş Metabolitlerin LC-MS/MS Yöntemi ile Tayinleri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2019. Kadınlar arasında en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerin % 18'ini oluşturan meme kanserinde en iyi koruyucu yöntem erken tanıdır. Metabolomik analizler erken tanıda ve hastalığın takibinde önemli rol almaktadırlar. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda hastalık tanısı için yeni belirteçlerin bulunması; hedeflenmiş metabolomikte ise seçilmiş belirteçlerin miktar tayinlerinin yüksek kesinlikte ve tekrarlanabilirlikte gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada, kaynaklarda meme kanserinin erken teşhisi için önerilen yirmi altı metabolit seçilerek analizleri yapılmıştır. Hedeflenmiş metabolomik analizler 105 sağlıklı gönüllü, 172 erken evre ve 92 metastatik evredeki meme kanseri hastasına ait plazma örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Analizler sonucunda glutamik asit, malik asit, gliserik asit, 3-hidroksibütirik asit, glutamin, prolin, kolin, fumarik asit, laktik asit, fumarik asit/glutamik asit ve malik asit/glutamik asit miktarlarının meme kanseri hastalarında önemli oranda değiştiği görülmüştür. Bu metabolitler meme kanserinin erken tanısında biyobelirteç olarak kullanılmak üzere önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, metabolomik, biyobelirteç, LC-MS/MS, plazma, hedeflenmiş

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK 1001 Projesi (114Z390)

TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı

ABSTRACT

Reçber, T., Determination of Targeted Metabolites in Breast Cancer by LC-MS/MS Method. Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Ph.D. Thesis, Ankara, 2019 The best preventive method for breast cancer, which accounts for 18% of the most common cancer-related deaths among women, is the early diagnosis. Metabolomic analyzes have an important role in early diagnosis and tracking of the disease progress. Untargeted metabolomic studies are aimed to find new markers for disease diagnosis in while targeted metabolomics are aimed quantitative determinations of selected markers with high accuracy and reproducibility. In the study, targeted metabolomic analyzes for twenty-six metabolites which were proposed in the literature for early diagnosis of breast cancer were performed in plasma samples of 105 healthy volunteers, 172 early stage and 92 metastatic breast cancer patients. For this purpose, a liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) method was developed, validated and applied to control and patient plasma samples. As a result of the analyzes, it was observed that the amounts of glutamic acid, malic acid, glyceric acid, 3-hydroxybutyric acid, glutamine, proline, choline, fumaric acid, lactic acid, fumaric acid/glutamic acid and malic acid/glutamic acid changed in breast cancer patients. These metabolites are recommended for use as biomarkers in the early diagnosis of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, metabolomics, biomarker, LC-MS/MS, plasma, targeted

Supported by: TUBITAK 1001 Support Project (114Z390)

TUBITAK 2214-A International Research Fellowship Programme (for PhD Students)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanserinde Anatomik Yapı, Evreleme ve Epidemiyoloji	3
2.2. Meme Kanserinde Tanı ve Tarama Yöntemleri	4
2.3. Omik Bilimler	6
2.3.1. Genomik	7
2.3.2. Transkriptomik	8
2.3.3. Proteomik	9
2.3.4. Metabolomik	10
2.4. Metabolomik Uygulamalar	12
2.4.1. Numune Hazırlama	13
2.4.2. Metabolomik Analiz Yöntemleri	14
2.4.3. Veri Analizi	28
2.5. Metabolitler	29
2.5.1. Biyobelirteç Olarak Metabolitler	29
2.5.2. Hedeflenen Metabolitler	29
2.6. Analitik Yöntem Validasyonu	38
2.6.1. Validasyon Parametreleri	38
2.7. Kaynak Özeti	39

3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.2. Kullanılan Cihazlar	44
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	44
3.4. Kullanılan Yazılım ve Veri Bankaları	45
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	45
3.6. Etik Kurul İzni	47
3.7. Plazma Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	47
3.8. Analiz Yöntemi	48
3.8.1. Optimizasyon Çalışmaları	48
3.8.2. Analiz Koşulları	51
3.9. Yöntemin Plazma Örneklerine Uygulanması	52
3.9.1. Plazma Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması	52
3.9.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması	54
3.9.3. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması	54
3.10. Analitik Yöntem Validasyonu	55
3.10.1. Seçicilik	55
3.10.2. Duyarlılık	55
3.10.3. Doğrusallık	55
3.10.4. Kesinlik	56
3.10.5. Doğruluk	56
3.10.6. Geri Kazanım	56
3.10.7. Kararlılık	57
3.11. Sistem Uygunluk Testi (SUT)	58
3.12. Veri Analizi	58
4. BULGULAR	59
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	59
4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları	59
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu	73
4.2.1. Seçicilik	73
4.2.2. Doğrusallık	73
4.2.3. Duyarlılık	81

4.2.4. Kesinlik	82
4.2.5. Doğruluk	82
4.2.6. Geri Kazanım	84
4.2.7. Kararlılık	86
4.3. Sistem Uygunluk Çalışması	88
4.4. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması	88
4.5. Veri Analizi	90
4.5.1. Yolak Analizi	97
4.5.2. Biyobelirteç Analizi	98
5. TARTIŞMA	103
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	116
7. KAYNAKLAR	118
8. EKLER	
EK 1. Etik Kurul İzni	
EK 2. Onam Formu	
EK 3. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK 4. Orjinallik Raporu Örneği	
EK 5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSS	Bağıl standart sapma
BH	Bağıl hata
CE	Kapiler elektroforez
cm	Santimetre
dk	Dakika
ER	Östrojen reseptörü
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
h	Hacim
GC	Gaz kromatografisi
HMDB	Human metabolome database
HML	Human metabolome library
HMP	Human metabolome project
HILIC	Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performansı sıvı kromatografisi
İS	İç standart
k'	Kapasite faktörü
L	Litre
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi
LOD	Gözlenebilme sınırı
LLOQ	Alt tayin sınırı
m	Metre
M	Molar
MA	Moleküler ağırlık
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MRM	Çoklu reaksiyon izleme yöntemi
MS	Kütle spektroskopisi
N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı)

ng	Nanogram
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
pKa	Asitlik ayrışma sabiti
PR	Progesteron reseptörü
Q	Kuadrapol
r	Korelasyon katsayısı
R²	Tanımlayıcılık katsayısı
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
s	Saniye
SH	Standart Hata
SIM	Seçici iyon izleme
SPE	Katı faz ekstraksiyon
SS	Standart Sapma
TCA	Trikloroasetik asit
t_R	Alıkonma zamanı
UPLC/UHPLC	Ultra performans sıvı kromatografisi
US FDA	Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu
V	Volt
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
\bar{x}	Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kadın memesine ait anatomik yapı ve olası tümör oluşma bölgeleri (9).	3
2.2.	Omik bilimlerin gelişimi ve ilgili moleküllerin hücre içerisindeki tahmini sayıları.	7
2.3.	Metabolomik analiz basamakları: Numune hazırlama (sıvı, doku, hücre ekstraktları), metabolomik analiz (GC-MS, LC-MS ve H-NMR) ve veri analizi (tek değişkenli ve çok değişkenli).	12
2.4.	Hedeflenmiş metabolomik analizlerde numune hazırlama yöntemlerinin dağılımı.	14
2.5.	LC-MS temelli hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik analizlerde iş akış şeması (50).	15
2.6.	Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisinde ayırma mekanizmaları (74).	18
2.7.	Sıvı kromatografisi cihazının temel kısımları (80).	20
2.8.	Kütle spektrometresi blok diyagramı.	22
2.9.	Elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği ile iyon oluşumu (85).	24
2.10.	Kuadrapol kütle analizörü (85).	25
2.11.	Üç kademeli kuadrapol (QQQ) kütle analizörü (86).	26
3.1.	Çalışılan hasta gruplarının histolojik alt tiplerine göre değerlendirilmesi.	47
3.2.	Plazma örneklerinin analizi için numune hazırlama basamakları.	54
4.1.	Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.	59
4.2.	Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.	67
4.3.	Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.	74
4.4.	Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.	78
4.5.	Standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100].	86
4.6.	1 µg/mL standart karışım çözeltisi eklenmiş plazma çözeltisi için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100].	87

- 4.7. Stok çözeltiler için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100]. 88
- 4.8. Kontrol ve hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeylerine ait PCA skor grafiği. 90
- 4.9. Çok değişkenli veri analizi. A) PLS-DA skor grafiği, B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, C) Olasılık analiz grafiği (n=100) (R^2 ve Q^2 sırasıyla modelin uyumluluğunu ve tahmin kapasitesini gösterir.). 91
- 4.10. Kontrol grubu (n:105), erken (n:172) ve metastatik (n:92) evre hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeyleri (* $p<0,05$ ve ** $p<0,01$). 92
- 4.11. Kontrol grubu, erken ve metastatik hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit oranları. 95
- 4.12. Meme kanseri hastalarında değişen yolaklar. 97
- 4.13. A) ROC eğrileri grafiği, B) En yüksek tahmin gücüne sahip biyobelirteç modelinin % 95 güven seviyesindeki ROC eğrisi. 100
- 4.14. Artan biyobelirteç sayısı ile doğrusal SVM modelinin tahmin doğruluğu (Kırmızı nokta: en doğru biyobelirteç modeli sayısı). 101
- 4.15. Biyobelirteçlerin doğrusal SVM modelindeki önem derecesi. 101
- 4.16. Öngörülen sınıf olasılıkları. 102

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. MS temelli analitik tekniklerin avantaj ve dezavantajları (88, 89).	27
2.2. Hedeflenen metabolitler.	30
3.1. LC-MS/MS yönteminin optimizasyonu için çalışılan deney koşulları.	49
3.2. Metabolitlerin analizi için gradient elüsyon şartları.	52
3.3. LC-MS/MS analiz parametreleri.	52
3.4. Plazma örneklerinin analizi için zemin çıkarma yöntemi ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.	53
3.5. Sistem uygunluk test kriterleri (USP).	58
4.1. Optimum MRM koşulları.	64
4.2. Kromatografik koşulların optimizasyonu için gözlemler.	66
4.3. Farklı çözücü sistemleri ile elde edilen bağıl geri kazanım değerleri.	72
4.4. Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler (n=8).	77
4.5. Metabolitlerin LOD ve LLOQ değerleri.	81
4.6. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=6).	82
4.7. Metabolitlerin mutlak ve bağıl geri kazanım değerleri (n=3).	85
4.8. Metabolitler için elde edilen sistem uygunluk parametreleri.	89
4.9. LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen metabolitlere ilişkin t-testi sonuçları.	96
4.10. İstatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.	98
4.11. Doğrusal SVM modeli kullanılarak tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçları (yanlış grup sınıflandırma analizi).	102

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser tipidir. Yaşam boyu meme kanserine yakalanma riski % 12 olup her sekiz kadından birinde meme kanseri gelişme riski bulunmaktadır. Günümüzde kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin % 32'si ve kansere bağlı ölümlerin % 18'i meme kanserinden olmaktadır. Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen on kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (1).

Tanı yöntemlerindeki hızlı ilerlemelere karşın meme kanseri özellikle 35-55 yaş grubu kadınlar arasında önde gelen ölüm nedeni olmaya devam etmektedir (2). Yayılım göstermeden, erken dönemde tanı konması durumunda, hastaların % 95'inden fazlası hayatta kalmaktadır. Bu nedenle meme kanserinin erken teşhisini ve zamanında tedavisine olanak sağlayacak yüksek hassasiyet ve seçicilikte invazif olmayan teşhis yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Meme kanseri için rutin takipler periyodik mamografi, fiziksel muayene ve kan testleri ile gerçekleştirilmektedir. Meme kanseri tarama programlarının meme kanserinden ölümleri azalttığı gösterilmiştir. Tarama programlarında tanı mamografi çekilerek veya fiziksel muayene ile konulabilmektedir (3). Ancak bu yöntemler daha erken ve kesin teşhise olanak sağlamamaktadır. Son yıllarda teşhis yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde erken teşhisin kolaylaştığı ve hayatta kalma oranının önemli ölçüde attığı görülmüştür. Günümüzde artık kanser tanı ve tedavisi multidisipliner olarak ele alınması gereken çok yönlü bir konu haline gelmiştir.

Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik analizler ile elde edilen detaylı bilgi; hastalıkların mekanizmasını anlamak, onların erken teşhisini kolaylaştırmak, bireysel tedavi stratejilerinin seçilmesi ve bunların etkinliğini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir (4). Son yıllarda teknolojik ilerlemeler ile paralel olarak gelişen metabolomik analizler ile sağlanan metabolizma bilgisi diğer hastalıklarda olduğu gibi meme kanserinin de erken tanısında ve mekanizmasının aydınlatılmasında önemli rol oynamaktadır (5).

Metabolomik analizler, doku veya vücut sıvılarındaki binlerce metabolitin aynı anda değerlendirilebilmesi ile hastalıklarda etkili olan metabolik yolların tanınması ve özgün metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesine ve klinik vakalar arasındaki

moleküler farklılıkların saptanması sonucunda erken teşhis ve tedavinin bireyselleştirilmesine olanak sağlamaktadır (4, 6, 7).

Yapılan analizlere göre metabolomik çalışmalar hedeflenmiş ve hedeflenmemiş olarak iki gruba ayrılmaktadır. Hedeflenmemiş analizlerle hastalık tanı ve teşhisi için yeni belirteçlerin bulunması amaçlanırken, hedeflenmiş çalışmalar ile seçilmiş belirteçlerin miktar tayinlerinin yüksek kesinlikte ve tekrarlanabilirlikte analizleri gerçekleştirilir (7). Hedeflenmemiş analizlerde elde edilen değerler ile yarı-nicel analizler gerçekleştirdiğinden laboratuvarlar arasında çok büyük varyasyonlar görülebilirken, hedeflenmiş analizler derişim temelli olduğundan varyasyonlardan daha az etkilenmektedir. Bu nedenle rutin analizlerde hedeflenmiş analizler kullanılmaktadır.

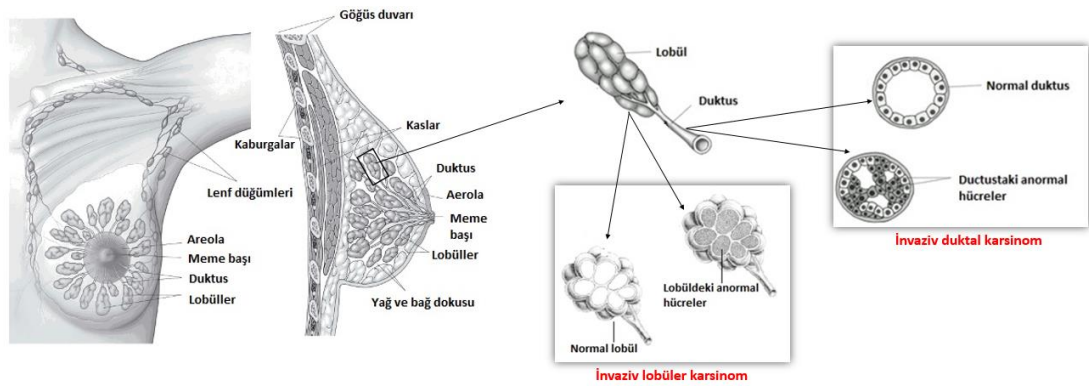
Bu tez çalışması kapsamında hedeflenmiş metabolomik analizler yapılarak meme kanseri için kaynak taraması ile seçilmiş yirmi altı biyobelirteç adayının aynı anda analizini sağlayacak bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır. Geliştirilen yöntemin 105 sağlıklı gönüllü (kontrol), 172 erken evre ve 92 metastatik meme kanseri hasta gruplarından alınan plazmaların analizlerine uygulanması sonucunda biyobelirteç adaylarının belirlenmesi ve bu adayların hastalığın teşhisindeki etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanserinde Anatomik Yapı, Evreleme ve Epidemiyoloji

Kanser, vücudun belirli bir bölümünde kontrol edilemeyen bir şekilde bölünen ve organlar dâhil çevredeki sağlıklı dokuyu tahrip etme gücüne sahip olan anormal hücrelerin gelişmesi sonucu oluşan bir durumdur.

Çoğu kanser hücresi türü tümör adı verilen bir kitle oluşturur ve tümörün köken aldığı kısmın adını alır. Meme kanseri ya süt üretimi için loblar denilen bezlerden oluşan meme dokusunda (invaziv lobuler karsinom) ya da lobülleri meme ucuna bağlayan kanallarda (invaziv duktal karsinom) başlar. Memenin geri kalanı, yağ, bağ ve lenfatik dokulardan oluşur (Şekil 2.1.) (8, 9).



Şekil 2.1. Kadın memesine ait anatomik yapı ve olası tümör oluşma bölgeleri (9).

Meme kanseri vücut içerisinde kanserin yayılma derecesine göre üç evrede sınıflandırılabilir:

- Erken evre kanser (Evre I); başlangıçtaki yerleşimiyle sınırlı olup yayılım göstermeyen kanser tipidir.
- İleri evre meme kanseri (Evre II-III); kanalcıklar veya lobüller ile kalmayıp meme dokusunun çevre alanlarına da yayılır.
- Metastatik evre meme kanseri (Evre IV); kanser yakın lenf düğümleri de dâhil olmak üzere vücudun başka yerlerine sıçramıştır (10).

Meme kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda görülebilir. Ancak kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır. Meme kanseri Dünya’da her yıl yaklaşık 2,1 milyon

kadını etkilemesiyle kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. 2018'de 627 bin kadının meme kanserinden öldüğü belirlenmiş olup bu sayı kadınlardaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 15'ini temsil etmektedir. Meme kanserinin dünyada ortalama insidansı yüz binde 38-40 civarında iken, Avrupa'da yüz binde 66-67, Türkiye'de yüz binde 40'dır. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların % 44,5'inin 50-69 yaş arasında olduğu, % 40,6'sının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Tanı alma ortanca yaşı 53 olarak bulunmuştur. Meme kanseri evreleri incelendiğinde ise vakaların % 11,5'i ileri evrededir (11, 12).

Meme kanserinde erken teşhis yöntemleri hastanın taşıdığı risk faktörlerine göre değişkenlik gösterir. Bu faktörlerin arasında yaş ilk sırada gelmektedir. Genç yaşlarda da görülmesine karşın ileri yaş gruplarında bu risk artmaktadır (13, 14).

2.2. Meme Kanserinde Tanı ve Tarama Yöntemleri

Meme kanserine karşı en iyi koruyucu yöntem erken teşhistir. Ülkemizde erken teşhis için ulusal tarama programı oluşturulan iki kanser türünden biri meme kanseridir. Meme kanseri erken evrede tespit edilebilir ise mastektomiye veya kemoterapiye ihtiyaç duyma ihtimali azalmaktadır. Ayrıca meme kanseri tarama programlarının meme kanserinden kaynaklanan ölümleri azalttığı da bilinmektedir (8, 15).

Herhangi bir semptom ortaya çıkmadan önce meme kanserinin teşhisi için farklı tarama yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlar; klinik muayene, mamografi, meme ultrasonu, meme manyetik rezonans görüntüleme ve laboratuvar testleridir (13).

Klinik Muayene

Klinik muayene eğitimli bir sağlık uzmanı veya hasta tarafından her iki göğsün muayene edilmesi olup konuma ve meme büyüklüğüne bağlı olarak 1-2 cm veya daha büyük tümörleri teşhis edebilen bir erken teşhis şeklidir (16).

Mamografi

Mamografi, memedeki anormallikleri belirlemek için düşük enerjili X ışınlarının kullanıldığı bir görüntüleme işlemidir. Mamografinin amacı, muayene ile belirlenemeyecek kadar küçük anormalliklerin, tipik olarak karakteristik kitlelerin veya mikro kalsifikasyonların saptanması yoluyla meme kanserinin erken teşhisidir. Gelişmiş sağlık sistemlerine sahip birçok ülke, meme kanserine bağlı ölümleri azaltmak amacıyla, genellikle her iki yılda bir 50 ila 70 yaşları arasındaki kadınlar için sistematik mamografi taraması yapmaktadır (17, 18).

Meme Ultrasonu

Meme ultrasonu, tümörleri ve diğer meme anormalliklerini taramak amacıyla memenin iç kısmının ayrıntılı görüntülerini almak için yaygın olarak kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. Meme ultrasonunun kalitesi, meme büyüklüğü, glandüler doku yoğunluğu, önceki ameliyatlara veya radyasyon ve inceleme uzmanı deneyimi gibi çeşitli değişkenlere bağlı olduğundan büyük ölçekli bir tarama aracı olarak kullanılmamaktadır (19).

Meme Manyetik Rezonans Görüntüleme

Meme manyetik rezonans görüntüleme yöntemi radyo dalgaları ve güçlü mıknatısların kullanıldığı en pahalı ve lojistik açıdan en zorlu olan meme muayenesi yöntemidir. Meme manyetik rezonans görüntüleme yöntemi, sıklıkla meme kanseri teşhisi konulmuş kadınlarda kanserin boyutunu ölçmeye yardımcı olmak, memedeki diğer tümörleri aramak ve diğer memedeki tümörleri kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır (20, 21).

Laboratuvar Testleri

Meme kanserli hastalarda tanı koymada, tedaviye yanıtın izlenmesinde, metastazın erken saptanmasında ve nüksün belirlenmesinde laboratuvar testleri de önemli bir rol oynamaktadır. Tümör belirteçleri, tümörler veya vücudun diğer hücreleri tarafından kansere veya bazı iyi huylu koşullara cevap olarak üretilen maddelerdir. Bu belirteçlerin çoğu kanser hücrelerinde olduğu gibi normal hücreler tarafından da üretilir ancak kanserli koşullarda çok daha yüksek seviyelerde üretilirler. Kanser antijen 27-29 (CA 27-29), kanser antijen 15-3 (CA 15-3), karsinoembriyonik antijen (CEA), doku polipeptidine özgü antijen, tümör baskılayıcı protein (p53), katepsin D, siklin E, nestin, HER-2, östrojen reseptörü (ER)/progesteron reseptörü (PR), ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) sıklıkla meme kanseri olan kişilerde eksprese edilen tümör belirteçleridir (22-25).

Tarama programlarında tanı mamografi çekilerek veya fiziksel muayene ile konulabilir. Ancak bu yöntemler daha erken ve kesin teşhise olanak sağlamamaktadır. Meme dokusu adet dönemlerinde, bedendeki hormonal dalgalanmalara bağlı olarak kendi içinde değişimler gösterebildiğinden, hekim tarafından gerçekleştirilen veya kendi kendine meme muayenesinin etkinliği diğer yöntemler kadar yüksek olmamakla birlikte bazı durumlarda meme kanserinin erken dönemde yakalanmasına katkı sağlamaktadır. Ancak fiziksel muayene kimi hastalar için rahatsız edici bir durum oluşturabilmektedir. Fiziksel muayeneye maruz kalmadan sadece kan örneğiyle ön tanının konabilmesi daha çok kadına ulaşılmasına ve meme kanserinin erken evrelerde yakalanmasına olanak sağlamaktadır (3). Son yıllarda teşhis yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde erken teşhisin kolaylaştığı ve hayatta kalma oranının önemli ölçüde attığı görülmüştür.

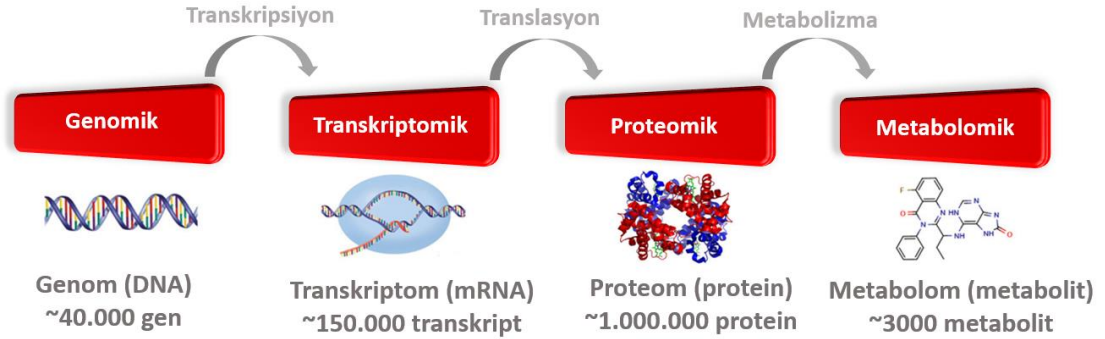
2.3. Omik Bilimler

Omik bir organizmanın fenotipi, organizmanın morfolojisi, gelişim süreçleri, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ve davranışı gibi gözlemlenebilir özelliklerinin bir bileşimi olup bir hücrenin/organizmanın fenotipi ve fonksiyonu, bir arada olan ve

etkileşen genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler ile tanımlanır. Geleneksel biyomedikal araştırmalar tek bir gen, protein, metabolit veya metabolik yolağın analizi üzerine odaklanmıştır. Bu "moleküler indirgemeci" yaklaşım genetik varyasyonları ve moleküler bileşenleri tanımlayarak hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasına yol açacağı varsayımına dayanmaktadır. Bununla birlikte hastalıkların birçoğu karmaşık ve çok faktörlü hastalıklar olduğundan hastalığın fenotipi, birden fazla genin, yolağın, proteinin ve metabolitin hücre, doku ve organizma seviyesinde meydana gelen değişikliklerinin analiz edilmesiyle anlaşılabilir (4, 26).

Omik araştırmalar organizmaların yapısını, fonksiyonunu ve dinamiğini belirleyen biyolojik moleküllerin özellikle nükleik asit, protein ve metabolitlerin kapsamlı bir şekilde karakterizasyonunu ve nicelleştirilmesini amaçlamaktadır (27).

Omik (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik) analizler (Şekil 2.2.) ile sağlanan kapsamlı biyolojik bilgi; hastalıkların mekanizmasını anlamak, onların erken teşhisini kolaylaştırmak, bireysel tedavi stratejilerini seçmek ve bunların etkinliğini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir (4).



Şekil 2.2. Omik bilimlerin gelişimi ve ilgili moleküllerin hücre içerisindeki tahmini sayıları.

2.3.1. Genomik

İlk omik disiplini olan genomik, hastalıklarla ilişkili genetik varyantları, tedaviye yanıtı veya gelecekteki hasta prognozunu belirlemeye odaklanmıştır (28).

Gen hücrelerdeki proteinlerin, enzimlerin ve diğer moleküllerin kodlarını taşıyan, kalıtsal özelliklerin nesiller arası aktarılabilmesini sağlayan, yaşam için

gerekli bütün biyokimyasal ve fizyolojik olayların işleyişini kontrol eden temel kalıtım birimidir. Gen, protein veya RNA molekülü gibi belirli bir işlev ile görevlendirilmiş olan kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden oluşmaktadır (29).

Genom, bir hücrenin veya organizmanın kromozomlarının taşıdığı genetik bilginin tamamını temsil etmektedir. Genomun ve kalıtımın temel yapı taşı olan genlerin sahip olduğu genetik bilgiyi anlamak için yapılan çalışmalar ise genomik olarak isimlendirilmektedir. 1990'lı yıllarda başlayıp 2003 yılında tamamlanan "İnsan Genom Projesi" kapsamında yapılan genomik çalışmalar ile insan genomunu tanımlamak, kalıtsal hastalıklara sebep olan genleri belirlemek ve bu genlerin birbirleri ve çevre ile ilişkilerini anlayarak etkili tanı ve tedavi yöntemleri geliştirmek amaçlanmıştır. Proje tamamlandığında 29,000 ila 36,000 arasında insan geninin olduğu belirlenmiş ve sonuçlar bilgisayar veri bankalarına işlenerek bu genlerin tamamının yeri, yapısı ve işlevi hakkında ayrıntılı bir bilgi kaynağı oluşturulmuştur. İnsan genom projesi ile çeşitli kronik hastalıkların genetik risk dağılımı belirlenmiş olup birçok genetik hastalığın teşhis ve tedavi olanaklarının araştırılmasında önemli veriler sağlanmıştır. Günümüzde ise sadece genomik çalışmalar ile hastalıkların önlenmesi, teşhisi ya da tedavisinin mümkün olmadığı ve sağlık alanında daha kesin bireysel stratejilerin belirlenmesi için diğer omik tekniklere ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (30-32).

Genomik çalışmalar; DNA'nın dizilim bilgisinin belirlendiği "yapısal genomik" ve transkriptomik olarak da adlandırılan "işlevsel genomik" olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (33).

2.3.2. Transkriptomik

Transkriptom belirli bir zaman diliminde bir hücrede bulunan mRNA transkriptlerinin tamamını temsil etmektedir (32).

mRNA, bir proteinin sentezlenmesi için ilgili proteinin amino asit dizilimine karşılık gelen kimyasal kodu taşıyan bir moleküldür. mRNA, DNA'nın transkripsiyonu sonucu meydana gelmekte olup protein sentez yeri olan ribozomlara protein kodlayıcı bilgiyi taşımakla görevlidir (34).

Moleküler biyolojideki en büyük zorluklardan biri, aynı genomun farklı hücre tiplerine nasıl yol açabileceğini ve gen ekspresyonunun nasıl düzenlendiğini anlamaktır. Transkriptomik analizler ile hücre ve dokularda farklı zamanlardaki mRNA'ların karşılaştırılması, gen ekspresyonunun farklı organizmalarda nasıl değiştiği ve hastalıkların anlaşılması konusunda etkili olmaktadır. Bu çalışmalar ile hastalık sırasında hangi genlerin aktif olduğu bilgisine ulaşılabilmekte ancak bu genlerin hangi oranlarda kullanıldığını kesin olarak bilmek mümkün olmamaktadır. Bunun nedeni mRNA'nın her zaman proteine çevrilmemesi ve dolayısıyla mRNA düzeylerinin kodlanmış protein aktivitesini tam olarak yansıtmamasıdır. Hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde proteinlerin genler ve transkriptlere göre çok daha etkili olduğu bilinmektedir (30, 35, 36).

2.3.3. Proteomik

Proteinler, amino asitlerin zincir halinde birbirine bağlanması sonucu oluşan makromoleküllerdir. Proteinler, organizma içinde metabolizma reaksiyonlarını katalizleme, DNA replikasyonu, uyarılara cevap verme, hücrelere ve organizmalara yapı sağlama ve molekülleri bir konumdan diğerine taşıma dâhil olmak üzere birçok hücresel işlevde rol almaktadır (37).

Bir organizmada veya sistemde genom tarafından kodlanan, hücreler arasında farklılaşabilen ve zamanla değişen proteinlerin tamamı proteomu oluşturmaktadır. Proteomik ise belirli biyolojik sistem veya organizmada belli koşullar altında (yer, zaman vb.) bulunan tüm proteinlerin yapılarının, yerlerinin, miktarlarının, modifikasyonlarının, işlevlerinin, diğer proteinlerle ve moleküllerle olan etkileşimlerinin belirlenmesi işlemidir (38).

Proteom, genom ve transkriptoma kıyasla daha dinamik bir yapıdır. Dolayısıyla proteomik çalışmalar genomik ile kıyaslandığında analiz ve veri değerlendirilmesi açısından çok daha karmaşıktır (39, 40).

Genomik çalışmalar ile insan genomunda yaklaşık 40,000 adet gen bulunduğu ve bu gen yapısının % 99,9'unun tüm insanlarda aynı olup insanlar arasında % 0,1 oranında bir farklılık bulunduğu belirlenmiştir (41). Bu genetik farklılığa sebep olan genlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi ve hastalıklar ile ilgili daha fazla bilgi sahibi

olunabilmesi için çok sayıda transkriptomik ve proteomik çalışmalar yapılmış ancak elde edilen sonuçlar klinik açıdan fenotiplerin açıklanması için yeterli olmamıştır. Bu nedenle klinik fenotiplerin açıklanmasında hücrede bulunan metabolitlerin taşıdığı bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (42).

Genomik, transkriptomik ve proteomik çalışmalar sadece organizmada neler olabileceğini hakkında bilgi verebilirken metabolomik çalışmalar organizmanın mevcut durumunu doğrudan ve doğru bir şekilde yansıtabilmekte ve organizmada tam olarak ne olduğu hakkında bilgi sunabilmektedir (43).

2.3.4. Metabolomik

Metabolizma canlıda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Metabolitler, bu biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan çeşitli küçük molekülü bileşikler (moleküler ağırlık ≤ 1500 Da) ifade etmekte olup insan hücrelerinin ve organlarının normal fizyolojik fonksiyonlarını korumada önemli bir rol oynayan hücreler arası sinyal iletimi için gerekli bileşenlerdir (44).

Metabolom ise bir hücre veya canlıdaki metabolizmanın tümünü temsil eden hücre içi metabolitler (endometabolom) ve hücre dışı sıvıya veya büyüme ortamına salgılanan metabolitlerden (ekzometabolom) oluşmaktadır. İnsan metabolomunda bulunan metabolit sayısı tam olarak bilinmemekte ancak bu sayının en az 2,000 en fazla 20,000 adet olduğu tahmin edilmektedir. Endometabolom düzeyindeki farklılıkları ölçmek için yapılan analizlere “metabolik parmak izi alma”, ekzometabolomda bulunan belirli metabolitlerin analizine ise “metabolik ayak izi alma” denilmektedir (30, 45-47).

Metabolomik belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük molekülü metabolitlerin (moleküler ağırlığı < 1500 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir (48).

Metabolomik analizler bir doku veya vücut sıvısındaki binlerce metabolitin aynı anda değerlendirilebilmesi ile hastalıklarda etkili olan metabolik yolların tanınması, özgün metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesi ve böylece klinik vakalar arasındaki moleküler farklılıkların saptanması sonucunda erken teşhis ve tedavinin bireyselleştirilmesine olanak sağlamaktadır (4, 6, 7). Metabolomik analizler sonucu

elde edilen veriler, fenotipik ve genotipik analizler, biyobelirteç keşfi, ilaç araştırmaları, nutrigenomik ve metabolik mühendislik gibi araştırmalarda kullanılarak karmaşık hücrenel sistemlerin biyokimyasal fonksiyonlarının anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir (49).

Planlanan analiz stratejisine göre metabolomik çalışmalar hedeflenmemiş ve hedeflenmiş olarak iki gruba ayrılmaktadır. Hedeflenmemiş analizlerde ölçülebilen (nitel olarak tayin edilebilen) tüm metabolitlerin (daha önceden tanımlanmamış olanlar da dahil) kapsamlı bir analizi gerçekleştirilir ve elde edilen fizyolojik bilgi metabolik yollar ile ilişkilendirilebilir. Hedeflenmiş analizlerde ise metabolizmadaki belirli bir metabolik yolağa katılan sınırlı sayıda metabolitin nicel analizi gerçekleştirilmektedir. Hedeflenmemiş analizlerle hastalık teşhisi için yeni belirteçlerin bulunması amaçlanmışken, hedeflenmiş metabolomik çalışmalarda ise seçilmiş belirteçlerin miktar tayinlerinin yüksek kesinlikte ve tekrarlanabilirlikte analizleri amaçlanmaktadır (7). Hedeflenmemiş analizlerde elde edilen değerler ile yarı-nicel analizler gerçekleştirdiğinden laboratuvarlar arasında hatta aynı laboratuvarda farklı zaman dilimlerinde yapılan analizlerde bile çok büyük varyasyonlar görülebilirken, hedeflenmiş analizler derişim üzerinden yürüdüğü için varyasyonlardan daha az etkilenmekte olup bu nedenle rutin analizlerde kullanılmaktadır.

Ayrıca farklı metabolik yolların ara maddelerinden oluşan metabolom oldukça karmaşık bir yapı olduğundan metabolomik verilerin yorumlanması için biyoloji, kimya ve matematik gibi disiplinlerin yer aldığı multidisipliner bir stratejiye ihtiyaç duyulmaktadır.

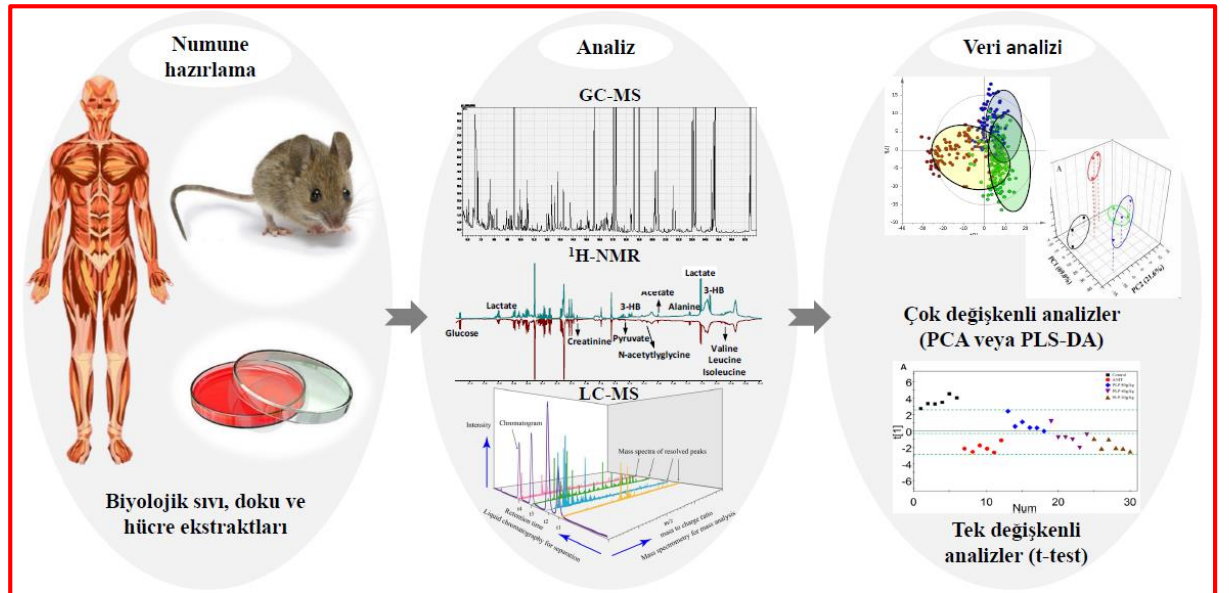
İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla hastalıkların moleküler düzeyde aydınlatılması ve bireysel tedavi olanaklarının belirlenmesinde yalnızca genom ya da proteom analizlerinin yeterli olmadığı görülmüş ve buna karşın metabolomik çalışmaların da dahil olduğu bütünsel bir değerlendirmeye ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır (50).

İlk olarak 2005 yılında başlayan HMP (Human Metabolome Project), Kanada Alberta Üniversitesi'nin, Genom Kanada ve Kanada İnovasyon Kurumu tarafından desteklenen 7,5 milyon dolar bütçeli bir inovasyon projesidir. Bu proje kapsamında insan vücudunda idrar, plazma, beyin omurilik sıvısı ve lökositlerde bulunan tüm metabolitleri tanımlamak, ölçmek ve referans değer aralığını belirlemek (Human

Metabolome Data Base-HMDB), bu verilerin serbestçe elektronik ortamda ulaşılabilir olmasını sağlayacak bir kütüphane (Human Metabolome Library-HML) oluşturmak amaçlanmıştır. HMP 2009 yılında tamamlanmış ve sonuçları www.hmdb.ca adresinde açıklanmış olup kimyasal, klinik ve moleküler verileri içerecek veya ilişkilendirecek şekilde tasarlanmıştır. HMDB'deki kimyasal veriler hem suda hem de lipitte çözünür olan farklı derişimdeki ($>1 \mu\text{M}$, $<1 \text{nM}$) metabolitleri kapsamaktadır. HMDB, ~114,100 metabolit verisi içermekte olup bu metabolitler 333,311'den fazla farklı sinonimle, ~25,770 metabolik yolakla, 6305 farklı enzim, 110,000 tek nükleotid polimorfizmi ve 652 genetik veya kazanılmış metabolik hastalıkla bağlantılıdır. HMDB endojen metabolitlerin yanı sıra ~2280 ilaç, ~28,000 besin bileşeni içermektedir. HML'deki bileşik sayısı 778'dir (30, 51, 52).

2.4. Metabolomik Uygulamalar

Metabolomik analizler; numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleri olmak üzere başlıca üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.3.).



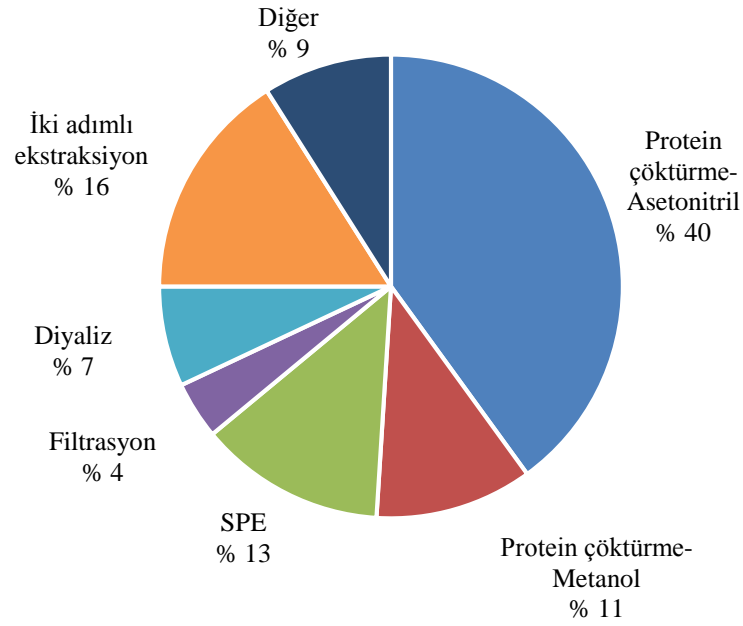
Şekil 2.3. Metabolomik analiz basamakları: Numune hazırlama (sıvı, doku, hücre ekstraktları), metabolomik analiz (GC-MS, LC-MS ve H-NMR) ve veri analizi (tek değişkenli ve çok değişkenli).

2.4.1. Numune Hazırlama

Metabolomik analizlerde ilk adım numunelerin toplanması, saklanması ve analize hazırlanmasını içeren numune hazırlama basamağıdır. Metabolomik analizler kan, plazma, tükürük ve idrar gibi biyolojik sıvılar, doku örnekleri veya hücre ekstraktları ve matriks ortamında gerçekleştirilmektedir.

Başlangıçta metabolomik çalışmanın amaca yönelik planlanması ve numunelerin sağlıklı bir şekilde toplanması gerekmektedir. Daha sonra, numunenin saklanması ve analize hazırlanması aşamalarında sonuçların doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini etkileyen zaman ve sıcaklık parametrelerinin kontrol edilmesi oldukça önemlidir. Metabolik reaksiyonlar son derece hızlıdır, bu nedenle numunelerin dondurulması ve analiz zamanına kadar -80°C 'de saklanması gerekmektedir.

Metabolomik analizlerde en kritik basamaklardan biri olan numune hazırlama işleminin düzgün bir şekilde yapılamaması numunedeki metabolit seviyelerinin bozulmasına ve toplanan verilerin yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir. Numune hazırlama yönteminin eksiklikleri ve sınırlamaları, bir numune hazırlama protokolü tasarlanmadan önce iyice anlaşılmalı ve aktif olarak dikkate alınmalıdır. İdeal numune hazırlama yöntemi basit ve sağlam olmalı, örneğin bütünlüğünü koruyabilmelidir (53). Numune hazırlama basamağı genellikle analiti matriks ortamından mümkün olduğunca temizlemek ve deriştirmek amacıyla yapılmaktadır. Analize hazırlanma aşamasında, kullanılacak analiz yöntemine ve numune tipine göre çeşitli çöktürme (farklı organik çözücüler kullanılarak), tüketme (sıvı-sıvı, katı faz tüketme vb.) ve türevlendirme işlemleri uygulanabilmektedir. Hedeflenmemiş analizlerde genellikle organik çözücü temelli protein çöktürme yöntemi numune hazırlamada önerilen bir yöntemdir. Çöktürücü olarak asetonitril oldukça yaygın kullanılmaktadır (Şekil 2.4.). Son yıllarda numune hazırlama basamağının otomatik hale getirildiği yaklaşımlar da ortaya çıkmış olup bu durum insan hatalarını ve numune hazırlama tekniklerindeki farklılıkları gidermeye yardımcı olmaktadır (54-57).



Şekil 2.4. Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde numune hazırlama yöntemlerinin dağılımı (56).

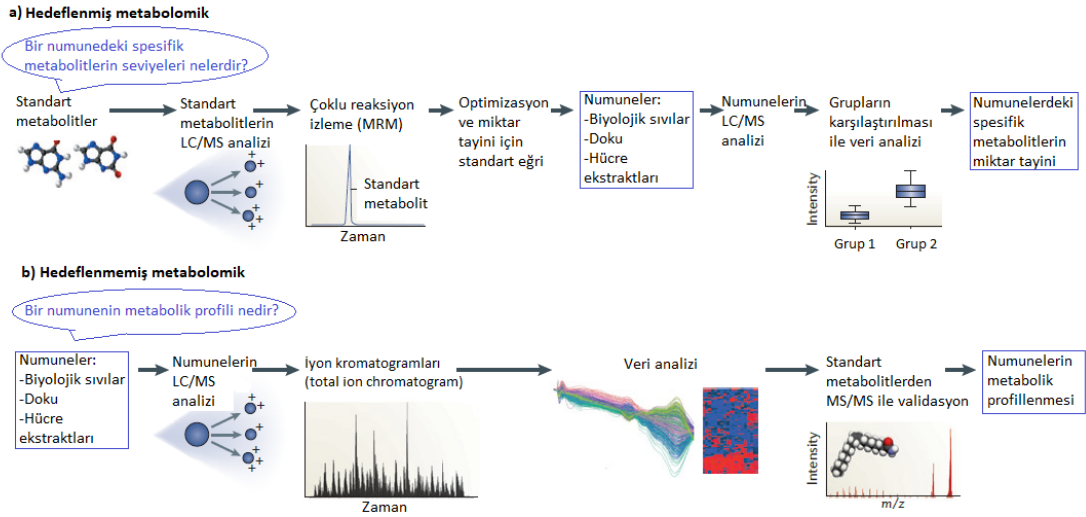
2.4.2. Metabolomik Analiz Yöntemleri

Metabolomik çalışmaların ikinci basamağını metabolitlerin analizi oluşturmaktadır. Metabolik ağların ve fonksiyonlarının kapsamlı bir karakterizasyonu için metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesi gerekir. Biyolojik sıvılarda bulunabilecek çok sayıda metabolitin yanı sıra bunların fiziko-kimyasal çeşitliliği ve geniş derişim aralığı analitik açıdan zorlayıcı bir durum olduğundan tek bir analitik yöntem ile bütün metabolomun analizi sağlanamamaktadır. Bu yüzden farklı analitik yöntemlerin birlikte kullanılması gerekmektedir (58, 59). Metabolomik analizlerde kullanılan analiz teknikleri hassasiyet düzeyi, analiz edilecek numune hacmi ve numune hazırlama yöntemlerine göre farklılaşmaktadır.

Metabolomik analizlerde kapiler elektroforez (CE), gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografi (LC) gibi ayırma yöntemleri ile nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle spektrometresi (MS) temelli dedeksiyon teknikleri genellikle kombine halde kullanılmaktadır.

Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik analizler için numunelerin toplanması, hazırlanma basamakları ve kromatografik sistemlerde kullanılan sabit ve

hareketli fazlar genellikle aynıdır. Ancak MS’de hedeflenmiş analizlerde iyon seçici modunda (SIM) çalışılırken, hedeflenmemiş çalışmalar ise tarama modunda (scan) gerçekleştirilir. LC-MS temelli hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizlere ilişkin örnek iş akış şeması Şekil 2.5.’de sunulmuştur.



Şekil 2.5. LC-MS temelli hedeflenmiş ve hedeflenmemiş metabolomik analizlerde iş akış şeması (50).

Ayırım Teknikleri

Kapiler Elektrophrez (CE)

CE yönteminde bileşikler analitin yüküne ve boyutuna bağlı olan kendi iç elektroforetik hareketliliklerindeki farklılıklar temelinde ayrılmaktadırlar. Bu nedenle CE polar ve yüklü metabolitlerin analizi için son derece uygundur. Ayrıca, CE'nin ayırma mekanizması, kromatografik esaslı ayırma tekniklerinden temel olarak farklı olduğu için, belirli bir biyolojik numunede mevcut olan metabolitlerin kompozisyonu hakkında tamamlayıcı bir bilgi sağlanabilmektedir. Ancak CE'in teknik olarak zorlu bir yaklaşım olması ve hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve yöntem sağlamlılığı konularındaki kısıtlamaları bu teknolojinin yaygın olarak kullanımını engellemiştir. CE'nin düşük örnek hacmine ihtiyaç duyma avantajı nedeniyle biyomedikal/klinik

çalışmalarda önemli bir rol oynayabileceği tahmin edilmekte olup büyük ölçekli klinik çalışmalar için analitik performansının kanıtlanması gerekmektedir (60).

Gaz Kromatografisi (GC)

GC yöntemi metabolomik analizlerde oldukça yaygın olarak kullanılmakta olan yüksek kapasiteli bir tekniktir. GC öncelikle termal olarak kararlı ve uçucu metabolitlerin analizinde kullanılır. GC ile apolar metabolitler doğrudan analiz edilebilirken polar metabolitlerin analizi için türevlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Metabolomik analizlerde GC yönteminin kullanılması diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında ayırım gücünün yüksekliği, tekrarlanabilirlik ve gelişmiş spektral kütüphanelere sahip olması açısından avantajlı bir yöntemdir. Ancak birçok metabolitin analizinde türevlendirmeye ihtiyaç duyulması ve termal olarak kararsız metabolitlerin analiz edilememesi gibi bazı dezavantajlara da sahiptir (61, 62).

Sıvı Kromatografisi (LC)

LC yönteminde ayırım, metabolitlerin sıvı veya katı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasındaki etkileşimine dayanmaktadır. LC diğer ayırım yöntemleri ile kıyaslandığında sağlam, hızlı ve tekrarlanabilir bir analiz olanağı sunmakla birlikte; metabolomik çalışmalarda analiz edebileceği metabolit çeşitliliği bakımından oldukça zengin bir yöntemdir. Ayrıca bir MS veya diğer ölçüm cihazları ile kombine edilmesi nispeten daha kolaydır (63, 64).

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen metabolomik analizlerde LC yöntemi kullanıldığından bu kısım daha ayrıntılı incelenecektir.

Sıvı Kromatografisi Temelli Metabolomik Çalışmalarda Ayırımı Etkileyen Parametreler

a) Sabit Faz Etkisi

Bilindiği üzere metabolitler birbirlerinden oldukça farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahiptirler. LC yöntemi ile hem hidrofobik hem de hidrofilik özellikte metabolitler analiz edilebilmektedir. Bu nedenle etkili bir ayırım sağlayabilmek için kullanılan sabit faz seçimi çok önemlidir (63).

Numune hazırlama yöntemindeki koşulların çeşitliliğine benzer şekilde tüm metabolit sınıfları için tek bir kromatografik yöntem uygun değildir. Büyük ölçekli metabolomik analizlerde LC oldukça kullanışlı bir ayırma yöntemi olmaktadır. C18 kolonlu ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yarı polar metabolitler ve lipitler için; hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisinde kullanılan HILIC kolon ise polar metabolitlerin ayrılması için uygundur (65, 66).

RPLC'de sabit faz, katı silika veya polimere kovalent olarak bağlı bir hidrofobik karbon zinciri olup ayırımın temeli numune moleküllerinin hidrofobikliğine dayanır. Organik elüentin içeriği artırılarak (değiştirilerek) hidrofobik moleküller kolonda ayrıştırılabilir. RPLC'de kullanılan elüsyon maddeleri genellikle uçucudur ve bu sebeple elektrosprey iyonlaştırıcılı (ESI) MS ile kombine edilmeye uygundur. RPLC'nin dezavantajı, polar molekülleri bağlama yeteneğinin zayıf olmasıdır. C18 kolonları kullanılan RPLC ile fenolik asitler, flavonoidler, glikosile edilmiş steroidler, alkaloidler ve diğer glikosile edilmiş türler gibi yarı polar bileşikler ayrılabilir (67).

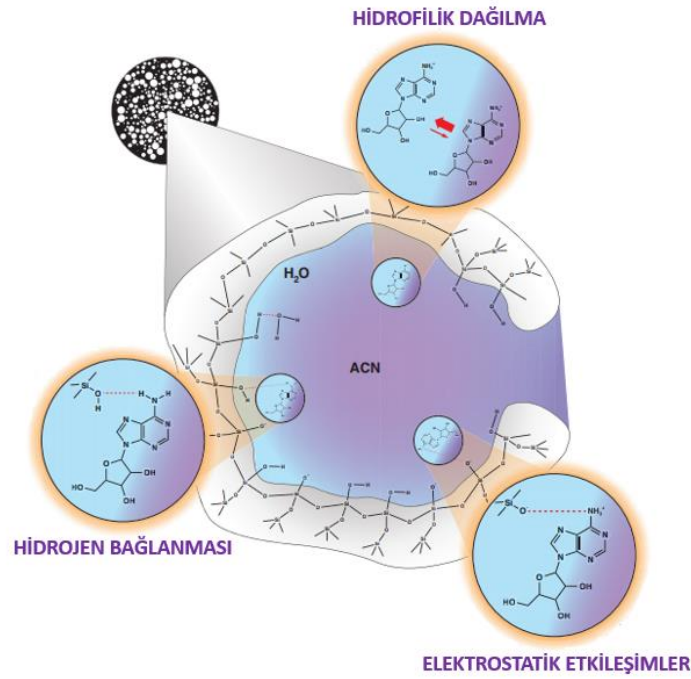
LC kolonlarında inorganik silika veya organik polimer olmak üzere iki tip sabit faz kullanılır; sabit faz gözenek büyüklüğü genellikle 80–300 Å ve partikül çapı 3-5 µm'dir. Kolon uzunluğu 30 ila 250 mm arasında değişebilmektedir (68, 69).

HILIC, normal faz kromatografisinin bir çeşidi olup ayırım mekanizması moleküllerin hidrofilikliğine dayanmaktadır. RPLC'nin polar bileşikleri ayıramadığı durumlarda genellikle iyi bir alternatiftir (70, 71).

HILIC, hareketli faz olarak sulu-organik bir elüentin kullanıldığı normal faz kromatografisi olarak kabul edilebilir. HILIC'te yaklaşık % 5 ila % 40 oranında su

içeren organik bir karışımın sabit faz üzerinde kısmen sulu bir tabaka halinde tutturulması ile oluşan polar bir sabit faz kullanılır. Bu nedenle bazen “sulu normal faz kromatografisi” olarak da adlandırılmaktadır. Sabit faz genellikle çıplak silika veya amit, diol, amin veya zwitteriyonik kısım gibi fonksiyonel gruplar tarafından modifiye edilmiş silikadan oluşur. Ayrıca polimer temelli sabit fazlar da kullanılabilir (56, 72).

HILIC’de sabit faz yüzeyine tutunma işlemi, temelde sabit fazın yapısına, organik çözücü tipine ve hareketli fazdaki çözücülerin yüzdesine bağlı olarak adsorpsiyon veya dağılma olayları sonucu gerçekleşmektedir. Tutunma mekanizmasında etkili olan güçler hidrofilik dağılma, dipol-dipol etkileşimi, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerdir (Şekil 2.6.) (73).



Şekil 2.6. Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisinde ayırma mekanizmaları (74).

Bu yöntem şekerler, amino asitler, vitaminler, karboksilik asitler ve nükleotidler gibi önemli endojen metabolitlerin büyük bir kısmını temsil eden polar bileşikleri ayırmak için kullanılabilir (75).

b) Hareketli Faz Etkisi

LC yöntemi geniş bir polarite aralığına sahip bileşiklerin, su-organik çözücü bileşiminin sabit kaldığı izokratik elüsyon veya ayırım sırasında su-organik çözücü bileşiminin değiştiği gradient elüsyon ile ayırılmasına olanak sağlamaktadır. Basit numuneler (metabolit sayısı<10) için izokratik elüsyon tercih edilir. Gradient elüsyon ise daha karmaşık numunelerin ayırılmasında kullanılmakta olup izokratik elüsyona kıyasla daha hızlı bir analiz ve daha keskin pikler sağlamaktadır (76).

Organik çözücü tipi, pH ve iyon gücü gibi hareketli faz özellikleri, pik kapasitesi, çözünürlük, pik şekli ve hassasiyet açısından ayırimda etkili olmaktadır. Öncelikle hareketli fazdaki organik çözücü türü ve oranı optimize edilmelidir. RPLC’de asetonitril, metanol ve tetrahidrofuran en yaygın kullanılan organik çözücülerdir. HILIC’de ise organik çözücü olarak genellikle asetonitril, asetonitril-su karışımı, metanol veya izopropil alkol kullanılmaktadır. HILIC kolon yüzeyinde bulunan su tabakasından dolayı kolonun hareketli faz ile şartlanması zaman alacağından sabit fazın hidrasyonunu sağlamak için gradient analizler % 5 ila % 95 sulu faz oranında gerçekleştirilmelidir (56, 73, 77).

Hareketli faz pH’sı polimerik sabit fazlar için 2-10, silika temelli sabit fazlarda ise 2-8 aralığında olmalıdır.

Hareketli faz değiştiriciler, RPLC ve HILIC’in ayırım kararlılığını ve verimliliğini geliştirmek ve MS duyarlılığını arttırmak için yaygın olarak kullanılır. Bu değiştiriciler, 5-10 mM derişim aralığında amonyum format, amonyum asetat veya % 0,05-0,2 seviyesinde formik asit, asetik asit olabilir (73).

Bununla birlikte, hedeflenen metabolitlerin özelliklerine bağlı olarak, en iyi analitik cevap için farklı hareketli faz tampon koşulları ve hareketli faz değiştiricilerine ihtiyaç duyulabilir. İyon değiştirici olarak tributil amonyum veya diamil amonyum kullanılan LC yöntemi, C18 gibi bir RPLC kolonunda polar metabolitlerin analizi için de uygundur, ancak iyon çifti oluşturan reaktiflerden kaynaklanabilecek MS kontaminasyonuna dikkat edilmelidir (71, 73).

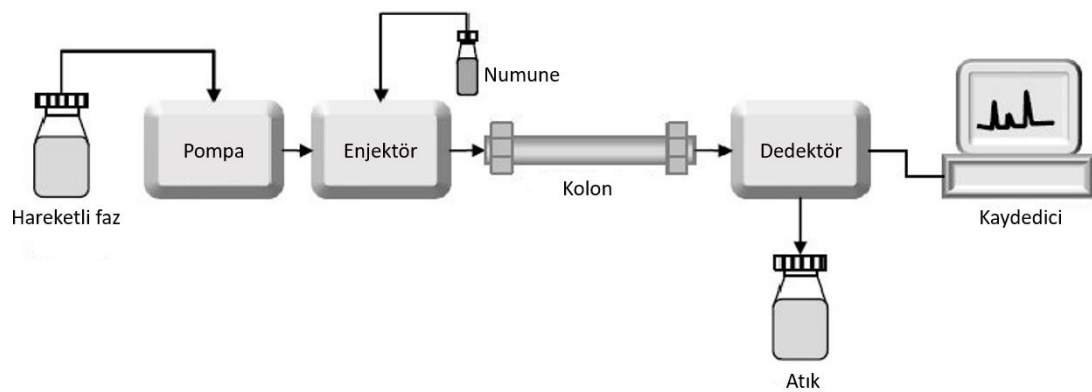
c) Analiz Süresi

Hedeflenmiş metabolomik analizler için LC'de analiz süresi, ayırım performansını iyileştirebilmekte olup MS tarafından tespit edilen piklerin sayısını arttırabildiğinden dikkate alınmalı, ancak bu durumun analitik süreyi uzatarak düşük verim oluşturabileceği unutulmamalıdır.

Nisbeten daha yeni bir teknik olan ultra performans sıvı kromatografisinin (UPLC/UHPLC) uygulanması ile daha kısa analiz süresinde daha iyi bir ayırım performansını sağlanabilmekte ve hedeflenmiş metabolomik analizler için ideal bir seçim olabilmektedir. HPLC ve UHPLC arasındaki fark, UHPLC'de daha küçük parçacık çapı ve kolon boyutlarının kullanılması (1-2 mm iç çap) ve analitlerin ayrılmasının çok yüksek basınç altında gerçekleşmesidir. UHPLC yöntemi ile daha kısa sürede daha yüksek kapasiteli ve keskin pikler elde edilerek hassasiyet ve verim arttırılmaktadır (78, 79).

Sıvı Kromatografi Cihazı

Bir LC cihazı temel olarak hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşmaktadır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Sıvı kromatografisi cihazının temel kısımları (80).

Dedeksiyon Yöntemleri

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

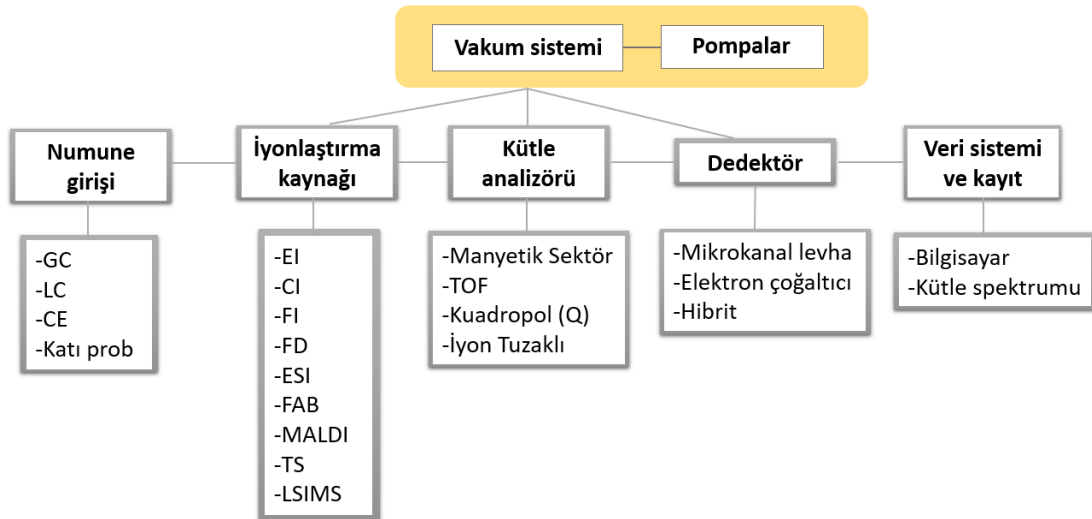
NMR spektroskopisi herhangi bir ayırım işlemine gerek olmaksızın çok sayıda metabolitin aynı anda analizine olanak sağlaması, numune hazırlama kolaylığı, basit protokoller ve zengin veri bankalarına sahip olması, yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük işletim maliyeti gibi avantajları sayesinde metabolomik analizlerde yaygın olarak kullanılan bir ölçüm tekniğidir. Ancak MS ile kıyaslandığında nispeten daha düşük duyarlılığa sahip olması NMR spektroskopisinin en önemli dezavantajı olup özellikle düşük derişimli numunelerin analizinde zorluklara ve tayin edilebilen metabolit sayısının daha az olmasına neden olmaktadır (81, 82).

Kütle Spektrometrisi (MS) (83-86)

MS, seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle metabolomik analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde kullanılan oldukça etkin bir analitik tekniktir.

Kütle spektrumu numunedeki iyonize hale getirilmiş moleküllerin kütle/yük (m/z) değerlerinin iyonun detektöre ulaşan miktarı ile orantılı olan yoğunluk (intesite) değerine karşı sıralanması ile elde edilmektedir. Bir bileşiğe ait kütle spektrumu bileşiğin moleküler kütlesi cinsinden ifade edildiğinden kimyasal yapı hakkında önemli bilgiler vermekte olup karmaşık karışımların nicel tayininde de kullanılmaktadır.

Kütle spektrometresi; numune girişi, vakum sistemi, iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri kayıt sistemi kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 2.8.). Kütle spektrometresinde analiz örneğinin buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların m/z oranlarına göre ayrılarak kaydedilmesi işlemleri gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.8. Kütle spektrometresi blok diyagramı.

Numune Girişi

Bir mikromol veya daha az derişimdeki numune GC, LC, CE veya katı prob tarafından 10^{-5} torr basınçtaki iyonizasyon bölümüne gönderilir.

Vakum Sistemi

Kütle spektrometrelerinde daha tekrarlanabilir fragmentasyon sağlayarak daha hassas ve doğru bir kütle analizi yapılabilmesi için sistem belli bir vakum altında tutulmaktadır. 10^{-4} - 10^{-7} torr değerindeki vakum, bir rotary ve turbomoleküler pompa olmak üzere iki kademeli vakum sistemiyle sağlanmaktadır.

İyon Kaynağı

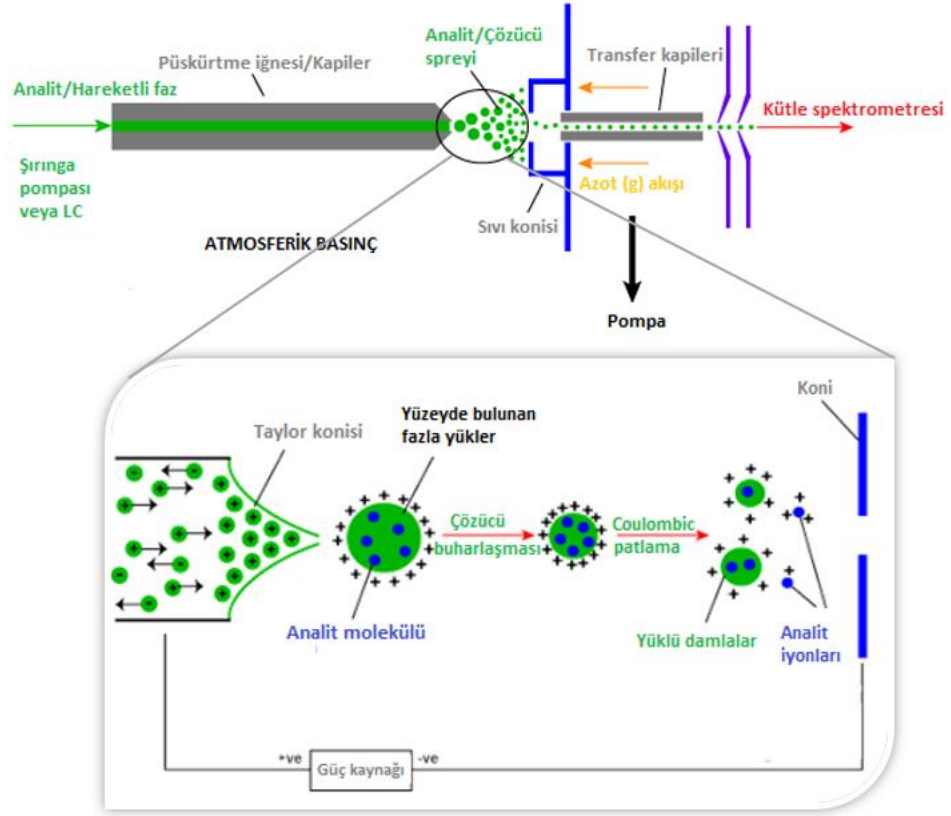
Kütle spektrometresi sistemine giren numune moleküllerine ilk olarak iyonlaştırma işlemi uygulanmaktadır. İyonlaştırma basamağında molekülün fiziksel özelliklerine ve iyonlaşma enerjisine bağlı olarak farklı iyonlaştırma teknikleri uygulanabilir. İyonlaştırma sırasında hem pozitif hem de negatif yüklü iyonlar oluşmakta ancak pozitif olanlar çoğunlukta olup analitik tekniklerde genellikle bu iyonlar kullanılmaktadır.

İyon kaynağının türünden bağımsız olarak iyonlaşmanın yüksek iyon verimi ve küçük enerji dağılımına sahip olması gerekmektedir. İyon kaynağı olarak elektron, foton, elektriksel ark (kıvılcım), ısı ve kimyasal reaksiyonlar kullanılabilir. Kütle spektrometrelerinde kullanılan iyonizasyon teknikleri; elektron bombardımanı (EI), kimyasal iyonizasyon (CI), alan iyonizasyonu (FI), alan desorpsiyon (FD), elektrospray iyonlaştırması (ESI), hızlı atom bombardımanı (FAB), matriks yardımcı desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI), termospray iyonlaştırma (TS), ikincil iyon kütle spektrometresi (SIMS) teknikleridir.

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan ESI tekniği ayrıntılı incelenecektir.

Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

En yumuşak iyonizasyon tekniği olan ESI proteinler, peptitler ve nükleik asitler gibi polar, iyonlaştırılması zor ve uçucu olmayan büyük moleküller için ideal bir iyonizasyon yöntemidir. ESI, sıvı kromatografisinde kolonun çıkışına bir arayüz ile bağlanmaktadır. ESI tekniğinde numune çözeltisi yüksek voltaj uygulanabilen (4,5 kV) mikro boyutta (~ 8 µm) bir kapiler iğne içerisinden sabit bir hacimde kaynak odacığına püskürtülür. Kapiler ile çıkış yönündeki levha arasında yüksek bir potansiyel fark oluşturulur. Damlacıklar kapilerden çıkarken yüklüdür ve uygulanan elektriksel alan yüklü sıvı damlacıklarını kapilerin ucunda bir koni (Taylor konisi) oluşturmaya zorlar. Taylor konisi damlacıklara ait yük/yüzey oranını azaltır. Bu damlacıkların uygulanan azot gazı ile etkileşmesiyle çözücü buharlaşırken yüklü analit moleküllerini bırakır ve damlalar kaybolur. Şekil 2.9.'da elektrosprey oluşumu şematize edilmiştir. Oluşan iyonlar kütle analizörüne gönderilir ve uygulanan voltaj türüne göre pozitif veya negatif yüklü iyonlar elde edilir. Hareketli faz, tampon, pH, akış hızı ve ilgili metabolit derişimi iyonlaşmayı etkileyebilmektedir. ESI kolaylıkla LC ve CE gibi ayırım teknikleri ile birleştirilebilir.



Şekil 2.9. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği ile iyon oluşumu (85).

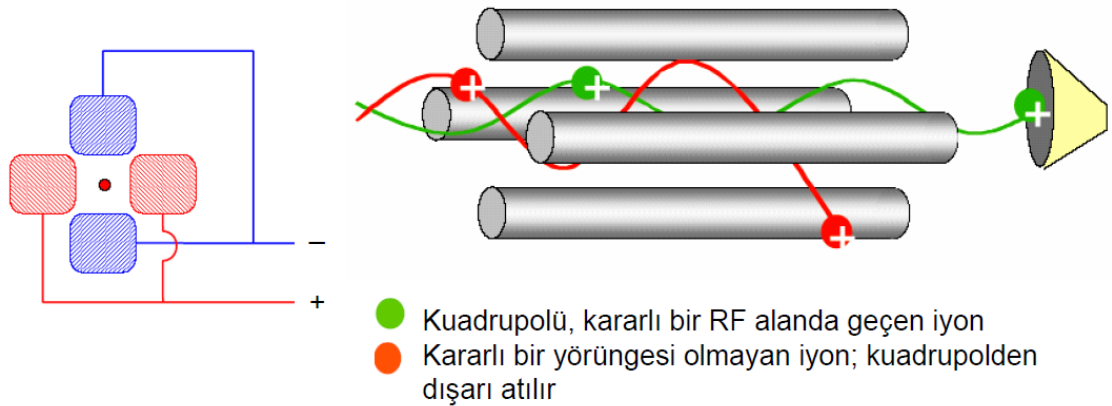
Kütle Analizörü

Kütle analizörü iyon kaynağı içerisinde oluşturulan iyonların elektrik alan etkisiyle zaman veya alan içindeki m/z oranlarına göre ayrıldığı kısım olup kütle spektrometrelerinin temel bileşenidir. En çok kullanılan kütle analizörleri magnetik sektörlü, uçuş zamanlı (TOF), kuadrapol (Q) ve iyon tuzaklı kütle analizörüdür. Bu analizörlerin metabolit analizi açısından boyut, fiyat, çözünürlük, kütle aralığı ve tandem kütle spektrometresi (MS/MS) deneylerini yapma yeteneklerine göre farklı güçlü ve zayıf yönleri vardır.

Tez çalışmasında kuadrapol kütle analizörü kullanıldığından bu analizör ayrıntılı olarak incelenecektir.

Kuadrapol Kütle Analizörü

Kuadrapol kütle analizörü birbirine paralel dört çubuktan oluşur; karşılıklı çubuklar aynı polaritede, komşu çubuklar zıt polaritededir. Her bir çubuğa doğru akım (DC) ve radyo frekansı (RF) voltaj uygulanır; DC/RF kuadrapol voltajları değiştirilerek iyonlar taranır. RF alanda, sadece seçilmiş m/z oranındaki iyonlar doğru yolu izlerler. Alanlardan ikisi de iyon kaynağından çıkan pozitif tanecikleri hızlandıracak bir etki yapmaz, fakat birleştirilen alan taneciklerin kendi hareketlerinin merkez eksenini etrafında titreşmesine neden olur; böylece çubuklardan biri ile çarpışarak saptırılmadan sadece uygun m/z oranındaki tanecikler dedektöre ulaşabilirler. Uygulanan alternatif akımın veya iki kaynağın potansiyellerinin değiştirilmesi fakat oranın sabit tutulması ile kuadrapol spektrumu çizilir (Şekil 2.10.).

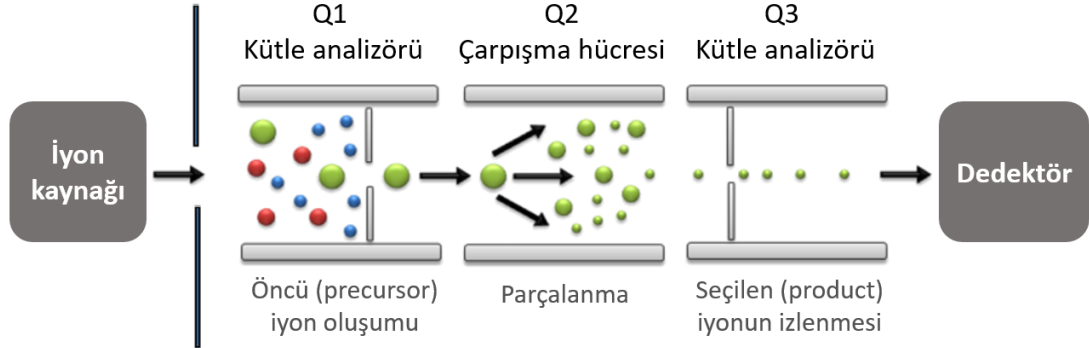


Şekil 2.10. Kuadrapol kütle analizörü (85).

Üç Kademeli Kuadrapol ve MS/MS

Üç kademeli (triple) kuadrapol genellikle metabolitlerin nicel analizi için kullanılmakta olup ESI ile kombine edilmiş kütle analizörleridir. Q1, Q2 ve Q3 olmak üzere üç farklı kuadrapolden oluşmaktadır (Şekil 2.11.). İyon kaynağından çıkan iyon karışımı ilk olarak Q1 analizörüne ulaşır ve istenilen m/z oranına sahip iyon taranarak Q2 analizörüne gönderilir. Bir çarpışma hücresi olarak çalışan Q2 analizöründe iyonların inert gaz (helyum, azot, argon veya ksenon) molekülleri ile çarpışması

sonucu parçalanma işlemi gerçekleşir. Son olarak Q3 analizörü hedeflenen m/z değerine sahip iyonu seçerek dedektöre gönderir.



Şekil 2.11. Üç kademeli kuadrapol (QQQ) kütle analizörü (86).

Üç kademeli quadrupol diğer yüksek çözünürlüklü analizörler ile karşılaştırıldığında maliyet, boyut, sağlamlık, kullanım ve bakım kolaylığı açısından avantajlı bir yöntem olmasına rağmen düşük çözünürlük ve sınırlı kütle aralığı gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. Ayrıca bu yöntem ile tam tarama (full scan), öncü iyon taraması (precursor ion scanning), nötral kayıp taraması (neutral loss scanning) ve çoklu reaksiyon izleme (multiple reaction monitoring, MRM) gibi farklı tarama modlarında çalışılabilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında MRM modunda çalışılmıştır. MRM, karmaşık numunelerde bilinen fragmentasyon özellikleri olan özgün bir analitin saptanması için kullanılır. MRM, bir öncü iyonun ve bu öncü için karakteristik bir özgün fragmentin sırasıyla Q1 ve Q3 tarafından seçildiği bir dizi kısa deneyden oluşur. Alet bir dizi öncü fragment çifti arasında geçiş yapar ve sinyali zamanın bir fonksiyonu olarak kaydeder (87).

MS temelli GC, CE ve LC analitik tekniklerinin karşılaştırılmasına ilişkin veriler Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. MS temelli analitik tekniklerin avantaj ve dezavantajları (88, 89).

Analiz tekniği	Avantaj	Dezavantaj	Analiz edilebilen metabolitler
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Uçucu ve yarı uçucu analitler için uygundur. • İyi ve tekrarlanabilir analiz sağlar. • Zengin veri bankalarına sahiptir. 	<ul style="list-style-type: none"> • Uçucu olmayan ve termal olarak kararsız bileşikler için uygun değildir. • Zaman alan bir türevlendirme gerektirir. • Türevlendirme, bilinmeyenlerin tanımlanmasında zorluklara neden olabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amino asitler • Karboksilik asitler • Pürinler ve pirimidinler • Şeker fosfatları
CE-MS	<ul style="list-style-type: none"> • İyi bir ayırım sağlar. • Küçük örnek hacimleri gerektirir. • Tampon gradienti uygulanmadığından elektrosprey iyonizasyonunda dalgalanma olmaz. 	<ul style="list-style-type: none"> • MS ile ara yüzey oluşturması zordur. • Kullanılan tamponlar MS ile uyumsuzluk oluşturur. • Hassasiyeti zayıftır. • Göç zaman kayması oluşabilir. 	<ul style="list-style-type: none"> • Organik asitler • Şeker fosfatları • Nükleotidler • Koenzimler
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> • Türevlendirme gerekli değildir. • Polar, yarı polar ve polar olmayan metabolitler için uygundur. • Farklı işlevselliklere sahip geniş bir sabit faz aralığı sunar (RP, hidrofilik etkileşim kromatografisi, iyon değişimi). • Termal olarak kararsız analitlerin analizine olanak sağlar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrosprey iyonlaşması matriks bileşenlerinden etkilenir. • Kullanılabilecek elüentler bazı sınırlamalara sahiptir (sadece uçucu tamponlar ve katkı maddeleri kullanılabilir). • Parçalanma ürünleri GC-MS'deki kadar tekrarlanabilir değildir. 	<ul style="list-style-type: none"> • Organik asitler • Şeker fosfatları • Nükleotidler • Koenzimler

2.4.3. Veri Analizi

Metabolitlerin analiz edilmesinden sonra elde edilen verilerin çeşitli istatistiksel yöntemler (tek değişkenli ve çok değişkenli), ilgili yazılım ve veri bankaları kullanılarak değerlendirilmesidir.

Yazılım Programları (90-92)

Verimli ve güvenilir veri işleme başarılı veri analizine ve biyolojik olarak önemli bulgulara doğru atılan ilk adımdır.

Özellikle hedeflenmemiş metabolomik analizlerde LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR tekniklerinin kullanılması ile elde edilen analitik verinin bilgisayar destekli bir ön işlemden geçirilmesinin nedeni çalışma sürecinde oluşabilecek zaman kaybını ve analizciden kaynaklı olası hataları en aza indirmektedir. Bu amaçla kullanılacak çok sayıda ticari olan veya olmayan yazılımlar bulunmaktadır. Metabolomik çalışmalarda kullanılan yazılımlardan bazıları; BioSpider, Colmar, FiD (Fragment iDentificator), HORA (Human blood RangeValidator), MeltDB, MetaboAnalyst, SIMCA, MetaboMiner, OpenMS, SetupX, XCMS, MetAlign, MS-DIAL, AMDIS, SpectConnect ve MZmine'dir. Her bir yazılım paketi, ön işleme, veri analizi, görselleştirme ve yorumlamanın farklı adımlarında kendine özgü avantajlara sahiptir.

Metabolomik Veri Bankaları (91, 93, 94)

Metabolomik çalışmalarda elde edilen kapsamlı verinin tanımlanması ve yorumlanabilmesi için uygun veri bankalarının kullanılması kaçınılmaz bir gerekliliktir. Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizlerde uygulanan ayırım yöntemine göre metabolitlerin alıkonma zamanını ve kütlelerini bilmek metabolomik çalışmalarda çok önemli bir avantajdır. GC-MS yöntemi, LC-MS ile karşılaştırıldığında ayırım gücü ve tekrarlanabilirlik gibi üstünlükleri sayesinde oldukça zengin kütüphanelere sahip olup metabolomik çalışmalar için evrensel bir yöntem haline gelmiştir. Günümüzde mevcut veri bankaları sayesinde tanımlanan her bir metabolite ait fiziksel

ve kimyasal özelliklere, klinik bilgiye, bilimsel yayınlara ve ilgili metabolitin katıldığı metabolik yollar hakkındaki bilgilere tek bir kaynaktan ulaşılabilir.

HMDB, METLIN, MMCD (Madison Metabolomics Consortium Database), SetupX, Fiehn GC-MS Database, BML-NMR (Birmingham Metabolite Library Nuclear Magnetic Resonance Database), Golm Metabolome Database, PubChem, ChEBI, ChemSpider, DrugBank, Therapeutic Target Database, SuperTarget, MetaCyc ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) metabolomik çalışmalarda kullanılan veri bankalarından bazılarıdır.

2.5. Metabolitler

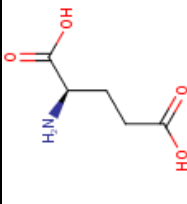
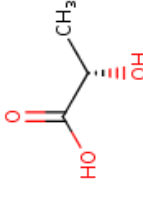
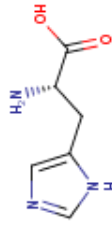
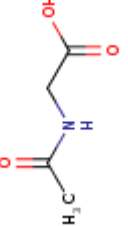
2.5.1. Biyobelirteç Olarak Metabolitler

National Institute of Health (NIH) biyobelirteç tanımlama çalışma grubu (NIH Biomarkers Definitions Working Group)'na göre biyobelirteç terimi, “normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir işlem sonucu oluşan farmakolojik tepkinin göstergesi olarak objektif olarak ölçülen bir özellik” olarak tanımlanmıştır (95). Biyobelirteçler kullanım amaçlarına göre tanısal, öngörücü, metabolik ve sonuç biyobelirteçleri olmak üzere dört farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Biyobelirteçler bir hastalığın erken tanısında, teşhisinde ve sınıflandırılmasında ya da tedavide kullanılan ilaç dozlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Metabolomik çalışmalardaki gelişmeler yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Yeni biyobelirteçlerin klinik alanda kullanılabilmesi için çeşitli validasyon çalışmaları ve uygulamalar yapılması zorunludur (96, 97).

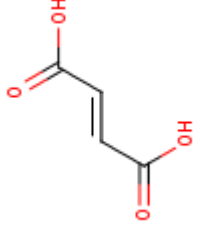


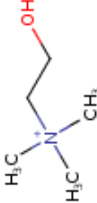
2.5.2. Hedeflenen Metabolitler

Tez kapsamında hedeflenmiş olan metabolitlere ait bilgiler Tablo 2.2.'de verilmiştir (98, 99).

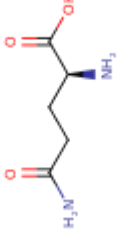
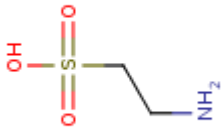
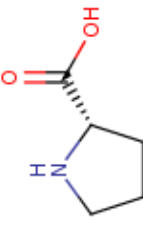
Tablo 2.2. Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
1	Glutamik asit	$C_5H_9NO_4$	147,13	1,88	-3,5		Glutamik asit, protein biyosentezinde kullanılan, esansiyel olmayan bir amino asittir. Glutamat formu merkezi sinir sistemindeki temel uyarıcı nörotransmitterdir ve beyindeki birçok reaksiyonda rol alır.	(100, 101)
2	Laktik asit	$C_3H_6O_3$	90,08	3,78	-0,47		Laktik asit, kimyasal sentez veya mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretilen kiral bir moleküldür. Laktik asit, çeşitli biyokimyasal işlemlerde rol oynar ve yoğun aktivite sırasında kaslarda üretilir.	(100, 102)
3	Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	155,16	1,85	-3,6		Histidin, bir imidazol fonksiyonel grubuna sahip olan 22 proteinojenik amino asitten biridir. Histidin, insanlarda büyüme ve doku onarımı için ihtiyaç duyulan semi-esansiyel bir amino asittir. Histidin histamin üretimi için ve kan hücreleri üretimi için gereklidir ve dokuları radyasyon ve ağır metallerin neden olduğu hasara karşı korur.	(103, 104)
4	N-Asetilglisin	$C_4H_7NO_3$	117,10	3,77	-1,3		N-asetilglisin, peptidomimetiklerin biyolojik araştırmalarında kullanılır. Bazı amino asitleri ve amino asit analoglarını hazırlamak ve ayrıca peptitleri modifiye etmek için N-terminus'un bloke edici ajanı olarak kullanılır. N-süstitüe glisin analogları, peptidomimetikler ve ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılır.	(103)

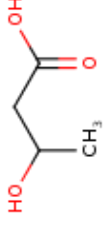
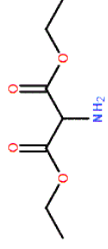
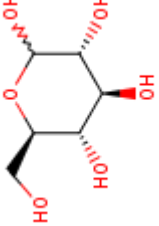
Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
5	Fumarik asit	$C_4H_4O_4$	116,07	3,55	-0,04		Fumarik asit süksinik asidin oksidasyonu ile oluşturulan bir dikarboksilik asit olup Krebs (TCA) döngüsünde rol alan bir ara moleküldür. Fumarik asit son zamanlarda kanser ile ilişkili endojen bir metabolit olarak tanımlanmıştır. Bu organik asit tümörlerde veya tümörü çevreleyen biyolojik sıvılarda yüksek seviyelerde bulunabilmektedir.	(100, 105)
6	Azelaik asit	$C_9H_{16}O_4$	188,22	4,15	1,82		Azelaik asit, oleik asidin oksidasyon ürünü olan bir dikarboksilik asittir. Hem in vitro hem de in vivo olarak çeşitli biyolojik etkilere sahiptir.	(103)
7	2-Aminoizobütirik asit	$C_4H_9NO_2$	103,12	9,72	-2,4		Pirimidin metabolizmasının bir son ürünü olan aminoisobütirik asit, sağlıklı bireylerin yaklaşık % 5'inin idrarında bulunan protein olmayan bir amino asittir. Doğada nadiren, yalnızca alametisin ve bazı antibiyotikler gibi mantar kökenli bazı antibiyotiklerde bulunabilir.	(100)
8	Kolin	$C_5H_{14}NO$	104,17	13,97	-4,7		Kolin birçok bitki ve hayvan organında bulunan lesitinin temel bir bileşenidir. Asetilkolinin öncüsü olarak, çeşitli metabolik işlemlerde ve lipid metabolizmasında bir metil donörü olarak önemlidir. Ayrıca kolin artık temel bir vitamin olarak kabul edilmektedir.	(103, 106)

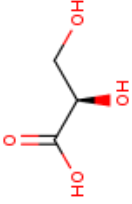
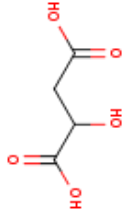
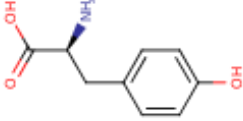
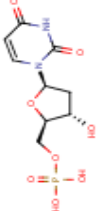
Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
9	Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	146,14	2,15	-0,17		Glutamin, standart genetik kod tarafından kodlanan 20 amino asitten biridir. İnsanlarda, esansiyel olmayan bir amino asit olarak kabul edilir. Protein sentezinin yapı taşlarından biri olmasının yanı sıra, beyin fonksiyonunda en yaygın uyarıcı nörotransmitterdir. Ayrıca GABAerjik nöronlarda GABA'nın sentezinde bir öncü molekül olarak bulunmaktadır.	(100, 101)
10	Taurin	$C_2H_7NO_3S$	125,15	-1,5	-2,6		Taurin, metiyonin, sistin, sistein ve homosistein gibi bir sülfür amino asittir. Taurin safra asitlerinin konjugasyonu, antioksidasyon, osmoregülasyon, membran stabilizasyonu ve kalsiyum sinyalleşmesinin modülasyonu gibi birçok temel biyolojik role sahiptir. Taurin beyinde, kalpte, göğüste, safra kesesinde ve böbreklerde bol miktarda bulunur ve bu organlarda birçok biyolojik fonksiyona sahiptir.	(100, 107)
11	Prolin	$C_5H_9NO_2$	115,13	1,94	-2,6		Proteinlerin yapıtaşı olan yirmi aminoasitten biri olan prolin, glutamik asitten sentezlenen esansiyel olmayan bir amino asittir. Kollajenin temel bir bileşenidir ve eklemlerin ve tendonların düzgün çalışması için önemlidir. Kalp kaslarının korunmasına ve güçlendirilmesine yardımcı olur.	(103)


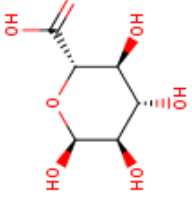
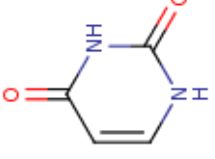
Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
12	3-Hidroksibütirik asit	$C_4H_8O_3$	104,10	4,41	-0,39		3-Hidroksibütirik asit, bir keton gövdesidir. İnsanlarda, 3-hidroksibütirat, karaciğerde asetil-CoA'dan sentezlenir ve kan şekeri düşük olduğunda beyin tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Bir başka önemli işlevi, kolesterol, yağ asitleri ve kompleks lipidlerin sentezi için asetoasetil-CoA ve asetil-CoA'nın sağlanmasıdır.	(103)
13	Dietilamino-malonik asit	$C_7H_{13}NO_4$	175,184	-	-1,9		Malonik asidin dietil esteridir. Doğal olarak üzüm ve çileklerde bulunmakta olup parfüm yapımında kullanılır. Ayrıca, barbitüratlar, yapay tatlandırıcılar, B1 vitamini ve B6 vitamini gibi diğer bileşiklerin sentezlenmesi için de kullanılır.	(100)
14	Glikoz	$C_6H_{12}O_6$	180,16	11,3	-2,9		Glikoz canlı organizmalar için birincil enerji kaynağı olan bir monosakarittir. Hayvanlarda glikoz, glikojenoliz sonucu glikojenin parçalanmasından ortaya çıkar. Glikoz, karaciğerde ve böbreklerde, glukoneogenez olarak bilinen bir işlemle piruvat ve gliserol gibi karbonhidrat olmayan ara maddelerden sentezlenir. D-Glukozun, metabolizmanın doğuştan hataları olan 3-metil-krotonil-glisinüri, büyüme hormonu eksikliği ve primer hipomagnezemi ile ilişkili olduğu bulunmuştur.	(100, 108)


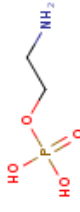
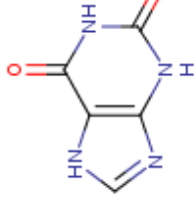
Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
15	Gliserik asit	$C_3H_6O_4$	106,08	3,42	-1,5		Gliserik asit, gliserol oksidasyonundan elde edilen renksiz bir şeker asididir. Gliserik asitin 2-fosfogliserik asit, 3-fosfogliserik asit, 2,3-bifosfogliserik asit ve 1,3-bifosfolgerik asit gibi fosfat türevleri glikolizde önemli biyokimyasal ara maddelerdir.	(100, 109)
16	Malik asit	$C_4H_6O_5$	134,09	3,2	-1,1		Tüm canlı organizmalar tarafından yapılan ve gıda katkı maddesi olarak kullanılan bir dikarboksilik asittir. İyonize formundaki malat anyonu fumarat ile birlikte TCA döngüsünün bir ara maddesidir. Anaplerotik reaksiyonlardan biri olarak piruvattan da oluşturulabilir.	(100, 110)
17	Tirozin	$C_9H_{11}NO_3$	181,19	2,0	-1,5		Tirozin vücutta fenilalaninden sentezlenen esansiyel olmayan bir amino asittir. Tirozin, vücudun proteinlerinin, enzimlerinin ve kas dokusunun üretimi için kritik öneme sahiptir. Tirozin, nörotransmitterler norepinefrin ve dopaminin bir öncüsüdür. Ayrıca melanin üretimine yardımcı olur ve tiroksin (tiroid hormonları) üretiminde kritik bir rol oynar.	(103, 111)
18	5-Hidroksimetil-2-deoksiuridin	$C_{10}H_{14}N_2O_6$	258,23	9,7	-		5-Hidroksimetil-2-deoksiüridin, antikanser ve antiviral aktiviteleri olan bir nükleosid analogudur. Oksidatif nükleik asit (DNA) hasarı için bir belirteç olarak kullanılır.	(112)

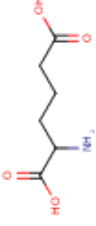
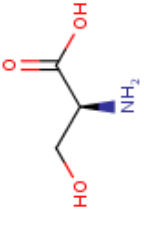
Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
19	Sitruilin	$C_6H_{13}N_3O_3$	175,19	2,27	-3,9		Sitruilin üre döngüsündeki merkezi reaksiyonlardan birinde ornitin ve karbamoil fosfattan yapılan bir amino asit olup esansiyel değildir. Ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilen reaksiyonun bir yan ürünü olarak arginininden üretilir. L-sitruilin, bir amino asit olmasına rağmen, protein sentezine dâhil değildir. Genellikle besin takviyesi olarak kullanılmaktadır.	(113)
20	Glukuronik asit	$C_6H_{10}O_7$	194,14	3,21	-2,6		Glikozun altıncı karbon atomunun oksidasyonu ile oluşan bir şeker asitidir. Üronik asit yolağının temel bir ara metaboliti olmasının yanı sıra, glukuronik asit, glukuronidler oluşturmak üzere onlarla birlikte konjuge edilerek bazı ilaçların ve toksinlerin detoksifikasyonunda da rol oynar.	(114)
21	Urasil	$C_4H_4N_2O_2$	112,09	9,77	-0,86		Urasil, RNA'da bulunan, doğal olarak oluşan yaygın bir pirimidindir, adenin ile çiftleşir ve DNA'da timin ile yer değiştirir. Urasil'in metilasyonu sonucu timin üretilir. Urasil hücrel fonksiyonlar için gerekli birçok enzimin, riboz ve fosfatlarla bağlanma yoluyla sentezlenmesine yardımcı olur. Ayrıca birçok önemli biyokimyasal reaksiyon için allosterik regülatör ve koenzim görevi görür.	(115)

Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
22	Fosfokolin	$C_5H_{15}NO_4P$	184,15	1,15	-4,8		Fosfokolin, organizmalarda bulunan küçük bir haptetik molektürdür. Fosfokolin, ATP ve kolin'i fosfokolin ve ADP'ye dönüştüren kolin kinaz ile katalizlenen bir reaksiyonda oluşur. İnsan hepatik tümörlerinde temel metabolik değişimler oluştuğunda fosfokolin derişiminde artış gözlenmektedir. Fosfokolin, glisin, serin ve treonin metabolizmasındaki kolinin öncü metabolitidir. Ayrıca gliserofosfolipid metabolizmasındaki ve dokularda fosfatidilkolin sentezinde bir ara maddedir.	(116)
23	Fosfoetanolamin	$C_2H_8NO_4P$	141,06	1,54	-2,5		Fosfoetanolamin fosfolipid metabolizmasının bir fosfomonoester metabolitidir. Fosfolipid sentezinin öncüsü ve fosfolipid yıkım ürünüdür. Ayrıca fosfoetanolamin bir inhibitör nörotransmitter olan GABA'ya güçlü yapısal benzerlik gösterir.	(117)
24	Ksantin	$C_5H_4N_4O_2$	152,11	7,95	-0,21		Ksantin, çoğu vücut doku ve sıvısında, bazı bitkilerde ve üriner taşlarda bulunan bir pürin bazıdır. Adenozin monofosfatın ürik aside indirgenmesinde, hipoksantin oksidasyonu ile oluşan bir ara maddedir. Ksantin Lesch-Nyhan sendromu ve ksantinüri tip I ile ilişkili olduğu bulunmuştur.	(118)

Tablo 2.2. (Devam) Hedeflenen metabolitler.

Sıra	Metabolit	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	pKa	logP	Molekül yapısı	Metabolit hakkında bilgi	Kaynak
25	2-Aminoasit	$C_6H_{11}NO_4$	161,16	2,01	-2,8		2-Aminoasit lisin ve sakkaropinin metabolizmasında rol alan bir ara maddedir. Glutamat reseptörü N-metil-D-aspartat tarafından modüle edilen nöroeksitatif aktiviteyi antagonize eder. Aminoasit asidin, beyin dokusunda uyarıcı amino asit reseptörü antagonisti olan kinurenin asit üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir.	(119)
26	Serin	$C_3H_7NO_3$	105,09	2,03	-3,9		Serin, glisinden elde edilen esansiyel olmayan bir amino asittir. Pirimidin, pürin, kreatin ve porfirin biyosentetik yollarında önemli bir rol oynar. Serin ayrıca tripsin ve kimotripsin içeren serin proteaz enzim sınıfının aktif bölgesinde de bulunur.	(100, 120)

2.6. Analitik Yöntem Validasyonu

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

2.6.1. Validasyon Parametreleri

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

Biyoanalitik yöntem validasyonu için incelenmesi gereken parametreler US FDA tarafından aşağıda şekilde sıralanmıştır (121).

- Kararlılık
- Seçicilik
- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Duyarlılık [Gözlenebilme sınırı (LOD) ve Alt tayin sınırı (LLOQ)]
- Geri kazanım
- Sistem uygunluk

2.7. Kaynak Özeti

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisindeki gelişmelerin izlenmesinde LC-MS, GC-MS, CE-MS ve NMR temelli metabolomik analizler kullanılmıştır (103, 122-146).

Beckonert ve arkadaşları, kanserli meme dokularında meydana gelen metabolik değişimleri ^1H NMR spektroskopisi yöntemi ile belirlemiştir. Analiz sonuçlarına göre UDP-heksoz, fosfokolin ve fosfoetanolamin derişimlerinde artış görülmüştür. Malign dokularda yüksek miktarda taurin bulunurken myo-inositol ve glikoz kontrol grubuna göre daha düşük miktarda bulunmuştur (131).

Asiago ve arkadaşları, teşhis konmuş ve cerrahi işlem görmüş meme kanseri hastaları ile kontrol grubu olarak kullanılan bireylere ait plazmalardaki metabolik profilleri NMR ve iki boyutlu gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC×GC-TOF-MS) kombine yöntemi ile analiz etmişlerdir. Sonuçlar çeşitli istatistiksel ve validasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla değerlendirilmiş, meme kanserinin erken teşhisi için format, histidin, prolin, kolin, tirozin, 3-hidroksibütirik asit, laktik asit, glutamik asit, N-asetilglisin, 3-hidroksi-2-metil-bütanoik asit ve azelaik asit (nonandioik asit) biyobelirteçleri belirlenmiştir (103).

Budczies ve arkadaşları, metabolomik analizleri östrojen reseptörü pozitif (ER+) olan 204 ve östrojen reseptörü negatif (ER-) olan 67 meme kanseri dokusu için GC-TOF-MS ile gerçekleştirmişlerdir. 19 metabolit belirlenmiş ve valide edilmiştir. ER- olan grupta beta-alanin, 2-hidroglutarat, glutamat, ksantin miktarları artarken glutamin miktarı azalmıştır. Beta-alaninin ER- ve ER+ gruplar arasında en fazla değişim gösteren metabolit olduğu görülmüştür (132).

Slupsky ve arkadaşları, erken ve geç dönem meme ve yumurtalık kanserli hastada meydana gelen metabolik değişimleri NMR spektroskopisi ile incelemiştir. 48 kadın hastadan alınan üriner sistem numunelerinde 67 metabolit incelenmiştir. Kanser hastalarının metabolik fenotipleri sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında bazı metabolitlerin meme ve yumurtalık kanserli hastalar arasında önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Ancak propilen glikol ve manitol gibi bazı metabolitler ise sağlıklı, meme kanserli ve yumurtalık kanseri olan hastalarda herhangi bir değişim göstermemişlerdir (126).

Woo ve arkadaşları, kadın kanserlerine ait biyobelirteçlerin belirlenmesi için GC-MS ve LC-MS kombine yöntemleri ile metabolik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Potansiyel idrar bazlı biyobelirteçlerin belirlenmesi için 10 meme kanseri, 9 yumurtalık kanseri, 12 rahim ağzı kanseri ve 22 sağlıklı birey; yaş ve menapoz durumları dikkate alınarak seçilmiş, nitel ve nicel analizler gerçekleştirilmiştir. Meme kanserinde 5-hidroksimetil-2-deoksiuridin ve 8-hidroksi-2 deoksiganozin gibi bilinen iki biyobelirteç çalışılan yöntemle analiz edilmiştir (127).

Nam ve arkadaşları, idrar örneklerinde metabolik biyobelirteçlerin belirlenmesi için sistematik bir yöntem geliştirmişlerdir. Belirlenen biyobelirteçlerin hem gen ekspresyon profilleri hem de metabolik profilleri valide edilerek sağlamlık ve tutarlılıkları araştırılmıştır. Önerilen yöntem 50 meme kanserli ve 50 sağlıklı bireyin gen ekspresyon profillerine ve idrar örneklerine uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre meme kanserli bireylerin gen ekspresyon profillerinden dokuz metabolik yolak tespit edilmiştir. Bu metabolik yollar arasında dört biyobelirtecin (homovanillat, 4-hidroksifenilasetat 5-hidroksindolasetat ve üre) kanserli ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (128).

Gu ve arkadaşları, ¹H NMR spektroskopisi ve gerçek zamanlı doğrudan analiz DART-MS yöntemleri ile meme kanserli ve sağlıklı bireylere ait plazma örneklerinden metabolik analizler gerçekleştirmişlerdir (129).

Sugimoto ve arkadaşları, uçuş zamanlı kütle spektroskopisi ile kombine edilmiş kapiler elektroforez (CE-TOF-MS) yöntemi ile meme kanseri de dahil farklı türde kanser hastalarından ve kontrol grubu olarak sağlıklı kişileri içeren 215 bireyden alınan tükürük örneklerinde metabolik analizler yapmışlardır. Çalışma sonucunda başlıca 57 metabolit belirlenmiştir (130).

Günther, insan meme kanserlerinde kullanılan metabolitleri klinik teşhis açısından incelediği derleme çalışmasında, çoğunlukla kan veya idrar örneklerinin kullanıldığı ancak kandaki uygulanabilirliğin idrardan daha fazla olduğu görülmüş ve histidin, prolin, fenilalanin, glutamik asit, 3-hidroksi bütirat, laktat ve lipidlerin olası biyobelirteçler olduğu sonucuna varmıştır (133).

Cala ve arkadaşları tarafından Kolombiyalı İspanyol kadınların plazmalarında metabolik çalışmalar 28 sağlıklı ve 29 meme kanserli kadın üzerinde ¹H NMR, GC-MS ve LC-MS yöntemlerinin verileri birleştirilerek yapılmış ve gliserolipit,

gliserofosfolipit, amino asit ve yağ metabolizmasında farklılaşan metabolitler olduğu belirlenmiştir (134).

More ve arkadaşları, meme kanserinin en sık görülen tipi olan invaziv duktal karsinoma, iyi huylu tümörler ve sağlıklı kontrol grubundan 72 doku ve 146 serum örneğinde LC-MRM/MS ve GC-MS ile metabolomik çalışmalar yapmışlardır. VIP (Variable Importance in Projection) skoruna dayanarak, bu üç grubun karşılaştırmalı çalışmasında serumda önemli değişiklikler gösteren ilk dört metabolit askorbik asit, triptofan, tirozin ve fenilalanin; dokuda ise histidin, glutamin, tirozin ve kreatin olarak tanımlanmıştır. 8 doku ve 9 serum örneğinde önemli fark yaratan metabolitlerin triptofan, tirozin ve kreatin olduğunu bulmuşlardır (135). Aynı kanser türünün 20 hasta ve 15 sağlıklı üzerinde LC-QTOF-MS ile yapılan analizler sonucunda sfingolipid, fosfo lipid, yağ asidi β -oksidasyon metabolizmasında rol oynayan 15 metabolit, Cui ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (136).

Hart ve arkadaşları, erken evre 590 ve metastatik 109 meme kanseri hastasında NMR ile yapılan analizleri farklı bir modelle değerlendirildiklerinde % 85 başarı ile erken evre ve metastazı birbirlerinden ayırabildiklerini belirtmişlerdir (137).

Jove ve arkadaşları, sağlıklı 20 ve meme kanseri tanısı konulmuş 91 hasta plazmasında LC-MS ile yapılan tayinlerin değerlendirilmesinde kanser tipine bakılmaksızın sağlıklı ve meme kanserinin ayrılabilirliğini; bu metabolitlerin, tümörlerin farklılaşma durumlarını değiştirerek, metastatik fenotipi indükleyerek veya tümörleri oksidatif stres koşullarında daha aktif hale getirdiklerini tartışmışlardır (138).

Cao ve arkadaşları, amino asitleri hedefleyerek 20 meme kanseri hastası ve sağlıklı gönüllü üzerindeki çalışmalarını ESI-QTOF-MS ile yapmış ve sağlıklı ile hasta plazması arasındaki triptofan düzeyi arasındaki farkı anlamlı bulmuşlardır (139).

Dowling ve arkadaşları, meme kanseri, malign olmayan meme tümörü ve sağlıklı olanlardan oluşan grubun plazma UPLC-MS ve GC-MS ile analizleri sonucunda CA15-3 biyobelirtecinin, glutamat, 12 HETE, β -hidroksi bütirat, faktör V ve matriks metaloproteinal ile yaptığı üçlü kombinasyonların kontrol ve malign olmayan arasındaki farkta bile daha yüksek olduğunu, bu metabolitlerinde tümörü belirleme de katkılarının olduğunu göstermişlerdir (140).

Jobard ve arkadaşları tarafından, lokalize erken evre 46 kişi ve metastatik 39 kişiden oluşan meme kanseri hasta grubunda ¹H-NMR ile yapılan analizlerde iki grup arasında histidin, asetoasetat, gliserol, glikoproteinler (N-asetil), mannoz, glutamat ve fenilalanin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (141).

Louis ve arkadaşları ise, 53 meme kanseri hastası ve 52 kontrolde ¹H-NMR ile yapılan analizler sonuçlarının değerlendirilmesinde önerilen yöntemin hastalıkla ilişkili biyokimyasal yollardaki bozuklukların daha iyi anlaşılmasına ve dolayısıyla çalışma bulgularının klinik açıdan anlamlı olmasına yol açabileceğini bildirilmiştir (142).

Euceda ve arkadaşları, 112 meme kanser hastasından alınan meme tümörlerinde uygulanan kemoterapi tedavisinin metabolik profil üzerine etkilerini araştırmışlar, tedavi öncesi ve sonrası farklılıkları gözlemlemişlerdir (143). Zhang ve arkadaşları, kemoterapik ajanlar ile MCF-7 hücrelerinin muamelesinden sonra LC-QTOF-MS ile metabolit değerlendirilmesi yapmışlardır (144).

Armengol-Alonso ve arkadaşları serum, tükürük, idrar, nefes ve plevral sıvı gibi biyolojik sıvılardaki tayinlerin, metabolik fenotip yaklaşımı, metabolizma verileri, teşhis ve tedaviye yanıtta klinik değişkenler ile birlikte değerlendirilmesi sonucunda kişiselleştirilmiş ilaç geliştirmeye katkıda bulunulabileceğini belirtmişlerdir (145).

Jasbi ve arkadaşları tarafından, 102 meme kanseri hastası ve 99 kontrole ait plazma örneğinde LC-MS/MS yöntemi ile yapılan hedeflenmiş metabolomik analizlerde 27 metabolik yolda rol alan 30 metabolit analiz edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı olarak farklılaşan 6 metabolitin (agmatin, glikosiyamin, prolin, indol, indol-3-asetat ve palmitik asit) hastalıkların erken evrede teşhisi için etkili olduğu gösterilmiştir (146).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal	Firma
Asetonitril (LC-MS için)	Merck
Metanol (LC-MS için)	J. T. Baker
İzopropil alkol (HPLC için)	Sigma Aldrich
Formik asit (LC-MS için)	Fluka
Su (LC-MS için)	Merck
Amonyum asetat	Sigma Aldrich
Glutamik asit	Sigma Aldrich
Laktik asit	Acros Organics
Histidin	Sigma Aldrich
N-Asetilglisin	Acros Organics
Fumarik asit	Acros Organics
Azelaik asit	Acros Organics
2-Aminoizobütirik asit	Acros Organics
Kolin	Acros Organics
Glutamin	Sigma Aldrich
Taurin	Acros Organics
Prolin	Acros Organics
3-Hidroksibütirik asit	Sigma Aldrich
Dietilaminomalonic asit	Acros Organics
Glikoz	Merck
Gliserik asit	Sigma Aldrich
Malik asit	Supelco
Trozin	Acros Organics
5-Hidroksimetil-2-deoksiüridin	Santa Cruz Biotechnology
Sitrülin	Sigma Aldrich
Glukuronik asit	Acros Organics
Urasil	Sigma Aldrich

Kimyasal	Firma
Fosfokolin	Sigma Aldrich
o-Fosfoetanol amin	Acros Organics
Ksantin	Sigma Aldrich
2-Aminoadipik asit	Sigma Aldrich
Serin	Sigma Aldrich
¹³ C ₆ Fenilalanin	Sigma Aldrich

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma
Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi	Shidmadzu LC-MS/MS (8030)
Santrifüj	Hermle Z 233 M-2 (15000 rpm)
Vorteks karıştırıcı	IDL RS2
Hassas terazi	Mettler-Toledo AG285
Ultrasonik banyo	Bandelin, Sonorex, RK514 BH
Derin donduruculu buzdolabı	Bosch

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

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

3.4. Kullanılan Yazılım ve Veri Bankaları

Yazılım/Veri bankası	Firma/Kaynak
LabSolutions yazılımı	Shidmadzu
HMDB veri bankası	İnsan metabolom projesi (Human Metabolome Database, HMP) sonucu oluşturulan veri bankası (http://www.hmdb.ca/)
KEGG veri bankası	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (http://www.genome.jp/kegg/)
SIMCA-P+	Umetrics
MetaboAnalyst	Alberta Üniversitesi Wishart Araştırma Grubu üyeleri tarafından oluşturulan veri bankası
Excel	Microsoft
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok çözeltiler	Hazırlanışı
Glutamik asit, laktik asit, histidin, N-asetilglisin, fumarik asit, azelaik asit, 2-aminoizobütirik asit, kolin, glutamin, taurin, prolin, 3-hidroksi bütirik asit, dietilamino malonik asit, glukoz, gliserik asit, malik asit, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin, sitrülün, glukuronik asit, urasil, fosfokolin, o-fosfoetanolamin ve serin (3000 µg/mL)	Her bir metabolit için 15,0 mg standart madde tartılıp 5 mL'lik balon jöjeye alınmış, üzerine yaklaşık 2 mL su eklenmiş, ultrasonik banyoda çözüldükten sonra 5 mL'ye su ile tamamlanarak ayrı ayrı hazırlanmıştır.
Tirozin ve 2-aminoadipik asit (3000 µg/mL)	Her bir metabolit için 15,0 mg standart madde tartılıp 5 mL'lik balon jöjeye alınmış, üzerine yaklaşık 2 mL su eklenmiş, ultrasonik banyoda

Stok çözeltiler	Hazırlanışı
	çözündükten sonra 5 mL'ye 1 M HCl ile tamamlanarak ayrı ayrı hazırlanmıştır.
Ksantin (<i>3000 µg/mL</i>)	15,0 mg standart madde tartılıp 5 mL'lik balon jöjeye alınmış, üzerine yaklaşık 2 mL su eklenmiş, ultrasonik banyoda çözündükten sonra 5 mL'ye 1M NaOH ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
¹³ C ₆ Fenilalanin çözeltisi (İS) (<i>1000 µg/mL</i>)	5 mg standart ¹³ C ₆ fenilalanin tartılıp 5 mL'lik balon jöjeye alınmış, üzerine yaklaşık 2 mL su eklenmiş, ultrasonik banyoda çözündükten sonra 5 mL'ye su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
Çözeltiler	Hazırlanışı
Standart karışım çözeltisi (<i>100 µg/mL</i>)	Her bir metabolit stok çözeltisinden (3000 µg/mL) 50 µL alınmış, su ilave edilerek hacim 1,5 mL'ye tamamlanmıştır. Standart karışım çözeltisi günlük olarak hazırlanmıştır.
Plazma analizlerinde kullanılacak kalibrasyon eğrileri için çalışma standart karışım çözeltileri	1, 10, 50, 100 ve 1000 µg/mL derişimlerinde çalışma standart karışım çözeltisi hazırlamak için metabolit stok çözeltisinden uygun hacimde alınmış ve her biri su ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

3.6. Etik Kurul İzni

Tez çalışması Helsinki Deklarasyonu ve İyi Klinik Uygulamalarının etik kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. “Meme Kanserinin Erken Tanısı için Kombine Kromatografik (LC-TOF-MS ve LC-MS/MS) Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Uygulanması” konulu Hacettepe Üniversitesi Araştırma Projesi (GO 14/162) için etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 19.03.2014 tarihli GO 14/162-20 karar no ile onaylanmıştır (Ek 1).

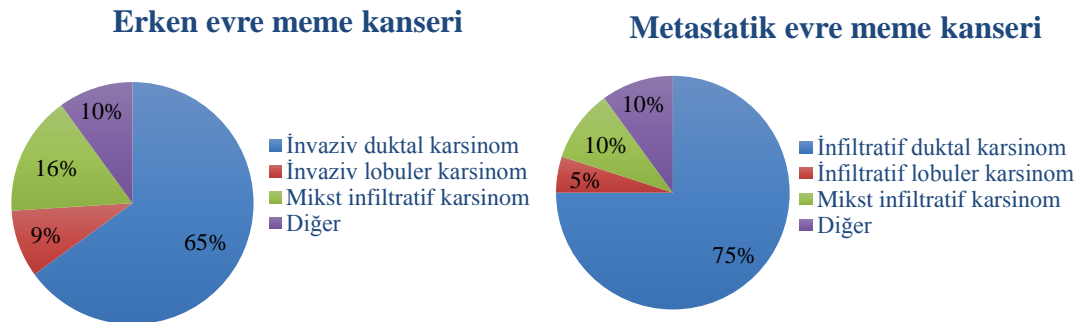
Çalışmaya dahil edilmeden önce tüm katılımcılardan “Araştırma amaçlı çalışma için aydınlatılmış onam formu” (Ek 2) alınmıştır.

3.7. Plazma Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Plazma örnekleri Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Medikal Onkoloji Bölümü tarafından meme kanseri tanısı konulmuş ve takip edilen hasta grubundan erken evrede olan (evre I-III) 172 kişi ve ileri metastatik evrede olan 92 kişi olmak üzere toplam 264 meme kanseri hastası ile 105 sağlıklı gönüllüden toplanmıştır.

Sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunun ortanca yaşı 45 (23-65), erken evre grubunun ortanca tanı yaşı 51 (23-84), metastatik grubun ise 51 (21-77)'dir.

Hastaların histolojik alt tiplerine göre değerlendirme yapıldığında, erken evre meme kanseri grubundaki hastaların % 65'inin invaziv duktal karsinom; metastatik evre meme kanseri grubunda ise hastaların % 75'inin infiltratif duktal karsinom olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çalışılan hasta gruplarının histolojik alt tiplerine göre değerlendirilmesi.

Kontrol ve hasta grubundaki bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 5 mL tam kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve ayrılan plazmalar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında -80°C'de analiz edilene kadar saklanmıştır.

3.8. Analiz Yöntemi

Metabolitlerin analizleri optimize edilen LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Optimizasyon Çalışmaları

MS/MS Koşullarının Optimizasyonu

MS/MS yönteminin optimizasyonunda kullanılmak üzere her bir metabolit için (Glutamik asit, laktik asit, histidin, N-asetilglisin, fumarik asit, azelaik asit, 2-aminoizobütirik asit, kolin, glutamin, taurin, prolin, 3-hidroksibütirik asit, dietilaminomalonic asit, glukoz, gliserik asit, malik asit, tirozin, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin, sitrülün, glukuronik asit, urasil, fosfokolin, o-fosfoetanolamin, ksantin, 2-aminoadipik asit ve serin) stok çözeltisinden su:asetonitril (1:1, h/h) karışımı ile seyreltilerek son derişimleri 1 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler LC-MS/MS sistemine kolon kullanılmadan 0,3 mL/dk akış hızında % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitrilden oluşan hareketli faz kullanılarak ayrı ayrı enjekte edilmiştir. MRM koşullarının optimizasyonu için sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Metabolit standart çözeltileri sırasıyla pozitif ve negatif polarizasyona ayarlanan MS sisteminde analiz edilerek uygun iyonizasyon modu ve metabolitlere ait öncü (precursor) iyonlar belirlenmiştir.
2. Fragment (product) iyonların belirlenmesi amacıyla aynı çözeltiler seçilen iyonizasyon modunda MS sistemine tekrar enjekte edilmiş ve düşük, orta ve yüksek çarpışma (collision) enerjileri (10, 20 ve 30 eV) uygulanarak parçalanma ürünleri incelenmiştir. Kütle spektrumundaki en yüksek şiddet

(intensity) ve m/z değerine sahip iyon optimum fragment iyon olarak belirlenmiştir.

3. Öncü ve fragment iyon bilgisi kullanılarak LC-MS/MS sisteminde bulunan LabSolutions yazılımı yardımı ile her bir metabolite ait optimum çarpışma enerjisi ve kuadropol voltajları (Q1 ve Q3) belirlenmiştir.
4. Son olarak m/z iyon sinyalinin ölçüm hassasiyeti açısından önemli bir parametre olan bekleme süresi (dwell time) optimize edilmiştir. Farklı bekleme sürelerinde (50, 70, 100 ve 200 ms) analizler yapılarak sonuçlar incelenmiş ve optimum süre belirlenmiştir.

Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

Optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için beş farklı özellikte analitik kolon, üç farklı hareketli faz bileşimi ve sekiz farklı gradient elüsyon programı denenmiş (Tablo 3.1.) ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. LC-MS/MS yönteminin optimizasyonu için çalışılan deney koşulları.

Yöntem	Kolon	Hareketli faz	Gradient profili*	Analiz süresi (dk)
1	Inertsil ODS-4 (3 µm, 2,1x50 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 70 25,0 → 20 25,1 → 5 27,0 → 70 30,0 → 70	30
2	MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 80 30,0 → 20 30,1 → 5 35,0 → 5 35,1 → 80 45,0 → 80	45
3	MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm)	(% 95 Asetonitril - % 5 su) – 5 mM Amonyum asetat pH: 9)	1,0 → 80 30,0 → 20 30,1 → 5 35,0 → 5 35,1 → 80 45,0 → 80	45

Table 3.1. (Devam) LC-MS/MS yönteminin optimizasyonu için çalışılan deney koşulları.

Yöntem	Kolon	Hareketli faz	Gradient profili*	Analiz süresi (dk)
4	Zorbax HILIC Plus (3,5 µm, 4,6x100 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 80 30,0 → 20 30,1 → 5 35,0 → 5 35,1 → 80 45,0 → 80	45
5	Waters HILIC (1,7 µm, 2,1x150 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 80 30,0 → 20 30,1 → 5 35,0 → 5 35,1 → 80 45,0 → 80	45
6	Phenomenex Luna NH ₂ (3 µm, 2x100 mm)	(%95 Asetonitril -%5 Su)-5 mM Amonyum asetat pH: 9	1,0 → 80 30,0 → 20 30,1 → 5 35,0 → 5 35,1 → 80 45,0 → 80	45
7	MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 80 8,0 → 20 8,1 → 5 13,0 → 5 18,0 → 80 22,0 → 80	22
8	MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x100 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 80 8,0 → 20 8,1 → 5 13,0 → 5 16,0 → 80 20,0 → 80	20
9	MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x50 mm)	% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril	1,0 → 90 3,0 → 90 6,0 → 20 6,1 → 5 8,0 → 5 12,0 → 90	12

*[dk→Asetonitril içeren fazın yüzdesi]. Tüm yöntemlerde kolon sıcaklığı: 40 °C ve akış hızı: 0,3 mL/dk olarak seçilmiştir.

Numune Hazırlama Basamağının Optimizasyonu

Metabolitlerin plazmadan ayırımı ve matriks bileşenlerinin uzaklaştırılması için protein çöktürme işlemi uygulanmış olup geri kazanım oranını etkileyebilecek parametrelerden çözücü tipi, seyreltme ve uçurma etkisi incelenmiştir. İlk olarak çözücü tipinin belirlenmesi amacıyla plazma ve suya 4 farklı derişimde (0, 1, 2 ve 5 µg/mL) standart karışım çözeltisi eklenmiş ve son çözeltiler analiz edilmiştir. Kullanılacak çözücü seçildikten sonra plazma örnekleri su ile 1/2 oranında seyreltilerek seyreltme etkisi incelenmiştir. Uçurma işleminin etkisini belirlemek amacıyla plazma çözeltileri protein çöktürme işlemi ile matriks bileşenlerinden uzaklaştırılmış ve ortamdaki çözücü vakumlu santrifüj cihazında +4°C sıcaklıkta vakum yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuştur. Sonrasında hareketli faz karışımı ile çözündürülerek LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiş ve sonuçlar uçurma işlemi yapılmaksızın hazırlanan örneklerin analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.8.2. Analiz Koşulları

LC-MS/MS yöntemi ile metabolitlerin analizinde ESI iyon kaynağı kullanılarak pozitif ve negatif iyonizasyon modlarında yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayan MRM kullanılmıştır.

LC-MS/MS analizleri hareketli faz olarak % 0,1 (h/h) formik asit içeren su ve % 0,1 (h/h) formik asit içeren asetonitril karışımı kullanılarak MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 50x4,6 mm) kolonda ve 0,3 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Analiz sırasında uygulanan gradient elüsyon şartları Tablo 3.2.'de ve kullanılan diğer LC-MS/MS parametreleri Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Metabolitlerin analizi için gradient elüsyon şartları.

Zaman (dk)	% 0,1 formik asit içeren su (%)	% 0,1 formik asit içeren asetonitril (%)
1,0	10	90
3,0	10	90
6,0	80	20
6,1	95	5
8,0	95	5
12,0	10	90

Tablo 3.3. LC-MS/MS analiz parametreleri.

Nebulizer gaz akışı	3 L/dk
Kurutucu gaz sıcaklığı	400° C
İyon kaynağı sıcaklığı	400° C
Kolon sıcaklığı	40° C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
İyon kaynağı	Elektrosprey
İyon tarama şekli	MRM

3.9. Yöntemin Plazma Örneklerine Uygulanması

3.9.1. Plazma Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Analizi yapılacak metabolitler plazmada endojen olarak bulunduğundan uygulama sırasında kalibrasyon eğrileri, zemin çıkarma yöntemi (background subtraction calibration curves) kullanılarak oluşturulmuştur (147). Her bir metabolite ait kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında; 100 µL plazma örneği üzerine çalışma standart karışım çözeltisinden farklı hacimlerde eklenmiş ve üzerine 20 µL İS eklendikten sonra toplam hacim 220 µL' ye su ile seyreltilmiştir (Tablo 3.4.). Çözelti 1 dk vortekslenildikten sonra üzerine 400 µL asetonitril ilave edilmiş ve tekrar 1 dk vortekslenmiştir. Karışım 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek proteinler

uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak santrifügattan 100 µL alınmış ve üzerine 50 µL hareketli faz karışımı [% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımı (1:1)] eklenmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. Plazma örneklerinin analizi için zemin çıkarma yöntemi ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.

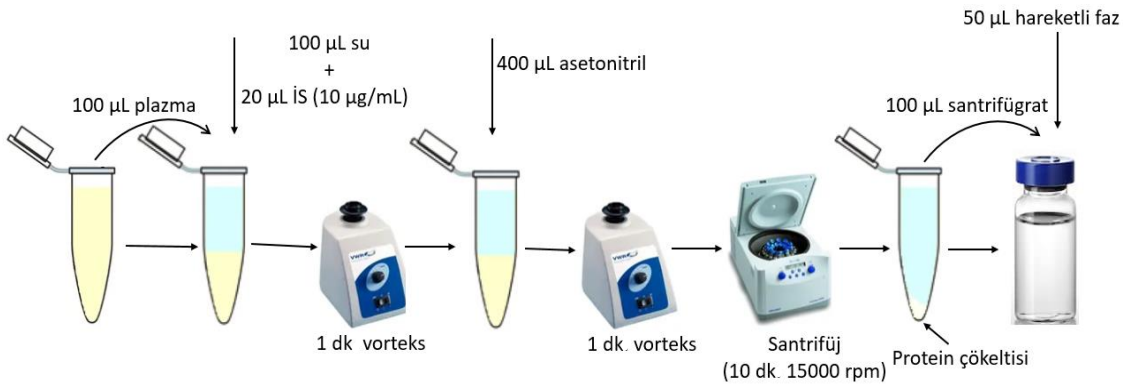
Boş plazma (µL)	Çalışma standart karışım çözelti derişimi (µg/mL)	Çalışma standart karışım çözelti hacmi (µL)	Su (µL)	İS (10 µg/mL) (µL)	Eklenen metabolitin son çözeltideki derişimi (µg/mL)	100 µL plazmaya eklenen metabolit derişimi (µg/mL)
100	-	-	100	20	-	-
100	1	5	95	20	0,02	0,05
100	1	10	90	20	0,05	0,1
100	1	50	50	20	0,23	0,5
100	10	10	90	20	0,45	1
100	10	20	80	20	0,91	2
100	10	50	50	20	2,27	5
100	50	20	80	20	4,55	10
100	50	40	60	20	9,09	20
100	50	100	0	20	22,73	50
100	100	75	25	20	34,09	75
100	100	100	0	20	45,45	100
100	1000	25	75	20	113,64	250
100	1000	50	50	20	227,27	500
100	1000	100	0	20	454,55	1000

3.9.2. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması

Plazma kalibrasyon standartları Bölüm 3.9.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak analiz edildikten sonra her bir metabolit için, metabolit alanının İS alanına oranının eklenen standart metabolit derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Oluşan standart ekleme doğrularına ait regresyon denklemleri ($y=ax+b$) belirlenmiş olup “b” değeri matriksdeki endojen metabolit cevabını temsil ettiğinden metabolitlere ait alan oranı değerlerinden çıkarılmıştır. Bu şekilde elde edilen yeni alan oranı değerleri 100 μ L plazmaya eklenen standart metabolit derişimine karşı grafiğe geçirilerek zemin çıkarma kalibrasyon doğruları oluşturulmuş ve bu doğrulara ait regresyon denklemleri kullanılarak plazma örneklerindeki metabolitlerin derişimleri hesaplanmıştır.

3.9.3. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Kontrol veya hasta grubuna ait 100 μ L plazma örneği üzerine 20 μ L İS (10 μ g/mL) ve 100 μ L su eklenerek 1 dk vortekslenmiştir. Ardından 400 μ L asetonitril ilave edilmiş ve 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek proteinler uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak santrifügattan 100 μ L alınmış ve üzerine 50 μ L hareketli faz karışımı [% 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımı (1:1)] eklenmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir (Şekil 3.2.). Plazma örneklerindeki metabolit miktarları zemin çıkarma yöntemi ile oluşturulmuş kalibrasyon doğruları kullanarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Plazma örneklerinin analizi için numune hazırlama basamakları.

3.10. Analitik Yöntem Validasyonu

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin validasyon çalışmalarında kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, geri kazanım ve seçicilik parametreleri US FDA rehberinde belirtilen biyoanalitik validasyon kriterlerine göre incelenmiştir (121, 148).

3.10.1. Seçicilik

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin matriks bileşenleri varlığında her bir metabolit için seçiciliğini belirlemek amacıyla standart ve plazma çözeltilerinin tekrarlı analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar incelenmiştir. Seçicilik, metabolit piklerine ait alıkonma zamanlarındaki değişim ve her bir metabolit için belirlenen m/z değerlerinde diğer metabolitler ve matriks bileşenlerinden kaynaklı girişimlerin incelenmesi ile belirlenmiştir.

3.10.2. Duyarlılık

Duyarlılık çalışmaları gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ) değerlerinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. LOD ve LLOQ değerleri sinyal/gürültü (S/G) oranının sırasıyla 3 ve 10 olduğu derişimler olarak belirlenmiştir.

3.10.3. Doğrusallık

Geliştirilen yöntemin doğrusallığını belirlemek amacıyla standart karışım çözeltilerinden 0,001-0,005-0,01-0,05-0,1-0,3-0,5-0,8-1-2-5 ve 10 µg/mL'lik standart çözeltiler hazırlanmış ve optimum deney şartlarında analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir metabolite ait pik alanının İS'nin pik alanına bölünmesiyle elde edilen değerler derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Eğrilerin istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda metabolitlerin doğrusal oldukları çalışma aralıkları belirlenmiştir. Her bir kalibrasyon eğrisine ait regresyon doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. ANOVA testi uygulanarak korelasyon

katsayısının önemi ve regresyon katsayılarının sıfırdan farklı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca yöntemin doğrusallığı, olması gereken derişimlere karşı pik alan değerlerinin regresyon doğru denkleminde yerine konulmasıyla bulunan derişimlerin grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen eğrinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile kontrol edilmiştir.

3.10.4. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları için öncelikle cihaz (enjeksiyon) tekrarlanabilirliği çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 1 µg/mL'lik standart karışım çözeltisinden on enjeksiyon yapılmış ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilmiştir.

Yöntemin kesinliği için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda doğrusallık aralığına giren üç derişim seviyesinde ve her derişim için altı ayrı çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda art arda gelen altı ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltiler kullanılarak analizler yapılmıştır. Kesinlik analiz sonuçlarının bağıl standart sapma (BSS) (Ek 3) değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

3.10.5. Doğruluk

Yöntemin doğruluğu kesinlik çalışmalarında olduğu gibi gün içi ve günler arası analizler yapılarak belirlenmiştir. Doğruluk analiz sonuçlarının bağıl hata (BH) (Ek 3) değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

3.10.6. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmalarında her bir metabolit için plazmadan bağıl ve mutlak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

Mutlak geri kazanım çalışmasında, plazma ve suya son derişimleri 0, 1, 2 ve 5 µg/mL olacak şekilde standart karışım çözeltileri eklenmiş ve çözeltiler analiz edilmiştir. Öncelikle her bir metabolit için plazma örneğinde endojen olarak bulunan metabolite ait (standart eklenmemiş çözeltilere ait) alan değeri diğer çözeltilerden

çıkartılarak eklenen metabolitlere ait gerçek alan değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra plazma ve suya eklenen metabolitlere ait pik alanlarının birbirleri ile karşılaştırılmasıyla ortalama bağıl geri kazanım değerleri belirlenmiştir.

Bağıl geri kazanımda ise plazma örnekleri Tablo 3.4.'de gösterildiği şekilde hazırlanmış, analiz edilmiş ve kalibrasyon doğruları zemin çıkarma yöntemi kullanılarak ortalama mutlak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.10.7. Kararlılık

Her bir metabolitin kararlılığı kısa dönem (oda sıcaklığında 24 saat), uzun süreli (derin dondurucuda $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de), oto örnekleyci ve donma-erime döngüsündeki kararlılıkları incelenerek değerlendirilmiştir. Kararlılık çalışmalarında $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ standart karışım çözeltisi ve $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ standart karışım çözeltisi eklenmiş plazma çözeltisi kullanılmıştır.

Stok çözeltiler (metabolitler ve İS için) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilerek 1 ay süresince analiz edilmişlerdir.

Kısa dönem kararlılık çalışmasında standart karışım ve plazma çözeltileri oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra analiz edilmiştir.

Uzun dönem kararlılık testi için ise plazma çözeltileri derin dondurucuda ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 6 ay boyunca bekletilerek analiz edilmiştir.

Oto örnekleycideki kararlılık çalışması ise standart karışım ve plazma çözeltileri 24 saat oto örnekleycide bekletilmiş ve analiz edilmiştir.

Donma-erime döngü testi için plazma çözeltileri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Çözeltiler, derin dondurucudan çıkarılıp çözünmesi beklendikten sonra analiz edilmiş ve tekrar dondurulmuştur. En az 24 saat beklenerek bu işlem üç kez tekrar edilmiş ve üç döngü oluşturulmuştur.

Elde edilen analiz sonuçları taze hazırlanmış standart karışım çözeltisi ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) ve plazma üzerine $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ standart karışım çözeltisi eklenerek taze hazırlanan çözeltinin analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.11. Sistem Uygunluk Testi (SUT)

Sistem uygunluğu, enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü (k'), kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı (N) hesaplanarak Amerika Bileşik Devletleri Farmakopesi (USP)'de (149) belirtilen sınır değerlere göre değerlendirilmiştir. Bu amaçla 1 µg/mL standart karışım çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu yapılmış ve elde edilen veriler sınır değerler ile karşılaştırılmıştır (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Sistem uygunluk test kriterleri (USP).

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

n: Enjeksiyon sayısı.

3.12. Veri Analizi

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile yapılan analizlere ait ölçüm sonuçları “LabSolutions” yazılımı aracılığı ile elde edilmiştir. Daha sonra “Excel” kullanılarak gerekli hesaplamalar yapılmış, kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve tek değişkenli istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve hasta plazma örneklerine ait metabolit miktarları “GraphPadPrism 7” yazılımı ile bar grafikleri şeklinde görselleştirilmiştir. “MetaboAnalyst 4.0” ve “Simca” yazılımları kullanılarak çok değişkenli istatistiksel analizler, yolak analizi ve biyobelirteç analizleri gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

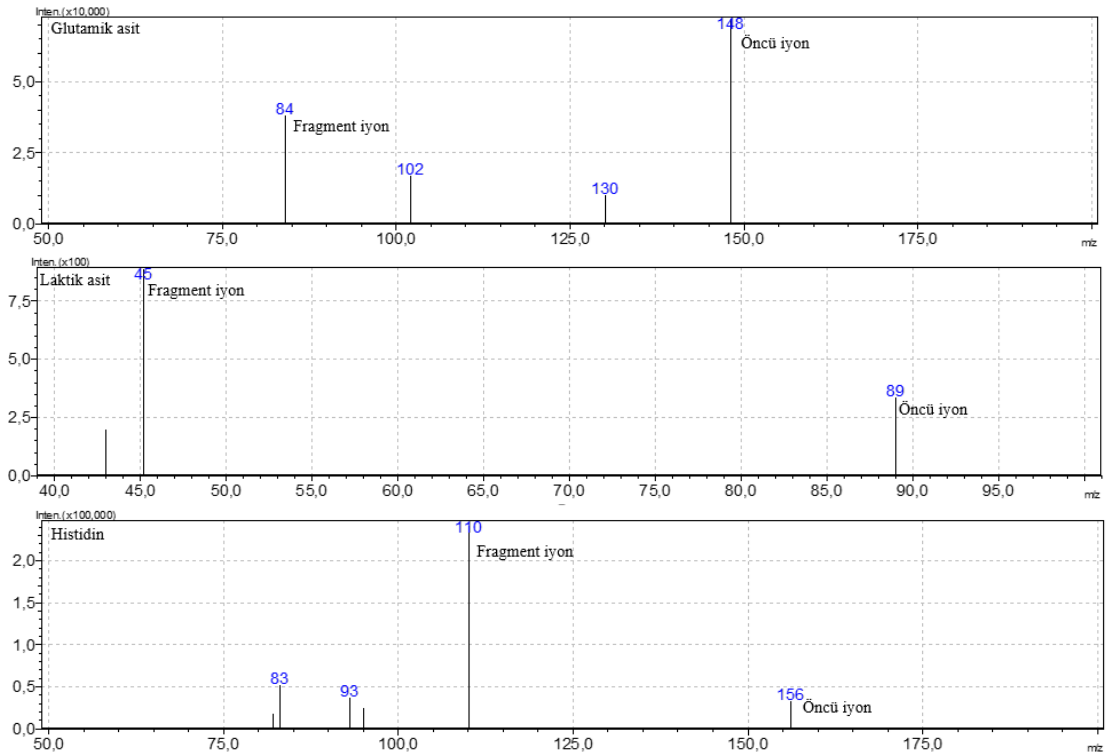
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

Analiz yönteminin geliştirilmesi sırasında kromatografik ayırımı ve kütle ölçümlerini etkileyen parametreler sistematik olarak incelenmiş ve optimize edilmiştir.

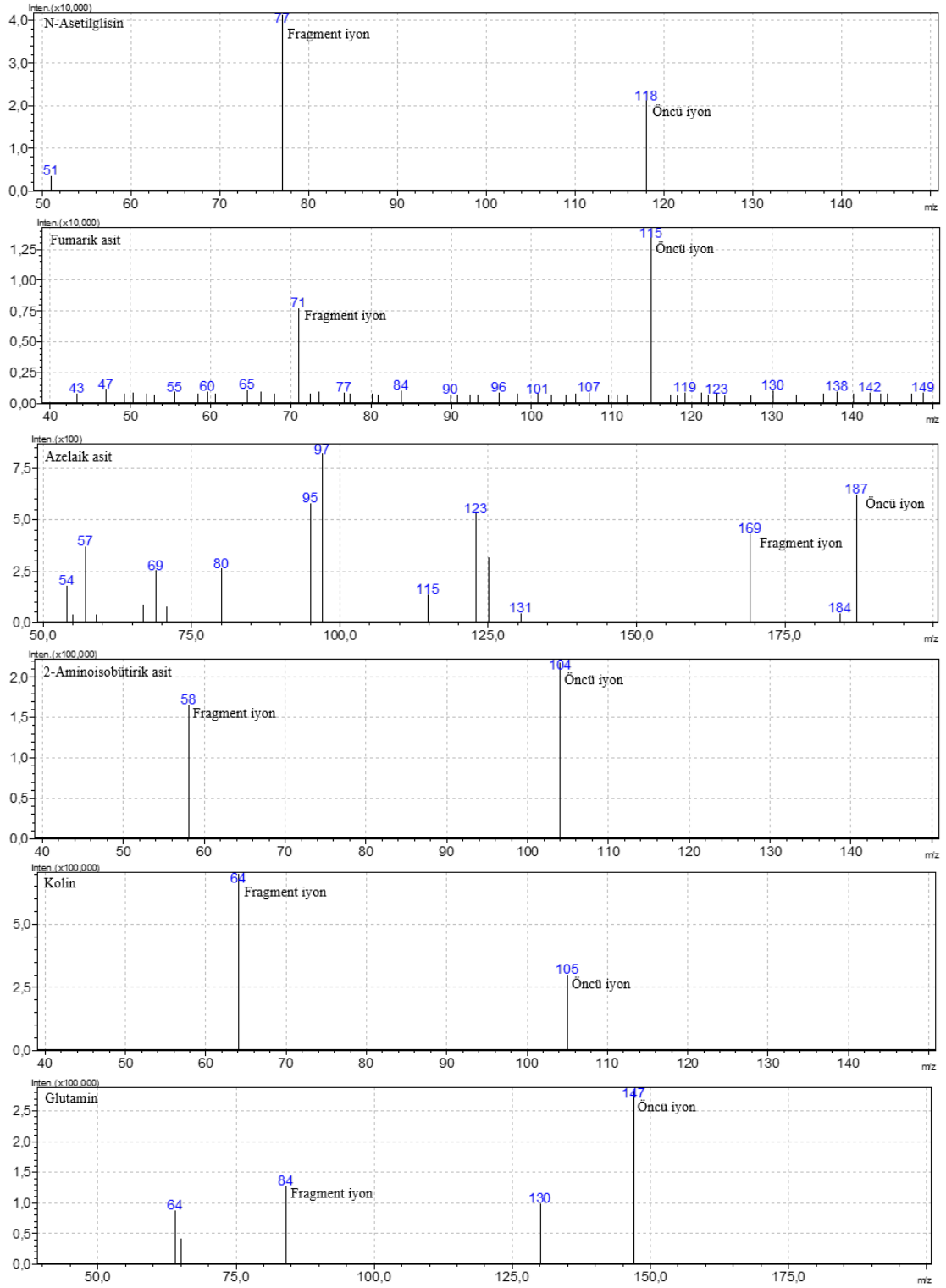
4.1.1. Optimizasyon Çalışmaları

MS/MS Yönteminin Optimizasyonu

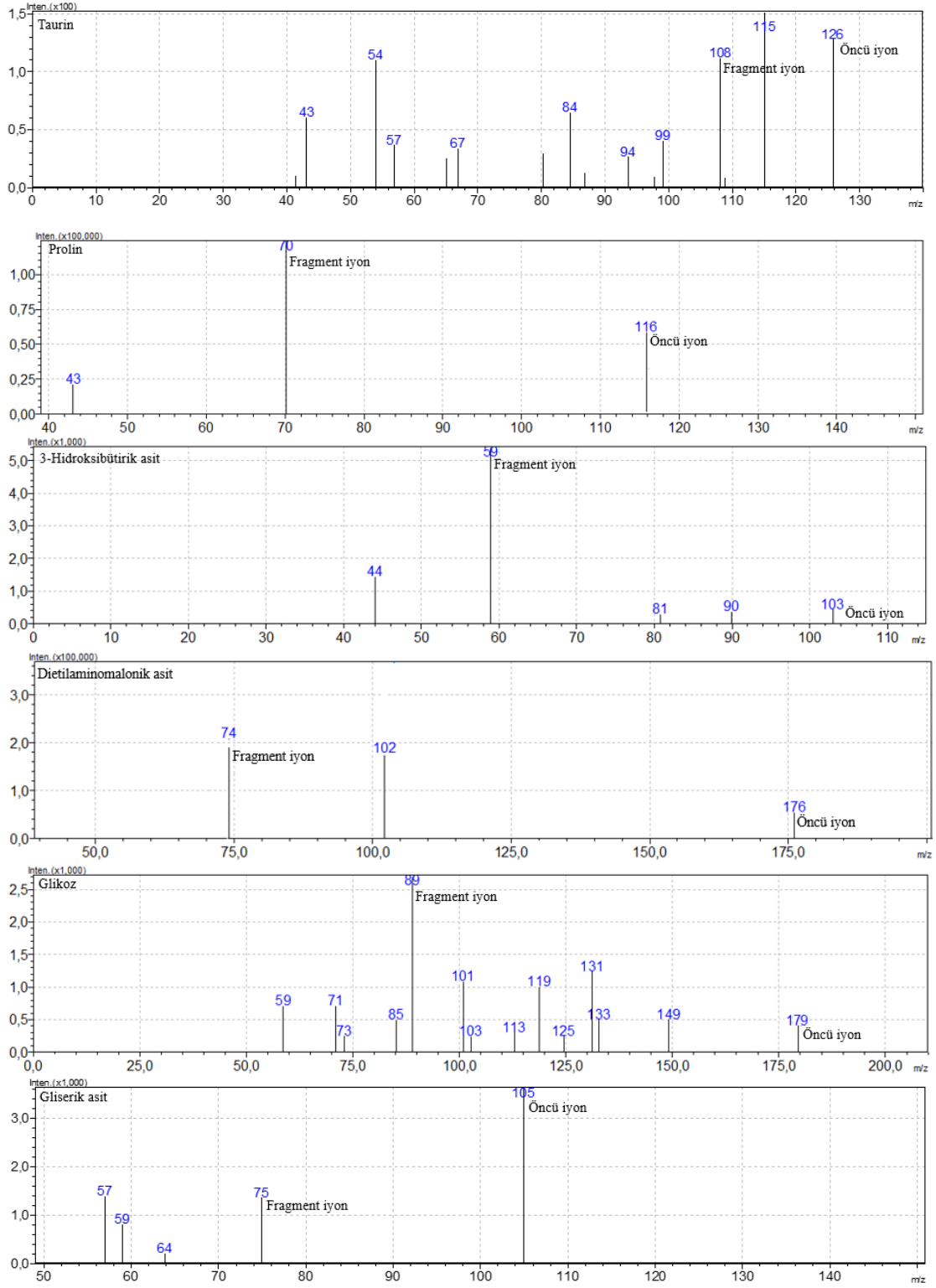
Çalışmamızda kullanılan MS/MS yöntemi Bölüm 3.8.1.'de "MS/MS Koşullarının Optimizasyonu" kısmında anlatıldığı şekilde optimize edilmiştir. Hedeflenen bütün metabolitler için MS/MS parçalanma modellerine ait kütle spektrumları Şekil 4.1.'de ve optimum analiz koşulları Tablo 4.1.'de sunulmuştur.



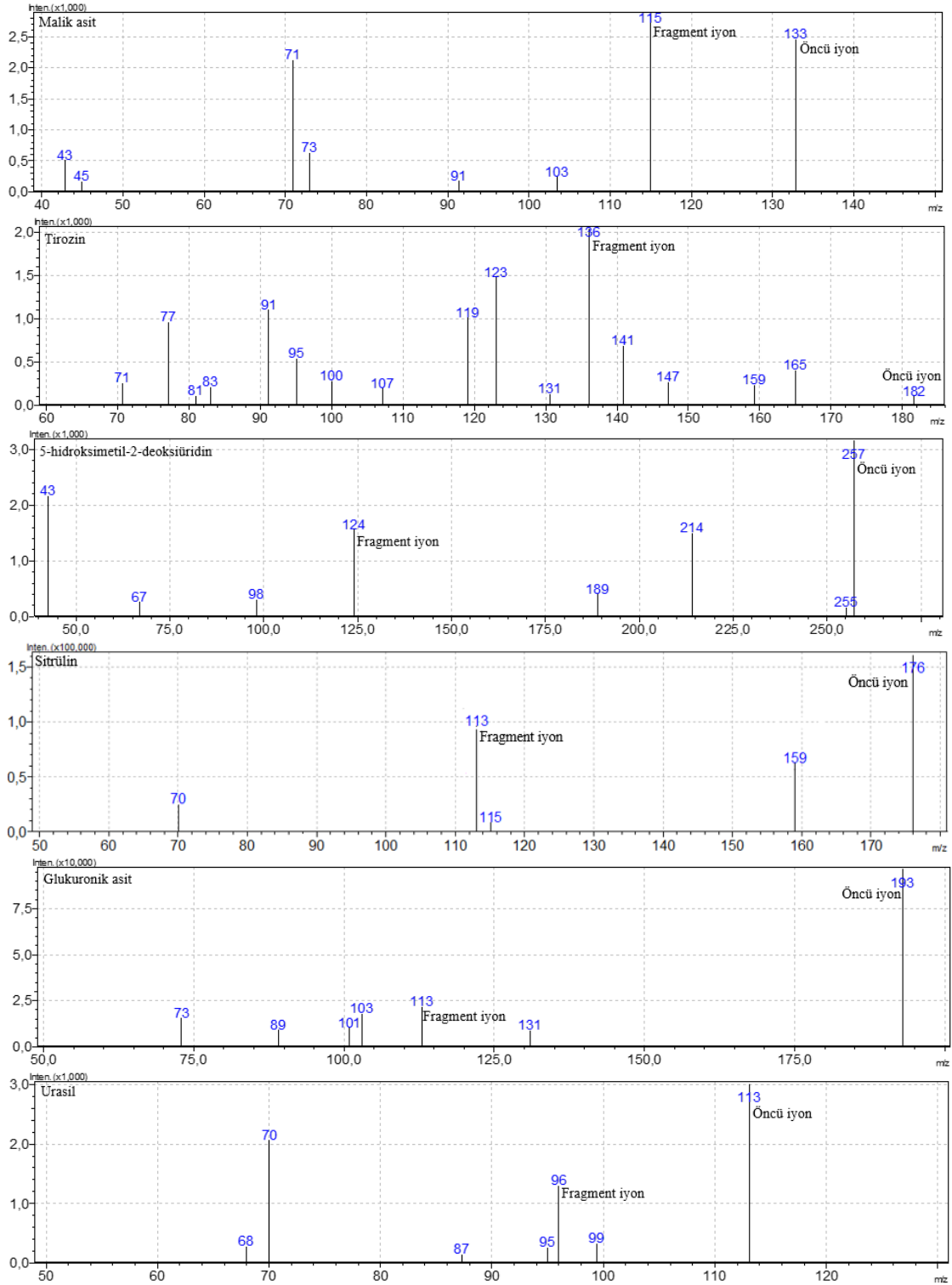
Şekil 4.1. Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.



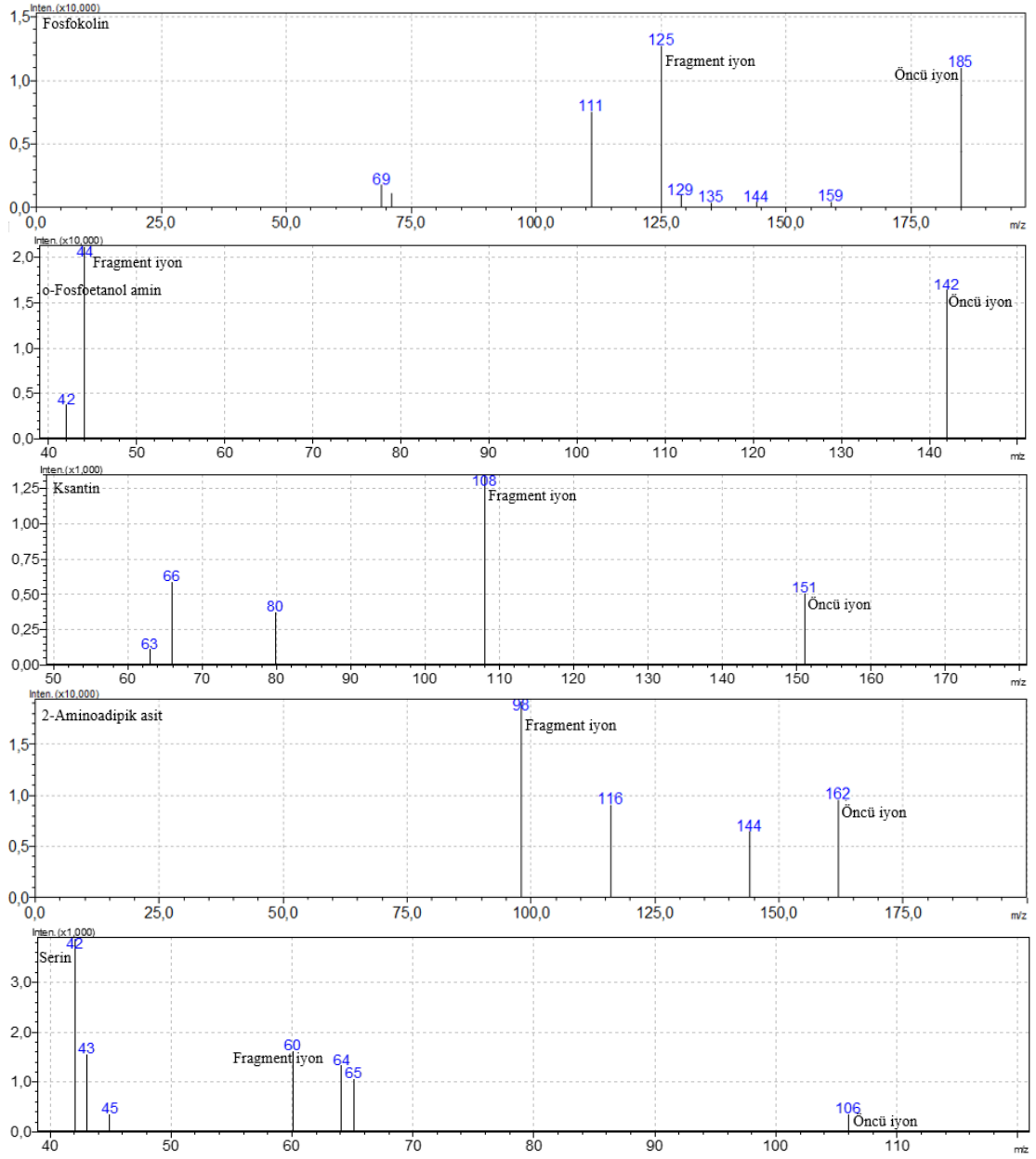
Şekil 4.1. (Devam) Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.



Şekil 4.1. (Devam) Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.



Şekil 4.1. (Devam) Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.



Şekil 4.1. (Devam) Metabolitlere ait MS/MS parçalanma modelleri.

Tablo 4.1. Optimum MRM koşulları.

Metabolit adı	m/z	İyonizasyon modu	Çarpışma enerjisi (eV)	Q1 (V)	Q3 (V)	Bekleme süresi (ms)
Glutamik asit	148,2→84,0	+	-17	-10	-18	50
Laktik asit	89,3→45,0	-	14	12	14	70
Histidin	156,1→110,1	+	-15	-11	-25	50
N-Asetilglisin	118,0→77,0	+	-21	-13	-15	50
Fumarik asit	115,2→70,9	-	11	12	21	70
Azelaik asit	187,0→169,1	-	15	11	14	70
2-Aminoisobütirik asit	104,0→58,0	+	-14	-11	-29	50
Kolin	105,2→64,1	+	-8	-11	-13	50
Glutamin	147,2→83,9	+	-16	-10	-17	50
Taurin	126,2→108,1	+	-25	-10	-25	50
Prolin	116,0→70,0	+	-21	-14	-22	50
3-Hidroksibütirik asit	103,0→59,0	-	6	11	23	70
Dietilaminomalonic asit	176,1→74,0	+	-22	-12	-26	50
Glikoz	179,1→89,0	-	13	12	16	70
Gliserik asit	105,0→75,1	-	8	12	11	200
Malik asit	133,1→114,9	-	7	14	16	70
Tirozin	182,3→135,9	+	-24	-13	-23	50
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	257,4→124,4	-	20	15	15	70
Sitrülin	176,3→113,3	+	-19	-21	-24	50
Glukuronik asit	193,1→112,9	-	20	15	21	70
Urasil	113,2→95,5	+	-15	-29	-22	50
Fosfokolin	185,0→125,0	+	-25	-16	-22	50
o-Fosfoetanol amin	142,1→44,2	+	-14	-16	-18	50

Q1: Birinci kuadrapol voltajı, Q3: Üçüncü kuadrapol voltajı.

Tablo 4.1. (Devam) Optimum MRM koşulları.

Metabolit adı	m/z	İyonizasyon modu	Çarpışma enerjisi (eV)	Q1 (V)	Q3 (V)	Bekleme süresi (ms)
Ksantin	150,9→108	-	27	13	26	70
2-Aminoadipik asit	162,2→98,1	+	-18	-10	-15	50
Serin	106,0→60,0	+	-12	-16	-24	50
¹³ C ₆ Fenilalanin (İS)	167,1→121,1	+	15	-15	-24	50

Q1: Birinci kuadrapol voltajı, Q3: Üçüncü kuadrapol voltajı.

Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin kromatografik koşullarının belirlenmesi amacıyla Tablo 3.1’de sunulan yöntemler kullanılarak analitik kolon, hareketli faz bileşimi ve gradient elüsyon programı optimize edilmiş ve analiz sonuçlarına ait gözlemler Tablo 4.2.’de sunulmuştur.

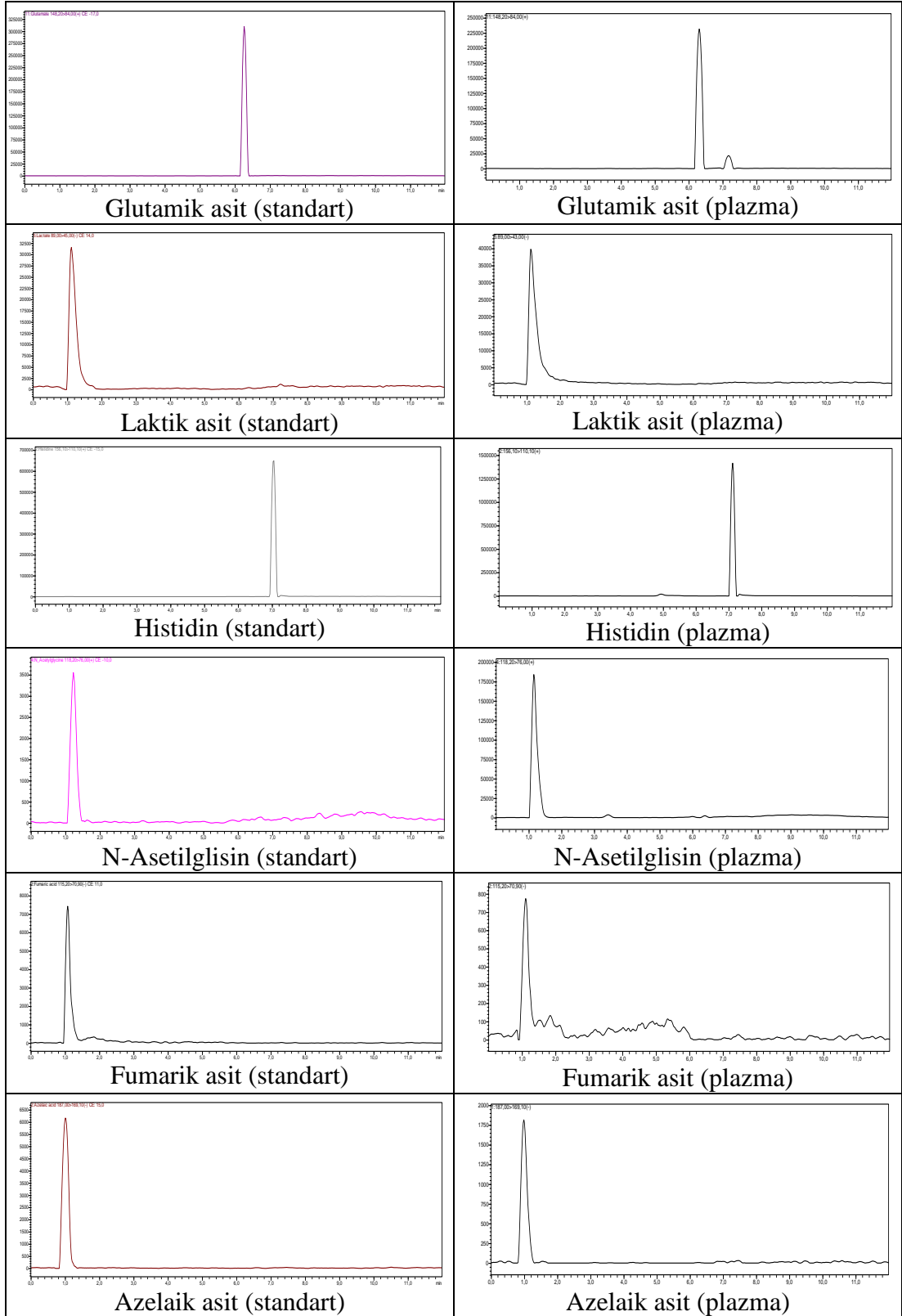
Kromatografik sistemde sabit fazın etkisi apolar özellikte ters faz C18 [Inertsil ODS-4 C18 (3 µm, 50x2,1 mm)] kolon kullanılarak incelenmiştir. Ancak metabolitlerin C18 sabit faz ile etkileşime girmeyerek kolonda tutunmadıkları görülmüş ve daha polar özellikte kolonlar ile optimizasyon çalışmasına devam edilmiştir. Bu amaçla metabolitler farklı polarite ve partikül çapına sahip dört farklı polar kolon [MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm), Zorbax HILIC Plus (3,5 µm, 4,6x100 mm), Waters HILIC (1,7 µm, 2,1x150 mm), ve Phenomenex Luna NH₂ (3 µm, 2x100 mm)] kullanılarak analiz edilmiştir. En iyi ayırımın ve pik şekillerinin elde edildiği MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm) kolon sabit faz olarak seçildikten sonra optimum ayırımı sağlayabilmek için farklı hareketli faz bileşimleri denenmiştir. En iyi ayırımın % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımından oluşan hareketli faz ile sağlandığı görülmüştür.

Tablo 3.1.’de gösterilen kolon, hareketli faz ve gradient profillerinin değiştiği dokuz farklı deney koşulunda yapılan metabolit analizleri sonucunda elde edilen pik şekilleri ve analiz süreleri değerlendirilmiş, optimum ayırımın sağlandığı dokuz numaralı deney koşulu seçilerek tüm analizlerde kullanılmıştır.

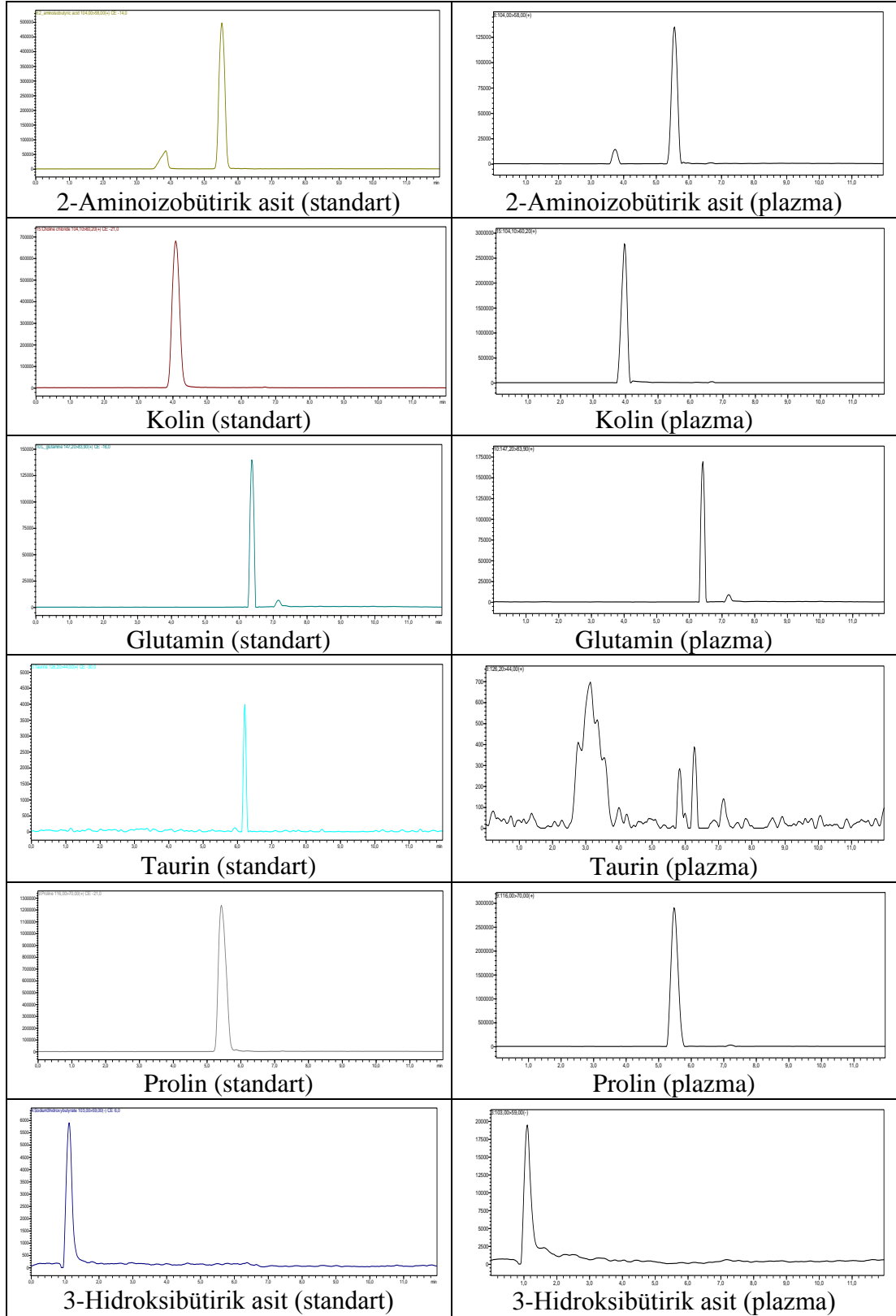
Tablo 4.2. Kromatografik koşulların optimizasyonu için gözlemler.

Yöntem	Gözlemler
1	Metabolitlerin kolonda tutunmadan hareketli faz ile birlikte elüe oldukları görülmüştür.
2	N-Asetilglisin, taurin, glikoz, urasil ve ksantin pikleri görülmemiş olup kolin, malik asit, glukuronik asit ve o-fosfoetanolamin piklerinde yarıma veya kuyruklanma oluşmuştur.
3	Laktik asit, N-Asetilglisin, taurin, dietilaminomalonic asit, gliserik asit, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin, urasil ve fosfokolin pikleri görülmemiş olup diğer pikler ise simetrik değildir.
4	Laktik asit, N-Asetilglisin, taurin ve dietilaminomalonic asit pikleri görülmemiş olup glutamik asit, 2-aminoisobütirik asit, glutamin ve prolin piklerinde yarıma veya kuyruklanma oluşmuştur.
5	Laktik asit, histidin, N-asetilglisin, taurin, prolin, dietilaminomalonic asit, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin ve o-fosfoetanolamin pikleri görülmemiş olup glutamin, gliserik asit ve ksantin haricindeki piklerde yarıma veya kuyruklanma oluşmuştur.
6	Laktik asit, N-asetilglisin, taurin, dietilaminomalonic asit, glikoz, tirozin, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin, glukuronik asit, urasil, fosfokolin ve o-fosfoetanolamin pikleri görülmemiş olup fumarik asit, 2-aminoisobütirik asit ve kolin piklerinde yarıma veya kuyruklanma oluşmuştur.
7	N-asetilglisin, taurin, glikoz ve 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin pikleri görülmemiş olup fumarik asit, 2-aminoisobütirik asit, kolin ve malik asit piklerinde yarıma veya kuyruklanma oluşmuştur.
8	Fumarik asit ve urasil metabolitlerine ait piklerde kuyruklanma gözlenmiş olup diğer metabolit pikleri analiz için uygun bulunmuştur.
9	Bütün metabolit piklerinin analiz için uygun olduğu görülmüştür.

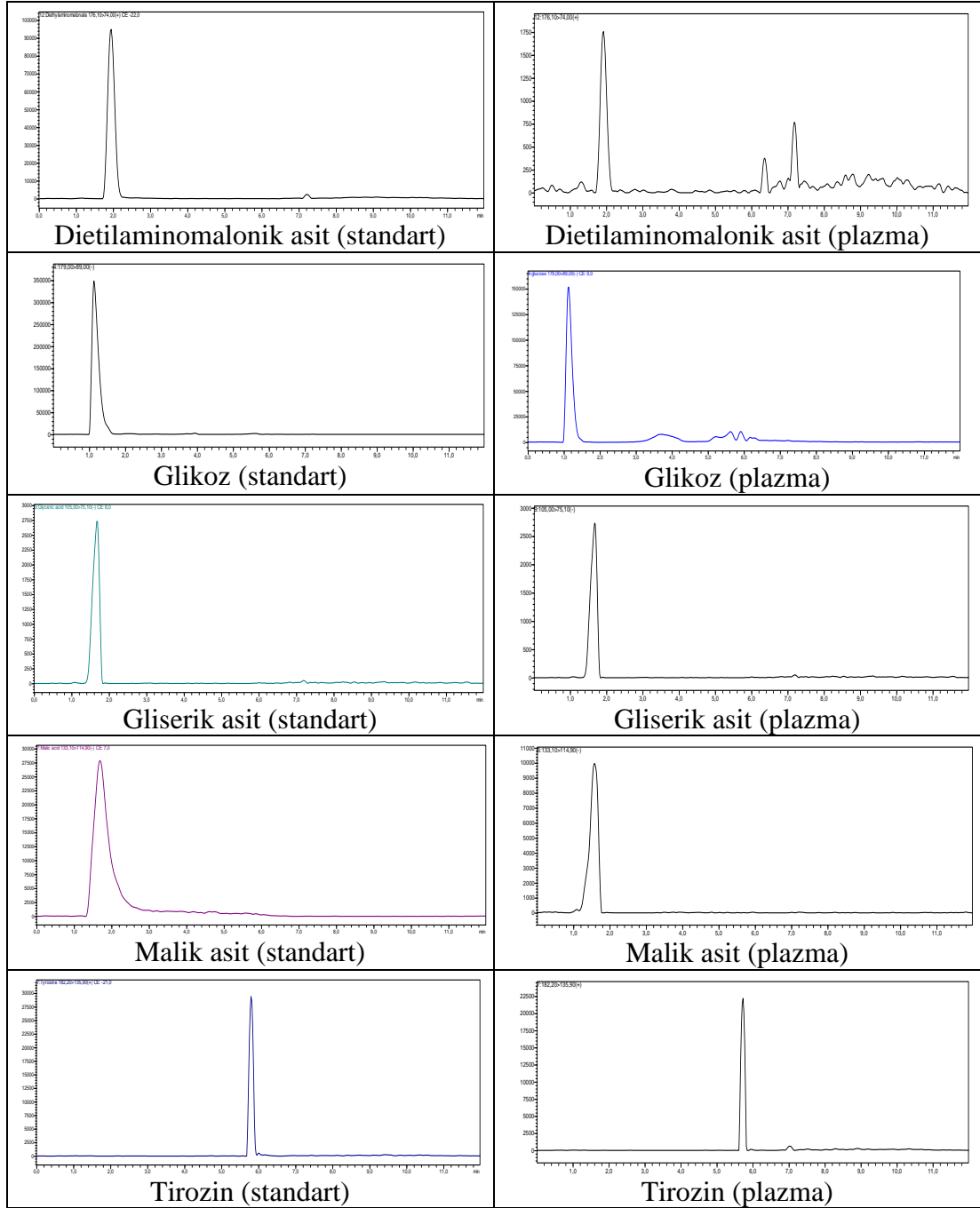
Tablo 3.1.'de gösterilen kolon, hareketli faz ve gradient profillerinin değiştiği dokuz farklı deney koşulunda yapılan metabolit analizleri sonucunda elde edilen pik şekilleri ve analiz süreleri değerlendirilmiş, optimum ayırımın sağlandığı dokuz numaralı deney koşulu seçilerek tüm analizlerde kullanılmıştır. Belirlenen analiz koşullarında yirmi altı metabolit için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2.'de verilmiştir.



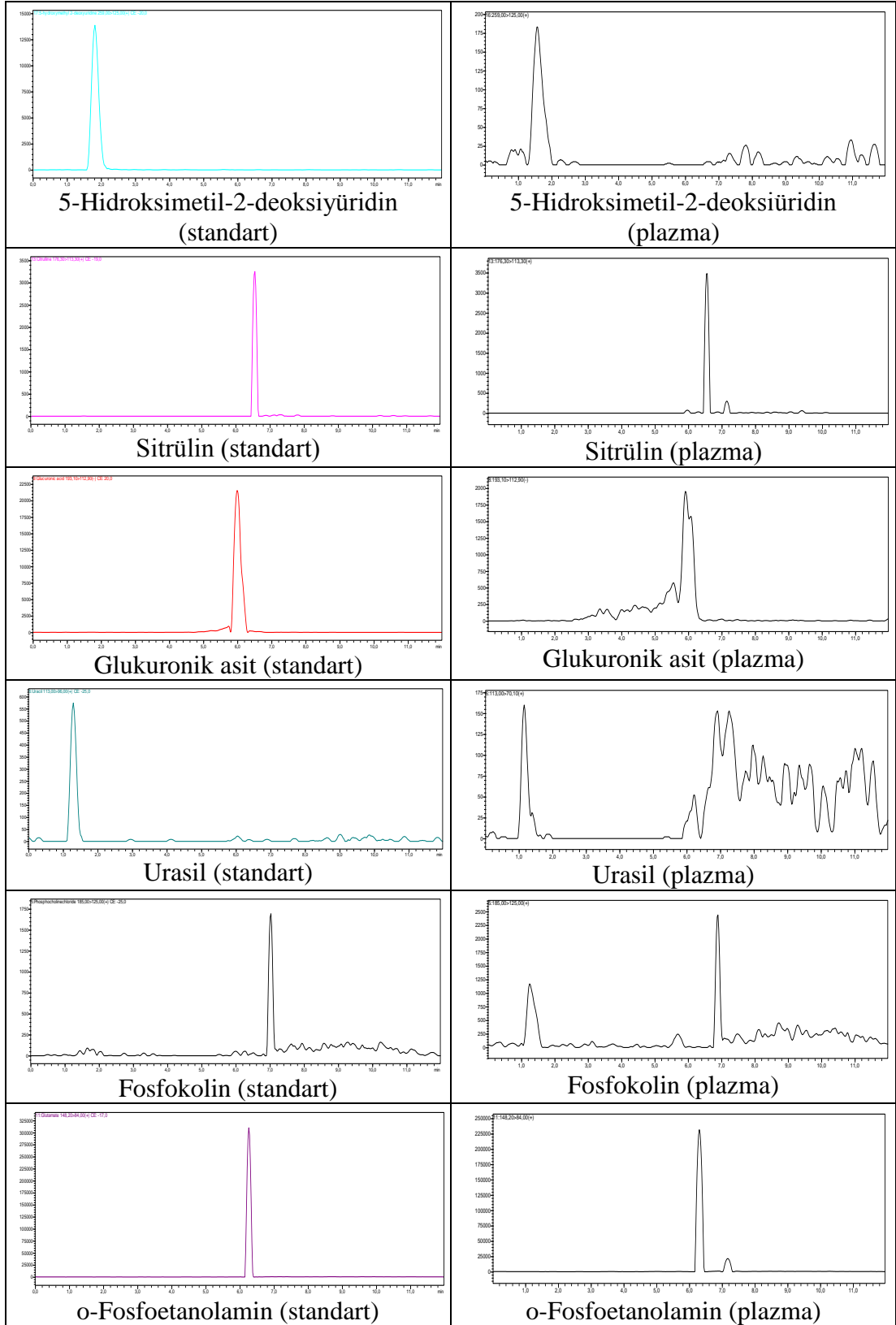
Şekil 4.2. Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.



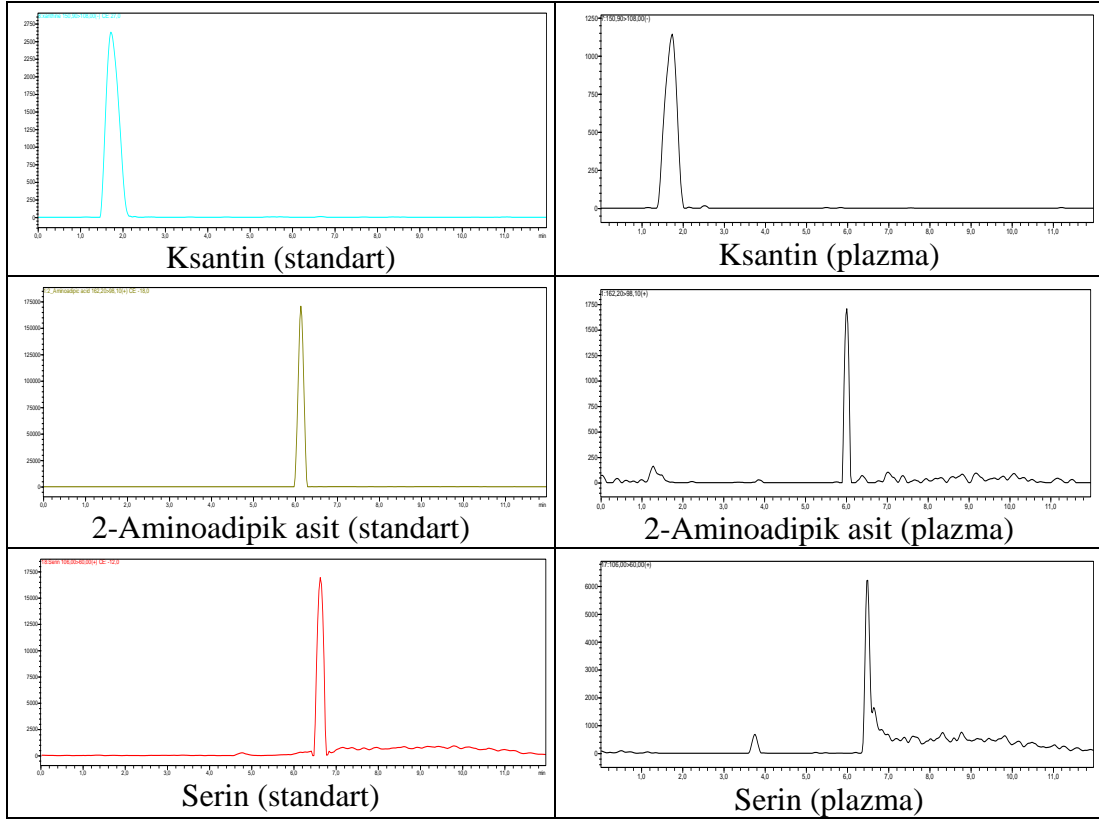
Şekil 4.2. (Devam) Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.



Şekil 4.2. (Devam) Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.



Şekil 4.2. (Devam) Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.



Şekil 4.2. (Devam) Tüm metabolitlere ait standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve hasta grubundan bir plazma örneğinin analizine ait kromatogramlar.

Numune Hazırlama Basamağının Optimizasyonu

Numunelerin analize hazırlanması sırasında metabolitlerin matriks bileşenlerinden uzaklaştırılması için protein çöktürme işlemi uygulanmış olup yöntem çözücü tipi, seyreltme ve uçurma etkisi parametreleri açısından değerlendirilmiştir.

Ekstraksiyon çözücüsü olarak asetonitril, metanol:su (9:1) (h:h), izopropilalkol:asetonitril:su (3:3:2) (h:h:h), perklorik asit:2 M potasyum bikarbonat (1:1) (h:h) ve trikloro asetik asit kullanılarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Perklorik asit:2 M potasyum bikarbonat karışımı ve trikloro asetik asit kullanıldığında pik şiddetlerinin belirgin düzeyde azaldığı ve bazı metabolit piklerinin kaybolduğu görülmüş; diğer çözücüler ile elde edilen ortalama bağıl geri kazanım sonuçları ise Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Farklı çözücü sistemleri ile elde edilen mutlak geri kazanım değerleri.

Metabolit	Geri Kazanım (%)		
	Asetonitril	Metanol:Su (9:1, h:h)	İzopropilalkol:asetonitril:su (3:3:2, h:h:h)
Glutamik asit	123,45	218,28	60,84
Laktik Asit	56,53	47,22	-
Histidin	91,15	112,96	78,92
N-Asetilglisin	71,03	98,71	33,44
Fumarik asit	65,78	51,03	56,72
Azelaik asit	56,41	48,42	39,09
2- aminoizobütirik asit	85,79	104,57	60,29
Kolin	72,23	130,50	129,52
Glutamin	75,41	79,12	20,25
Taurin	56,41	48,42	-
Prolin	67,12	115,97	143,80
3- hidroksibütirik asit	61,93	24,22	-
Dietilaminomalonik asit	67,37	78,31	25,19
Glikoz	54,52	-	-
Gliserik asit	57,36	39,21	-
Malik asit	82,46	45,95	83,39
Tirozin	49,52	-	-
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	62,89	29,07	10,98
Sitrülin	68,97	9,47	5,65
Glukuronik asit	74,50	93,91	102,39
Urasil	88,01	87,66	31,20
Fosfokolin	29,54	-	-
o-Fosfoetanolamin	52,75	1,77	2,44
Ksantin	68,00	54,66	45,35
2-aminoadipik asit	84,65	110,88	50,41
Serin	47,90	22,55	20,55

Tüm plazma analizleri sırasında protein çöktürmesi metabolitlerin çoğunluğu için yüksek geri kazanım değerlerinin elde edildiği asetonitril ile yapılmıştır.

Seyreltme etkisi plazma örneğinin 1/2 oranında seyreltilmesi ile incelenmiş ve seyreltme yapıldığında bazı metabolitler için cihaz sinyalinde oluşan aşırı doygunluğun önüne geçilmiştir. Son olarak uçurma işlemi uygulanarak hazırlanan

örnekler ile uçurmadan hazırlanan örnekler sırasıyla analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle uçurma işlemine gerek olmadığına karar verilmiştir.

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

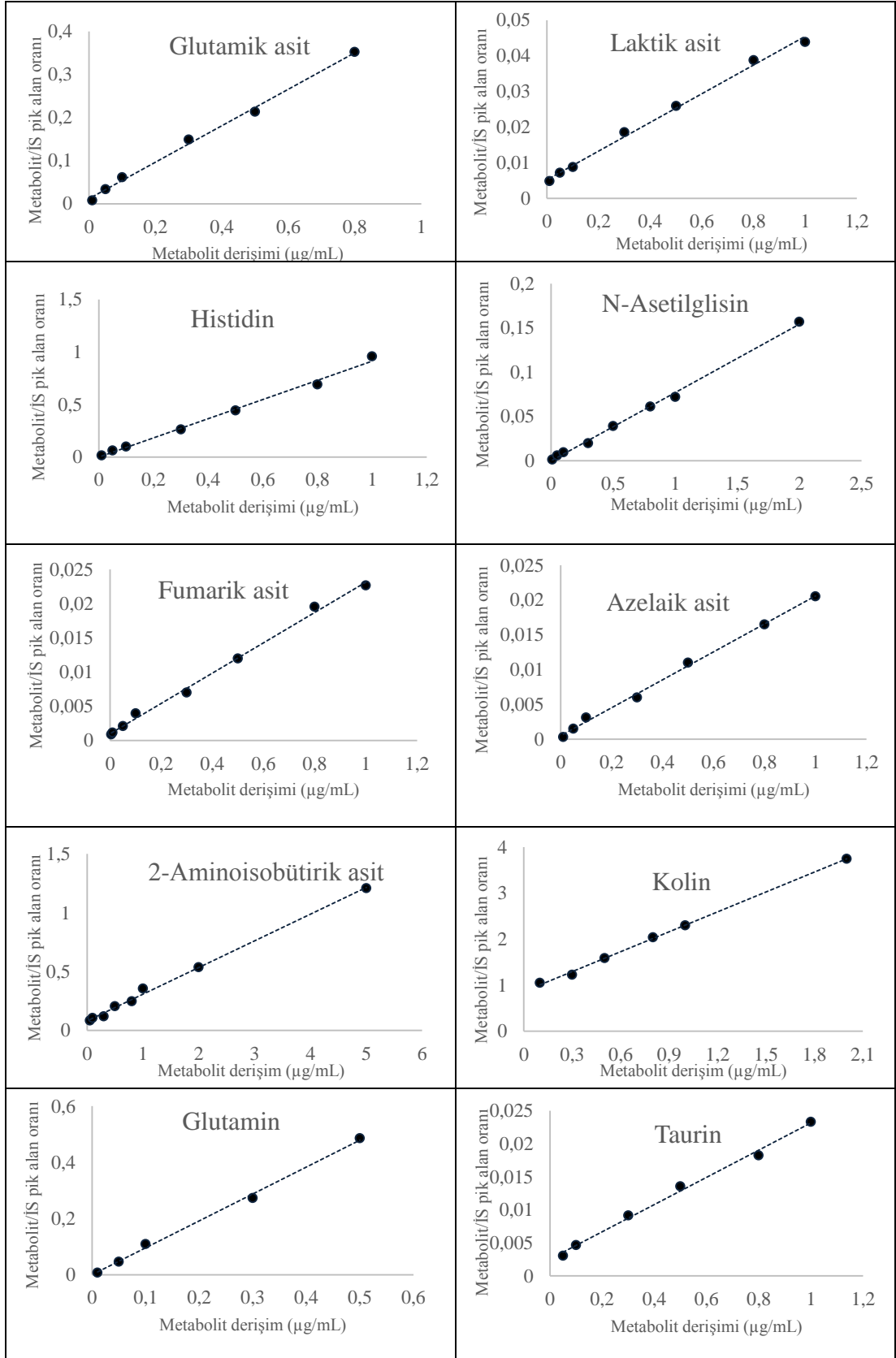
Optimize edilen LC-MS/MS yöntemi US FDA'nın biyoanalitik yöntem validasyon kılavuzlarına göre valide edilmiştir (121). Bu amaçla metabolitlerin kararlılığı, geliştirilen yöntemin seçiciliği, doğrusallığı, duyarlılığı, kesinliği, doğruluğu, geri kazanımı ve sistem uygunluğu incelenmiştir.

4.2.1. Seçicilik

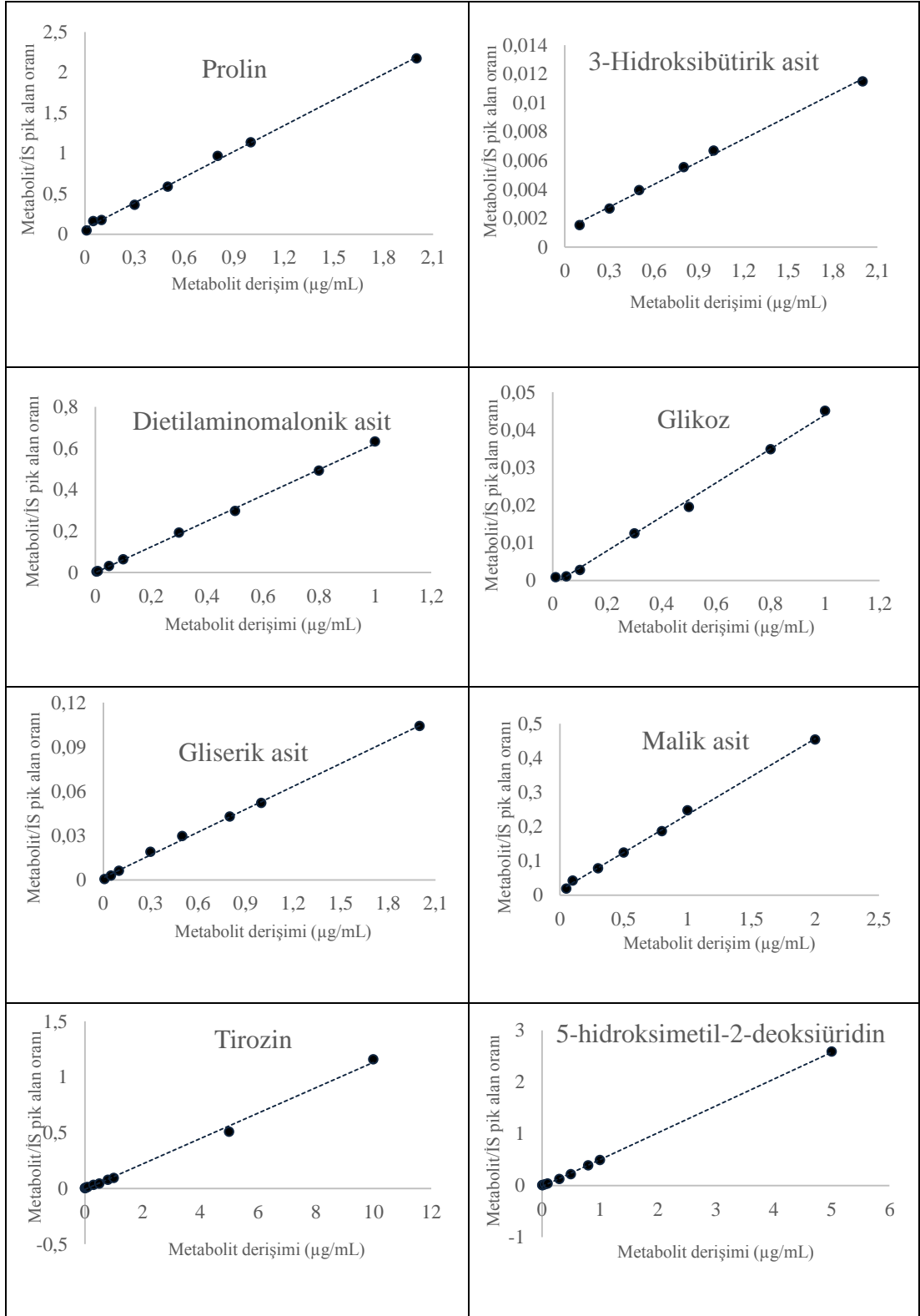
Standart ve plazma çözeltilerinin tekrarlı analizleri sonucu elde edilen kromatogramlar geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliğini belirlemek amacıyla incelenmiştir (Şekil 4.2.). Her bir metabolite özgün alıkonma zamanında sadece bir pik görülmüş ($BSS_{IR} < 2,00$) ve herhangi bir metabolit pikinin başka bir metabolitin m/z değerinde görülmediği saptanmıştır. Ayrıca analiz süresince kullanılan hareketli faz çözeltisi de bu amaçla analiz edilmiş ve metabolitlerin MRM koşullarında herhangi bir girişim gözlenmemiştir.

4.2.2. Doğrusallık

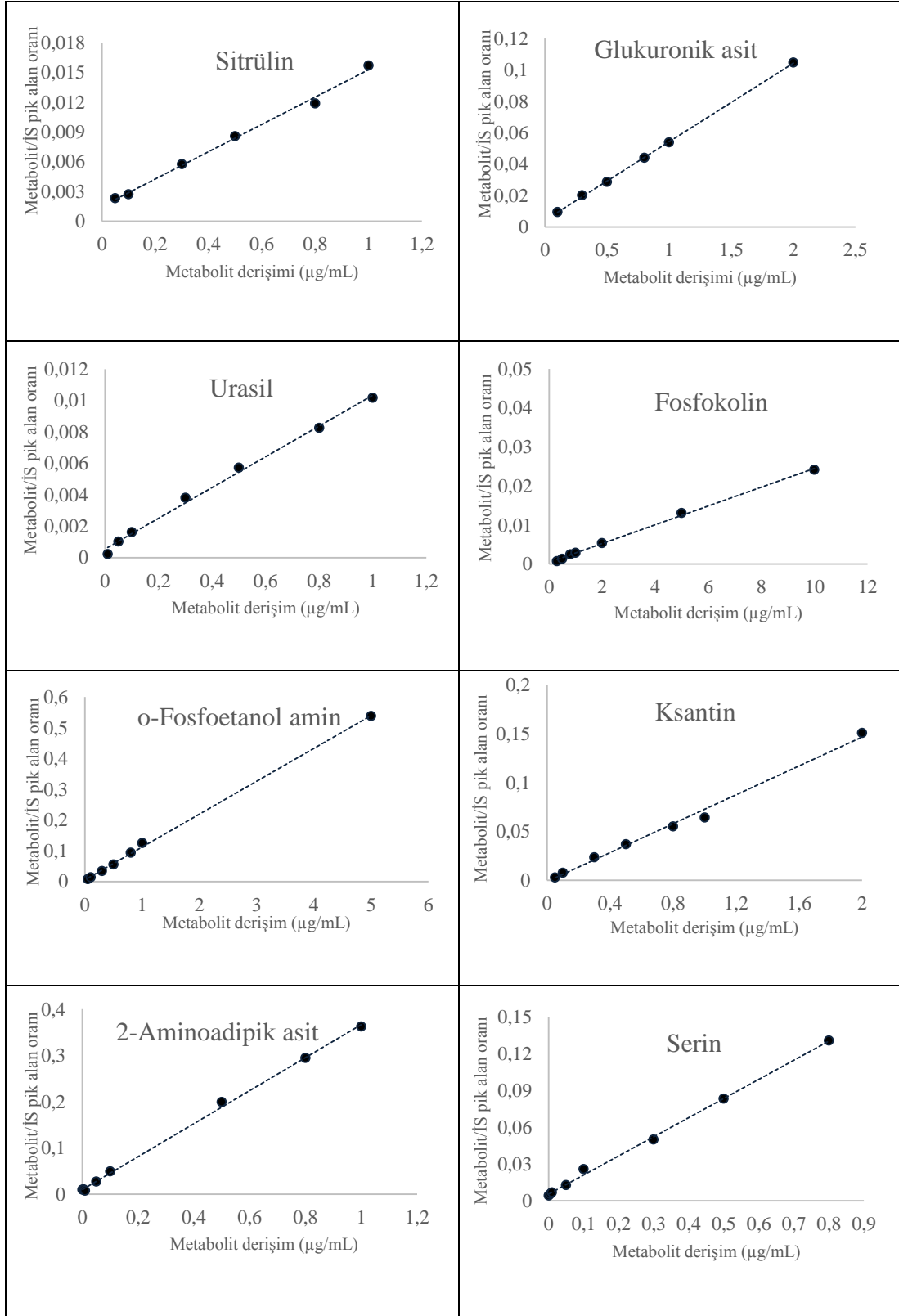
Her bir metabolit için 0,001-0,005-0,01-0,05-0,1-0,3-0,5-0,8-1-2-5 ve 10 µg/mL derişimlerde standart karışım çözeltileri analiz edilmiş ve kalibrasyon eğrileri her bir metabolit alanının iç standardın alanına bölünmesiyle elde edilen değerlerin metabolit derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 4.3.). Elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bilgiler ve ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.4.'de, yöntemin doğrusallığının kontrolü için oluşturulan grafikler ise Şekil 4.4.'de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.



Şekil 4.3. (Devam) Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.

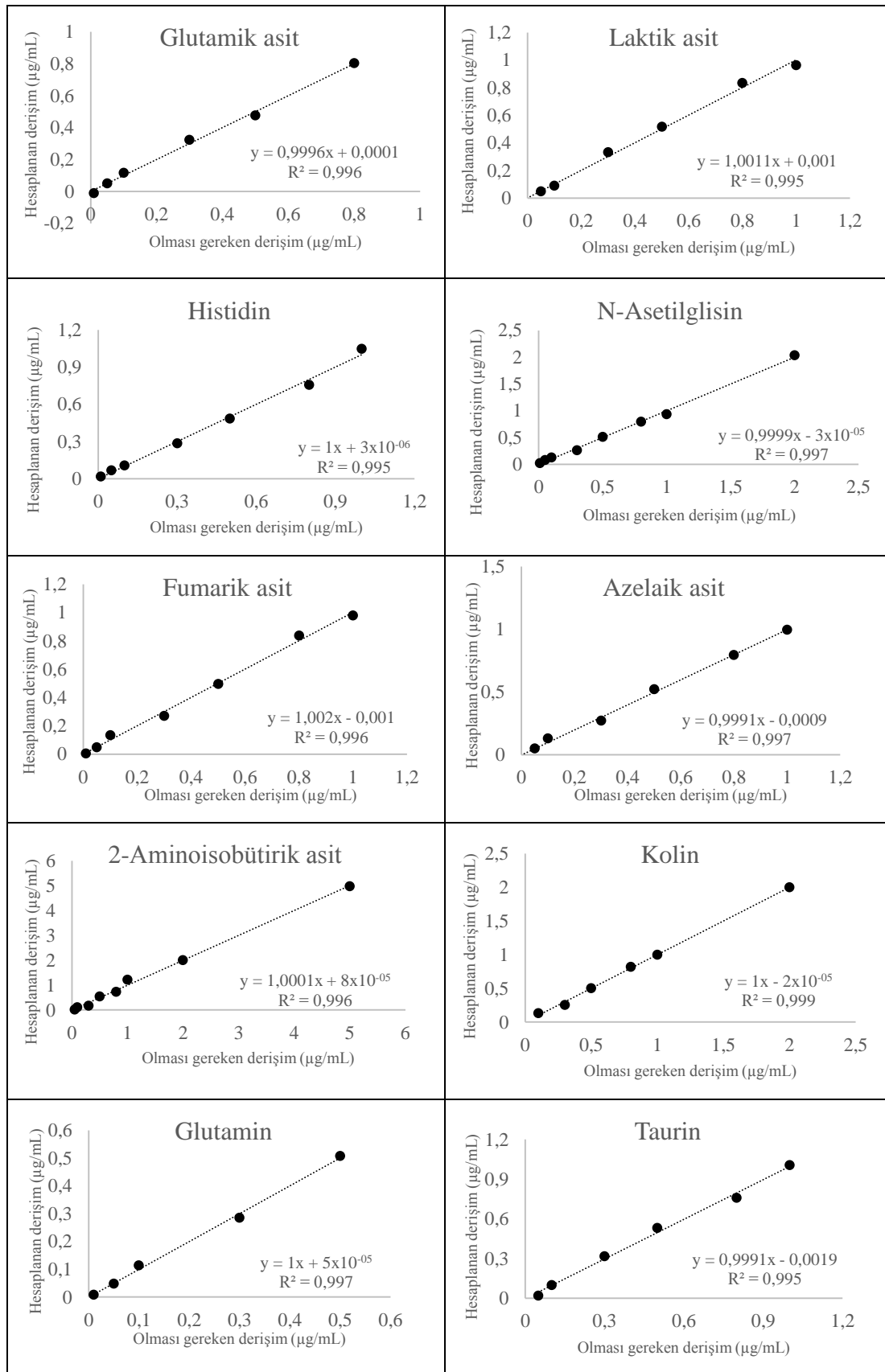


Şekil 4.3. (Devam) Metabolitlere ait kalibrasyon doğruları.

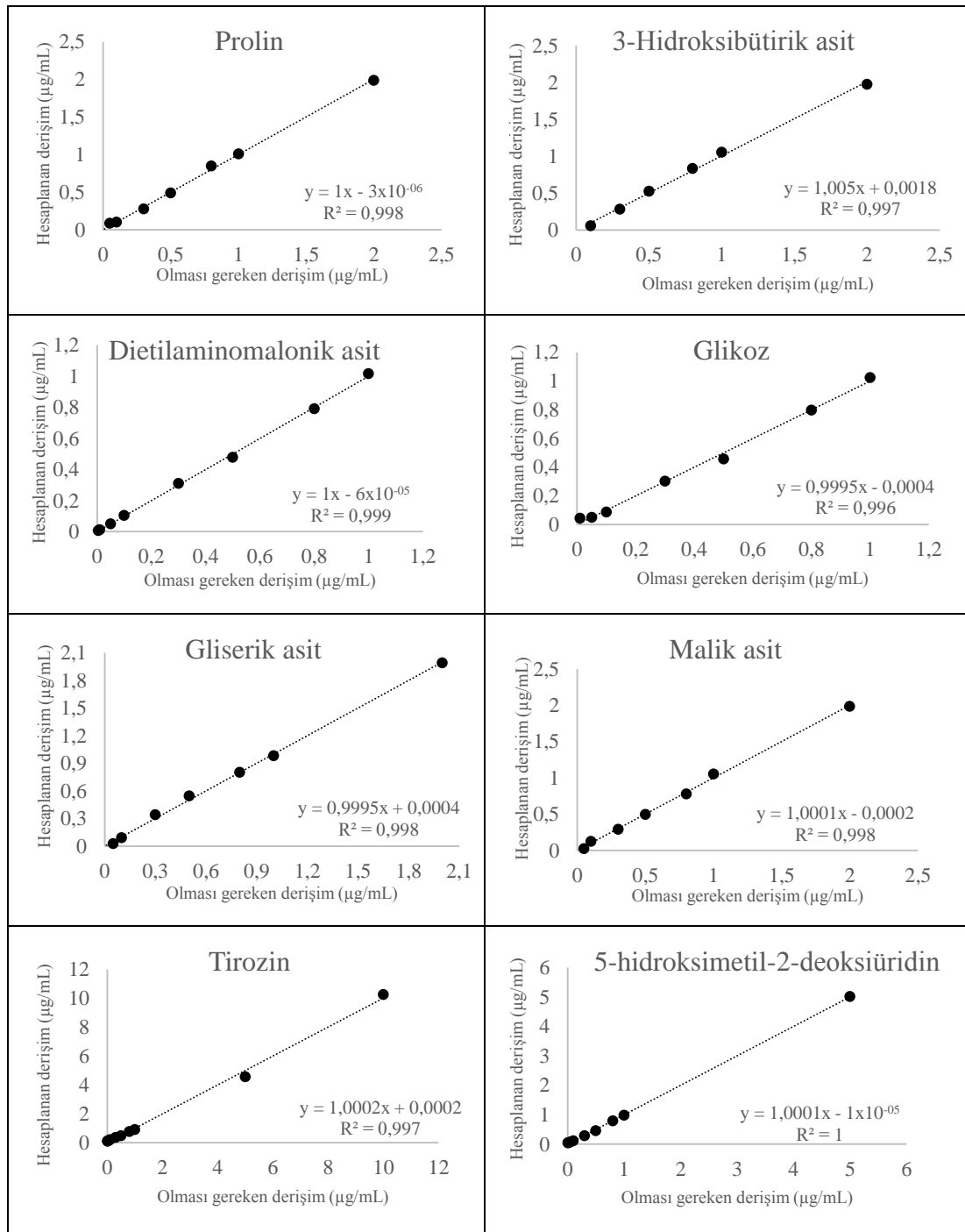
Tablo 4.4. Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen kalibrasyon doğrularına ait bilgiler (n=8)*.

Metabolit adı	Aralık (µg/mL)	a	b	r	R ²	p**	F***
Glutamik asit	0,01-0,80	0,4423	0,0093	0,998	0,996	0,787	650,2
Laktik asit	0,01-1,00	0,0294	0,0048	0,997	0,995	0,061	1062,2
Histidin	0,01-1,00	0,9834	0,0001	0,997	0,994	0,994	3161,6
N-Asetilglisin	0,01-2,00	0,0602	0,0008	0,998	0,997	0,133	23594,2
Fumarik asit	0,05-1,00	0,0191	0,0007	0,998	0,996	0,085	1954,6
Azelaik asit	0,01-1,00	0,0189	0,0007	0,998	0,997	0,916	2351,8
2-Aminoisobütirik asit	0,05-5,00	0,2153	0,0741	0,998	0,996	0,102	2559,7
Kolin	0,1-2,00	1,5636	0,6332	0,997	0,995	0,052	2667,8
Glutamin	0,01-0,50	0,5803	0,0033	0,999	0,998	0,094	5043,8
Taurin	0,05-1,00	0,0025	0,0004	0,997	0,994	0,058	104,1
Prolin	0,01-2,00	1,0423	0,0631	0,999	0,998	0,082	6059,4
3-Hidroksibütirik asit	0,1-2,00	0,2109	0,0020	0,997	0,995	0,050	720,3
Dietilaminomalonic asit	0,005-1,00	1,5508	0,0274	0,999	0,998	0,229	8196,4
Glikoz	0,01-1,00	0,0314	0,0030	0,995	0,991	0,424	1047,8
Gliserik asit	0,01-2,00	0,0577	0,0002	0,999	0,998	0,806	4459,4
Malik asit	0,05-2,00	0,2215	0,0138	0,999	0,998	0,116	2855,2
Tirozin	0,005-10,00	0,1724	0,0008	0,998	0,997	0,211	82619,1
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	0,005-5,00	0,4833	-0,019	0,999	0,999	0,134	19558,7
Sitrülin	0,005-1,00	0,0116	-0,0035	0,997	0,994	0,055	343,9
Glukuronik asit	0,1-2,00	0,0499	0,0069	0,998	0,997	0,102	2786,7
Urasil	0,01-1,00	0,01	0,0005	0,997	0,995	0,215	1767,6
Fosfokolin	0,3-10,00	0,0021	0,0003	0,999	0,998	0,069	4256,1
o-Fosfoetanol amin	0,05-5,00	0,0883	0,0091	0,999	0,998	0,060	3603,9
Ksantin	0,05-2,00	0,1104	0,0009	0,997	0,995	0,489	1640,8
2-Aminoadipik asit	0,001-1,00	0,3376	0,0060	0,998	0,997	0,065	362,5
Serin	0,001-0,80	0,2839	0,0451	0,999	0,998	0,102	2761,9

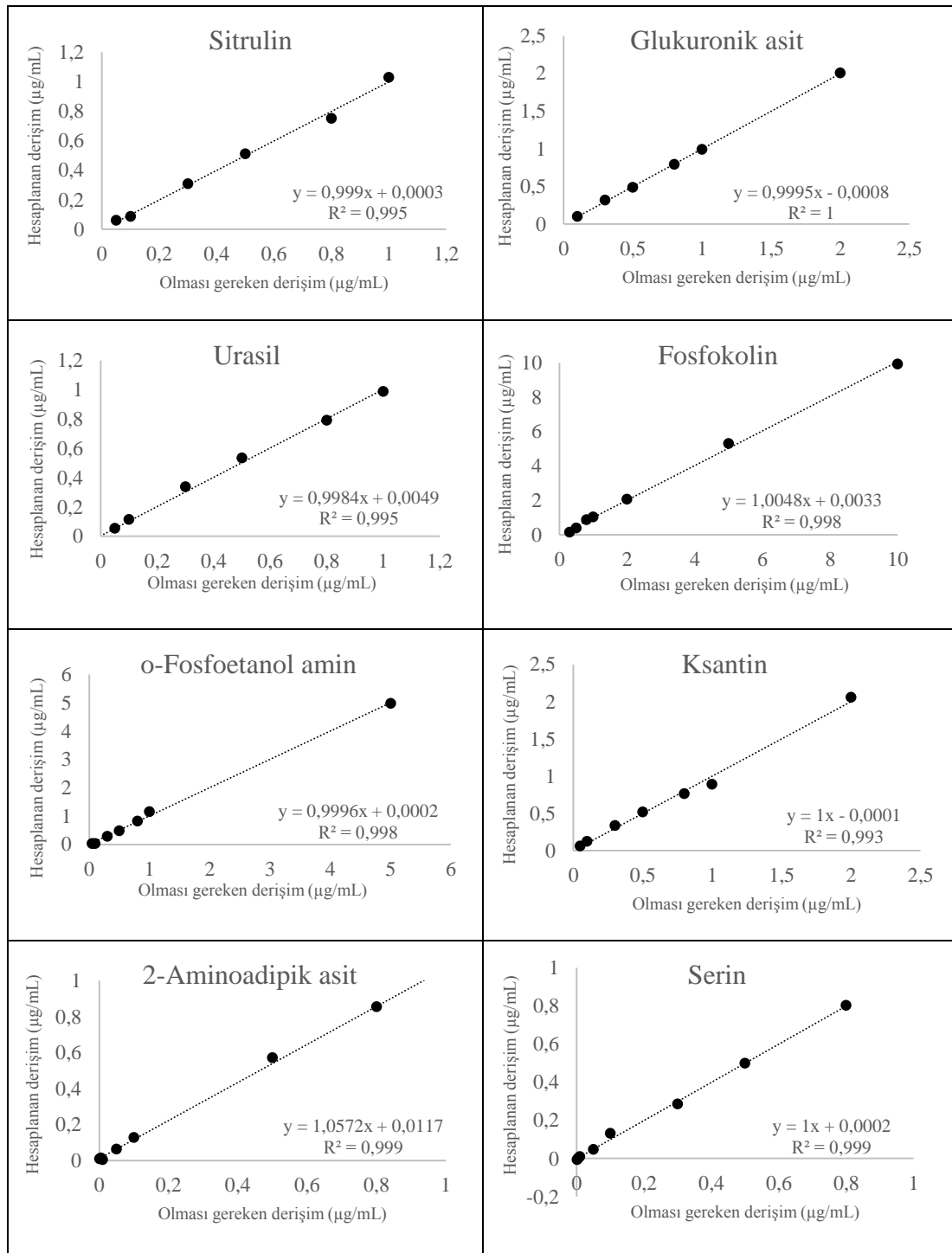
*y = ax+b; a: Eğim; b: Kesişim; x: Derişim (µg/mL); y: Pik alan oranı; r: Korelasyon katsayısı; R²: Tanımlayıcılık katsayısı; **p: Kesişimin olasılık değeri, eğimin p değeri bütün metabolitler için 0,0000<p'dir; ***F: Varyans analizi için hesaplanan değer.



Şekil 4.4. Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.



Şekil 4.4. (Devam) Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.



Şekil 4.4. (Devam) Metabolitlere ait doğrusallık kontrol grafikleri.

4.2.3. Duyarlılık

Metabolitlere ait gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ) sinyal/gürültü oranının sırasıyla 3 ve 10 olduğu derişim değerleri olarak belirlenmiş ve Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Metabolitlerin LOD ve LLOQ değerleri.

Metabolit adı	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Metabolit adı	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Glutamik asit	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-4}$	Glikoz	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$
Laktik Asit	$6,4 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$	Gliserik asit	$6,1 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-2}$
Histidin	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-4}$	Malik asit	$1,8 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-3}$
N-Asetilglisin	$6,3 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-2}$	Tirozin	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$
Fumarik asit	$4,7 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$	5-Hidroksimetil- 2-deoksiüridin	$7,3 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-2}$
Azelaik asit	$3,6 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$	Sitrülin	$8,3 \times 10^{-4}$	$5,3 \times 10^{-3}$
2- Aminoizobütirik asit	$2,6 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-4}$	Glukuronik asit	$1,5 \times 10^{-3}$	$9,4 \times 10^{-3}$
Kolin	$6,9 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	Urasil	$8,7 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-2}$
Glutamin	$9,3 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-4}$	Fosfokolin	$1,0 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$
Taurin	$1,3 \times 10^{-3}$	$4,1 \times 10^{-2}$	o-Fosforiletanol- amin	$1,8 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$
Prolin	$5,9 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-4}$	Ksantin	$1,1 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$
3- Hidroksibütirik asit	$4,9 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	2-Aminoadipik asit	$9,4 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-4}$
Dietilaminoma- lonik asit	$2,6 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	Serin	$2,5 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$

4.2.4. Kesinlik

Kesinlik çalışmasında her bir metabolit için doğrusallık aralığına giren üç farklı derişimdeki çözeltiler altı farklı seri hazırlanarak aynı günde (gün içi kesinlik) ve altı farklı günde (günler arası kesinlik) analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kalibrasyon eğrileri kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçların BSS değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=6).

Metabolit adı	Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler arası		
		$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b	$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b
Glutamik asit	0,05	0,05 ± 0,002	9,63	4,78	0,05 ± 0,001	5,75	3,93
	0,3	0,30 ± 0,01	6,80	-1,59	0,30 ± 0,004	3,19	0,22
	0,8	0,80 ± 0,01	2,75	0,15	0,80 ± 0,01	2,37	-0,39
Laktik asit	0,05	0,05 ± 0,001	2,01	-0,82	0,05 ± 0,001	3,54	-1,65
	0,3	0,29 ± 0,01	4,73	-2,45	0,30 ± 0,01	4,45	-1,41
	0,8	0,80 ± 0,01	1,15	-0,50	0,80 ± 0,01	1,05	-0,54
Histidin	0,05	0,05 ± 0,001	4,04	-0,57	0,05 ± 0,001	5,39	4,06
	0,3	0,3 ± 0,03	2,83	-2,31	0,30 ± 0,01	4,52	0,39
	0,8	0,78 ± 0,01	4,26	-2,30	0,79 ± 0,01	2,82	-0,98
N-Asetilglisin	0,05	0,05 ± 0,001	4,35	2,29	0,05 ± 0,001	4,05	1,70
	0,5	0,5 ± 0,01	3,32	-0,09	0,49 ± 0,01	5,53	-1,83
	1,0	1,01 ± 0,01	2,87	1,00	0,99 ± 0,01	3,46	-0,88
Fumarik asit	0,05	0,05 ± 0,004	1,84	2,32	0,05 ± 0,001	3,28	0,74
	0,5	0,5 ± 0,001	0,54	0,14	0,49 ± 0,004	1,82	-1,13
	1,0	1,0 ± 0,01	1,93	-0,14	0,99 ± 0,01	2,31	-1,22
Azelaik asit	0,05	0,05 ± 0,003	1,69	0,61	0,05 ± 0,004	1,83	3,75
	0,5	0,51 ± 0,002	0,81	1,27	0,50 ± 0,002	1,18	0,92
	1,0	0,99 ± 0,01	1,31	1,06	0,99 ± 0,01	1,42	-1,48
2-Aminoisobütirik asit	0,1	0,1 ± 0,004	8,41	2,39	0,10 ± 0,004	8,97	1,78
	0,5	0,49 ± 0,004	1,81	-1,88	0,49 ± 0,04	2,18	-1,06
	2,0	1,99 ± 0,04	4,37	-0,54	2,01 ± 0,02	2,00	0,61
Kolin	0,1	0,10 ± 0,002	5,84	1,29	0,10 ± 0,002	4,17	-0,46
	0,5	0,49 ± 0,01	3,41	-1,42	0,48 ± 0,01	3,83	-3,05
	2,0	1,98 ± 0,01	1,08	-0,99	1,99 ± 0,03	3,99	-0,32
Glutamin	0,01	0,01 ± 0,003	7,60	-6,95	0,01 ± 0,004	9,25	0,04
	0,1	0,11 ± 0,001	3,02	6,56	0,10 ± 0,002	5,93	1,11
	0,5	0,5 ± 0,002	1,01	0,27	0,49 ± 0,004	2,03	-1,87

$\bar{X} \pm SH$: Ortalama ± standart hata, ^a:BSS, Bağıl standart sapma, ^b: BH, Bağıl hata (Ek 2).

Tablo 4.6. (Devam) Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=6).

Metabolit adı	Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler arası		
		$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b	$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b
Taurin	0,1	0,10 ± 0,01	4,62	0,60	0,10 ± 0,01	4,39	1,09
	0,5	0,49 ± 0,01	1,36	-2,65	0,49 ± 0,01	2,24	-1,17
	1,0	1,01 ± 0,03	4,65	1,19	1,01 ± 0,03	4,65	1,19
Prolin	0,05	0,05 ± 0,002	7,56	1,62	0,05 ± 0,002	1,07	1,59
	0,3	0,29 ± 0,01	4,31	-3,84	0,29 ± 0,003	2,55	-3,12
	1,0	1,01 ± 0,01	2,35	1,05	0,99 ± 0,01	2,46	-0,95
3-Hidroksibütirik asit	0,1	0,10 ± 0,003	8,05	0,76	0,10 ± 0,003	6,92	1,92
	0,5	0,51 ± 0,01	2,64	2,72	0,53 ± 0,01	3,52	5,18
	1,0	1,01 ± 0,02	3,99	1,48	1,02 ± 0,02	3,93	1,85
Dietilaminomalomik asit	0,05	0,05 ± 0,01	1,62	-6,29	0,05 ± 0,01	4,62	-4,84
	0,3	0,29 ± 0,01	4,11	-2,33	0,30 ± 0,01	5,79	0,47
	1,0	0,99 ± 0,02	4,71	-0,52	0,99 ± 0,01	3,58	-1,02
Glikoz	0,05	0,05 ± 0,01	3,81	1,89	0,05 ± 0,01	2,59	4,44
	0,3	0,31 ± 0,01	2,49	1,97	0,29 ± 0,01	4,49	3,49
	0,8	0,79 ± 0,01	0,84	-0,76	0,76 ± 0,01	2,07	-4,66
Gliserik asit	0,05	0,05 ± 0,01	4,37	1,05	0,05 ± 0,01	3,99	-1,34
	0,3	0,31 ± 0,01	5,29	2,96	0,31 ± 0,01	4,16	1,77
	1,0	0,97 ± 0,02	4,73	-3,05	0,97 ± 0,02	4,72	-3,27
Malik asit	0,05	0,05 ± 0,01	0,65	-1,81	0,05 ± 0,01	0,57	-1,77
	0,5	0,51 ± 0,01	0,63	1,13	0,50 ± 0,01	1,09	0,47
	2,0	2,06 ± 0,05	3,93	3,19	1,98 ± 0,07	5,72	-0,98
Tirozin	0,05	0,05 ± 0,001	3,24	7,10	0,05 ± 0,001	4,68	7,86
	0,5	0,49 ± 0,007	3,42	-2,71	0,47 ± 0,01	3,53	-5,58
	5,0	4,80 ± 0,07	3,66	-3,96	4,78 ± 0,07	3,84	-4,45
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	0,05	0,05 ± 0,001	1,91	-0,38	0,05 ± 0,001	2,93	-1,07
	0,3	0,29 ± 0,007	5,73	-3,34	0,28 ± 0,004	3,91	-7,67
	1,0	1,02 ± 0,01	2,47	2,01	1,01 ± 0,02	5,12	1,00
Sitrülin	0,01	0,01 ± 0,001	5,49	-5,19	0,01 ± 0,001	5,72	2,08
	0,3	0,30 ± 0,01	4,60	-0,06	0,29 ± 0,01	5,24	-2,89
	1,0	0,99 ± 0,01	3,05	-1,15	1,03 ± 0,01	1,77	2,82
Glukuronik asit	0,1	0,11 ± 0,007	1,72	5,54	0,10 ± 0,001	1,84	4,04
	0,5	0,49 ± 0,004	1,83	-1,48	0,49 ± 0,003	1,60	-1,58
	2,0	1,98 ± 0,01	0,73	-0,94	1,97 ± 0,01	1,31	-1,54
Urasil	0,05	0,05 ± 0,001	4,18	-1,52	0,05 ± 0,001	3,79	-1,97
	0,3	0,30 ± 0,003	2,81	0,28	0,29 ± 0,004	3,47	-2,17
	0,8	0,79 ± 0,01	1,64	-0,88	0,79 ± 0,01	2,93	-1,01
Fosfokolin	0,5	0,49 ± 0,01	3,60	-2,49	0,49 ± 0,002	0,94	-1,52
	1,0	1,00 ± 0,01	3,28	-1,35	1,00 ± 0,01	2,28	-0,40
	5,0	4,97 ± 0,03	1,52	-0,63	4,93 ± 0,03	1,64	-1,45

$\bar{X} \pm SH$: Ortalama ± standart hata, ^a:BSS, Bağıl standart sapma, ^b: BH, Bağıl hata (Ek 2).

Tablo 4.6. (Devam) Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=6).

Metabolit adı	Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler arası		
		$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b	$\bar{X} \pm SH$	BSS ^a	BH ^b
o-Fosfoetanol-amin	0,1	0,10 ± 0,01	4,62	-4,49	0,10 ± 0,01	3,19	-4,55
	0,5	0,48 ± 0,01	3,42	-3,44	0,48 ± 0,01	4,03	-4,08
	1,0	1,07 ± 0,02	4,23	7,23	1,00 ± 0,03	6,41	0,26
Ksantin	0,1	0,10 ± 0,01	3,64	2,29	0,10 ± 0,01	2,78	3,86
	0,5	0,50 ± 0,01	2,32	-0,34	0,49 ± 0,01	4,60	-2,43
	1,0	0,97 ± 0,01	2,73	-2,78	0,98 ± 0,02	5,67	-2,30
2-Aminoadipik asit	0,01	0,01 ± 0,001	3,44	3,60	0,01 ± 0,001	8,31	1,27
	0,1	0,10 ± 0,003	6,03	3,02	0,11 ± 0,003	5,97	5,46
	0,8	0,78 ± 0,01	2,93	-1,93	0,77 ± 0,01	2,77	-3,22
Serin	0,01	0,01 ± 0,001	2,04	-4,24	0,01 ± 0,001	5,97	-5,49
	0,3	0,29 ± 0,003	1,21	-4,58	0,29 ± 0,001	0,47	-3,93
	0,8	0,80 ± 0,01	1,27	0,06	0,79 ± 0,01	2,46	-1,50

$\bar{X} \pm SH$: Ortalama ± standart hata, ^a:BSS, Bağıl standart sapma, ^b: BH, Bağıl hata (Ek 2).

4.2.5. Doğruluk

Doğruluk çalışmasında her bir metabolit için derişim aralığına giren üç farklı derişimdeki çözeltiler altı farklı seri hazırlanarak aynı günde (gün içi doğruluk) ve altı farklı günde (günler arası doğruluk) analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kalibrasyon eğrileri kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlara ilişkin BH değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir.

4.2.6. Geri Kazanım

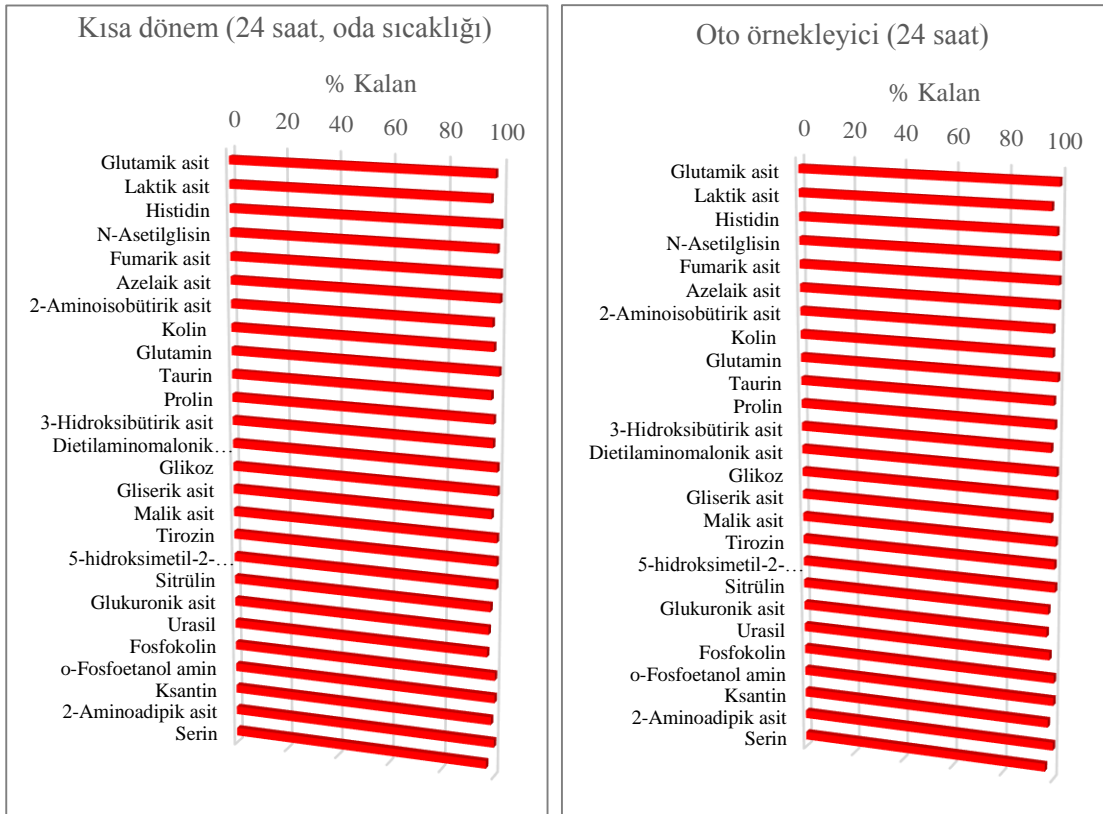
Bölüm 3.10.6'da anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen mutlak ve bağıl geri kazanım değerleri Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Metabolitlerin mutlak ve bağıl geri kazanım değerleri (n=3).

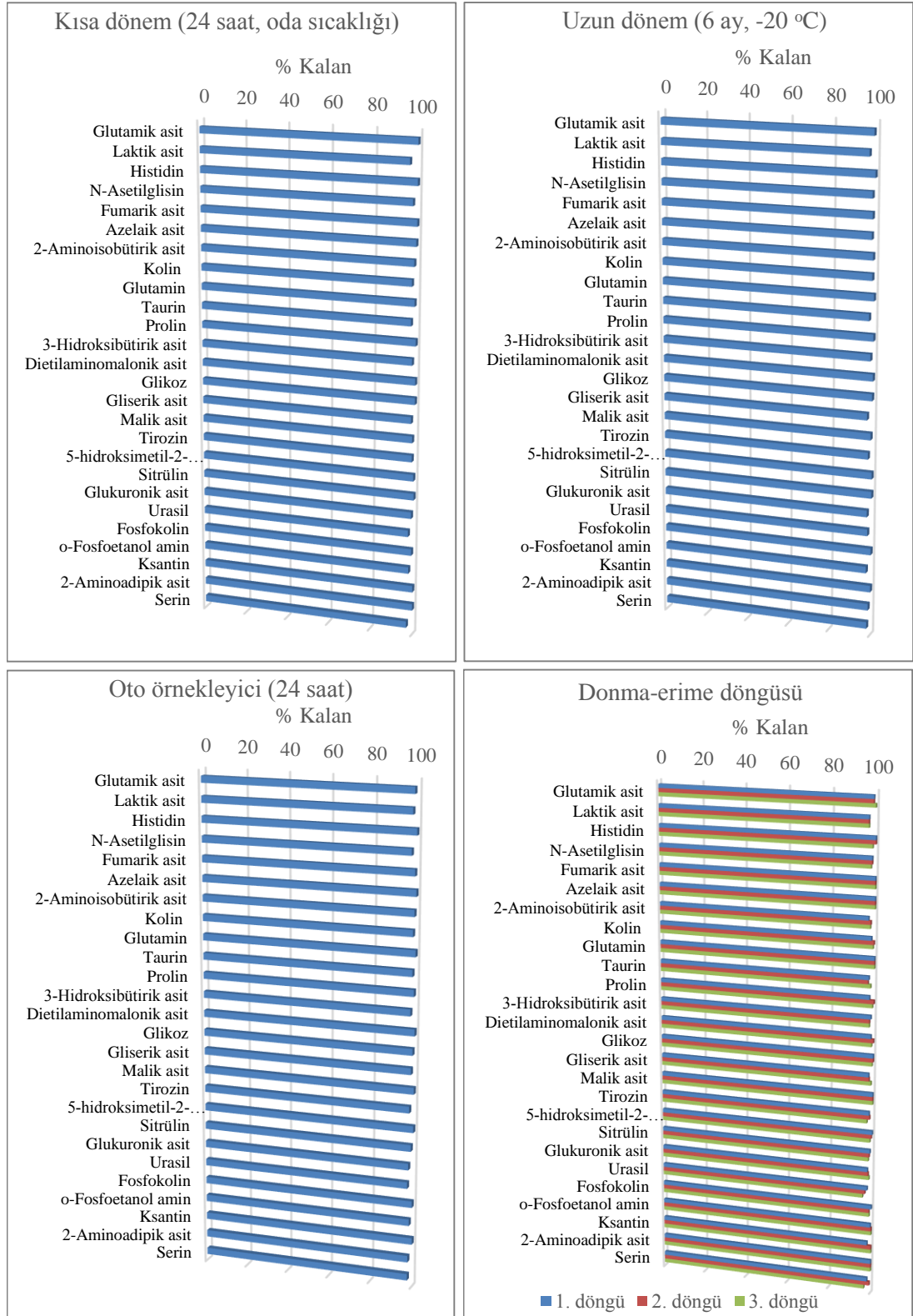
Metabolit	Mutlak Geri Kazanım (%)	Bağıl Geri Kazanım (%)
Glutamik asit	123,45	94,72
Laktik Asit	56,53	111,21
Histidin	91,15	98,44
N-Asetilglisin	71,03	104,51
Fumarik asit	65,78	113,12
Azelaik asit	56,41	92,84
2- aminoizobütirik asit	85,79	104,47
Kolin	72,23	108,86
Glutamin	75,41	92,74
Taurin	56,41	85,96
Prolin	67,12	94,38
3- hidroksibütirik asit	61,93	108,73
Dietilaminomalonic asit	67,37	93,60
Glikoz	54,52	106,26
Gliserik asit	57,36	108,87
Malik asit	82,46	106,58
Tirozin	49,52	109,51
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	62,89	95,01
Sitrülin	68,97	97,21
Glukuronik asit	74,50	60,11
Urasil	88,01	77,23
Fosfokolin	29,54	107,52
o-Fosfoetanolamin	52,75	85,39
Ksantin	68,00	87,23
2-aminoadipik asit	84,65	96,76
Serin	47,90	94,07

4.2.7. Kararlılık

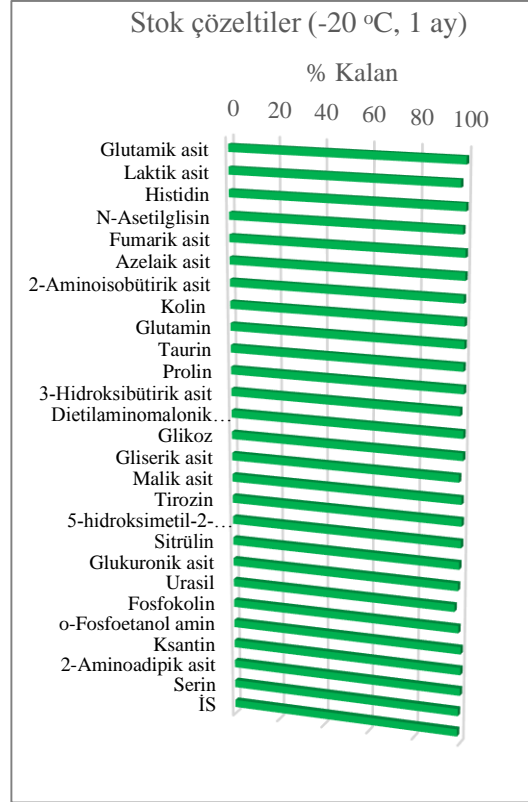
Kararlılık çalışmalarında standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ve plazma üzerine 1 µg/mL standart karışım çözeltisi eklenerek hazırlanan plazma çözeltisi oda sıcaklığında 24 saat (kısa dönem) ve oto örnekleyicide 24 saat bekletilerek; ayrıca plazma çözeltisi -20°C’de 6 ay (uzun dönem) bekletilerek ve 3 donma-erime döngüsü sonunda analiz edilerek taze hazırlanmış çözeltilerin analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilmiş, kalan analit miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.5. ve 4.6.’da verilmiştir. Stok çözeltilerin ise -20 °C’de 1 ay süresince kararlılıkları incelenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.5. Standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100].



Şekil 4.6. 1 µg/mL standart karışım çözeltisi eklenmiş plazma çözeltisi için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100].



Şekil 4.7. Stok çözeltiler için kararlılık testi sonuçları. [% Kalan= (Belirtilen süre sonunda çözeltideki metabolitin pik alanı/Taze hazırlanmış çözeltideki metabolitin pik alanı) x 100].

4.3. Sistem Uygunluk Çalışması

1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisinin on tekrarlı enjeksiyonu ile elde edilen verilere göre belirlenen her bir metabolite ait alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı Tablo 4.8.'de verilmiştir.

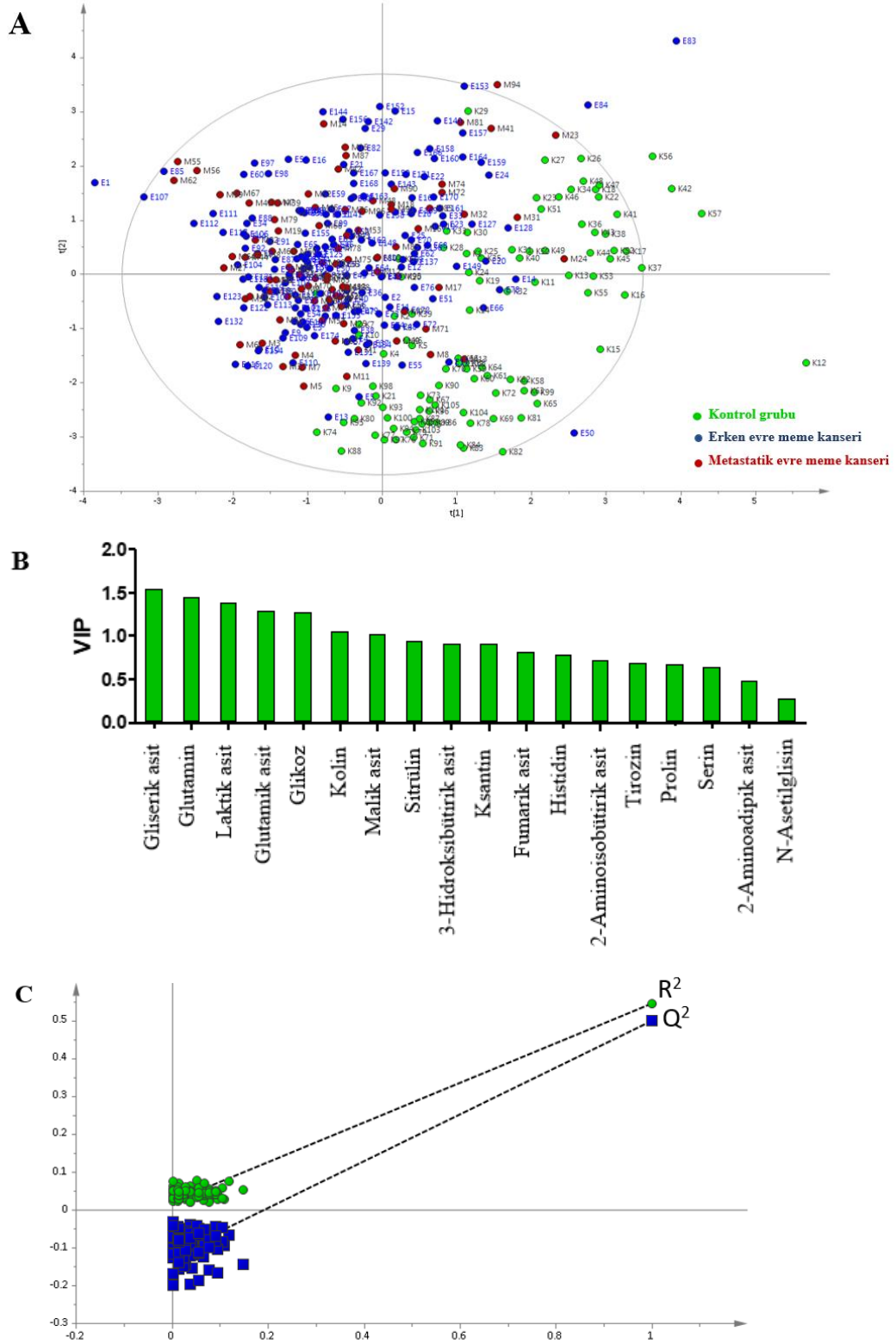
4.4. Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Kontrol grubundan ve erken evre ve metastatik meme kanseri hastalarından alınan plazma örnekleri Bölüm 3.9.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve geliştirilip valide edilmiş olan LC-MS/MS yöntemi ile Bölüm 3.8.2'de belirtilen optimum deney koşullarında analiz edilmiştir. Plazma örneklerinin analizine ilişkin örnek kromatogramlar Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Metabolitler için elde edilen sistem uygunluk parametreleri.

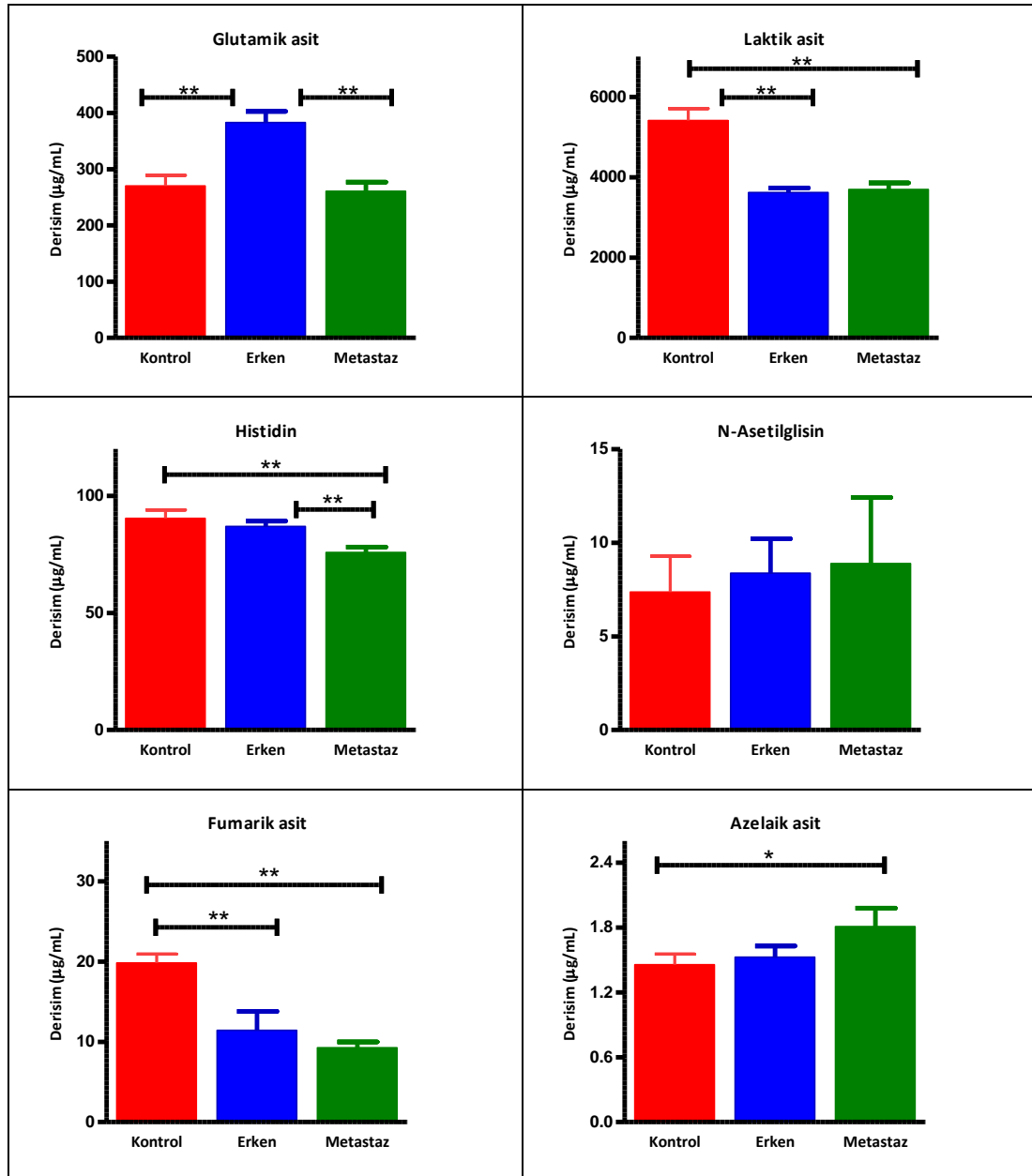
Metabolit	Alıkonma zamanı (dk)	Enjeksiyon tekrarlanabilirliği*	Kapasite faktörü (k')	Kuyruklanma faktörü	Teorik tabaka sayısı (N)
Glutamik asit	6,49	0,04	16,83	0,96	159195
Laktik asit	1,15	0,58	2,16	1,07	2643
Histidin	7,11	0,07	18,53	0,99	196130
N-Asetilglisin	1,19	0,18	2,27	1,12	3946
Fumarik asit	1,11	0,67	2,05	1,06	3467
Azelaik asit	1,02	0,75	1,80	1,12	3651
2-Aminoisobütirik asit	5,75	0,92	14,80	0,99	121778
Kolin	4,42	0,27	11,14	1,11	44749
Glutamin	6,58	0,05	17,08	0,99	149078
Taurin	6,29	0,01	16,28	1,00	257403
Prolin	6,72	0,91	17,46	1,09	100748
3-Hidroksibütirik asit	1,13	0,69	2,10	1,14	3571
Dietilaminomalonic asit	2,42	2,02	5,65	1,00	26463
Glikoz	1,21	0,49	2,32	1,12	3213
Gliserik asit	1,76	1,00	3,84	1,54	2242
Malik asit	1,70	0,86	3,67	1,57	3605
Tirozin	5,95	1,16	15,35	1,01	60226
5-hidroksimetil-2-deoksiüridin	1,83	1,18	4,03	1,53	3105
Sitrülin	6,67	0,12	17,32	1,00	248800
Glukuronik asit	6,00	0,15	15,48	1,15	67249
Urasil	1,24	1,36	2,41	1,08	3627
Fosfokolin	7,01	0,13	18,26	1,04	262717
o-Fosfoetanol amin	6,33	0,09	16,39	1,01	146685
Ksantin	1,67	2,01	3,59	1,39	2250
2-Aminoadipik asit	6,35	0,15	16,45	0,97	106830
Serin	6,61	0,21	17,16	1,00	291636

*Alıkonma zamanlarının BSS (%) değerleri verilmiştir (n=10).

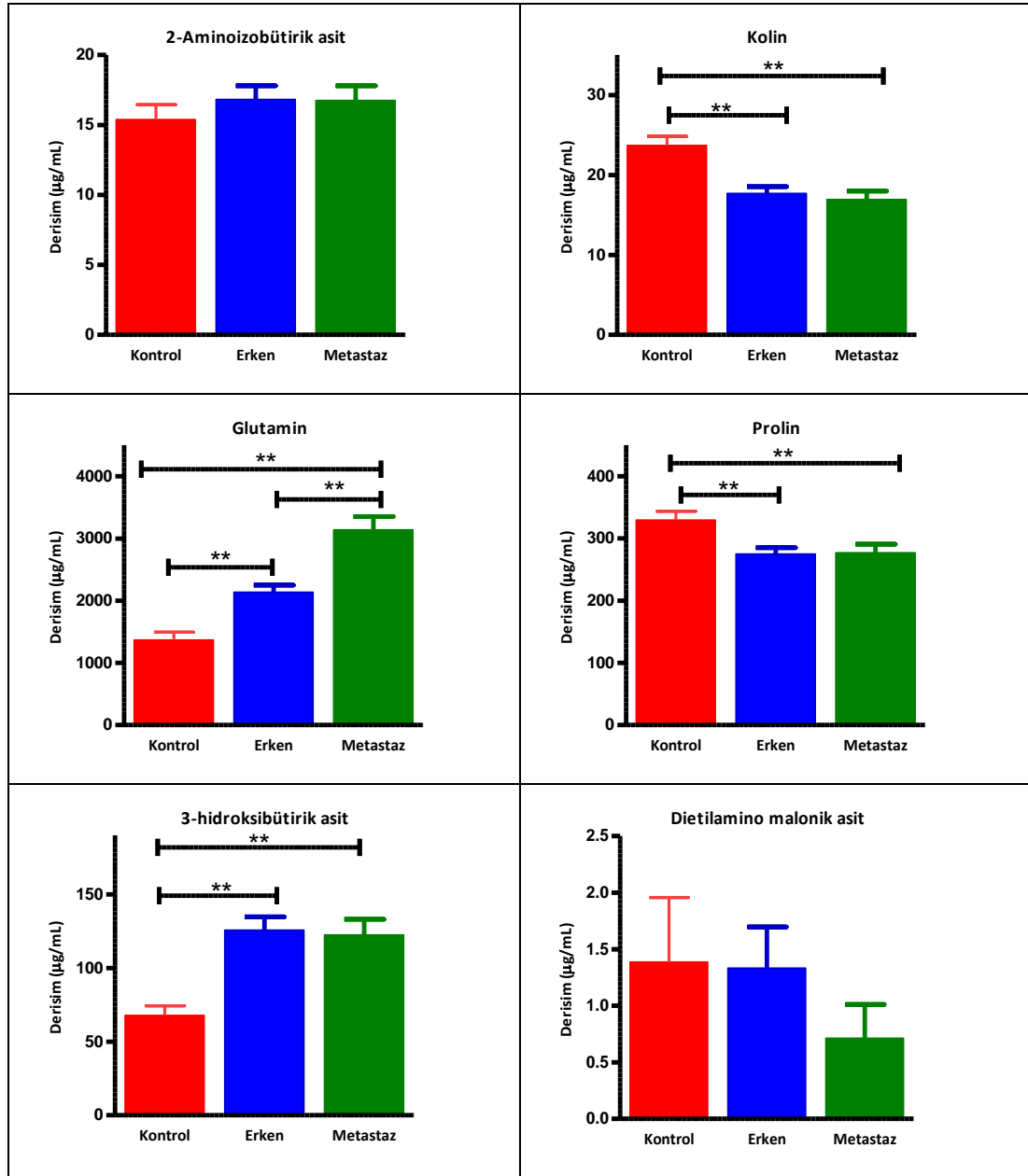


Şekil 4.9. Çok değişkenli veri analizi. A) PLS-DA skor grafiği, B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, C) Olasılık analiz grafiği (n=100) (R^2 modelin uyumluluğunu, Q^2 tahmin kapasitesini göstermektedir).

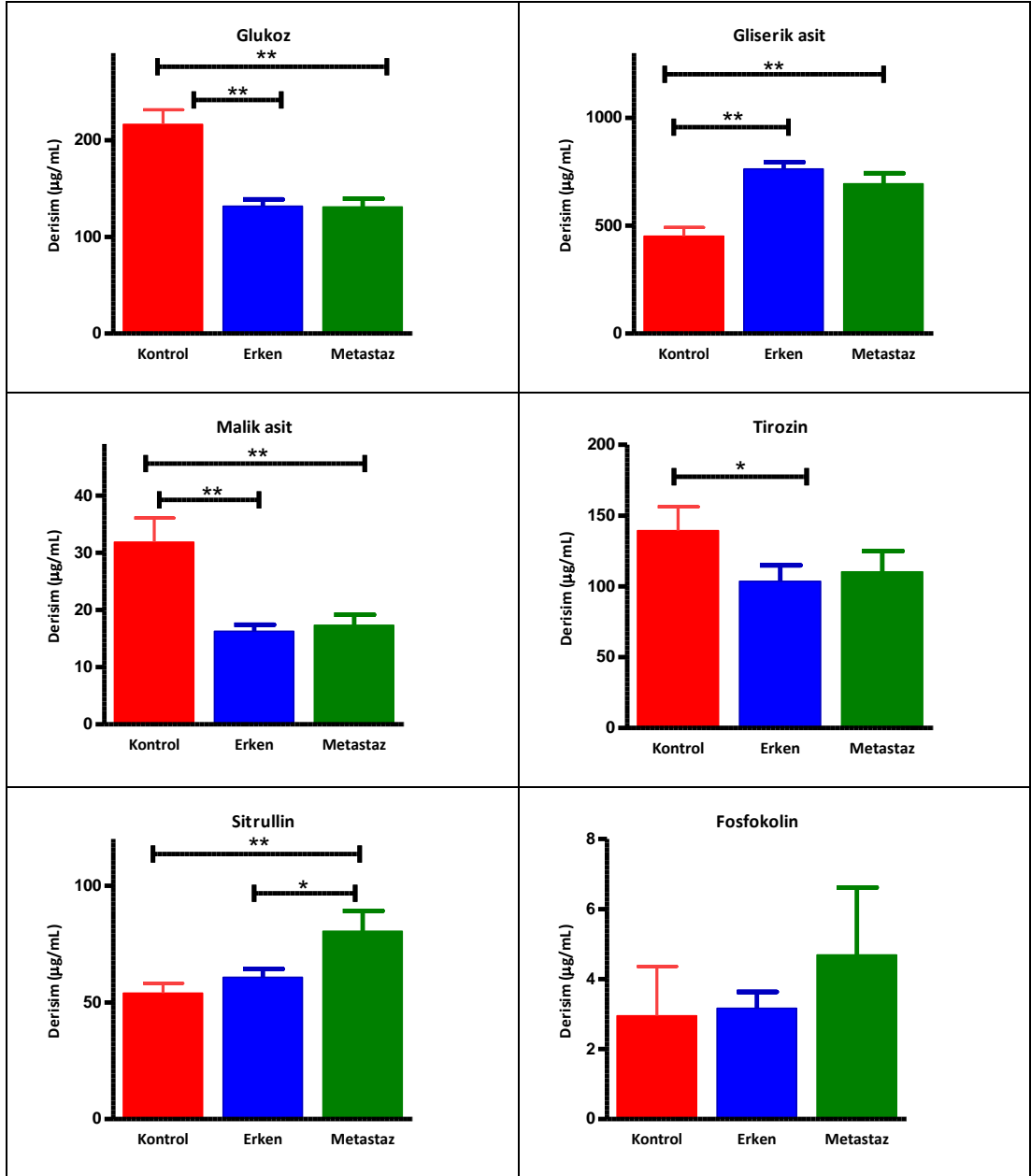
Sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubu ile erken evre ve metastatik hastalardan alınan plazma örneklerinin analizleri ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.10.'da verilmiştir.



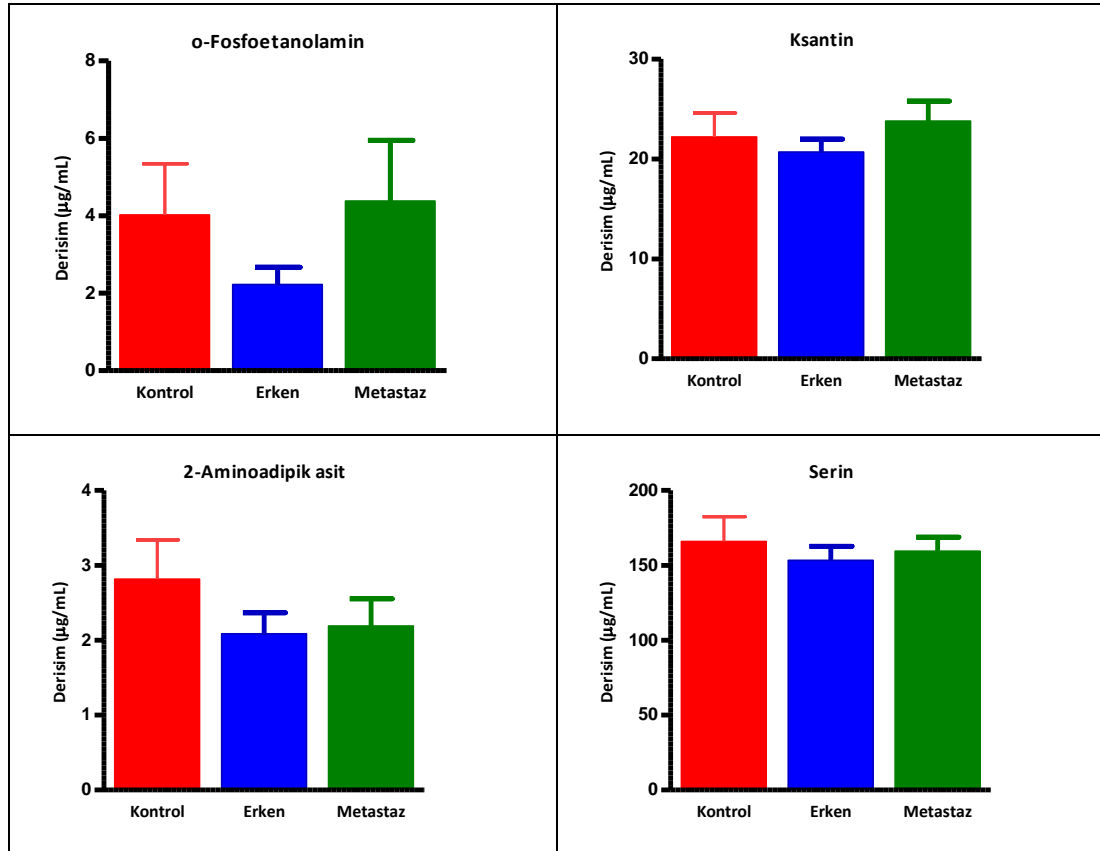
Şekil 4.10. Kontrol grubu (n=105), erken (n=172) ve metastatik (n=92) evre hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeyleri (* p<0,05 ve ** p<0,01).



Şekil 4.10. (Devam) Kontrol grubu (n=105), erken (n=172) ve metastatik (n=92) evre hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeyleri (* p<0,05 ve ** p<0,01).

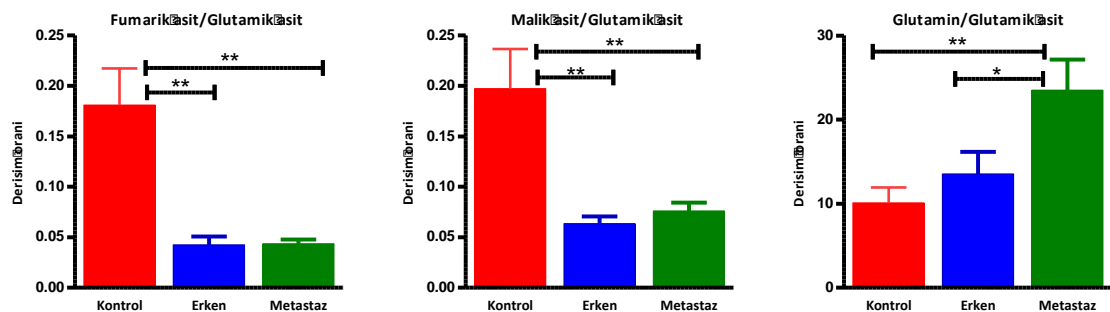


Şekil 4.10. (Devam) Kontrol grubu (n=105), erken (n=172) ve metastatik (n=92) evre hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeyleri (* p<0,05 ve ** p<0,01).



Şekil 4.10. (Devam) Kontrol grubu (n=105), erken (n=172) ve metastatik (n=92) evre hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit düzeyleri (* p<0,05 ve ** p<0,01).

Ayrıca Krebs indeksleri (fumarik asit/glutamik asit, malik asit/glutamik asit) ve amonyak fiksasyon indeksini (glutamin/glutamik asit) oluşturan metabolit oranları da Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Metabolitlere ilişkin t-testi sonuçları Tablo 4.9.'da sunulmuştur.



Şekil 4.11. Kontrol grubu, erken ve metastatik hasta gruplarına ait plazma örneklerindeki metabolit oranları.

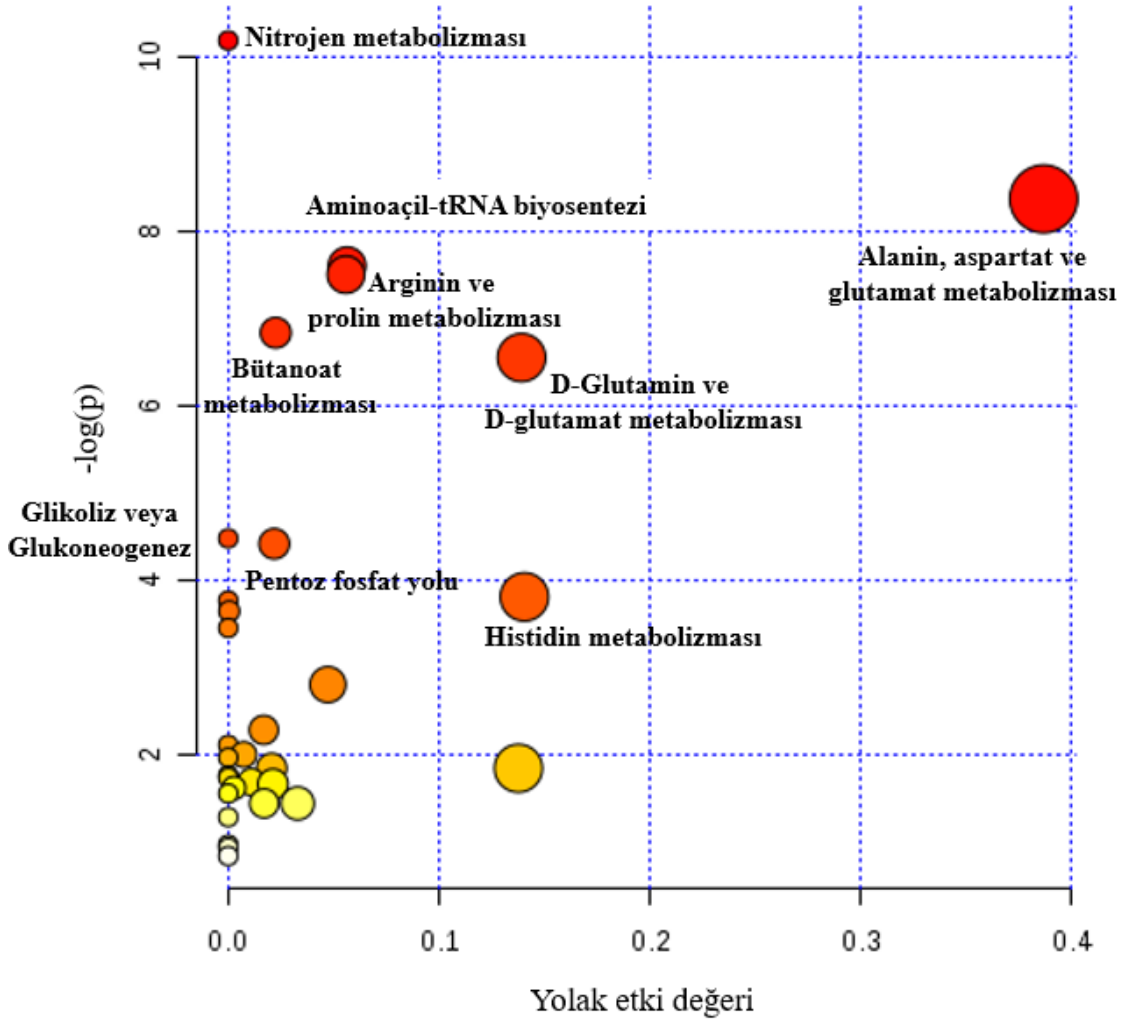
Tablo 4.9. LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen metabolitlere ilişkin t-testi sonuçları.

Metabolit adı	p değeri*		
	Kontrol-Erken	Kontrol-Metastatik	Erken-Metastatik
Glutamik asit	0,000	0,354	0,000
Laktik Asit	0,000	0,000	0,347
Histidin	0,202	0,000	0,000
N-Asetilglisin	0,351	0,352	0,449
Fumarik asit	0,001	0,000	0,060
Azelaik asit	0,311	0,040	0,082
2-Aminoizobütirik asit	0,158	0,182	0,475
Kolin	0,000	0,000	0,287
Glutamin	0,000	0,000	0,000
Prolin	0,001	0,004	0,454
3-Hidroksibütirik asit	0,000	0,000	0,409
Dietilaminomalonic asit	0,468	0,152	0,098
Glikoz	0,000	0,000	0,467
Gliserik asit	0,000	0,000	0,122
Malik asit	0,000	0,001	0,313
Tirozin	0,040	0,097	0,359
Sitrülin	0,108	0,003	0,019
Fosfokolin	0,444	0,120	0,121
o-Fosfoetanolamin	0,106	0,431	0,117
Ksantin	0,292	0,306	0,099
2-Aminoadipik asit	0,086	0,133	0,412
Serin	0,253	0,365	0,323

*: İlgili gruplar (kontrol-metastatik, kontrol-erken, erken-metastatik) arasında farklılık göstermiş olan metabolitler koyu renkte yazılmış olup $p < 0,05$ olması farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir.

4.5.1. Yolak Analizi

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile yapılan analizler sonucunda kontrol ve hasta (erken evre ve metastatik) grupları arasında anlamlı olarak değişen metabolitler (Tablo 4.9) kullanılarak MetaboAnalyst yazılımında KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanına göre yolak analizleri gerçekleştirilmiş ve meme kanseri ile değişen yolaklar Şekil 4.12. ve Tablo 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.12. Meme kanseri hastalarında değişen yolaklar.

Tablo 4.10. İstatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.

Yolak adı	Eşleşme durumu*	p değeri	Etki
Nitrojen metabolizması	4/39	$3,79 \times 10^{-5}$	0,000
Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	3/24	$2,34 \times 10^{-4}$	0,387
Aminoasıl-tRNA biyosentezi	4/75	$5,03 \times 10^{-4}$	0,056
Arginin ve prolin metabolizması	4/77	$5,56 \times 10^{-4}$	0,056
Bütanoat metabolizması	3/40	0,001	0,023
D-Glutamin ve D-glutamat metabolizması	2/11	0,001	0,139
Glikoliz veya Glukoneogenez	2/31	0,012	0,000
Pentoz fosfat yolu	2/32	0,012	0,022
Histidin metabolizması	2/44	0,022	0,140
Fenilalanin metabolizması	2/45	0,023	0,000
Glisin, serin ve treonin metabolizması	2/48	0,026	$4,7 \times 10^{-4}$
Keton cisimlerin sentezi ve yıkımı	1/6	0,032	0,000
Tirozin metabolizması	2/76	0,061	0,047

*İstatistiksel olarak farklılık gösteren metabolit sayısının yolakta bulunan toplam metabolit sayısına oranı.

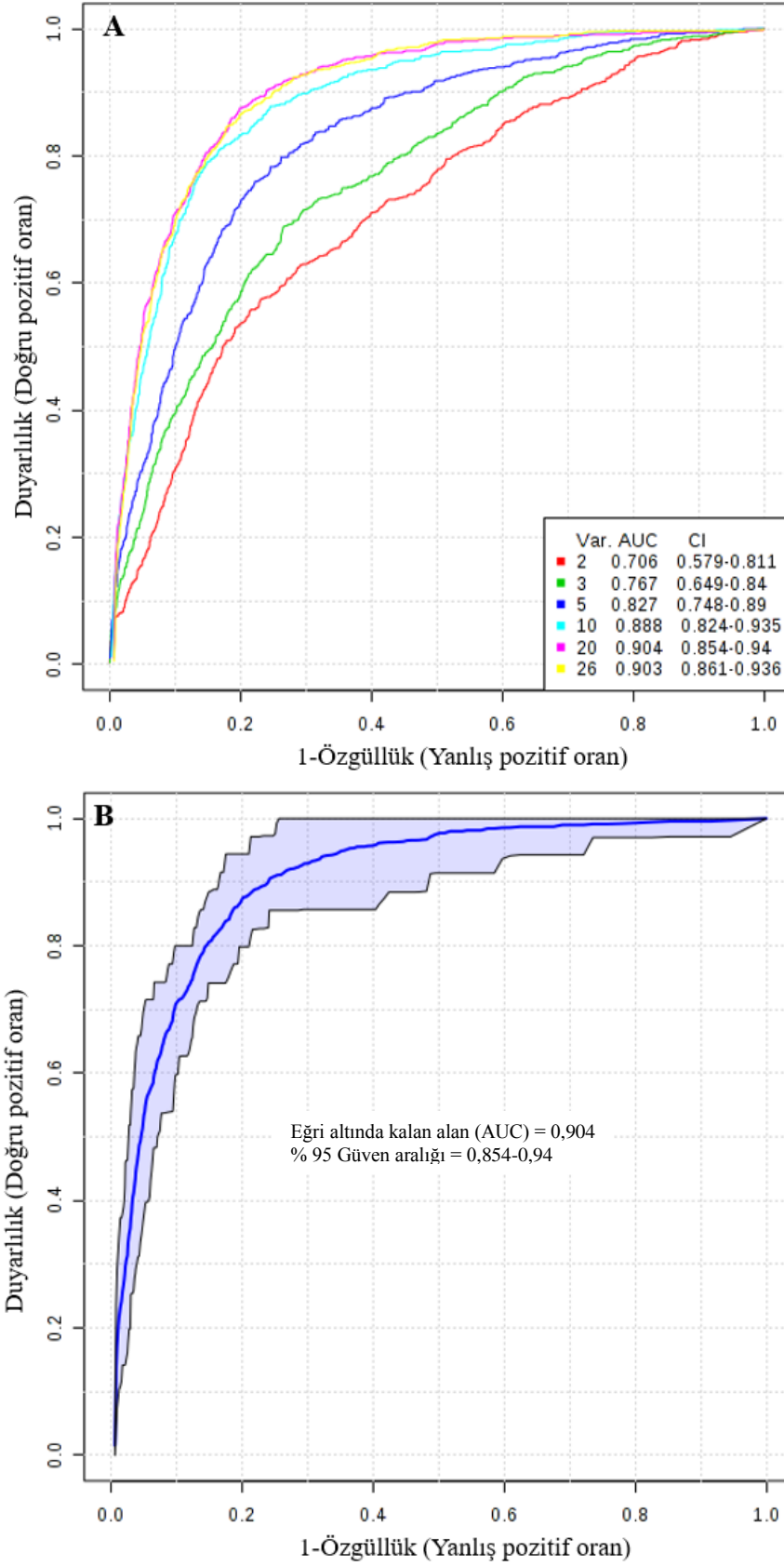
4.5.2. Biyobelirteç Analizi

Hedeflenen yirmi altı metabolitten kontrol ve hasta plazma örneklerinde bulunan metabolit derişimleri (yirmi üç adet) ile Krebs indeksi (fumarik asit/glutamik asit, malik asit/glutamik asit) ve amonyak fiksasyon indeksi (glutamin/glutamik asit) olan metabolit oran değerleri MetaboAnalyst yazılımına yüklenerek biyobelirteç analizleri gerçekleştirilmiş, elde edilen verilerle yanlış ve doğru pozitif oran hesaplamaları yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrileri bir rastgele örnekleme yöntemi olan Monte-Carlo çapraz validasyonu (MCCV) tarafından dengeli alt örnekleme kullanılarak oluşturulmuştur. Her bir MCCV'de, metabolitlerin önemini değerlendirmek için örneklerin üçte ikisi (2/3) kullanılmış ve en önemli yirmi metabolit daha sonra dışarıda kalan örneklerin 1/3'ünde valide edilen sınıflandırma modelleri oluşturmak için seçilmiştir. Çalışmamızda sınıflandırma yöntemi olarak doğrusal destekli vektör makineleri (SVM) kullanılmıştır. Yapılan MCCV çalışmalarındaki analizler sonucunda tüm analiz modelleri incelenmiş (Şekil 4.13.A.), en doğru tahmin gücüne (en yüksek AUC

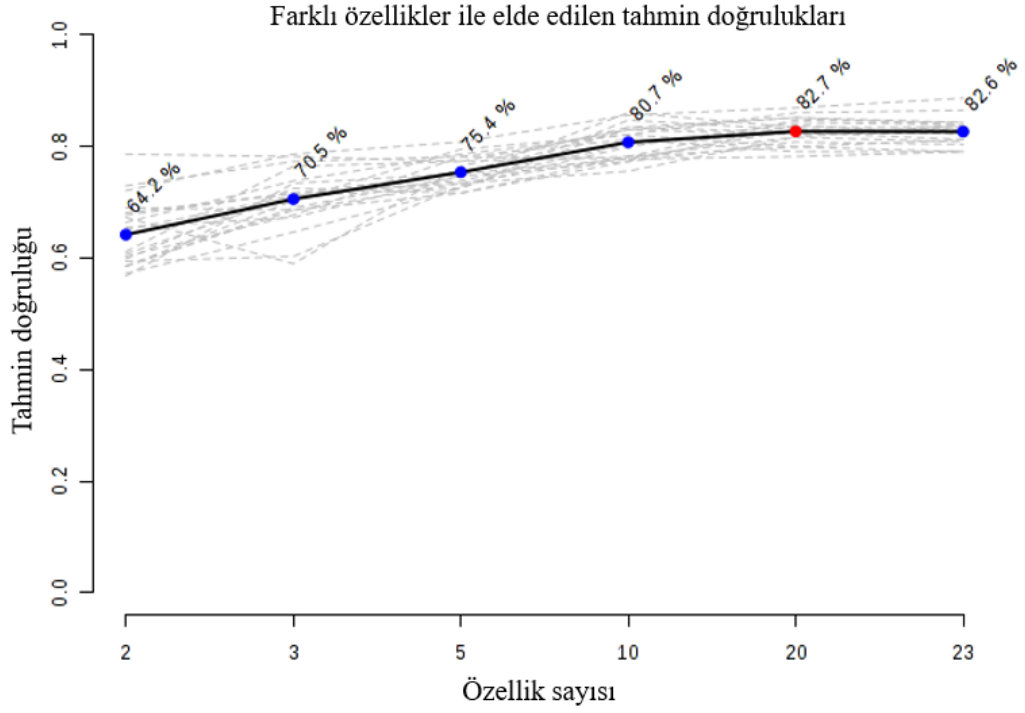
değerine) sahip doğrusal SVM modelinin 20 metabolitin kullanıldığı biyobelirteç modeli olduğu saptanmış (AUC: 0,904) ve bu modele ait % 95 güven seviyesindeki ROC eğrisi Şekil 4.13.B.'de sunulmuştur.

Ayrıca artan biyobelirteç sayısına göre doğrusal SVM modelinin tahmin doğruluk grafiği ile farklı sayıda metabolitler ile oluşturulan biyobelirteç modellerinin grupların belirlenmesindeki tahmin oranları incelenmiştir. En doğru biyobelirteç modelinin % 82,7'lik tahmin doğruluk değeri ile yirmi metabolitin kullanıldığı model olduğu görülmüş (Şekil 4.14.) ve metabolitlerin önem sırasını gösteren grafik (Şekil 4.15.) çizilmiştir.

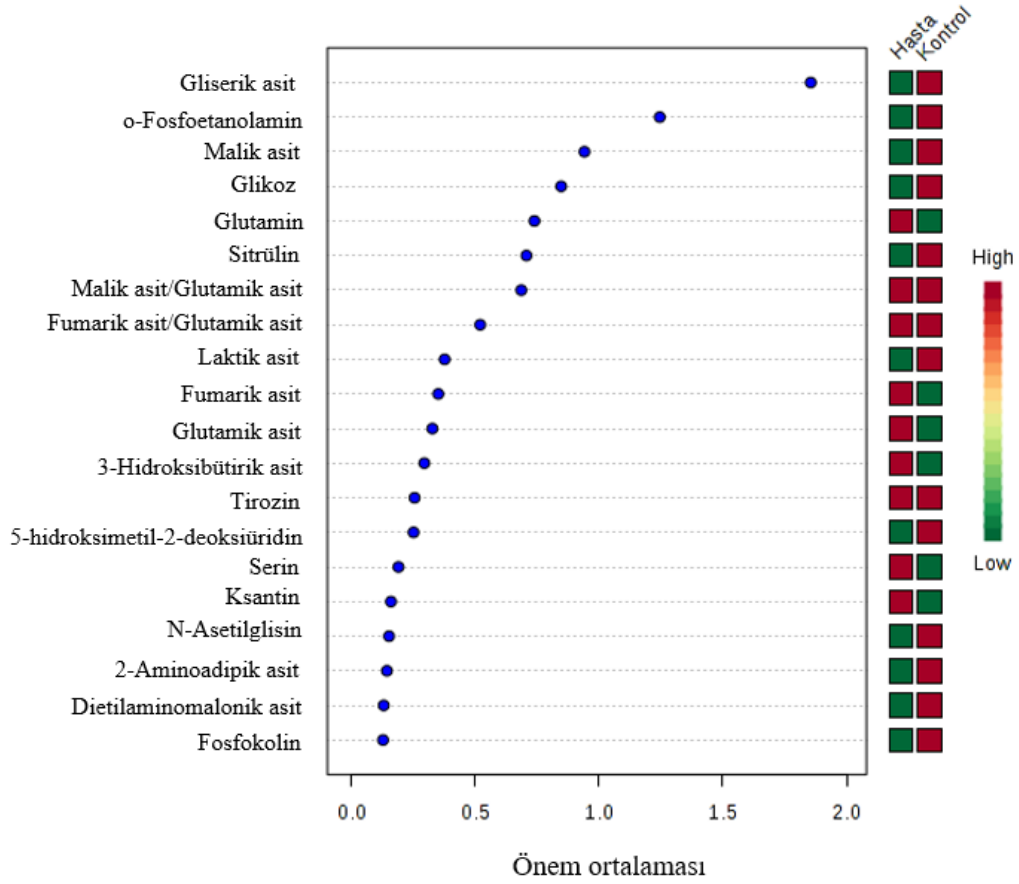
Belirlenen doğrusal SVM modeli kullanılarak tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçları (yanlış grup sınıflandırma analizi) öngörülen sınıf olasılıkları grafiği ile görselleştirilmiş (Şekil 4.16.) ve çapraz validasyon analiz sonuçları Tablo 4.11.'de sunulmuştur.



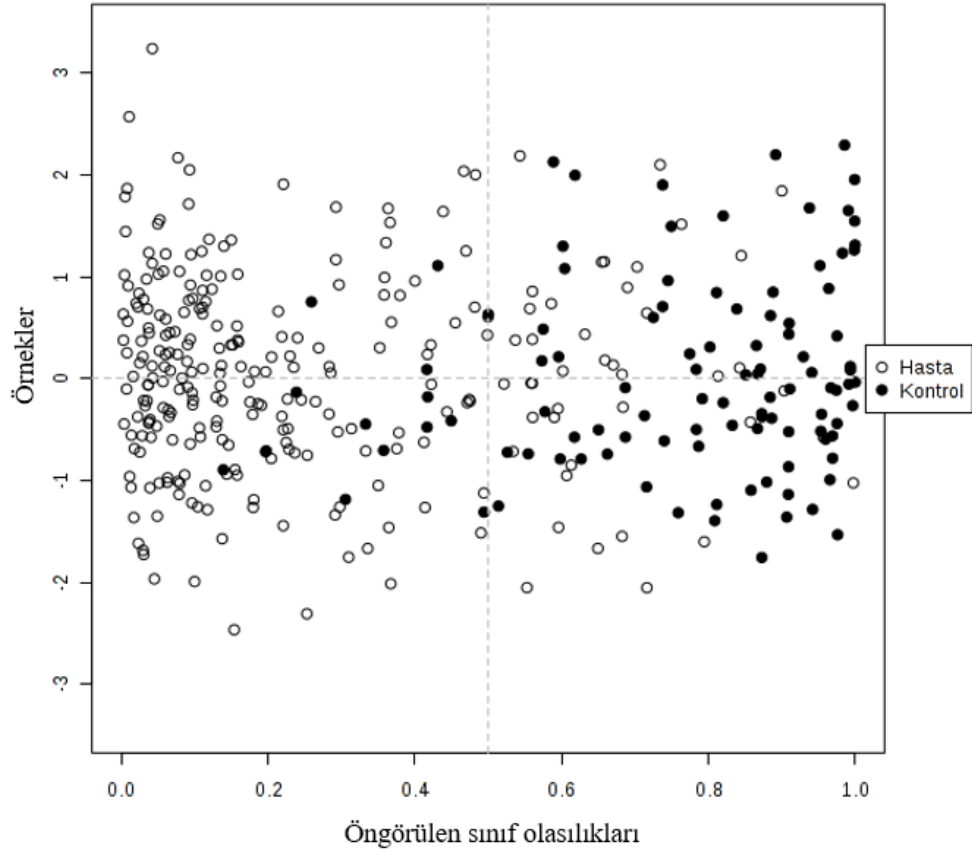
Şekil 4.13. A) ROC eğrileri grafiği, B) En yüksek tahmin gücüne sahip biyobelirteç modelinin % 95 güven seviyesindeki ROC eğrisi.



Şekil 4.14. Artan biyobelirteç sayısı ile doğrusal SVM modelinin tahmin doğruluğu (Kırmızı nokta: en doğru biyobelirteç modeli sayısı).



Şekil 4.15. Biyobelirteçlerin doğrusal SVM modelindeki önem derecesi.



Şekil 4.16. Öngörülen sınıf olasılıkları.

Tablo 4.11. Doğrusal SVM modeli kullanılarak tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçları (yanlış grup sınıflandırma analizi).

	Numune sayısı	Doğru	Hasta grubu	Kontrol
Kontrol	105	% 86,67	14	91
Hasta (Erken ve metastatik evre)	264	% 84,09	222	42

5. TARTIŞMA

Ciddi bir sağlık problemi olan kanser tüm Dünya’da giderek artmakta olup bireyler için maddi ve manevi kayıp ve zorluklara neden olması yanı sıra toplum açısından da önemli bir sosyoekonomik yük oluşturmaktadır. Kanserli hücreler sağlıklı hücrelere kıyasla hücre metabolizmasında önemli farklılıklar göstermektedir. Kanserlin erken dönemde tespiti için etkili tarama yöntemlerinin geliştirilmesi modern kanser araştırmalarında karşılaşılan en büyük zorluklardan biridir. Hücre, doku, kan veya idrardaki metabolit düzeylerinin belirlenerek metabolizmanın sistematik olarak değerlendirildiği metabolomik çalışmalar özellikle kanser hastalığının erken evrede tespit edilebilmesi için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser tanısı ile ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesi, hastalığın takibi ve bireysel tedavi stratejilerinin oluşturulmasında metabolomik çalışmaların etkinliğini göstermektedir (150).

Bu tez çalışmasında, meme kanserinin erken tanısında kullanılmak üzere yirmi altı metabolitin aynı anda analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem erken evre ve metastatik meme kanseri hastalarından ve sağlıklı gönüllülerden alınan plazma örneklerine uygulanmış ve belirlenen biyobelirteç adaylarının hastalık teşhisindeki etkinliği incelenmiştir.

Çalışmada kullanılacak metabolitler seçilirken meme kanseri için plazmada ve tümör dokusunda yapılan hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca farklı analitik sistemler kullanılarak belirlenen bu metabolitlerin LC-MS/MS ile analizlerinde herhangi bir problem yaşanmaması için kaynak araştırması yapılmış olup her bir metabolitin LC-MS sistemi ile analizlerine ilişkin örnek kaynaklar ve hedeflenen metabolitler Tablo 2.2.’de listelenmiştir.

MS/MS Yönteminin Optimizasyonu

Çalışmamızda hedeflenen metabolitlerin aynı anda analizleri için MRM modunda çalışan bir MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. MRM, karmaşık bir karışımdaki belirli moleküllerin tespit edilmesine ve ölçülmesine olanak sağlayan hedeflenmiş kütle spektrometrisi tekniğidir.

MS sisteminin optimize edilmesi amacıyla 1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisi analiz edilmiş, her bir metabolit için moleköl yapıları ve Human Metabolite Data Base sisteminde triple kuadrapol için verilen koşullar dikkate alınarak pozitif ve negatif iyonizasyon modlarında denemeler yapılmış, her bir metabolite ait iyonizasyon modu, öncü ve fragment iyonlar, çarpışma enerjileri, kuadrapol voltajları (Q1, Q3) ve bekleme süreleri belirlenmiştir (Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.).

MS/MS analizlerinde iki veya daha fazla bileşik aynı fragment iyon ve alıkonma zamanına sahip ve örnek içerisinde yüksek derişimlerde bulunuyor ise “Cross-talk” etkisi meydana gelebilmektedir. Genellikle bu etki art arda gelen MRM geçişleri arasındaki bekleme süresi uzun olduğunda belirgin şekilde görülmektedir. Sonraki MRM geçişi ölçülmeye başlandığında çarpışma hücresinde önceki ölçümden kalan iyonlar “cross-talk” etkisi ile hatalı bir sonuca neden olabilir. Bu nedenle MS/MS analizlerinde yüksek hassasiyet ve doğrulukta sonuçlar elde edebilmek için “cross-talk” etkisini çarpışma enerjileri ve bekleme sürelerinin optimizasyonu ile ortadan kaldırmak gerekmektedir (151). Bu amaçla ilk olarak LC-MS/MS sisteminde bulunan LabSolutions yazılımı yardımı ile metabolitlere ait optimum çarpışma enerjileri ile Q1 ve Q3 voltajları belirlenmiştir.

Bekleme süresinin optimizasyonu farklı bekleme sürelerinde (50, 70, 100 ve 200 ms) analizler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bekleme süresi her bir döngü sırasında belirli bir MRM geçişi elde etmek için harcanan zaman olup ölçüm hassasiyetini etkileyebilmektedir. Teorik olarak, sinyal/gürültü oranının bekleme süresinin karekökü ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir. Bekleme süresinin arttırılması, sinyal daha uzun bir süre ölçüldüğünden dedektör iyon sayımını, yani hassasiyeti arttırır. Ancak ölçülen iyon geçişi çok sayıda ise uzun bekleme süreleri iyon kayıplarına sebep olabilir. Genellikle nitel analizlerde >10 ms bekleme sürelerinin uygulanması önerilmekte olup bu değerler cihaz performansına, analiz edilen bileşiklerin sayısına ve derişimlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen yöntem ile yirmi altı metabolitin aynı anda analizi amaçlandığından bekleme süresinin aynı anda çok sayıda iyon geçişini gerçekleştirebilmek için mümkün olduğunca kısa olması gerekmektedir. Bu nedenle yapılan analizler sonucunda her bir metabolite ait pik sinyalleri incelenerek optimum bekleme süreleri belirlenmiştir. Pozitif iyonizasyon modunda analiz edilen metabolitlerin genellikle yüksek pik sinyallerine sahip olduğu

görülmüş ve sinyal/gürültü değerlerinin 50 ms'lik bekleme süresinde amaçlanan analiz için uygun hassasiyette olduğuna karar verilmiştir. Negatif iyonizasyon modundaki metabolitlerin pik sinyalleri ise genellikle düşük olduğundan pozitif moda göre daha yüksek bir bekleme süresine ihtiyaç duyulmuş ve negatif mod için 70 ms'lik bekleme süresi ile yeterli hassasiyet sağlanmıştır. Ancak gliserik asidin düşük pik sinyaline sahip olması nedeniyle bekleme süresi 200 ms olarak belirlenmiştir.

Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu

Bütün metabolitlerin aynı anda analizine olanak sağlayan kromatografik koşulların optimize edilebilmesi için farklı özellikte analitik kolonlar, hareketli faz bileşimleri ve elüsyon programları denenmiştir (Tablo 3.1.).

Kromatografik ayırimda kullanılacak sabit fazın belirlenmesi amacıyla ilk olarak apolar özellikte ters faz C18 (Inertsil ODS-4, 3 µm 2,1x50 mm) kolon ile standart karışım çözeltisi analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar incelendiğinde metabolitlerin C18 sabit faz ile etkileşime girmeyip hareketli faz ile elüe oldukları dolayısıyla kolonda tutunmadıkları görülmüştür. Hedeflenen metabolitlerin molekül yapıları ve logP değerleri incelendiğinde oldukça polar özellikte olan apolar sabit faz ile etkileşmemiş olmaları beklenen bir sonuçtur. Çünkü C18 gibi ters faz kolonlar yarı polar metabolitlerin ve lipidlerin; hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisinde kullanılan HILIC kolon ise polar metabolitlerin ayrılması için uygun bir sabit fazdır. HILIC kolonlar C18 kolonun polar bileşikleri ayıramadığı durumlarda genellikle iyi bir alternatiftir. Bu nedenle daha polar sabit faza sahip HILIC kolonlar ve NH₂ kolon ile optimizasyon çalışmasına devam edilmiştir.

Metabolitler farklı polarite ve partikül çapına sahip dört farklı polar kolon [MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm), Zorbax HILIC Plus (3,5 µm, 4,6x100 mm), Waters HILIC (1,7 µm, 2,1x150mm) ve Phenomenex Luna NH₂ (3µm, 2x100 mm)] kullanılarak analiz edilmiştir. Bu kolonlar arasında diğerlerine kıyasla en iyi ayırımın ve pik şekillerinin elde edildiği polimer temelli zwitter iyonik yapıdaki sabit faz olan MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x150 mm) optimizasyon çalışmasında kullanılacak analitik kolon olarak belirlenmiştir.

LC-MS sistemlerinde kullanılan hareketli fazın bileşimi moleküllerin iyonlaşma verimi üzerinde oldukça etkili olup yüksek bir iyonlaşma ve yeterli kromatografik ayırım sağlamak için organik hareketli faz olarak asetonitril veya metanol kullanılmaktadır. Çalışmamızda metabolitlerin ayırımı ve alıkonma zamanları üzerinde etkili olduğu bilinen hareketli faz bileşimindeki organik çözücü tipini belirlemek amacıyla metanol ve asetonitril çözücüleri denenmiştir. Asetonitril kullanıldığında metanole kıyasla daha fazla sayıda metabolit pikinin elde edilebildiği görülmüş olup organik çözücü olarak asetonitrilin kullanılmasına karar verilmiştir.

Ayrıca hareketli faz bileşimine uçucu asitler (formik asit ve asetik asit) veya amonyum format ve amonyum asetat gibi hareketli faz değiştiriciler eklenerek daha verimli bir iyonizasyon, yüksek tekrarlanabilirlik ve simetrik pikler elde edilebilir. Optimum hareketli faz bileşimini belirleyebilmek için organik faz olarak asetonitril ile hareketli faz değiştirici olarak % 0,1 formik asit ve 5 mM amonyum asetat (pH=9) denenmiştir. Amonyum asetat kullanılarak yapılan analizlerde formik asitten farklı olarak laktik asit, dietilaminomalonic asit, gliserik asit, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin ve fosfokolin metabolitlerine ait piklerin görülmediği ve diğer metabolitlere ait piklerin ise şekil açısından uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle en iyi ayırımın % 0,1 formik asit içeren su ve % 0,1 formik asit içeren asetonitril karışımından oluşan hareketli faz ile sağlandığı görülmüştür. Hareketli faz derişimi ESI'da oluşabilecek iyon baskılanmasını önlemek amacıyla düşük seviyede tutulmuştur (152, 153).

Analiz edilmesi planlanan örnek sayısının fazlalığı düşünüldüğünde kısa analiz süresine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle toplam analiz süresini optimize etmek amacıyla farklı uzunlukta analitik kolonlar [(MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x100 mm) ve MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x50 mm)] ve çeşitli gradient elüsyon profilleri denenmiştir. HILIC kolon yüzeyinde bulunan su tabakasından dolayı kolonun hareketli faz ile şartlanması zaman alacağından sabit fazın hidrasyonunu sağlamak için gradient analizler % 5 ila % 95 sulu faz oranında gerçekleştirilmelidir (56). Bu nedenle HILIC kolonun şartlanmasına olanak sağlayacak şekilde farklı gradient profilleri oluşturulmuştur. Optimizasyon çalışması boyunca kullanılan gradient genellikle yüksek organik çözücü oranlarında (% 80-90) başlatılmış olup bu oran gradient boyunca doğrusal olarak azaltılmıştır. Analiz yüksek oranda sulu faz kullanılarak tamamlanmış (% 80-90) ve bir sonraki analizde ihtiyaç duyulan

şartlanmayı sağlayabilmek için hareketli faz bileşimi tekrar yüksek organik faz seviyesine getirilmiştir.

Tablo 3.1.'de belirtilen yöntemlerin sistematik olarak uygulanması sonrasında elde edilen kromatogramlar metabolitlerin aynı anda ilgili yöntem ile analiz edilip edilememesi ve pik şekilleri açısından değerlendirilmiştir (Tablo 4.2.). İlk yedi yönteme ait deney koşullarında bazı metabolit piklerine rastlanmamış olup elde edilmiş olan metabolit piklerinin çoğunun ise analiz için uygun olmadığı görülmüştür. Yöntem 8'de fumarik asit ve urasil metabolitlerine ait piklerde kuyruklanma gözlenmiş olsa da diğer metabolit pikleri analiz için uygun bulunmuştur. Ancak Yöntem 9'da analiz süresini kısaltmak amacı ile daha kısa bir analitik kolon [MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 4,6x50 mm)] ve farklı bir gradient programı uygulandığında bütün metabolitlerin aynı anda simetrik pikler elde edilerek 12 dk'lık bir sürede analiz edilebildiği görülmüştür.

Sonuçta optimum kromatografik analiz koşulları MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 50x4,6 mm) kolon, % 0,1 formik asit içeren su (A): % 0,1 formik asit içeren asetonitril (B) (1:1, h/h) karışımından oluşan hareketli faz sistemi, 0,3 mL/dk akış hızı ve 40°C kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Seçilen gradient elüsyon profilinde B fazının yüzdesi 0 ila 3 dk arasında % 90 oranında tutulmuş; 3. dk'dan 6. dk'ya kadar doğrusal olarak % 20'ye düşürülmüştür; 6. dk'dan 8. dk'ya kadar B yüzdesi % 5'e düşürülmüş ve son olarak 8. dk'dan 12. dk'ya kadar % 90'a yükseltilmiştir. Bu koşullarda yirmi altı metabolitin LC-MS/MS ile analizine ait kromatogramlar Şekil 4.2.'de verilmiştir.

LC-MS sistemlerinde karmaşık bir matriksteki bir metabolitin ekstraksiyonu ve analizi sırasında geri kazanım, matriks etkileri ve iyonlaşmadaki değişkenliği düzeltmek amacıyla İS olarak kararlı izotop işaretli standartların kullanımı oldukça yaygındır (154). Bu tez çalışması kapsamında kararlı izotop işaretli ¹³C₆ fenilalanin İS olarak kullanılmış ve optimum analiz koşullarında alıkonma zamanı 3,92 ± 0,04 olarak bulunmuştur.

Numune Hazırlama Basamağının Optimizasyonu

Numune hazırlama basamağında metabolitlerin plazma ortamından geri kazanımı için protein çöktürme işlemi uygulanmış ve farklı bileşenlerin (ekstraksiyon çözücüsünün tipi, seyreltme ve uçurma) etkisi araştırılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak perklorik asit-potasyum bikarbonat karışımı veya trikloroasetik asit kullanıldığı örneklerde, bazı metabolitlerin pik alanlarının belirgin şekilde azalmış olduğu; tirozin, 2-aminoizobütirik asit, prolin ve gliserik aside ait piklerin ise kaybolduğu gözlemlenmiştir. Çözücü olarak asetonyitril ve metanol kullanıldığında ise glutamik asit, histidin, trozin, prolin ve glutamin metabolitlerine ilişkin çok yüksek sinyaller ölçülmüştür. Bunun nedeninin söz konusu metabolitlerin plazmada yüksek derişimlerde bulunması olduğu sonucuna varılmıştır. Standart ekleme tekniği ile yapılan geri kazanım çalışmalarında bu metabolitler için cihaz sinyalinde aşırı doygunluğa ulaşılmış olması nedeni ile geri kazanım oranları hesaplanamamıştır. Bu durum örneklerin 1/2 oranında seyreltilerek analizlerinin yapılması ile ortadan kaldırılmıştır.

Örneklerin analize hazırlanması sırasında yapılan uçurma işlemi belirli bir sıcaklıkta, vakum veya inert bir gaz yardımı ile çözücü moleküllerinin numune ortamından uzaklaştırılması sonucu gerçekleştirilir. Metabolomik analizlerde uçurma işlemi genellikle 3 ana amaçla uygulanmaktadır:

1. Örnek içerisinde bulunan metabolitler düşük derişimde olduğunda ya da ekstraksiyon veya protein çöktürme işlemi sırasında kullanılan çözücüler nedeniyle seyreilmeye uğradığında analizin hassasiyetini artırmak için ihtiyaç duyulan ön derişirme işleminde,
2. LC-MS enjeksiyonu ile iyi bir uyumluluk sağlamak için çözücü bileşiminin değiştirilmesi gerektiği durumlarda,
3. Örneklerin analiz öncesinde uzun süreler saklanabilmesi için kararlılığının artırılmasında.

Bununla birlikte, uçurma işlemi nispeten zaman alıcıdır ve aynı anda deriştirilebilen örneklerin sayısı sınırlıdır. Ek olarak birçok metabolit matriksteki çözücünün buharlaşması için gereken sıcaklıklarda kararlı olmayabilir (155, 156).

Numune hazırlama basamağında uçurma işleminin gerekli olup olmadığını belirlemek amacıyla plazma örnekleri asetonitril kullanılarak matris bileşenlerinden uzaklaştırıldıktan sonra ortamdaki çözücü vakumlu santrifüj cihazında +4°C sıcaklıkta vakum yardımıyla kuruluğa kadar uçurulmuş ve hareketli faz karışımı ile çözüldürülerek LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Uçurma işlemi uygulanan örneklerde bazı metabolitlerin pik şekillerinde bozulmalar olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca uçurma işlemi uygulanarak hazırlanan örnekler ile uçurmadan hazırlanan örnekler arasında geri kazanım değerleri açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Bu nedenle numune hazırlama sırasında uçurma işleminin uygulanmamasına karar verilmiştir.

Sonuçta mutlak geri kazanım çalışmalarında ekstraksiyon çözücü olarak asetonitril kullanılarak uçurmadan hazırlanan örneklerde daha yüksek geri kazanım değerleri (Tablo 4.3.) ve daha simetrik pik şekilleri elde edilmiştir.

Yöntem Validasyonu

LC-MS/MS yöntemi seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk ve geri kazanım validasyon parametreleri incelenerek valide edilmiştir.

Seçicilik standart ve plazma çözeltilerinin geliştirilen yöntem ile analizlerine ait kromatogramların incelenmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2.). Metabolitlerin özgün alıkonma zamanında yalnızca tek bir pik gözlenmesi, bir metabolite ait pikin başka bir metabolitin m/z değerinde görülmemesi ve hareketli faz çözeltilisinin çalışılan MRM koşullarında herhangi bir girişim yapmamış olması yöntemin seçici olduğunu göstermektedir.

Doğrusallık çalışmaları sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.3.'de, kalibrasyon eğrilerine ait bilgiler ve ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Her bir metabolitin doğrusal olduğu çalışma aralığında korelasyon katsayısı değerlerinin 0,991-0,999 arasında bulunmuş olması yöntemin doğrusallığını göstermektedir. Doğrusallıktan ayrılışın önemsiz ($p > 0,05$) ve korelasyon katsayısının önemli bir değer olduğu ($F_H > F_T$) istatistiksel olarak bulunmuştur. Ayrıca yöntem doğrusallığı kontrol grafikleri (Şekil 4.4.) oluşturulmuş ve elde edilen kalibrasyon

eğrilerinin eğimlerinin bire yakın çıkması ve korelasyon katsayılarının 0,993-1,000 aralığında olması geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir.

Metabolitlere ait gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ) sinyal/gürültü oranının sırasıyla 3 ve 10 olduğu derişim değerleri olarak seçilmiştir. Metabolitlerin LOD ve LLOQ değerleri sırasıyla $5,9 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$ ve $1,8 \times 10^{-4}$ - $5,3 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$ aralığında bulunmuştur (Tablo 4.5). Düşük LOD ve LLOQ değerleri yöntemin analiz için yeterli hassasiyette olduğunu göstermektedir.

Enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için, 1 $\mu\text{g/mL}$ standart karışım çözeltisinden on tekrarlı enjeksiyon yapılmış ve alıkonma zamanı için BSS'nin % 2,02'nin altında (Tablo 4.8.) bulunması enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin göstergesidir.

Üç farklı derişimde yapılan gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları sonucunda BSS değerlerinin % 9,63'den küçük ve BH değerlerinin % 7,86'dan küçük bulunması; biyoanalitik yöntemler için kılavuzlarda (121) belirtilen % 15 değerini aşmadığından plazmadan metabolit tayini için geliştirilen yöntemin doğru ve kesin olduğunu göstermektedir (Tablo 4.6.).

Bağıl geri kazanım çalışmalarında % 85,39-113,12 arasında geri kazanım değerleri elde edilmiştir (Tablo 4.7.). Bu değerler biyoanalitik yöntem validasyonu açısından kabul edilebilir olup (121) yöntemin doğruluğunu destekler niteliktedir.

Kararlılık çalışmalarında kısa dönem, uzun dönem, oto örnekleyici, donma erime döngüsü ve stok çözeltilerin kararlılıkları incelendiğinde, taze hazırlanmış çözeltilerin analiz sonuçları ile karşılaştırma yapıldığında kalan analit miktarlarının % 95,8'in altında olmaması tüm koşullarda kararlılığın sağlandığını göstermektedir (Şekil 4.5-4.7). 1 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki standart ve standart eklenmiş plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında ve oto örnekleyicide 24 saat; ayrıca plazma çözeltilerinin -20°C 'de 6 ay ve üç donma-erime döngüsü süresince kararlı olduğu görülmüştür. Metabolitlere ait stok çözeltilerin ise -20°C 'de 1 ay kararlı oldukları saptanmıştır.

Validasyon çalışmasına ait sonuçlar hedeflenen metabolitlerin plazmadan analizleri için geliştirilen ve herhangi bir tüketme basamağına ihtiyaç duyulmaksızın sadece protein çöktürmesi ile hazırlanan numunelerin doğrudan analizini mümkün kılan LC-MS/MS yönteminin rutin analizlerde uygulanabileceğini göstermektedir.

LC-MS/MS sisteminin geliştirilen yöntem için uygunluğu alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı esas alınarak değerlendirilmiştir. Sistem uygunluk testi için metabolitlerin 1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltilisinin on tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Elde edilen değerler (Tablo 4.8.) belirtilen sınırlar [BSS (alıkonma zamanı)≤% 1, kapasite faktörü>2, kuyruklanma faktörü≤1,5 ve teorik tabaka sayısı>2000] (USP) içinde bulunmuş olup sistemin hedeflenen metabolitlerin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Tez çalışması, 105 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubu ile Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Medikal Onkoloji Bölümü tarafından meme kanseri tanısı alan 172 erken evre ve 92 metastaz evresindeki meme kanseri hastasına ait plazma örneklerinin optimize ve valide edilen LC-MS/MS yöntemi ile analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.).

Plazma örneklerinin toplandığı kontrol ve hasta grubunda yer alan kişilerin ortanca yaşları arasında bir fark bulunmamaktadır.

Veri Analizi

Kontrol ve hasta plazma örneklerinde zemin çıkarma kalibrasyon tekniği kullanılarak metabolit derişimleri belirlenmiştir (Şekil 4.10.).

Fakat örnek sayısı ve analiz edilen metabolit sayısının fazla olması veri içindeki aykırı değerlerin belirlenmesini güçleştirmektedir. Bir metabolit için bir hastada çıkan aykırı değer aynı hastaya ait diğer tüm metabolitler için de aykırı bir değer olup olmadığının değerlendirilmesi çok zordur. Bu yüzden grupları farklılaştırmaya zorlamayan bir yöntem olan PCA uygulanarak çok değişkenli veri analizi yapılmış ve veri içinde aykırılık gösteren hastaların belirlenmesi sağlanmıştır (Şekil 4.8.). PCA analizi sonucu E83 ve K23 hastalarına ait sonuçlar aykırı değerler olarak belirlenmiştir. Sonrasında gruplar arası farklılaşma PLS-DA grafiği ile incelenmiş ve kontrol grubunun hasta gruplarından farklı bir metabolik profil

gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.9.A.). PLS-DA grafiğinde farklılaşmaya neden olan metabolitler VIP grafikleri çizilerek gösterilmiştir (Şekil 4.9.B.). VIP grafiğinde en yüksek VIP değerine sahip metabolit grupların ayrılmasında en etkili olan ve istatistiksel olarak en fazla değişiklik gösteren metabolittir. Çalışmamızda en yüksek VIP değerlerinde olan metabolitler; gliserik asit, glutamin, laktik asit, glutamik asit, glikoz, kolin, malik asit, sitrullin, 3-hidroksibütirik asit ve ksantindir. Yönteme ait PLS-DA analizleri sonucu üretilen değerlerden R^2 'nin 0,566 olması (0,5 den büyük olması) elde edilen PLS-DA modelinin güvenilirliği göstermektedir. PLS-DA modelinin geçerlilik çalışmalarını değerlendirmek amacıyla veri matrisinin rastgele olasılık analizinden sonra (n=100) üretilen modellerin sınıflandırma istatistikleri hesaplanmıştır (Şekil 4.9.C.). Olasılık analizi sonucunda üretilen R^2 ve Q^2 değerlerinin yönteme ait değerlerden (en sağdaki noktalar) küçük çıkması PLS-DA modelinin geçerliliğini, kararlılığını ve tahmin etme gücünün yeterli olduğunu göstermektedir.

Daha sonra kontrol - erken evre, kontrol - metastatik evre ve erken evre-metastatik evre hasta grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak t testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.10., Tablo 4.9.).

Laktik asit, malik asit, prolin, glikoz, kolin, fumarik asit ve histidin'in erken evre ve metastatik kanser hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük derişimde ve farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Glutamin, sitrülün, 3-hidroksi bütirik asit ve gliserik asit erken evre ve metastatik kanser hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek derişimde ve farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur. Glutamik asidin kontrol grubuna göre erken evre kanser hastalarında arttığı ($p<0,01$) ancak metastatik hastalarda değişmediği gözlemlenmiştir. Laktik asit, prolin, kolin, histidin, glutamin, 3-hidroksibütirik asit ve glutamik asit'in gruplar arasında anlamlı olarak değişmiş olması kaynaklarda belirtilen hedeflenmemiş çalışmalar ile de uyumluluk göstermektedir (137, 141).

Çalışmamızda Krebs döngüsü indeksleri olarak fumarik asit /glutamik asit, malik asit /glutamik asit ve amonyak fiksasyon indeksi olarak glutamin/glutamik asit oranları incelenmiş olup her üç oranda erken ve metastatik evre hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılaşma görülmüştür (Şekil 4.11.). Fumarik asit ve malik asit seviyelerinin azalması ve glutamik asit seviyesinin artması enerji metabolizmasının oksidatif fosforilasyondan glikolize kaydığı bir

göstergesidir. Düşük fumarik asit ve malik asit derişimleri, Krebs döngüsü mediyatörlerin azaldığını göstermektedir. Bu durum karbonhidrat ve yağ metabolizmasındaki değişimlerin yansması olabilir. Bu nedenle kanser hücrelerinin yetersiz mitokondriyal substrat kullanımı ve metabolomik heterojeniteden dolayı enerji tercihinde farklı yollara yönlendiği düşünülebilir. Artan glutamin/glutamik asit oranı ve azalan Krebs döngüsü mediyatörleri amonyak fiksasyonunun ve detoksifikasyonun yanı sıra amino asit yıkımının da arttığını göstermektedir. Artan amino asit ve yağ metabolizması mitokondri için gerekli olan substrat rezervlerini artırarak oksidatif fosforilasyona geçişi hızlandırmaya çalıştığını işaret etmektedir. Bu durum kanser hastalarında enerji ihtiyacının oksidatif fosforilasyondan ziyade diğer yollara kaydığını göstermektedir (157).

Gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren metabolitler kullanılarak yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Yolak analiz grafiklerinde metabolik yollar yolak zenginleştirme (pathway enrichment analysis) (dikey eksen) ve topoloji analizlerinden (yatay eksen) alınan puanlara göre daireler şeklinde temsil edilir. Dairelerin renkleri, ilgili yoldaki metabolitlerin değişimini göstermekte olup yolak zenginleştirme analizinden elde edilen p değerine bağlı olarak değişir. Dairelerin boyutu ise yolak etki değerine karşılık gelir. Yolak etki değeri bir yolak içerisinde rol alan metabolitin önemine dayanarak belirlenir. Dolayısıyla daire ne kadar koyu renkli ve büyük ise ilgili yolak istatistiksel olarak o kadar anlamlıdır (158). Yapılan yolak analizleri sonucu “nitrojen”, “alanin, aspartat ve glutamat”, “aminoasil-tRNA biyosentezi”, “arginin ve prolin”, “bütanoat”, “D-glutamin ve D-glutamat”, “glikoliz veya glukoneogenez”, “pentoz fosfat yolu”, “histidin”, “fenilalanin”, “glisin, serin ve treonin”, “keton cisimlerin sentezi ve yıkımı” ve “tirozin” metabolizmalarının istatistiksel olarak anlamlı değişmiş olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12.). Ayrıca Tablo 4.10.’da her bir yolak için istatistiksel olarak farklılık gösteren metabolit sayısının yolda bulunan toplam metabolit sayısına oranı, p değerleri ve yolak etki değerleri gösterilerek istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin rol aldığı yollara ait daha ayrıntılı bilgiler sunulmuştur.

Tıbbi araştırmalarda tanısal testlerin dolayısıyla biyobelirteçlerin doğruluğunu belirlemek amacıyla ROC eğrileri kullanılmaktadır. ROC eğrileri bir tanı testinin performansını değerlendirmek, birden fazla tanı testlerinin performanlarını

karşılaştırmak veya tanı testlerindeki pozitif-negatif test sonuçları arasındaki ayırımı sağlayan en iyi eşik değerini belirlemek amacıyla kullanılır. ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) değeri bir tanı testi sonucunda hastalarla sağlıklıların birbirinden ne seviyede ayrıldığını gösteren bir performans ölçüsüdür. AUC değerleri 0,5 ila 1 arasında değişmektedir. AUC ne kadar büyük ise tanı testinin hastalığın tahmin edilmesindeki doğruluğu da o kadar yüksektir. Alan değeri 0,5 civarında olduğunda tanı testinin hastaları belirlemede hiçbir bilgi sağlamadığını alan değeri 1'e yaklaştığında ise bütün hasta ve sağlıklıların doğru şekilde sınıflandırıldığını ve mükemmel bir tanı konulabileceğini göstermektedir (159).

Biyobelirteçleri tanımlamak ve seçilen biyobelirteçlerin ne kadar kullanılabilir olduğunu göstermek için çeşitli istatistiksel teknikler uygun bir şekilde birleştirilebilir. Metabolomik çalışmalardaki kritik noktalardan biri verilerin aşırı uyuşmasını (overfitting) önlemektir. Çok sayıda metabolit ve nisbeten küçük bir örneklem ile yapılan analizlerde, karmaşık bir model verilere özgü bilgileri gereğinden fazla uygun hale getirerek çok iyi bir performans gösterebilir. Ancak sonuçlar çapraz validasyon çalışmaları ile yeni bir veri seti kullanılarak değerlendirilemez ise hatalı sonuçlar oluşabilir. Bu nedenle uygun modeli belirlemek, bir modelin gerçek potansiyelini ve olası biyobelirteçleri anlamak için oldukça önemlidir (160).

Hedeflenmiş olduğumuz metabolitlerin analizleri sonucunda oluşturulan veri matrisinde Bölüm 4.5.2.'de anlatıldığı şekilde ROC analizleri ile olası biyobelirteç belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ROC eğrilerini oluşturan modeller, bir rastgele örnekleme yöntemi olan MCCV tarafından dengeli alt örnekleme kullanılarak üretilmiş ve sınıflandırma yöntemi olarak SVM kullanılmıştır. SVM, iki sınıfı ayırmak için doğrusal bir karar sınırı kullanmayı öneren güçlü bir sınıflandırma tekniğidir.

Yapılan MCCV çalışmalarındaki analizler sonucunda tüm analiz modelleri incelenmiş (Şekil 4.13.A.), en doğru tahmin gücüne (en yüksek AUC değerine) sahip doğrusal SVM modelinin 20 metabolitin kullanıldığı biyobelirteç modeli olduğu saptanmış (AUC: 0,904) ve bu modele ait % 95 güven seviyesindeki ROC eğrisi Şekil 4.13.B.'de gösterilmiştir. Ayrıca artan biyobelirteç sayısına göre doğrusal SVM modelinin tahmin doğruluk grafiği ile farklı sayıda metabolitler ile oluşturulan biyobelirteç modellerinin grupların belirlenmesindeki tahmin oranları incelenmiştir. Bu grafik de en doğru biyobelirteç modelinin % 82,7'lik tahmin doğruluk değeri ile

tüm yirmi metabolitin kullanıldığı model olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14.). Bu tahminde rol alan yirmi biyobelirteç önem derecelerine göre sırasıyla gliserik asit, o-fosfoetanolamin, malik asit, glikoz, glutamin, sitrülün, malik asit/glutamik asit, fumarik asit/glutamik asit, laktik asit, fumarik asit, glutamik asit, 3-hidroksibütirik asit, tirozin, 5-hidroksimetil-2-deoksiüridin, serin, ksantin, N-asetilglisin, 2-aminoadipik asit, dietilaminomalonic asit ve fosfokolin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15.). Belirlenen doğrusal SVM modeli kullanılarak tüm örneklerin tahmin edilen sınıf olasılıklarına ait çapraz validasyon analiz sonuçları (yanlış grup sınıflandırma analizi) öngörülen sınıf olasılıkları grafiği ile görselleştirilmiş (Şekil 4.16.). Model oluşturmak için dengeli bir alt örnekleme yaklaşımı kullanıldığından, Şekil 4.16.'da da görülebileceği gibi sınıflandırma sınırı her zaman merkezdedir ($x = 0,5$ -noktalı çizgi). Bu sınırlar içerisinde her bir örneğin hangi gruba ait olduğuna dair tahmini yerleşimi incelenmiş ve modelin % 84'ün üzerinde bir tahmin gücüne sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.11.). Bu değer klinik çalışmalar için klinisyenler tarafından bildirilen % 30'luk tahmin gücünün çok üzerindedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Meme kanserinin erken tanısında kullanılmak amacıyla hedeflenmiş yirmi altı metabolitin plazmadan aynı anda analizleri için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

Metabolitlerin LC-MS/MS yöntemi ile kromatografik ayırımında MerckSeQuant ZIC-HILIC (5 µm, 50x4,6 mm) kolon kullanılmıştır. Analizler % 0,1 formik asit içeren su (A): % 0,1 formik asit içeren asetonytril (B) (1:1, h/h) karışımından oluşan hareketli faz sisteminde, 0,3 mL/dk akış hızında, 40°C kolon sıcaklığında gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Gradient elüsyon sırasında B fazının yüzdesi 0 ila 3 dakika arasında % 90 oranında tutulmuş; 3. dk'dan 6. dk'ya kadar doğrusal olarak % 20'ye düşürülmüştür; 6. dk'dan 8. dk'ya kadar B yüzdesi % 5'e düşürülmüş ve son olarak 8. dk'dan 12. dk'ya kadar % 90'a yükseltilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL ve analiz süresi 12 dk'dır. Her bir metabolit kendine özgü MRM koşullarında analiz edilmiş olup nebulizatör gaz akış hızı, 3 mL/dk; kurutma gazı akış hızı, 15 L/dk; ayırma hattı sıcaklığı, 250° C; ısı bloğu sıcaklığı, 400° C'dir.

Geliştirilen analiz yöntemi biyoanalitik validasyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde yöntemin yirmi altı metabolitin plazmadan analizi için seçici, doğrusal, duyarlı, kesin, doğru ve seçici olduğu sonucuna varılmıştır.

Optimize ve valide edilen LC-MS/MS yöntemi kontrol ile erken evre ve metastatik evredeki hasta plazma örneklerine uygulanmış olup analiz sonuçlarının tek ve çok değişkenli istatistiksel testler ile değerlendirilmesi sonucu olası biyobelirteç adayları belirlenmiştir. Yolak analizleri ve biyobelirteç analizleri ile bu adayların meme kanserinin erken tanısındaki etkinliği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasının sonucunda; kontrol ve erken evre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren ($p < 0,01$) glutamik asit, malik asit, gliserik asit, 3-hidroksibütirik asit, glutamin, prolin, kolin, fumarik asit, laktik asit ile fumarik asit/glutamik asit ve malik asit/glutamik asit oranlarının meme kanserinin erken tanısında kullanılmak üzere biyobelirteç adayları olarak önerilmesine karar verilmiştir. Bu metabolitlere ek olarak glikoz plazma düzeyinin de kontrol ve erken evre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmış olmasına rağmen

açlık-tokluk glikoz plazma düzeyleri arasındaki farklılığın bireylerde belirgin varyasyonlara neden olacağı düşünüldüğünden biyobelirteç olarak önerilmemiştir.

Analizi yapılan diğer metabolitlerin istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasının nedeninin metabolit seviyelerinin genetik, çevre koşulları ve yaşam stillerinden etkilenmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (161, 162). Bu nedenle ülkemiz popülasyonu için yeni biyobelirteçlerin aranması ve başka toplumlarda yapılan çalışmalar sonucunda önerilen diğer biyobelirteçlerin de ülkemizde doğruluk çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Kaynaklardaki hedeflenmemiş metabolomik çalışmalar sonucu elde edilen metabolit adaylarına ait m/z değerleri meme kanserinin erken tanısında çok önemlidir. Bulunan m/z değerine göre molekülün tanımlanmasında olası yanlış adlandırmalar bu molekülün anlamlı değişimini ve söz konusu molekülün biyobelirteç olma olasılığını değiştiremez. Ancak bu biyobelirteç adaylarının klinik kullanımlarından önce mutlaka standartlarla doğruluk çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında LC-MS/MS sistemiyle yapılan hedeflenmiş analizler bu yaklaşımın doğruluğunu göstermektedir. Kaynaklarda belirtilen ve bu nedenle çalışmamızda seçilmiş olan yirmi altı metabolitin analizleri sonucunda tüm metabolitler için kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı fark bulunmamış olması yaklaşımı doğrulamakta ve hedeflenmiş analizlerin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Geliştirdiğimiz ve valide ettiğimiz LC-MS/MS yöntemi klinik laboratuvarlarda rutin analizlerde kolaylıkla kullanılacak bir yöntemdir. Geliştirilen yöntemin Türkiye genelinde birçok laboratuvarda uygulanabilmesi daha fazla kişinin taranmasına ve kanser tedavisinde en önemli unsur olan erken tanının gerçekleştirilmesine katkı sağlayacaktır. Böylece bireylerin kaliteli bir yaşam sürmesi yanı sıra azalan tedavi masraflarıyla da ülke ekonomisine büyük katkılar sağlanması beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Aslan FE, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*. 2007;3:63-8.
2. Scherer LD, Ubel PA, McClure J, Greene SM, Alford SH, Holtzman L, et al. Belief in numbers: When and why women disbelieve tailored breast cancer risk statistics. *Patient Educ Couns*. 2013;92(2):253-9.
3. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 1992;327(5):319-28.
4. Nemutlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian medical journal*. 2012;53(6):529-34.
5. Claudino WM, Quattrone A, Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I, Di Leo A. Metabolomics: available results, current research projects in breast cancer, and future applications. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(19):2840-6.
6. Nemutlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D 31P NMR for monitoring 18O/16O isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;403(3):697-706.
7. Aura A-M, Mattila I, Seppänen-Laakso T, Miettinen J, Oksman-Caldentey K-M, Orešič M. Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochemistry Letters*. 2008;1(1):18-22.
8. Breast cancer facts & figures 2017–2018: American Cancer Society Atlanta, GA; 2017 [Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>].
9. Breast cancer 2019 [Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/breast-cancer/symptoms-causes/syc-20352470>].
10. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma K. Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced pharmaceutical technology research*. 2010;1(2):109.
11. Yazıcı O, Özdemir N. Meme Kanserinde Epidemiyolojik Veriler, Risk Faktörleri, Risk Azaltıcı Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri Medical Oncology-Special Topics*. 2018;11(1):1-7.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019;69(1):7-34.
13. Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International Journal of Gynecology Obstetrics*. 2015;131(1):36-9.

14. McPherson K, Steel C, Dixon J. ABC of breast diseases: breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ: British Medical Journal*. 2000;321(7261):624.
15. Gültekin S, Erbaş G. Meme Kanseri Tarama Programları, Dünü, Bugünü ve Yarını. *Türkiye Klinikleri Medical Oncology-Special Topics*. 2018;11(1):13-22.
16. Schwab FD, Huang DJ, Schmid SM, Schötzau A, Güth U. Self-detection and clinical breast examination: Comparison of the two “classical” physical examination methods for the diagnosis of breast cancer. *The Breast*. 2015;24(1):90-2.
17. Njor S, Nyström L, Moss S, Paci E, Broeders M, Segnan N, et al. Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies. *Journal of Medical Screening*. 2012;19(1_suppl):33-41.
18. da Costa Vieira RA, Biller G, Uemura G, Ruiz CA, Curado MP. Breast cancer screening in developing countries. *Clinics*. 2017;72(4):244-53.
19. Hersh MR. Imaging the dense breast. *Applied Radiology*. 2004;33(1):22.
20. Greenwood HI, Freimanis RI, Carpentier BM, Joe BN, editors. *Clinical Breast Magnetic Resonance Imaging: Technique, Indications, and Future Applications*. Seminars in Ultrasound, CT and MRI; 2018: Elsevier.
21. Phi X-A, Houssami N, Obdeijn I-M, Warner E, Sardanelli F, Leach MO, et al. Magnetic resonance imaging improves breast screening sensitivity in BRCA mutation carriers age \geq 50 years: evidence from an individual patient data meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;33(4):349-56.
22. Pagana KD, Pagana T. *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*.—8th ed: St Louis: Mosby Elsevier; 2007.
23. Kabel AM. Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*. 2017;3(1):5-11.
24. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5287-312.
25. Kazarian A, Blyuss O, Metodieva G, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Kiseleva EM, et al. Testing breast cancer serum biomarkers for early detection and prognosis in pre-diagnosis samples. *British Journal of Cancer*. 2017;116(4):501-8.
26. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PloS one*. 2012;7(2):e32737.
27. Simó C, Cifuentes A, García-Cañas V. *Fundamentals of advanced omics technologies: from genes to metabolites*: Newnes; 2014.
28. Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2018;19(5):299-310.

29. Pearson H. What is a gene? : Nature Publishing Group; 2006.
30. Başaran E, Aras S, Cansaran-duman D. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2010;67(2):85-96.
31. Hood L, Rowen L. The human genome project: big science transforms biology and medicine. *Genome Medicine*. 2013;5(9):79-86.
32. Horgan RP, Kenny LC. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician Gynaecologist*. 2011;13(3):189-95.
33. Griffiths AJ, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH. An introduction to genetic analysis: Macmillan; 2005.
34. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan; 2008.
35. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature Protocols*. 2003;422(6928):193-7.
36. Hasin Y, Seldin M, Lusk A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*. 2017;18(1):83-98.
37. Harper HA, Murray RK, Granner DK, Mayes PA. *Harper's biochemistry*: McGraw-Hill Health Professions Divisions; 2000.
38. Anderson NL, Anderson NGJE. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998;19(11):1853-61.
39. Mishra NC. *Introduction to proteomics: principles and applications*: Wiley Online Library; 2010.
40. Berrar D, Granzow M, Dubitzky W. Introduction to genomic and proteomic data analysis. *Fundamentals of Data Mining in Genomics and Proteomics*: Springer; 2007. p. 1-37.
41. Venter JC. A part of the human genome sequence. *Science*. 2003;299(5610):1183-5.
42. Bren L. Metabolomics: working toward personalized medicine. *FDA consumer*. 2005;39(6):28-33.
43. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics—a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*. 2010;659(1-2):23-33.
44. Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Functional Genomics*: Springer; 2002. p. 155-71.
45. Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends in Biotechnology*. 2005;23(11):544-6.
46. Scholz M, Gatzek S, Sterling A, Fiehn O, Selbig J. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. *Bioinformatics*. 2004;20(15):2447-54.

47. Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(7):557–65.
48. Villas-Boas SG, Nielsen J, Smedsgaard J, Hansen MA, Roessner-Tunali U. *Metabolome analysis: an introduction*: John Wiley & Sons; 2007.
49. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2005;24(4):285-94.
50. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(4):263–9.
51. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*. 2017;46(1):608-17.
52. Wishart D, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer metabolomics and the human metabolome database. *Metabolites*. 2016;6(1):10-26.
53. Causon TJ, Hann S. Review of sample preparation strategies for MS-based metabolomic studies in industrial biotechnology. *Analytica Chimica Acta*. 2016;938:18-32.
54. Gong Z-G, Hu J, Wu X, Xu Y-J. The recent developments in sample preparation for mass spectrometry-based metabolomics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2017;47(4):325-31.
55. 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.
56. Nemutlu E, Kir S. HILIC Based LC/MS for Metabolite Analysis. *Novel Developments in Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 2018. p. 98-130.
57. Li W, Jian W, Fu Y. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*: Wiley; 2019.
58. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(2):443-58.
59. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2008;1:45-69.
60. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE–MS for metabolomics: developments and applications in the period 2014–2016. *Electrophoresis*. 2017;38(1):190-202.
61. Qiu Y, Reed D. Gas chromatography in metabolomics study. *Advances in Gas Chromatography*: IntechOpen; 2014.
62. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Metabolic Profiling*: Springer; 2011. p. 191-204.
63. Bajad S, Shulaev V. LC-MS-based metabolomics. *Metabolic Profiling*: Springer; 2011. p. 213-28.

64. Xiao JF, Zhou B, Ransom HW. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;32:1-14.
65. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry- based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007;26(1):51-78.
66. McCalley DV. Hydrophilic interaction liquid chromatography: An update. LC GC Europe. 2019.
67. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography: John Wiley & Sons; 2011.
68. Cabrera K. Applications of silica- based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*. 2004;27(10- 11):843-52.
69. Trivedi DK, Iles RK. Do not just do it, do it right: urinary metabolomics—establishing clinically relevant baselines. *Biomedical Chromatography*. 2014;28(11):1491-501.
70. dos Santos Pereira A, David F, Vanhoenacker G, Sandra P. The acetonitrile shortage: is reversed HILIC with water an alternative for the analysis of highly polar ionizable solutes? *Journal of Separation Science*. 2009;32(12):2001-7.
71. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 1990;499:177-96.
72. Spagou K, Tsoukali H, Raikos N, Gika H, Wilson ID, Theodoridis G. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabolomic/metabolomic studies. *Journal of Separation Science*. 2010;33(6-7):716-27.
73. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2012;402(1):231-47.
74. Monica Dolci LP, Dafydd Milton, Tony Edge. HILIC Method Development in a Few Simple Steps 2018 [Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/PN-21029-HILIC-Method-Development-Fewer-Simple-Steps-PN21029-EN.PDF>].
75. 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.
76. Allwood JW, Goodacre R. An introduction to liquid chromatography—mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical Biochemical Techniques*. 2010;21(1):33-47.
77. Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*. 2006;29(12):1784-821.

78. Zhou J, Yin Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*. 2016;141(23):6362-73.
79. Swartz ME. UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*. 2005;28(7-8):1253-63.
80. High Performance Liquid Chromatography (HPLC):Principle, Types, Instrumentation and Applications 2019 [Available from: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>].
81. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*. 2007;2(11):2692.
82. Emwas A-HM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Metabonomics*: Springer; 2015. p. 161-93.
83. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of instrumental analysis*: Cengage learning; 2017.
84. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook*: Springer Science & Business Media; 2006.
85. De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications*: Great Britain: John Wiley Sons Ltd; 2007.
86. Gross JH. Tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry*: Springer; 2017. p. 539-612.
87. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
88. Courant F, Antignac JP, Dervilly- Pinel G, Le Bizec B. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics*. 2014;14(21-22):2369-88.
89. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE- MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2016–2018. *Electrophoresis*. 2019;40(1):165-79.
90. Spicer R, Salek RM, Moreno P, Cañueto D, Steinbeck C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics*. 2017;13(9):106.
91. Çelebier M. Metabolomik Çalışmalarda Yazılım ve Veritabanı Desteği: LC-MS Verilerinin Değerlendirilmesinde XCMS Kullanımı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2014;23(2):168-85.
92. *Metabolomics Software and Servers 2018* [Available from: <http://metabolomicssociety.org/resources/metabolomics-software>].
93. Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, Navarro M, Salek RM, Yanes O. Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: state of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;78:23-35.

94. Databases 2018 [Available from: <http://metabolomicsociety.org/resources/metabolomics-databases>].
95. Group F-NBW. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) resource. 2016.
96. Khleif SN, Doroshov JH, Hait WN. AACR-FDA-NCI Cancer Biomarkers Collaborative consensus report: advancing the use of biomarkers in cancer drug development. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(13):3299-318.
97. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology Medicine*. 2018;243(3):213-21.
98. The Human Metabolome Database 2019 [Available from: <http://www.hmdb.ca/>].
99. PubChem 2019 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>].
100. Kanaan YM, Sampey BP, Beyene D, Esnakula AK, Naab TJ, Ricks-Santi LJ, et al. Metabolic profile of triple-negative breast cancer in African-American women reveals potential biomarkers of aggressive disease. *Cancer Genomics-Proteomics*. 2014;11(6):279-94.
101. Qu J, Chen W, Luo G, Wang Y, Xiao S, Ling Z, et al. Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. *Analyst*. 2002;127(1):66-9.
102. Henry H, Marmy Conus N, Steenhout P, Béguin A, Boulat O. Sensitive determination of d- lactic acid and l- lactic acid in urine by high- performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012;26(4):425-8.
103. Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GN, Owusu-Sarfo K, Ballas RA, et al. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Research*. 2010;70(21):8309-18.
104. Kleinnijenhuis AJ, Kjeldsen F, Kallipolitis B, Haselmann KF, Jensen ON. Analysis of Histidine Phosphorylation Using Tandem MS and Ion– Electron Reactions. *Analytical Chemistry*. 2007;79(19):7450-6.
105. Bylund D, Norström SH, Essén SA, Lundström US. Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007;1176(1-2):89-93.
106. Holm PI, Ueland PM, Kvalheim G, Lien EA. Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2003;49(2):286-94.
107. Chaimbault P, Albéric P, Elfakir C, Lafosse M. Development of an LC–MS–MS method for the quantification of taurine derivatives in marine invertebrates. *Analytical Biochemistry*. 2004;332(2):215-25.
108. Schrimpe-Rutledge AC, Fontès G, Gritsenko MA, Norbeck AD, Anderson DJ, Waters KM, et al. Discovery of novel glucose-regulated proteins in isolated human pancreatic islets using LC–MS/MS-based proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(7):3520-32.

109. Rashed MS, Aboul- Enein HY, AlAmoudi M, Jakob M, Al- Ahaideb LY, Abbad A, et al. Chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry in the determination of the configuration of glyceric acid in urine of patients with D- glyceric and L- glyceric acidurias. *Biomedical Chromatography*. 2002;16(3):191-8.
110. Yang S, Sadilek M, Synovec RE, Lidstrom ME. Liquid chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry measurement of targeted metabolites of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown on two different carbon sources. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(15):3280-9.
111. Meesters RJ, Wolfe RR, Deutz NE. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for the analysis of stable isotope enrichments of phenylalanine and tyrosine. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(1-2):43-9.
112. Cho SH, Choi MH, Kwon OS, Lee WY, Chung BC. Metabolic significance of bisphenol A- induced oxidative stress in rat urine measured by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Applied Toxicology*. 2009;29(2):110-7.
113. Shin S, Fung S-M, Mohan S, Fung H-L. Simultaneous bioanalysis of l-arginine, l-citrulline, and dimethylarginines by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(7):467-74.
114. Lutz U, Lutz RW, Lutz WK. Metabolic profiling of glucuronides in human urine by LC-MS/MS and partial least-squares discriminant analysis for classification and prediction of gender. *Analytical Chemistry*. 2006;78(13):4564-71.
115. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, Bühr C, Amstutz U, R Largiadèr C. LC- MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5, 6- dihydrouracil, 5- fluorouracil and 5- fluoro- 5, 6- dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(1):7-16.
116. Xu F, Zou L, Lin Q, Ong CN. Use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and online databases for identification of phosphocholines and lysophosphatidylcholines in human red blood cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009;23(19):3243-54.
117. Held PK, White L, Pasquali M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ reagents. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(26):2695-703.
118. Rashed MS, Saadallah AA, Rahbeeni Z, Eyaid W, Seidahmed MZ, Al-Shahwan S, et al. Determination of urinary S- sulphocysteine, xanthine and hypoxanthine by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2005;19(3):223-30.
119. Kaspar H, Dettmer K, Chan Q, Daniels S, Nimkar S, Daviglus ML, et al. Urinary amino acid analysis: A comparison of iTRAQ®–LC–MS/MS, GC–MS, and amino acid analyzer. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(20):1838-46.

120. Berna MJ, Ackermann BL. Quantification of serine enantiomers in rat brain microdialysate using Marfey's reagent and LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2007;846(1-2):359-63.
121. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry 2018 [Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>].
122. Kouremenos KA, Johansson M, Marriott PJ. Advances in gas chromatographic methods for the identification of biomarkers in cancer. *Journal of Cancer*. 2011;3:404-20.
123. Dzeja PP, Hoyer K, Tian R, Zhang S, Nemetlu E, Spindler M, et al. Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. *J Physiol-London*. 2011;589(21):5193-211.
124. Renda G, Yalcin FN, Nemetlu E, Akkol EK, Suntar I, Keles H, et al. Comparative assessment of dermal wound healing potentials of various *Trifolium L.* extracts and determination of their isoflavone contents as potential active ingredients. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;148(2):423-32.
125. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in Mitochondrial Dynamics and Metabolomic Signatures of Evolving Energetic Stress in Mouse Models of Familial Alzheimer's Disease. *PloS one*. 2012;7(2).
126. Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(23):5835-41.
127. Woo HM, Kim KM, Choi MH, Jung BH, Lee J, Kong G, et al. Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers. *Clinica Chimica Acta*. 2009;400(1):63-9.
128. Nam H, Chung BC, Kim Y, Lee K, Lee D. Combining tissue transcriptomics and urine metabolomics for breast cancer biomarker identification. *Bioinformatics*. 2009;25(23):3151-7.
129. Gu H, Pan Z, Xi B, Asiago V, Musselman B, Raftery D. Principal component directed partial least squares analysis for combining nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data in metabolomics: Application to the detection of breast cancer. *Analytica Chimica Acta*. 2011;686(1):57-63.
130. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010;6(1):78-95.
131. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*. 2007;2(11):2692.
132. Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM, Barupal DK, Richter-Ehrenstein C, Kleine-Tebbe A, et al. Comparative metabolomics of estrogen receptor positive

- and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *Journal of Proteomics*. 2013;94:279-88.
133. Günther UL. Metabolomics biomarkers for breast cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):153-65.
 134. Cala MP, Aldana J, Medina J, Sánchez J, Guio J, Wist J, et al. Multiplatform plasma metabolic and lipid fingerprinting of breast cancer: A pilot control-case study in Colombian Hispanic women. *PloS one*. 2018;13(2):e0190958.
 135. More TH, RoyChoudhury S, Christie J, Taunk K, Mane A, Santra MK, et al. Metabolomic alterations in invasive ductal carcinoma of breast: A comprehensive metabolomic study using tissue and serum samples. *Oncotarget*. 2018;9(2):2678.
 136. Cui M, Wang Q, Chen G. Serum metabolomics analysis reveals changes in signaling lipids in breast cancer patients. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(1):42-7.
 137. Hart CD, Vignoli A, Tenori L, Uy GL, Van To T, Adebamowo C, et al. Serum metabolomic profiles identify ER-positive early breast cancer patients at increased risk of disease recurrence in a multicenter population. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(6):1422-31.
 138. Jové M, Collado R, Quiles JL, Ramírez-Tortosa M-C, Sol J, Ruiz-Sanjuan M, et al. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(12):19522-33.
 139. Cao Z, Qin X, Liu F, Zhou L. Tryptophan-induced pathogenesis of breast cancer. *African Health Sciences*. 2015;15(3):982-5.
 140. Dowling P, Henry M, Meleady P, Clarke C, Gately K, O'Byrne K, et al. Metabolomic and proteomic analysis of breast cancer patient samples suggests that glutamate and 12-HETE in combination with CA15-3 may be useful biomarkers reflecting tumour burden. *Metabolomics*. 2015;11(3):620-35.
 141. Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Herrmann B, Trédan O. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer Letters*. 2014;343(1):33-41.
 142. Louis E, Bervoets L, Reekmans G, De Jonge E, Mesotten L, Thomeer M, et al. Phenotyping human blood plasma by ¹H-NMR: a robust protocol based on metabolite spiking and its evaluation in breast cancer. *Metabolomics*. 2015;11(1):225-36.
 143. Euceda LR, Haukaas TH, Giskeødegård GF, Vettukattil R, Engel J, Silwal-Pandit L, et al. Evaluation of metabolomic changes during neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab in breast cancer using MR spectroscopy. *Metabolomics*. 2017;13(4):37-51.
 144. Zhang P, Zhu W, Wang D, Yan J, Wang Y, He L. Enantioselective Effects of Metalaxyl Enantiomers on Breast Cancer Cells Metabolic Profiling Using HPLC-QTOF-Based Metabolomics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1):142-58.

145. Armengol-Alonso A, Matadamas-Guzman ML, Resendis-Antonio O. System biology, metabolomics, and breast cancer: Where we are and what are the possible consequences on the clinical Setting. *Quantitative Models for Microscopic to Macroscopic Biological Macromolecules and Tissues*: Springer; 2018. p. 169-88.
146. Jasbi P, Wang D, Cheng SL, Fei Q, Cui JY, Liu L, et al. Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. *Journal of Chromatography B*. 2019;1105:26-37.
147. Yang Y, Zhong Q, Mo C, Zhang H, Zhou T, Tan W. Determination of endogenous inflammation-related lipid mediators in ischemic stroke rats using background subtracting calibration curves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017;409(28):6537-47.
148. Whitmire M, Ammerman J, De Lisio P, Killmer J, Kyle D, Mainstone E, et al. LC-MS/MS bioanalysis method development, validation, and sample analysis: points to consider when conducting nonclinical and clinical studies in accordance with current regulatory guidances. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2011;4(2):1-11.
149. United States Pharmacopoeial Convention TNFNUSP. *The National Formulary (NF 25): USP XXX: United States Pharmacopoeia*. Mack Printing Rockville. 2007.
150. Wang L, Liu X, Yang Q. Application of Metabolomics in Cancer Research: As a Powerful Tool to Screen Biomarker for Diagnosis, Monitoring and Prognosis of Cancer. *Biomarkers Journal*. 2018;4(12):1-8.
151. Taylor T. Optimizing LC-MS and LC-MS-MS Methods. *LCGC North America*. 2014;32(1):74.
152. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B*. 2008;871(2):236-42.
153. Jemal M, Xia Y-Q. LC-MS development strategies for quantitative bioanalysis. *Current Drug Metabolism*. 2006;7(5):491-502.
154. Reddy NR. Stable Labeled Isotopes as Internal Standards: A Critical Review. *Modern Applications in Pharmacy & Pharmacology*. 2017;1(2):1-4.
155. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 2012;403(6):1523-48.
156. Villas- Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*. 2005;24(5):613-46.
157. Nemetlu E, Zhang S, Xu Y-Z, Terzic A, Zhong L, Dzeja PD, et al. Cardiac resynchronization therapy induces adaptive metabolic transitions in the metabolomic profile of heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 2015;21(6):460-9.

158. Xia J, Wishart DS. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics*. 2010;26(18):2342-4.
159. Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2013;4(2):627-35.
160. Xi B, Gu H, Baniasadi H, Raftery D. Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data. *Mass Spectrometry in Metabolomics*: Springer; 2014. p. 333-53.
161. Nemetlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by ¹⁸O-assisted ³¹P NMR and mass spectrometry. *Physiological Genomics*. 2012;44(7):386-402.
162. Nemetlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. ¹⁸O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croatian Medical Journal*. 2012;53(6):529-34.

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557 -381

26 Mart 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 19.03.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/05
Proje No : GO 14/162 (Değerlendirme Tarihi 19.03.2014)
Karar No : GO 14/162 - 20

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sedef KIR'ın sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Kadri ALTUNDAĞ, Doç.Dr. Emirhan NEMUTLU, Doç.Dr. Sercan AKSOY, Doç.Dr. Ali Rıza SEVER ve Araş.Gör. Tuba REÇBER ile birlikte çalışacakları GO 14/162 kayıt numaralı ve "Meme Kanserinin Erken Tanısı için Kombine Kromatografik (LC-TOF-MS ve LC-MS/MS) Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Uygulanması" 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. Yıldırım 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 Sökmensüer (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 Vâizoğlu (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK 2. Onam Formu

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (*Hekimin Açıklaması*)

Meme kanserde erken tanısı ve tedavi etkinliği için yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Meme kanserinin erken tanısı için kombine kromatografik (LC-TOF-MS ve LC-MS/MS) yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması”dır.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, meme kanseri şüphesiyle bize başvurmanızdır. Araştırmamızın amacı meme kanserin erken teşhisininkan örneklerinden yapılarak kesin tanı konulabilmesidir. Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Medikal Onkoloji Bölümü ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalları'nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof. Dr. Sercan Aksoy veya onun görevlendireceği bir hekim tarafından muayene edileceksiniz ve bulgular kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 3mL (1 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Alınan kanda aminoasit gibi birçok metabolitin miktarı ölçülecektir.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: Çalışmayla ilgili herhangi bir risk oluşması beklenmemektedir. Çünkü bu işlem size çalışma yapılsa da yapılmasa da uygulanacaktır. Sadece 3mL daha fazla kan alınacaktır. Yine de kan alımı sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az

bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tüm kişisel ve tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Prof. Dr. Sayın Sercan Aksoy (klinik sorumlusu) ve Prof. Dr. Sayın Sedef Kır (araştırma sorumlusu) tarafından Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Medikal Onkoloji Bölümüne Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalları tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak

da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç. Dr. Sercan Aksoy’u 0(312) 305 2941 (iş) veya 0(542) 721 2606 (cep) no’lu telefonlardan ve Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Medikal Onkoloji Bölümü adresinden arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza:

EK 3. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

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

Bağıl Hata Hesaplanması

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

Standart Hata Hesaplanması

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

% Geri Kazanım Hesaplaması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

EK 4. Orjinallik Raporu Örneği

Tuba Reçber Baskı

ORJINALLIK RAPORU

% 11	% 8	% 2	% 9
BENZERLIK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 2
2	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.analitikkimya2018.com İnternet Kaynağı	% 1
5	vdocuments.site İnternet Kaynağı	<% 1
6	bilsenbesergil.blogspot.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<% 1

EK 5. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Tuba Reçber
Ödev başlığı: Tuba Reçber Baskı
Gönderi Başlığı: Tuba Reçber Baskı
Dosya adı: TUBA REÇBER TEZ.docx
Dosya boyutu: 6.07M
Sayfa sayısı: 153
Kelime sayısı: 26,932
Karakter sayısı: 182,640
Gönderim Tarihi: 16-Eyl-2019 11:35AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1173598051

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİNDE BEYAZI ENMİŞ METABOLİTLERİN
LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE TAYİNLERİ

Doç. Dr. Tuba REÇBER

ANKARA KİMYA FAKÜLTESİ
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2019

9. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Akdağmadeni’nde doğdum. Rauf Denktas Lisesi’ni bitirdikten sonra 2006 yılında girdiğim Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım ve 2013 yılında “Leflunomid’in farmasötik preparatlardan analizi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmesi ve validasyonu” isimli yüksek lisans tezimi tamamladım. 2013 yılında başladığım doktora tez çalışmalarım kapsamında Kasım 2018 – Temmuz 2019 tarihleri arasında 9 ay süreyle Viyana’da, University of Natural Resources and Life Science’da çalışmalarda bulundum. Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.