MİDE KANSERİ DOKULARINDA HEDEFLENMEMİŞ METABOLOMİKS TEKNOLOJİLERİ YARDIMIYLA ALTERNATİF TANI VE YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nurgül KIZILTAŞ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi - 2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİDE KANSERİ DOKULARINDA HEDEFLENMEMİŞ METABOLOMİKS TEKNOLOJİLERİ YARDIMIYLA ALTERNATİF TANI VE YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nurgül KIZILTAŞ

Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

ERZURUM
2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

MİDE KANSERİ DOKULARINDA HEDEFLENMEMİŞ METABOLOMİKS TEKNOLOJİLERİ YARDIMIYLA ALTERNATİF TANI VE YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nurgül KIZILTAŞ

Tez Savunma Tarihi: : 15.01.2019

Tez Danışmanı: : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi M. Fatih POLAT

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir

Prof. Dr. Duygu ARIKAN

Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**

TEŞEKKÜR ..... **IV**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT ..... **VII**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VIII**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **VIIII**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **X**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **6**

2.1. Mide ve Mide Kanseri 6

2.2. Mide kanserinde Risk Faktörleri 9

2.2.1. Helikobacter Pylori Enfeksiyonu 10

2.2.2. Beslenme Şekli 11

2.3. Mide Kanserinin Sınıflandırılması 12

2.4. Mide Kanserinin Evrelemesi 13

2.5. Mide Kanserinde Prognostik Faktörler 14

2.6. Kanserin Erken Teşhisinde Biyobelirteçler 15

2.7. Omiks Teknolojisi 15

2.8. Metabolomiks 17

2.9. İnsan Metabolom Projesi 21

2.10. Metabolomiks Teknolojisinin Kullanım Alanları 22

2.11. Kanser Araştırmalarında Metabolomiks 24

2.12. Mide Kanseri ve Metabolomiks 25

2.13. Metabolitleri Tanımlamada Kullanılan Analitiksel Yöntemler 26

2.14. Mide Kanseri Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan Başlıca Analitiksel Yöntemler 27
2.14.1. NMR Spektroskopisi 27
2.14.2. Kütle Spektrometrisi 28
2.14.3. Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) 29
2.14.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS) 29
2.14.5. Kapiller Elektroforez-Kütle Spektroskopisi (CE-MS) 30
2.14.6. Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (TOF-MS) 30
2.15. Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Yöntemler 32
2.15.1. Veri Analizi ve Algoritma Seçimi 32
2.16. Mide Kanseri Çalışmalarında Biyobelirteçlerin Keşfi ve Metabolomiks Çalışmaları Üzerine Yapılmış Olan Araştırmalar 34
3. MATERYAL VE METOT 47
3.1. Kullanılan Materyaller 47
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler 47
3.1.2. Cihazlar 47
3.2. Yöntem 48
3.2.1. Genel Deneysel Prosedür 48
3.2.2. Doku Örneklerinin Toplanması 48
3.2.3. Cerrahi Müdahale Kararı Alınmış Hasta Bilgileri 49
3.2.4. Doku Numunelerinin Hazırlanması ve Metabolit Ekstraksiyonu 49
3.2.5. Q-TOF LC/MS Sistemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması 50
3.2.7. QTOF-LC/MS Analizi İçin Yöntem Şartları 51
3.2.8 Metabolit Profillemede Kullanılan Çoklu Analiz ve İstatiksel Veri Analizi 52
4. BULGULAR 53

4.1. Doku Örneklerinin Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşımı 53
4.2. Metabolitlerin Yolak Analizi 56
4.2.1 Aminoaçil-tRNA Biyosentezi 59
4.2.2Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması 60
4.2.3 Yağ Asidi Metabolizması 61
4.2.4 Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi 62
4.2.5 Siyanoamino Asit Metabolizması 63
4.2.6 Glutatyon Metabolizması 64
4.2.7 Azot Metabolizması 65
4.2.8 Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması 66
4.2.9 Valin, Lösin ve İzolösin Bozulması 67
4.2.10 D-Glutamin ve D-glutamat Metabolizması 68
4.2.11 Sfingolipid Metabolizması 69
5. TARTIŞMA 70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 78
KAYNAKLAR 79
EKLER 86

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yoğun çalışma temposuna rağmen desteğini ve bilgisini esirgemeyen, fikirleri, ilgisi ve yardımlarıyla bana destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na,

tez çalışmamın uygulama aşamasında bilgi ve birikimini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞENOL'a,

yüksek lisansım boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, hep yanımda olduğunu hissettiren, çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında yardımlarıyla ümit veren Sayın Doç. Dr. Alptuğ ATİLA'ya,

doku örneklerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İlhan YILDIRGAN, Dr. Öğr. Üyesi Esra DİŞÇİ ve Dr. Bilal AYDIN'a,

deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Tuğrul Çağrı AKMAN'a, grafik ve şekil tasarımlarında bana yardımcı olan Ecz. Oğuzhan SAVAŞ'a,

değerli bilgi birikimini ve tecrübelerini sürekli benimle paylaşarak her zaman öğrenmemi sağlayan ve bana büyük sabır göstererek her zaman destek olan Arş. Gör. Dr. M. Emrah YAMAN'a,

bütün yüksek lisansım süresince bana her konuda destek olarak hayatımı kolaylaştıran, deney aşamalarım sırasında yardımını esirmeyen güzel dostum Uzm. Moleküler Biyolog Feyza SÖNMEZ'e,

bütün hayatım boyunca varlıkları ile bana güç veren, aldığım bütün kararlarımın arkasında duran ve beni her konuda destekleyen canım babam Seyfettin KIZILTAŞ'a, canım annem Jale KIZILTAŞ'a ve canım kardeşim Mirac Can KIZILTAŞ'a,

küçük büyük yardımı olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurgül KIZILTAŞ

ÖZET

Mide Kanseri Dokularında Hedeflenmemiş Metabolomiks Teknolojileri Yardımıyla Alternatif Tanı Ve Yöntemlerin Geliştirilmesi

Amaç. Bu çalışmada, kanser kaynaklı ölümlerde ikinci sırada yer alan mide kanserinin tanı ve tedavisinde ayrıca bu kanser türünün mekanizmalarının aydınlatılmasında etkili bir alan olan metabolomiks çalışmaları ile potansiyel biyobelirteçlerin keşfi ve metabolik yolakların karakterize edilmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot. Alınan doku örnekleri sıvı azot içerisinde dondurularak -80 ° C'de saklandı. Ekstraksiyon işlemi için çıkarılan doku örneklerinin tartımı yapıldıktan sonra elektrik homojenizatörde parçalandı. Santrifüj sonrası toplanan süpernatantları vakumlu konsantratörde tamamen kuruyuncaya kadar uçurma işlemi gerçekleştirildi. Doku örnekleri mobil faz içerisinde çözüldükten sonra Q-TOF LC/MS cihazı ile pozitif iyon modunda analiz edildi. Analiz sonuçları çoklu değişkenli veri analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular. LC/QTOF-MS ile analiz edilen kanserli ve kontrol gruplarının sonuçları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı 31 metabolit tanımlandı. Metabolitlerin ilişkili olduğu yolaklar analiz edildiğinde aminoaçil t-RNA biyosentezi, alanine, aspartat, glutamat metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması ve valin, lösin, izolösin biyosentezi ve yağ asidi biyosenteziyle anlamlı derecede ilişkili olduğu görüldü**.**

Sonuç. Tanımlanan 31 tane anlamlı metabolitin tümörlü dokulardaki glutamin seviyesindeki değişiklikler, l-alanin, l-asparajin, l-lösin, l-valin, glisin, l-treonin, gibi amino asitlerin seviyelerindeki değişiklikler, glukoz konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikler, miristik asit, palmitik asit, oleik asit gibi yağ metabolizmasında etkili olan değişiklikler ve C16 sfingan seviyesindeki artışın ileri dönemde yapılacak araştırmalara yol göstereceği kanaatindeyiz**.**

Anahtar Kelimeler. Adenokarsinom, biyobelirteç, , metabolomiks, metabolik yolak, omiks teknolojisi, Q-TOF LC/M**S**

ABSTRACT

Development Of Alternatıve Dıagnosıs And Methods Wıth The Assıstance Of Metabolomıcs Technologıes In Stomach Cancer Tıssues

AİM. The aim of this study is to identify the potential biomarkers and metabolic pathways in the diagnosis and treatment of gastric cancer which is the second most common cause of cancer-related deaths.

Materials and Methods. Tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ° C. After weighing the extracted tissue samples for the extraction process, the electricity was disintegrated in the homogenizer. After centrifugation, the supernatants were collected in the vacuum concentrator until complete drying. Tissue samples were analyzed in the positive ion mode with the Q-TOF LC / MS device after dissolving in the mobile phase. Analysis results were evaluated using multivariate data analysis methods

Results. Results of cancer and control groups analyzed by QTOF-LC/MS were compared and 31 metabolites were identified statistically significant. When the pathways associated with metabolites were analyzed, it was seen that aminoacyl t-RNA biosynthesis, alanine, aspartate, glutamate metabolism, glycine, serine, threonine metabolism and valine, leucine, isoleucine biosynthesis and fatty acid biosynthesis were significantly related.

Conclusion. Changes in glutamine levels in tumor tissues of 31 significant metabolites identified, changes in levels of amino acids such as 1-alanine, 1-asparagine, 1-leucine, 1-valine, glycine, 1-threonine, changes in glucose concentration, myristic acid, palmitic acid We believe that changes in fat metabolism like oleic acid and increase in C16 sfingan level will lead to further research.

Keywords. Adenocarcinoma, biomarker, metabolomics, metabolic pathway, QTOF-LC/MS omix technology,

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CE-MS : Kapiller Elektroforez-Kütle Spektroskopisi

GC-MS : Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

GC : Gastrik Kanser

HP : Helikobakter pylor

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HMDB : İnsan Metabolom Veri Tabanı

LC-MS : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi

MS : Kütle Spektrometresi

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

OPLS-DA : Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi

PCA : Temel bileşen analizi

PLS-DA : Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (

TCA : Trikarboksilik Asit

TIC : Toplam İyon Akımı

QC : Kalite Kontrol

QTOF/LC-MS : Sıvı kromatografisi Dört Kutuplu Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mide Bölümlerinin Şematik Gösterimi 7

Şekil 2.2. Kanser Oluşumunun şematik gösterimi. 8

Şekil 2.3. Omik Teknolojisi Şematik Gösterimi 17

Şekil 2.4. Metabolomiks Yaklaşımlar 20

Şekil 3.1. Genel Deneysel Prosedürün şematik gösterimi 48

Şekil 4.1. Kanserli-Sağlıklı Doku Örneklerinin OPLS-DA Grafiği 55

Şekil 4.3. Doku Örneklerinin Yolak Etki Değerleri 58

Şekil 4.4. Mide kanseri ile ilişkili ana metabolik yollar; L-Glutamin, L-Alanin, L-Asparjin, Glisin, L-treonin, L-serin, L-sistein, L-valin, L-lösin, L-izolösin, L-prolin ... 59

Şekil 4.5. Mide kanseri ile ilişkili Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasında etkili metabolitler C00152(L-asparajin), C00041(L-Alanin), C00064(L-Glutamin), C00025(L-Glutamik asit) 60

Şekil 4.6. Mide Kanseri ile ilişkili Yağ Asidi Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C01571(Kaprik Asit), C06424(Myristik Asit), C00249(Palmitik Asit), C00712(Oleik Asit), C01530(Steroik Asit) 61

Şekil 4.7. Mide Kanseri ile ilişkili Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00188(L-treonin), C00407(L-izolösin), C00123(L-Lösin), C00183(L-valin) 62

Şekil 4.8. Mide Kanseri ile ilişkili Siyanoamino Asit Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00152(L-Asparajin), C00065(L-Serin), C00037(Glisin) 63

Şekil 4.9. Mide Kanseri ile ilişkili Glutatyon Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00097(L-sistein), C00025(L-Glutamik Asit), C00037(Glisin), C00072(Askorbik Asit) 64

Şekil 4.10. Mide Kanseri ile ilişkili Azot Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00064(L-Glutamin), C00162(L-asparajin), C00037(Glisin), C00026(L-Glutamik Asit) 65

Şekil 4.11. Mide Kanseri ile ilişkili Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00188(L-Treonin), C00037(Glisin), C00065(L-Serin), C00097(L-Sistein) 66

Şekil 4.12. Mide Kanseri ile ilişkili Valin, Lösin ve İzolösin Bozulması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00123(L-Lösin), C00407(L-İzolösin), C00183(L-Valin) 67

Şekil 4.13. Mide Kanseri ile ilişkili D-Glutamin ve D-glutamat Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00064(L-Glutamin), C00025(L-Glutamik Asit) . 68

Şekil 4.14. Mide Kanseri ile ilişkili Sfingolipid Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00065(L-Serin), C00836(Sifingonin)..... 69

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kanser Evreleme Sistemi; Primer Tümör 14

Tablo 2.2. Kanser Evreleme Sistemi; Bölgesel Lenf Nodu Metastazı 14

Tablo 2.3. Kanser Evreleme Sistemi ; Evre 14

Tablo 3.1. Hasta Bilgileri 49

Tablo 3.2. Gradiyent Elüsyon Zaman Çizelgesi 51

Tablo 4.1. Doku örneklerinde tanımlanan metabolitler 54

Tablo 4.2. Metabolom Analizinde Doku Örneklerinin Yolak Analizi 57

1. GİRİŞ

Vücudun en küçük canlı yapıtaşı olan hücrelerin temel özelliği bölünüp çoğalmasıdır. Bölünüp çoğalan hücreler dış veya iç faktörlerden dolayı değişime uğrayarak kontrolsüz bir şekilde büyüme ve yayılma göstererek kötü huylu olarak karakterize edilen kanser oluşumuna sebep olur.[1] Dünya çapında, çağın hastalığı olan 20 kanser türü coğrafi değişkenliğe bağlı olarak Uluslararası Kanser Araştırma Ajansları tarafından 2018 yılında bir durum raporu halinde sunulmuştur. Bu rapora göre 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon kanser sebebiyle ölüm olacağını ileri sürmüşlerdir[2]. Kanserin oluşumu kalıtsal mutasyonlar, radyasyon, yaşam koşulları, beslenme alışkanlıkları, metabolizmadan kaynaklanan hormanlara bağlı olduğu bilinmektedir. Bu faktörler hızla değişkenlik göstermektedir.[1-3]

Kanserin bir türü olan mide kanseri ise genellikle mide de mukoza zarında gelişir. Mide kanserinin %90'ı adenokarsinomdur. %10'unu ise lenfoma, karsinoid, sarkomlar, stromal tümörler, neuroendokrin ve midenin metastatik tümörlerden oluşturur. Adenokarsinomların %50'i kadarının yerleşme yeri antrumdur.[4] Dünya çapında önemli bir kanser olmaya devam eden mide kanseri en sık rastlanan 4. kanser türü olup en ölümcül 2. kötü huylu tümördür. 2018'de 1.000.000'in üzerinde yeni vakaya ve küresel olarak her 12 ölümde 1'e karşılık gelen 783.000 ölüme sebep olmuştur. Teşhis edilen kanserler cinsiyete göre değişiklik göstermektedir. Mide kanserinde erkeklerdeki oranlar kadınlara göre 2 kat daha yüksektir. Ülkemizde mide kanserinin epidemiyolojik özellikleri hakkında geniş ve güvenilir veriler bulmak zordur.[2]

Mide kanseri genellikle asemptomatiktir ve erken evrelerinde spesifik olmayan semptomlara neden olur. Bu nedenle, mide kanseri genellikle daha ileri bir aşamada tespit edilir ve ilerlemiş mide kanseri olan hastalarda kötü prognozlar görülmektedir. İleri kanserli hastaların prognozu, yüksek nüks oranı ve lenf nodu invazyonu, peritoneal

implantasyon ve karaciğer metastazı gibi metastatik özellikleri nedeniyle hala kötü kalmaktadır.[3] Yani daha şiddetli semptomlar ortaya çıktığında genellikle vücudun diğer kısımlarına metastaz yapmış olur.[4] Erken evre mide kanseri için yaygın olarak kullanılan tarama yöntemlerinden biri olan endoskopi, invaziv olup sonuçlar kesin değildir. Erken evre mide kanseri taramasında noninvaziv yöntemlere ve daha etkili tümör biyobelirteçlerine ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, günümüzde erken teşhis için onaylanmış, spesifik ve duyarlı bir biyolojik belirteç bulunmamaktadır.[4] Hastalığın erken teşhis yöntemlerinin iyileştirilmesinde en etkili yol, erken dönemde GC karsinogenezisin ve metastazın öngörülmesidir bunun da doğru bir şekilde yapılması ve optimal tedavinin planlanması gereklidir. Dolayısıyla diagnostik tarama yöntemleri için spesifik biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyolojik Belirteçler (Biyobelirteçler) belli bir fizyolojik durumu kesin olarak tanımlayan biyolojik işaretlerdir. Bu işaret, ölçülen bir veya birden fazla bileşenin sayısal veya görsel değeri olabilmektedir. Biyobelirteçler belirli bir hastalık durumunun taranması, tedavi altındaki hastaların izlenmesi, bir hastalık durumunun tekrar nüksetme ihtimalinin belirlenmesi ve hatta bir hastalığın oluşma riskinin yüksek olduğu kişi gruplarının belirlenmesi için kullanılabilir.[5]

Kanser biyobelirteçlerini tanımlamak için hızlı ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkan metabolomiks, biyo-akışkanlardan ve doku örneklerinden (metabolitleri <1 kDa) binlerce küçük molekülün yüksek verimli teknolojiler kullanılarak aynı anda tespit edilmesini, miktarının belirlenmesini ve tanımlanmasını sağlamaktadır.[6] "Omics" araştırmasının nihai hedefi olarak kabul edilen metabolomik hastalığın arkasındaki olası mekanizmalar hakkında derin bilgiler verir.[7] Farklı hastalıklarda ve kanser araştırmalarında kullanılan bu uygulama yavaş yavaş genomik ve proteomik için tamamlayıcı bir teknik haline gelmiştir. Genom projesi ile çoğu insan genomu, transkripti

ve proteom verileri bilinmektedir fakat metabolomiksteki en önemli sınırlama, insan metabolomunun henüz çok iyi karakterize edilmemiş olmasıdır.[6-8]

Bir biyolojik örnekteki metabolitlerin (metabolik ara ürünler, hormonlar, sinyal molekülleri, sekonder metabolitler) yani hücrede bulunan düşük molekül ağırlığına sahip molleküllerin tümüne metabolom denir. Metabolom terimi ilk olarak 1998 yılında ortaya atılmıştır. Metabolom, organizmanın genotipine, fizyolojisine ve çevresine bağlıdır. Metabolik ürünler hücresel gen ifadesinin nihai ürünleri olduğundan, tümörlerin büyümesi ve gelişmesi anormal metabolik süreçlerle yakından ilişkilidir. Gen ekspresyonundaki küçük değişiklikler, organizmadaki metabolitlerin miktarını ve çeşitliliklerini etkilemektedir. Bütün bunlar genotip-fenotip ve genotip-çevre arasındaki ilişkinin incelenmesi için araştırmaların kapsamını daha da genişletebilir.[9]

Metabolomik analiz, çalışma durumuna bağlı olarak farklı stratejileri kapsamaktadır. Bütün uygulanan stratejiler hedeflenmiş ve hedeflenmemiş analizler arasında ayrım yaparak basitleştirilmektedir. Hedeflenmiş metabolomiks çalışmaları bir metabolitin ya da daha sıklıkla kimyasal olarak benzer metabolitlerin küçük bir grubunun kalitatif ve kantitatif çalışmasını amaçlayan hedef analizidir. Hedeflenmiş metabolomiks yaklaşımına en iyi örnek diyabette kan şekerinin belirlenmesi ve koroner kalp hastalığında kolosterol düzeyinin ölçülmesidir. Böylece aslında tek tek metabolitlerin yıllardır hastalık teşhisinde kullanılmış olduğu görülmektedir.[10]

Hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarında ise belirli bir biyolojik sistemdeki mümkün olan en fazla metabolitin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Tespit edilmesi muhtemel metabolitler hakkında önceden herhangi bir bilgi yoktur. Önemli metabolitlerin, analizinden önce bilinmeyen tanımları olduğu gibi, genellikle geniş bir değişkenlik aralığını kapsayan fiziko-kimyasal özellikleri olduğu sonucuna varmışlardır.[10] Bütün bunlardan dolayı hedeflenmemiş metabolomiks analizinde mümkün olan en fazla

metabolit tanımlanır ve elde edilen veriler kullanılan algoritma programlarının sonuç vermesiyle yorumlanır.[10, 11]

Metabolik çalışmalar da hiçbir ayırma tekniği kullanılmadan ham olarak –NMR, MS, FT-IR Spektroskopisi ile birçok veri elde edilebildiği gibi GC-MS, LC-MS, MALDI-TOF MS Kapiller elektroforez-kütle spektrometresi (CE-MS), Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FTICR) –MS, Q-TOF LC/MS gibi birbirini tamamlayıcı analitik platformların bir kombinasyonu kullanılarak geniş bir metabolit yelpazesinin tespit edilmesi de sağlanılabilir.[10]

Bilinmeyen yapıların aydınlatılmasında son zamanlarda sıklıkla kullanılan Q-TOF LC/MS küçük moleküller için üretilen parça iyonları sayesinde doğru kütle ölçümünü en hassas şeklide gerçekleştirir. Çoklu yüklü iyonların yük-durum tanımlamasını ve izobarik türlerin daha fazla farklılaşmasını sağlar ve bu da veri toplama kabiliyetini artırarak daha fazla sonucun açığa çıkmasında katkıda bulunur.[12]

Mide kanseri teşhis, tanı ve prognozu için kullanılan geleneksel yöntemlerin dışında metabolomiks alanında yapılan çalışmalar pratik çözümler sunabilir. Yaptığımız çalışmada hedeflenmemiş metabolomiks analizi için ideal bir şekilde numunenin toplanması, saklanması ve iyi bir numuneyi hazırlama yöntemi amaçlanmıştır. Numune mümkün olduğunca orijinal metabolit bileşimlerini korurken, tekrarlanabilir, basit, hızlı şekilde verilen analitik platform ile uyumlu bir forma dönüştürülmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada mide kanseri teşhisi konulmuş ve cerrahi müdahale kararı alınmış hastalardan alınan doku örneklerinin homojenizasyonu sonrasında kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile proteinleri çöktürüp metabolitleri çözeltiden çekerek, yüksek kütle çözme gücünden dolayı tamamlayıcı bilgiler sağlayacağı düşünülen Q-TOF LC/MS analitik tekniği ile ölçümler yapılmıştır. Kanserli ve kontrol olmak üzere 38 tane örneği

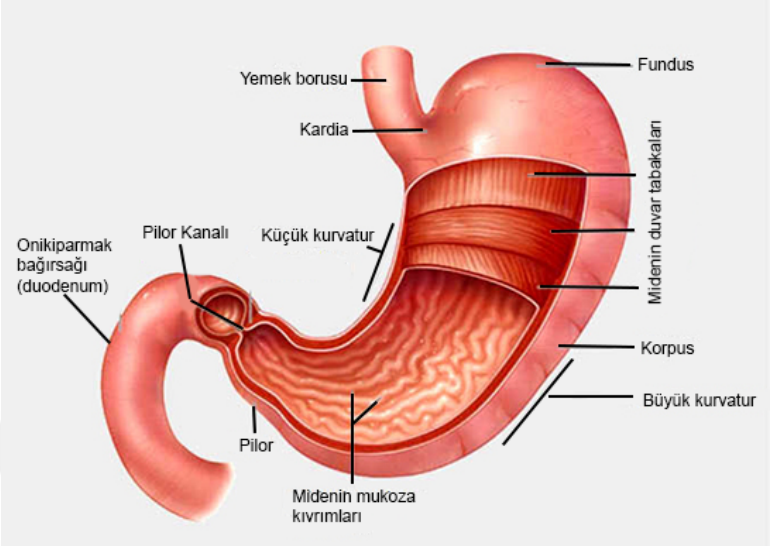
istatiksel olarak karşılaştırarak yeni yolakları belirlenmesini ve potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanması amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide ve Mide Kanseri

Mide, sindirim sisteminin kese şeklinde genişlediği yemek borusu ile ince bağırsak arasında yer alan sistem organıdır. Besinleri depolar, karıştırır ve sindirir. Diyaframın altında, karın boşluğunun sol üst bölgesinde yer alan mide kardiya, fudus, pilor, antrum, korpus diye bölgelere ayrılır. Midenin yemek borusuyla açılan üst kısmına mide ağzı (Kardia); midenin ince bağırsakla açılan alt kısmına da mide kapısı (Pilor) denir. Böylece mideye geçen besinler yemek borusuna tekrar gelmez veya aynı şekilde enine, boyuna ve çapraz şekilde bulunan düz kaslar vasıtasıyla mekanik sindirime ve mide de bulunan sıvılar sayesinde kimyasal sindirime uğrayarak kimüs(bulamaç) haline geldikten sonra bağırsağa gönderilir ve tekrar bunlar mideye geçmez yani mideye yapılan giriş çıkışlar kontrol altında tutulur. Mide ile özofagus (yemek borusu) arasında mide de bulunan içeriğin yukarı çıkmasına engel olan sisteme kardiyo özofageal sfinkter sistem denir. Midenin dış yüzeyi bağ dokusu ve periton adı verilen zarla örtülüdür. İç yüzeyini ise kaplayan mukoza tabakasında mukus ve sindirim için gerekli sıvıları salgılayan çok sayıda tüp şeklinde salgı bezleri bulunmaktadır. Mide mukozasında kardiya, fundus, korpus ve antrum olmak üzere dört farklı bölge bulunmaktadır. Salgı bezleri mide de bulunan bu bölümler de farklı nitelik ve biçimlerde salgılanırlar. Midenin farklı bölümlerinde farklı nitelik ve biçimlerde bezlerin salgıladığı sıvılara mide öz suyu denir. Mide öz suyunda ihtiva eden maddeler asidik bir ortam oluşturarak pepsinojeni aktif hala getiren ve bazı mikropları yok eden HCL, midenin asitli ortamlardan korunması ve hidroklorik asitin zararlı etkisinden korumak için bulunan mukus, az miktarda lap enzimi, proteinin kimyasal sindirime uğramasını sağlayan pepsinojen enzimi, organik ve inorganik maddelerdir. Besinler ağızda sindirime başlamışken vagus siniri ile mide bezlerini uyarak gastrin hormonunu salgılanarak mide çalışır.[13]

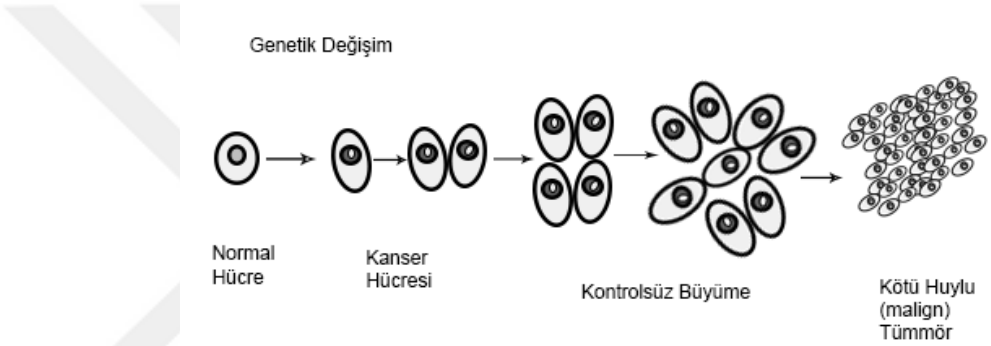
Mide ile yemek borusu arasında mide içeriğinin yukarı kaçmasına engel olan fonksiyonel bir sistem vardır (kardiyo özofageal sfinkter sistemi).



Şekil 2.1. Mide Bölümlerinin Şematik Gösterimi

Hücre insan vücudunda en küçük canlı yapıtaşı olmasının yanı sıra farklı görevler üstlenerek bu görevleri planlı bir şekilde yerine getirdiği için fabrikaya benzetilebilir. Tüm bu süreç hücrenin merkezinde bulunan çekirdek tarafından kontrol edilir. Çekirdekte bulunan DNA hergün farklı etkilere maruz kalarak zarar görür fakat vücudumuzu bu zararlara karşı korur ve tamir eder. Bazı iç ve dış faktörlerden dolayı değişime uğrayan hücre mekanizması bu hasarları onaramayacak hale gelir ve DNA'daki hasarlar birikmeye başlar bunun sonucu genlerin herzaman ki özelliklerini yitirerek kontrolsüz bir şeklide çoğalmasıyla çağımızın önemli sorunu haline gelen kanser meydana gelir.[14] Zarar gören hücredeki DNA bunu onaramazsa, gerekli hücre içi sinyalleri gönderemezse ve hücre yaşlanırsa apopitoz adı verilen hücre ölümüne gider fakat kanserli hücreler sağlıklı hücrelere göre farklı bir mekanizmada çalıştıkları için kanserli hücreler apopitozdan kaçarlar ve kontrolsüz olarak büyür, bölünür, yeni damarlar oluşturur, başka dokulara

yayılmaya (metastaz) devam ederler. Kanser hücrelerinin sayılarını artırarak biriktirmesi sonucu hücre grupları veya başka bir ifadeyle sağlıksız dokuları oluşturması tümör olarak adlandırılmaktadır. Tümörler iyi ya da kötü huylu olarak bulunabilirler. Kötü huylu (malignant) tümörler, kan dolaşımı ve lenf sistemine karışarak tümörün asıl bulunduğu yerden uzaklaşarak vücudun diğer bölümlerindeki yakın dokulara ve organlara yayılıp büyümeye devam ederler ve bu olaya metastaz denilmektedir. İyi huylu tümörler ise dokulara ve vücudun diğer bölümlerine sıçramazlar.[15]



Şekil 2.2. Kanser Oluşumunun şematik gösterimi.

Mide kanseri, Dünya çapında en sık teşhis edilen 4. Kanser türü olup kanser ölümlerine sebep olan 2. kanser türüdür. Bu kanser türünün insidansı ülkeler arasında farklılık gösterse de genellikle erkeklerdeki mide kanseri kadınlara göre iki kat daha yüksektir. İran, Türkmenistan ve Kırgızistan dahil olmak üzere Batı Asya'da erkekler arasında çok sık rastlanır ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Moğolistan, Japonya, Kore cumhuriyeti gibi Doğu Asya ülkelerinde insidans oranları belirgin bir şekilde yükselmektedir. Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Afrika bölgelerinde görülme sıklığı daha düşük oranlardadır. Bu farklılıkların sebebi bilinmemekle beraber çevresel etkenlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Göçmenler üzerinde yapılan çalışmalar mide

kanserinin coğrafi değişkenliğe bağlı olarak insidans oranlarını etkilediğini belgelemiştir. Japonya'daki ilk nesil Japon göçmenler arasında mide kanseri görülme oranı, Japonya'da yaşayan Japonlar arasındaki oranlardan daha düşük olduğu görülmüştür ve ikinci nesil olan Hawaii doğumlu Japonlarda ise mide kanseri insidansında bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Özofagel-gastrik alana bitişik bölgede ortaya çıkan gastrik kardia kanserleri yani proksimal mide kanserleri yüksek gelirli ülkelerde daha sık görülürken, distal mide kanserleri daha düşük ekonomik gelirli ülkelerde görülür.[2, 15]

Dokunun oluşumu ve gelişimi açısından bakıldığında mide kanserleri iki temel histolojik tipte sınıflandırılır. Lauren'in ileri evre kanserli dokularda çalışmış ve bağırsak tipi özellikler gösterenler, yaygın infiltrasyon ve gelişim gösterenler şeklinde geniş olarak sınıflandırılabileceğini ileri sürmüştür. Bu tipler sırasıyla intestinal tip karsinom yani daha iyi farklılaşmış bağırsak karsinomları ile diffüz tip karsinom yani farklılaşmamış tip karsinomlar olarak sınıflandırmıştır. Yüsek insidansa sahip bölgelerde intestinal tip karsinom görülürken, düşük insidans bölgelerde diffüz tip karsinomlar görülür. Mide kanseri son 10 yılda belirgin bir şekilde azalma göstermiştir ve bu azalmada intestinal tip karsinomlarda görülen azalmaların payı vardır. Mide kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisinin temel bilgilerinin büyük bir kısmı karsinomları ilgilendirir.[16] Mide kanseri genellikle mideyi döşeyen mukus üreten hücrelerde başlar bu tip kanserlere adenokarsinom denir ve mide karsinomlarının büyük çoğunluğu adenokarsinomlardır.[15]

2.2. Mide kanserinde Risk Faktörleri

Mide kanserinin başlaması ve ilerlemesi yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durum, yaşanılan coğrafi bölge, meslek gibi birçok faktörle ilişkilidir ve aynı anda birçok parametreyi kontol altında tutarak mide kanseri etyolojisini açıklamak bu nedenle zordur.

2.2.1. Helikobacter Pylori Enfeksiyonu

İnsan midelerinde gözlenen bakteriler, 1980'lerin başlarına kadar bakteriyel aşırı üreme veya gıda kirleticileri olarak kabul edildi. Tam bu sırada Warren ve Marshall, çığır açıcı deneyleri gerçekleştirdiler ve 100 hastadan 58'inde bir bakterinin tanımlanmasını sağladılar. Birçok şekilde adlandırılmasına rağmen en son helikobakter pylori olarak adlandırıldı. Helikobakter pylor (HP)bakterisi kronik antral gastritin gelişiminde etkili olduğu netleştirildi. Mide de sık sık ve uzun şekilde tekrarlayan iltihap oluşması, mide ve duedonum ülserlerinin sebebinin bu bakteri türü olduğu ve bu bakteri kısa sürede izole edilip, insan da enfeksiyona neden olduğu kanıtlanmıştır. Enfeksiyon, çoğunlukla gastritin şekli ve şiddeti ile ilişkili olan çeşitli bakteriyel, konakçı ve çevresel faktörlere bağlıdır.[17] Dünya nüfusunun yarısından fazlası h.pylori ile enfektedir ve erişkin nüfusu daha fazla etkilemektedir. H.pylori enfeksiyonu prevalansı gelişmekte olan ülkelerde, düşük sosyal tabakada ve temiz olmayan yerlerde fazladır. HP ile sık sık enfekte olan kişilerin bir kısmında aktif kronik gastrit, intestinal metaplazi ve displazi gibi fenotipik değişiklikler görülür. Bu değişiklikler helikobakter pylori'ye ait genlerdeki özellikleri kanser gelişimine sebebiyet verecek değişikliklere yatkın hale getirir. H.pylori bir insan kanserojeni olarak kesinleşmesi gastrik kanser sıklığında mide karsinojenezini ve temporal / coğrafi varyasyonu yorumlamak için yeni bir paradigma getirmiştir.[18, 19] Çinde yapılan bir araştırmada mide kanserinden ölüm oranı ile h.pylori enfeksiyonunun yaygınlığı arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. H.pylori enfeksiyonu mide kanseri epidemiyolojisi kardia ve distal bölgeleri ile histolojik özellikler intestinal ve diffüz kategorilerinden biri veya bir diğeri ile spesifik bir ilişki içindedir fakat yapılan çalışmalarda h.pylori enfeksiyonu distal mide karsinomunun en önemli sebebi olduğunu göstermiştir.[18, 19]

H.pylori'nin konakçı genetik faktörü ve virulans faktörleri kanser riskinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır. H.pylori bol miktarda üreaz enzimini ifade eder.550 kDA ağırlığında bir moleküldür. Üreaz enzimi ve üre transport protein dahil olmak üzere birçok faktör nötr pH mikro-çevre ve organizmanın hayatta kalmasını sağlamak için anahtardır. Üreaz enzimi mide mukozasında bazik bir ortam oluşturarak midenin asit ortamından korunmasını sağlar. H.pylori ise özellikle asidik kolonileşmeye ve hayatta kalmaya uyarlanmıştır.

H.Pylori ile ilişkili çok sayıda virülans faktörü yanında klinik tablo ile yakın ilişki gösteren Cag A ve Vac A geni olan iki loküs saptanmıştır. Epitel hücre içine enjekte olan ve hücre polarizasyonunu bozan bir protein olan CagA taşıyan H.pylori, taşımayanlara göre "intestinal" tip kanser riskine artışa yol açar. H.pylori'ye ait diğer molekül de Vac A geninin kanser gelişimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur.[19]

2.2.2. Beslenme Şekli

Mide kanserinin insidansı ve mortalitesinde görülen önemli farklar farklı sosyoekonik gruplarda ve yaşanılan coğrafi bölgelerde beslenme şeklinin etiyolojik olarak önemli olabileceğini göstermiştir.[20]

a) Tuz

Tuz besinlerin saklanması için yıllar boyu kullanılmıştır fakat yapılan bazı çalışmalar yüksek tuzlu gıdalarla beslenmenin mide mukozasında açtığı hasar ile mide kanseri riskini artırdığını düşünülmektedir.[20]

b) Meyve ve Sebze

Çok sayıda yapılan çalışmalar, taze meyve ve sebzeye ulaşımın artmasıyla mide kanseri insidansında azalma olduğunu göstermiştir. Taze meyve ve sebzelerde koruyucu mikro besinler arasında vitamin ve minerallerin özellikle C vitamini(askorbat) ve A

vitamininin(beta-karoten) vücuda alınmasıyla H.pylori eradikasyonu premalign lezyonların regrasyonunu başarılı bir şekilde artırdığı ve mide kanseri riskini azalttığı düşünülmektedir.[20]

b) N-Nitroso Bileşikleri;

N-nitroso bileşikleri, midede amitlerin veya aminlerin nitritlerle nitrikleşmesiyle, mide suyundaki C vitamini tarafından inhibe edilen bir işlemle yaşayan dokular üzerinde oluşturulan güçlü karsinojenlerdir. Bu güçlü karsinojenler, tütsülenmiş et, tütsülenmiş balık, kızarmış veya ızgara edilmiş gıdalarda bulunur.[20]

d) Sigara Kullanımı

Mide karsinomunun sigara ile arasındaki bağlantı yani prognostik etkileri arasında anlamlı bir ilişki elde edilememiştir. Sadece yapılan bazı çalışmalar sigara kullanımının CagA-pozitif H.pylori enfeksiyonunun etkisini artırdığını öne sürmüştür.[21]

e) Alkol Kullanımı

Mide kanserinin alkol alımı ile ilişkisinde kanserin tam mekanizması belirsiz kalmıştır çünkü etanol tek başına karsinojen değildir fakat etanolün oksidasyonunun metaboliti olan asetaldehitin kanserojen etkileri olduğunu göstermiştir. Fazla içki tüketiminin mide kanserini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.[21]

2.3. Mide Kanserinin Sınıflandırılması

Mide kanseri, klinik olarak erken tanı ve geç tanı olarak ikiye ayrılır. Erken ya da geç karsinom sınıflaması invazyon derinliğine göre belirlenir ve prognoz açısından önemlidir. Erken mide karsinomları lenf nodu metastazına bakılmaksızın mukoza ve submukozaya sınırlanmış invaziv tümörleri kapsar. Mide karsinom, mikroskobik olarak heterojendir ve bu heterojen yapı çok sayıda mikroskobik sınıflandırma yöntemini ileri

sürmüştür. Mide karsinom tipleri ve bunların alt tip isimlerinin çok sayıda olması mide karsinogenezini anlamayı güçleştirmektedir.

Differansiasyon derecesine göre: İyi differansiye, orta derecede differansiye, az differansiye.

Tümör lokalizasyonuna göre: Proksimal ve distal

İleri evre mide karsinomları için en çok kullanılan sınıflama olan Bormann yöntemi Polipoid (tip I), Fungal, kabarık, keskin sınırlı (tip II), ülseröz (sınırları belli olmayan (tip III), diffüz infiltran (tip IV) şeklinde kategorize edilirler.

Mikroskopik olarak en yaygın kullanılan sınıflama olan Lauren yöntemi ise intestinal tip ve diffuse tip diye gruplandırır.

Özefagogastrik bileşke tümörlerinin makroskopik sınıflamasında kullanılan Siewert yönteminde; Özefagus alt uç-barret özefagusu kaynaklı (tip I), kardia (tip II), subkardial-fundik (tip III) diye 3 gruba ayırır.

Namikawa mide karsinom sınıflaması; Gastrik, intstinal, kombine gastrik-intestinal ve sınıflandırılamayan olarak 4 gruba ayırır.

Mide kanserinin evreleme ve sınıflaması için bunlar dışında, WHO sınıflaması, Goseki sınıflaması, Carneiro sınıflaması, Ming sınıflaması gibi birçok yöntem kullanılmaktadır.

2.4. Mide Kanserinin Evrelemesi

Mide karsinom evrelemesinde en çok kullanılan American Joint Committee on Cancer" (AJCC) ve "International Union Against Cancer" (UICC) birlikteliği ile hazırlanmış olan TNM sistemidir. AJCC-UICC evreleme sisteminde tümör derinliği, metastatik lenf nodu sayısı ve uzak metastaz durumu gözönüne alınır.

Tablo 2.1 Kanser Evreleme Sistemi; Primer Tümör

TİS	**Karsinoma in situ**
T1	Lamina propria veya submukoza invazyonu
T2	Muskularis propria invazyonu
T3	Seroza penetrasyonu
T4	Komflu yapıların invazyonu

Tablo 2.2 Kanser Evreleme Sistemi; Bölgesel Lenf Nodu Metastazı

N0	**Yok**
N1	Primer tümörün kenarına 3 cm uzaklıktaki perigastrik lenf nodlarına metastaz
N2	Primer tümör kenar›na 3 cm'den daha uzak perigastrik lenf nodlar› ile beraber gastrik, kommon hepatik, splenik veya çölyak arterlere metastaz

Tablo 2.3 Kanser Evreleme Sistemi ; Evre

0	**I**	**II**	**III**	**IV**
Tis	T1	T1	T2	T4
N0	T2	T2	T3	T1-4
M0	N0-1	T3	T4	N2
	N0	N2	N2	N1-2
	M0	N1	N1-2	M0
	M0	N0	N0-1	M1
		M0	M0	
		M0	M0	
		M0	M0	

2.5. Mide Kanserinde Prognostik Faktörler

Mide kanserinin teşhisinde gecikme nedeniyle prognozu kötüdür. Yüksek bir sağkalım oranına ulaşabilmek için erken evre lezyonlarının belirlenmesi hayati önem taşımaktadır.[22] Mide kanserinde prognoza etki eden faktörler ise hastaya ait faktörler,

tümörle ilişkili faktörler, tedavi ile ilişkili faktörler şeklinde kategorize edilebilir. Hastaya ait faktörler; Cinsiyet, yaş, vücut kitle indeksi, kan grubu ve kan transfüzyonu, tümörle ilişkili faktörler; tümör okalizasyonu, tümörün boyutu, makroskopik tip, histolojik tip ve diferansiyasyon derecesi, evre, perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu, tedavi İle ilişkili faktörler ise; cerrahi, lenfadenektomi, laboratuar parametreleri ile değerlendirilebilir.[23]

2.6. Kanserin Erken Teşhisinde Biyobelirteçler

Biyolojik belirteçler (biyobelirteçler), Atkinson ve ark tarafından hastalık riskini teşhis etmek, izlemek veya tahmin etmek için kullanılabilecek nesnel olarak ölçülebilir biyolojik özellikler olarak tanımlamışlardır. Biyobelirteçler yıllardır hastalık teşhisinde kullanılmaktadır. Örneğin meme kanseri riski için genetik belirteç olan BRCA1 mutasyonları, diyabeti izlemek için kullanılan kan şekeri, böbrek fonksiyonları için serum kreatin, prostat kanseri için prostat spesifik antijen (PSA) proteini kimyasal belirteçlerdir. Klinik tanının duyarlılığını ve özgüllüğünü iyileştirmek için iki veya daha fazla biyobelirteçleri bir araya getirerek, daha doğru teşhis ve prognozlar üretmenin veya benzer hastalıklar arasında daha iyi ayrım yapmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ortaya çıkan transkriptomiks, proteomiks veya metabolomiks gibi teknolojiler hem birden çok biyobelirteçleri hem de hastalığın erken teşhisi, hastalığın sürelerinin belirlenmesi, hastalığın izlenmesi gibi ihtimalleri yükseltmiştir..[24]

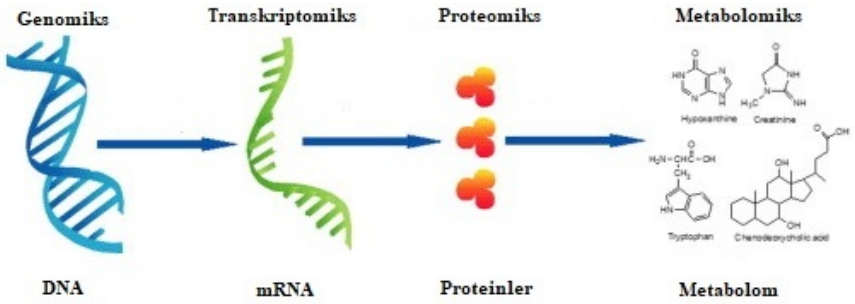
2.7. Omiks Teknolojisi

“Omiks” teknolojileri, bir hücre, doku veya organizmayı oluşturan, tüm evrelerin bütünsel bir görüntüsünü ortaya çıkarmayı benimsemiştir. Bunlar, öncelikle, spesifik olarak genlerin (genomikslerin), mRNA (transkriptomiks), proteinlerin (proteomiks) ve metabolitlerin (metabolomikslerin) evrensel algılanmasını amaçlar. Sistem bilimi ve omiks deneyleri, büyük oranda hipotez güdümlü veya indirgemeci olan geleneksel çalışmalardan farklıdır. Tersine, sistem biyolojisi, hipotez oluşturmayan, herhangi bir

hipotezin bilinmediği, ancak tüm verilerin elde edildiği ve daha fazla teste tabi olabilecek bir hipotezi tanımlamak için analiz edildiği yöntemsel yaklaşımlardır. Bu stratejiler birçok uygulamaya ve çok potansiyele sahiptir. Omiks teknolojisi, normal fizyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması için değil, aynı zamanda tarama, tanı ve prognozda rol oynadığı ve hastalık etiyolojisini anlamamızı sağlayan hastalık süreçlerinde de uygulanabilir. Omiks teknolojisi, eş zamanlı olarak çoklu molekülleri araştırdıkları, biyobelirteç keşifleri sayesinde ortaya çıkmıştır. Omiks araştırmalar, ilaç keşfinde ve toksisitenin ve etkinliğin değerlendirilmesinde giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır.[25]

Genom, bir hücre veya organizmanın toplam DNA'sıdır. Genomiksler ise bir organizmanın genomunun sistematik bir şekilde çalışmasıdır. İnsan genomu 3,2 milyar temel ve tahmini 30 000–40 000 proteini kodlayıcı gen içerir. Geleneksel olarak, genler tek tek ayrıştırılmıştır, ancak son yıllarda mikrodizi teknolojisi büyük ölçüde ilerlemiştir. Transkriptomiks ise, bir hücre veya organizmasındaki toplam mRNA ve translasyon olarak adlandırılan bir işlemde protein sentezi için oluşturulan şablondur. Transkriptom, herhangi bir zamanda aktif olarak eksprese edilen genleri etkiler. Gen ekspresyonu mikrodizomisi, gen aktivitesinin bir özeti olarak mRNA'yı paketlenmesidir. Genomiks ve transkriptomiksde ilerleyen mikroarray teknolojisinde ilerler ve artık tek bir gen veya herhangi bir gen grubu sınırlamasına gerek kalmadan gen topluluğunun davranışı bütün bir halde sorgulanabilmiştir. Proteomiks, bir hücre, doku veya organizmadaki tüm eksprese proteinlerin kümesi olarak tanımlanmaktadır. Proteomiks, hem genlerin hem de çevrenin dinamik bir yansımasıdır ve biyobelirteç keşfi için özel bir vaat olduğu düşünülmektedir çünkü proteinler, hastalık ve hastalık tepkisinde her zamanki gibi etkilenecektir. Proteomiks düşük bolluktaki proteinleri tespit etmesi açısından yetersizdir. Metabolomiksler, genel olarak binlerce küçük molekülün aynı anda izlenmesini ele alır.

Metabolomiksler, genomiks ve proteomikslere tamamlayıcı bir teknik haline gelerek yeni kanser biyobelirteçlerini tanımlamada hızlı ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır.[6, 25]



Şekil 2.3. Omik Teknolojisi Şematik Gösterimi

2.8. Metabolomiks

Genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks dahil olmak üzere bu dört "omiks" ile birlikte sistem biyolojisinin yapı taşları oluşturularak bunların geliştirilmesi ve uygulanması için yoğunlaşılmıştır. "İnsan Genom Projesi" sayesinde hastalık genleri keşfedilerek hastalıkların kişiler arasında neden farklılık gösterdiği, kişilerin taşıdığı hastalık riskleri ve yine bazı kişilerin neden ilaç tedavisine iyi yanıtlar verdiği gibi karmaşık konuları aydınlatmaya katkı sağlayarak genlerin fonksiyonlarını araştırmaya basamak oluşturmuştur. Bunun üzerine, proteomiks ve transkriptomiks çalışmalarına ağırlık verilmiş ve bu veriler elektronik ortama aktarılmıştır fakat bu araştırmalar genotip-fenotip ve genotip-çevre arasındaki ilişkileri aydınlatmada yeterli olamamıştır. Bu bilgileri belirleyen ise hücrede oluşan metabolitlerde saklı olduğu görülmüştür.[26]

Metabolomiks, metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli tanımlanması, nicelleştirilmesi ve karakterizasyonu ile ilgili ortaya çıkan bir "bilim" araştırmasıdır. Metabolom, belirli bir hücre, organ veya organizmada bulunan tüm küçük moleküllü (<1500 Da) metabolitlerin tamamlayıcısı olarak tanımlanabilir yani

metabolom bir biyolojik sistemin fizyolojik, gelişimsel ve patolojik durumu ile ilgili bilgileri gösterebilen, resim olarak düşünülebilir. Metabolitler ise canlıların vücutlarında oluşan tepkimelerin birikmeyerek başka kimyasal bileşiklere dönüşürken oluşturduğu küçük moleküllü (<1500 Da) ara ve son ürünlerdir. Metabolitle incelenen küçük moleküller; peptitler, oligonükleotidler, lipitler, aminler, aminoasitler, streoidler, alkaloidler, ketonlar, nükleozidler, organik asitler, şekerler ve ilaçlardır. İnsandaki metabolitlerin sayısı tam olarak bilinmemekle 200.000'i aştığı tahmin edilmektedir.[8]

Metabolitler, bir hücrenin bakımı, büyümesi ve normal çalışması için gereklidir ve hücre içerisinde birçok farklı yolaklara bağlanmasını sağlayarak metabolomiks profilini eşleştirmede bütünlük sağlar. Belirli bir hastalık durumu için, küçük bir genomik değişim metabolit seviyesinde birçok kez çoğaltılabilir ve niceliksel olarak ölçülebilir. Dokular, idrar, tükürük, beyin omurilik sıvısı ve kan plazması gibi biyolojik örneklerde bulunan metabolitler ölçülebilir ve bu da araştırmacıların spesifik metabolik yolaklarını tanımlamasına izin verir. İdrar, kan plazması ve tükürük gibi akıcı maddeler, minimal invazif yollarla elde edilebildikleri için, çalışmak için en uygun örneklerdir.[27]

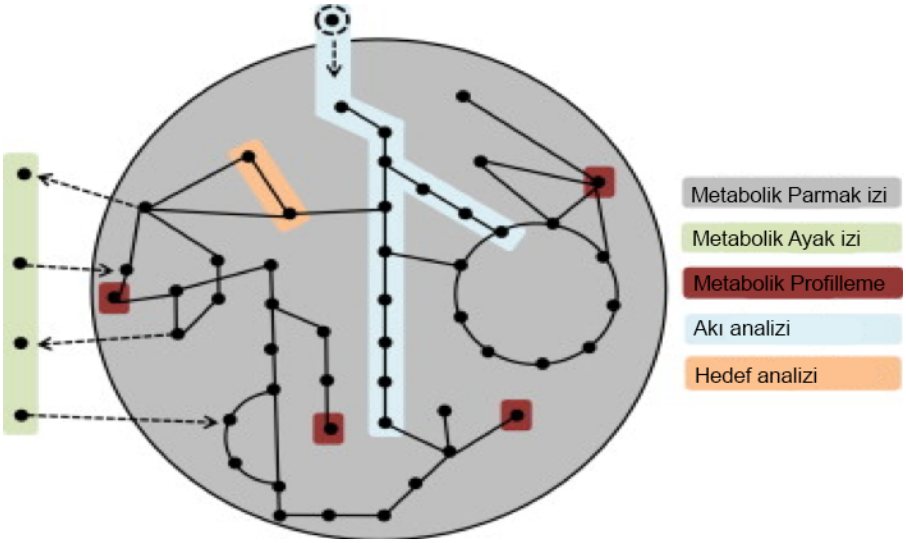
"Metabolom" terimi ilk olarak Olivier ve ark. 1998 yılında, bir organizma tarafından sentezlenen metabolitleri tanımlamak için, genom ve proteoma benzer bir şekilde tarif edildi fakat bu tanım "belirli bir fizyolojik veya gelişimsel durumdaki hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin tümünün kantitatif tamamlayıcısı" olarak sınırlandırıldı.[9] Daha sonra metabolomikler Fiehn tarafından bir biyolojik sistemin tüm metabolitlerinin tanımlandığı ve nicelleştirildiği kapsamlı bir analiz olarak tanımlandı.[28]

Bununla birlikte, metabolik yolakların tek başlarına değil, geniş bir ağın parçası olarak hareket etmediğinin fark edilmesi, metabolit analizinde daha bütünsel bir yaklaşıma duyulan ihtiyacı doğurmuştur.[29]

Metabolomiks alan, kimyasal belirteçlerin taranmasında önemli bir role sahiptir ve bu yaklaşım, hedeflenmiş ve hedeflenmemiş olmak üzere iki ayrı kategorize edilir.

Hedeflenmiş metabolomiks analizlerinde, sadece belirli bir metabolit veya metabolitlerin niteliksel ve niceliksel analizi söz konusudur. Genel olarak spesifik bir yol veya biyolojik bir aktivite ile ilişkili olan bir dizi bilinen nicel metabolitlerin değişikliklerine odaklanır. Sonuç olarak, metabolomun sadece çok küçük bir kısmıyla ilişkilidir, diğer tüm bileşenlerden gelen sinyaller göz ardı edilir. Böylece metabolitin tam olarak ölçülmesini sağlar.

Hedeflenmemiş metabolomiks analizlerinde ise, metabolitler hakkında önceden bir bilgi sahibi olmadan, belirli bir örnek grubunda yani hasta ve sağlıklı gruplar veya aynı hastalığın farklı dereceleri gibi iki grubun karşılaştırılarak mevcut olan tüm olası metabolitlerin veriye dayalı, yüksek verimli ve hızlı analizidir. Çok sayıda farklı istatistiksel yöntemler kullanarak, bireysel metabolitleri ayırt etmeden veya nicelleştirmeden, çok sayıda örneği hızla sınıflandırmayı amaçlar. Bununla birlikte, biyolojik sistemler arasında nispi karşılaştırmalar yapmak için yararlıdır. Tespit edilen metabolitlerin konsantrasyonundaki varlığı, yokluğu veya nispi farkı deney grupları arasında karşılaştırılabilmesini sağlar. Hedeflenmiş analizler ile hedeflenmemiş analizler karşılaştırıldığında, hedeflenmemiş metabolomikslerde daha fazla sayıda değişkene bağlı olarak nicelleştirilmesi mümkün değildir ve metabolitlerin kimliği genellikle bilinmemektedir bu da yeni yeni metabolizma alanlarının ortaya çıkmasını mümkün kılar. Yani hedeflenmemiş metabolomiks çalışmaları yeni biyobelirteç tespiti yapılmasını, farklı metabolomiks yolak analizlerini, ilaç aktivite çalışmalarını amaçlar. [29-31]



Şekil 2.4. Metabolomiks Yaklaşımlar

Metabolik parmak izi yaklaşımı, sistem içerisindeki tüm saptanabilir metabolitlerin geniş bir yelpazede taranmasını içerir. Hedeflenmemiş analiz yaklaşımlarında yaygın olarak kullanılır.

Metabolik ayak izi yaklaşımı, hücreler tarafından metabolit atılımı veya alınımının bir yansıması olan hücre kültür ortamlarında metabolitlerin tabaka analizidir

Metabolik profilleme, spesifik bir metabolik yola ya da bir bileşik sınıfına bağlı, bir grup metabolitin analizine odaklanır. Analiz için metabolit yolları seçilmiştir ve belirleyicileri için spesifik analitik yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yaklaşım metabolizmanın kısıtlayıcı olmayan kapsamlı bir görünümünü sağlar. Metabolit profili en eski ve en köklü yaklaşımlardan biridir ve metabolomiks için öncü bir analiz yöntemi olarak kabul edilebilir. Metabolik profilin sonuçları kantitatiftir.

Akı analiz ise, genellikle bir izotop işaretli karbon olan bir bileşiğin, akıbetini belirlemek için belirli bir yol veya yollar dizisinin takiben niceliksel veri yorumunun yapılmasını sağlar.[30, 32]

2.9. İnsan Metabolom Projesi

İnsan genomunun amacı, insanın evrimini, hastalığın nedenselleşmesini ve çevre ile insanlık arasındaki durumunu tanımlamak, kalıtımlar arasındaki etkileşimi anlamak ve bu katkılardan dolayı tanı ve tedaviyi kolaylaştırmaktı. İnsan Genom projesi ile global bir çalışma yapılarak 2003 yılında insan vücudunda 25.000 civarında gen bulunduğunu ve genomun sadece % 1.1'i eksonlar tarafından bulunurken, % 24'ü intronda bulunurken genomun % 75'i intergenik DNA'dan olduğu açıklanarak bu verilerin tamamı kayıt altına alınarak tamamlanmıştır. Fakat daha sonraki araştırmalar genlerin çok fazla proteini kodlağını ve bu proteinleri değişikliklere uğradığını ortaya çıkardı. İnsan genom projesi sayesinde transkrşptomiks ve proteomiks çalışmaları yapılarak yeni veriler elde edildi fakat hastalığın mekanizmasının aydınlatılmasında bu analizler yeterli olmadığı görüldü.[33] Metabolomiksteki anahtar sınırlama ise, insan metabolomunun henüz çok iyi bir şekilde karakterize edilememiş olmasıdır. 2004 yılında başlatılan, insan vücudundaki tüm saptanabilir metabolitleri (>1 mM) belirlemek ve ölçmek amacıyla İnsan Metabolom Projesi (HMP) için çalışmalar başlatılmıştır. Farklı vücut sıvılarında yüzlerce metabolitin deneysel olarak tanımlanmasına ve ölçülmesine ek olarak, bu çok yıllı proje aynı zamanda önceden tanımlanmış tüm metabolitlerin geri doldurulması, doğrulanması ve bu bilgilerin elde edilmesini amaçlamaktadır.

HMP ile insan vücudunda > 1 mM konsantrasyonlarında bulunan tüm metabolitleri, bunların ilişkili enzimlerini veya taşıyıcıları ve bunların hastalıklarla ilgili özellikleri hakkında kantitatif, analitik veya moleküler ölçek bilgisine odaklanan çok amaçlı bir biyoinformatik-keminformatik-tıbbi bilişim veritabanı olan HMDB(İnsan Metabolom Veri Tabanı) kullanılarak bir kütüphane (Human Metabolome Library-HML)oluşturulması amaçlanmıştır. Kolayca erişilebilir, deneysel olarak doğrulanmış,

tam olarak referans verilen, kolayca araştırılan, kolayca yorumlanabilen ve insan metabolizmasının mümkün olduğunca fazla kısımlarını kapsamaktadır.

Veriler ve gerekli alan bilgisi genişliği, HMDB'nin hem zor hem de fazla zaman harcanmasıyla bir araya getirildi. Bu kapsamlı veri koleksiyonunu derlemek, onaylamak için iki düzineden fazla ders kitabı, birkaç bin dergi makalesi, yaklaşık 30 farklı elektronik veri tabanı ve en az 20 kurum içi veya web tabanlı program, önceki iki yıl boyunca bireysel olarak araştırılmış, erişilmiş, karşılaştırılmış, yazılmış ve yayınlanmıştır. Ayrıca, 2100'den fazla doğrulayıcı NMR ve MS spektrası toplanmış, 160 deneysel çözünürlük belirlemesi yapılmış, 75 organik sentez tamamlanmış ve yüzlerce yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayırımı yapılmıştır.

HMDB şu anda 27 700'den fazla farklı eş anlamlılığa bağlı, 2180'den fazla insan metaboliti girişini içermektedir. Bu metabolitler ayrıca 115 metabolik yolakla, 2080 farklı enzime, 110 000 SNP'ye ve ayrıca 862 metabolik hastalığa (genetik ve kazanılmış) bağlantılıdır.[8, 33]

2.10. Metabolomiks Teknolojisinin Kullanım Alanları

Metabolizma teknolojisinin hızlı gelişimi ve metabolomiklerin araştırma çabalarına dahil edilmesiyle, artık uzmanlar tarafından tam olarak ele alınamayan temel soruları yanıtlamak mümkün. Bakterilerden insana, bu prensibin örnekleri, analitik kimyadaki olağanüstü yeni gelişmelerle mümkün kılınan bir hızla gerçekleşmektedir.

Bakteriyel genomdaki genlerin Siew ve ark.[34] tarafından yapılan araştırmalar sonucu en az % 30-50'sinin yanlış açıklandığı veya bilinmeyen bir fonksiyon olduğu ortaya çıkmıştır. Küçük molekül imzalarının, bu genlerin işlevini belirlemesinde metabolomiks çalışmaları kullanılmaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir metabolomiks çalışmaların da Martin ve ark. geleneksel farelerde normal bağırsak florası kolonizasyonunu mikropsuz farelerde, insan

bebek bağırsak florası kolonizasyonuyla karşılaştırmak için hem NMR hem de MS teknolojilerini kullanmıştır. İnsan distal bağırsak mikrobiyotaları üzerinde metabolomiks çalışmaları önemli rol oynamaktadır. Yapılan bu mikrobiyota çalışmaları ile lipitlerin depolanması, aynı zamanda enerjinin diyetten çıkarılması gibi sonuçlara varılmıştır ve bu da dengeli ve iyi adapte edilmiş bir mikroflora üretmek bazı hastalıkların önlenebileceğini ileri sürmüştür. Yapılan çalışmalar doğrultusunda gıda kalitesinin doğrudan metabolom bileşimine bağlı olduğu görülmüştür.[35]

Bitkilerin metabolomlarında 200.000 molekül tespit edileceği tahmin edilmiştir. Bitkilerin biyokimyası özellikle insanları sağlığı ve rehafı ile ilgilidir. Metabolomiksler bitki metabolizmasını, fizyolojisini ve gelişimini incelemek ve değiştirmek için yol gösterir.

Metabolomiksler, gen eksikliği ve nükleer reseptörlerin aktivasyonunda moleküler parmak izlerini bulmak için kullanılmaktadır.[36]

Metabolizmanın önemli bir rol oynayabileceği başka bir alanda ilaç metabolizmasında ve toksisitesinde kişiden kişiye değişkenlik çalışması olan ilaç geliştirme alanı farmakogenetiktir.

Metabolik potansiyeli belirlemek için, kanserin moleküler epidemiyolojisini anlamada büyük bir değere sahip olan metabolomikslerin başka bir kullanım alanıdır.

Son zamanlarda, transgenik fare çizgilerinin kullanımı, ilaç ve kimyasal toksisiteye, ilaç-ilaç etkileşimlerine, karsinojenez mekanizmalarına ve kanser kemoterapisinde metabolizmanın rolüne ve aynı zamanda hassas biyolojik belirteçler geliştirmeye yol açan yolları daha iyi anlamak için bu teknoloji önemli sonuçlar vermektedir.

Metabolizmanın insan sağlığına olan öneminin yapılan bu tür çalışmalarla daha fazla tanınması ve 2004 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH, ABD) tarafından metabolomiks temanın oluşturulmasıyla kanıtlanmıştır.[29, 37]

2.11. Kanser Araştırmalarında Metabolomiks

Kanser araştırmaları, pek çok gelişmelere ve katkılara rağmen yine de kanserin işlevini açıklamak için yeterli olmamıştır bundan dolayı yapılan çalışmalar büyük hızla devam etmektedir. Özellikle kanser metabolomu üzerine yapılan araştırmalarda, metabolit konsantrasyonlarındaki küçük değişikliklerin izlenebilir olması biyolojik fonksiyona göre fenotipik değişimleri ortaya çıkarmanın en iyi yolu olabilir bu da metabolomiksin diğer alanlarda olduğu kadar kanser araştırmalarında da en hızlı gelişen disiplinlerden biri olduğunu göstermektedir. Kanser metabolizmasının normal dokudan farklı olduğu, 1950'lerde Otto Warburg tarafından, karaciğer kanser hücrelerini normal karaciğer hücrelerine göre karşılaştırarak yapılan araştırmada önemli bir hipotezin kanser hücrelerinin fizyolojik oksijen seviyeleri altında bile enerji kaynağı olarak anaerobik metabolizmaya bağlı olduğunu öne sürdüğü bilinmektedir. Kanser metabolizmasının en önemli özelliği, merkezi karbon metabolizması, glikoliz trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve oksidatif fosforilasyon arasındaki ilişkidir. Normal hücrelerde oksijen varlığı glikolizi inhibe eder, glikoliz işlemi, bir glikoz molekülü iki adenosin 5p-trifosfat (ATP) kazanımı ile iki piruvat molekülü oluşturur. Piruvat daha sonra asetil koenzim A'ya (asetil-CoA), vazgeçilmez olan sitrik asit döngüsüne (TCA döngüsü) girerek dönüştürülür. Sonuç olarak, 38 yeni ATP molekülü üretilir. Kanser hücreleri glikozu verimli bir şekilde kullanmazlar. Pirüvat yerine laktat üretirler fakat bunun kanser metabolizması için tek başına kural olmadığı gösterilmiştir. TCA döngüsünün aşağı regülasyonu ve oksidatif fosforilasyon ile birlikte glikolitik aktivite

artışı gösterdiği yaygın bir anlayıştır ve bu anlayışa göre tümörlerin kanserle ilişkili değişen metabolik enerji yollarına "Warburg etkisi" denilmektedir.

Metabolomiks, yaşam bilimlerinde gittikçe yaygınlaşan bir araç haline gelmeye başladıkça farklı kanser türlerinde yapılan araştırmalar için bir dizi farklı analitik platformlar kullanılarak spesifik biyobelirteçlerin tanısal ve prognoz amaçlı taramalarda kullanılabileceği umulmaktadır.[30, 38]

2.12. Mide Kanseri ve Metabolomiks

Mide kanserinin erken evreleri asemptomatiktir ve erken evrelerinde spesifik olmayan semptomlar gözlemlenir. İleri kanserli hastaların prognozu, yüksek nüks oranı ve lenf nodu invazyonu, peritoneal implantasyon ve karaciğer metastazı gibi metastatik özellikleri nedeniyle hala kötü kalmaktadır. Bu nedenle, hasta prognozunu iyileştirmenin en etkili yolu, erken dönemde GC karsinogenezisin ve metastazın öngörülmesidir. Bu sebeplerden dolayı mide kanseri tanısı ve prognozu için çeşitli biyobelirteç çalışmaları hız kazanmıştır. Bu biyobelirteçler mide mukozasında taranabilir ve klinik olarak anlamı olabilecek başarılı biyobelirteçlerin ortaya çıkması ile günümüzde kullanılan endoskopi ve biyopsi gibi invaziv prosedür içeren yöntemlere alternatif olmuştur. Mide kanseri için yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasında serum, idrar, plazma, tükürük, beyin omurilik sıvısı ve tümörlü, tümörsüz dokularda dahil olmak üzere birçok farklı vücut sıvılarında çalışmalar yapılmaktadır. Biyobelirteçlerin hastalıklar için tespiti ve etkisi karmaşık bir süreçtir.[3] Mide kanseri için yeni biyobelirteç keşiflerinde, örnek toplama, depolama ve farklı birçok analitsel teknikler kullanılır ve elde edilen metabolomiks verileri analiz etmek için çok sayıda istatistiksel yöntemler kullanılarak sonuçlar yorumlanır. Yüksek kalite de sonuçlar elde edebilmek, erken evre tanı ve tespiti için bütün bu çalışmalar mide kanserinde önemli bir rol oynamaktadır.[3]

2.13. Metabolitleri Tanımlamada Kullanılan Analitiksel Yöntemler

Metabolomiks deneyler, türün spesifik metabolom büyüklüğü, dinamik aralığı ve farklı biyolojik örneklerde uygulanmasına bağlı olarak birçok faktör göz önüne alındığında bir veya daha fazla farklı analitik platformlar kullanılabilir. Tümörlü ve normal hücreler arasında farklı davranan anahtar yollar arasında glikoliz ve pentoz fosfat yolu, nükleotid ve protein biyosentezi, lipit ve fosfolipit devri, TCA döngüsü ve redoks stres yolları yer alır ve bundan dolayı örneklerde gözlemlenebilecek tüm bileşikleri tespit ederken tek bir platform kullanılamayabilir, bu nedenle tekniklerin bir karışımı kullanılmalıdır. Böylece biyolojik örneklerde tespit edilmesi mümkün olan metabolitlerin sayısı artar, kanserin fenotipini incelemek için uygun bir seviyeye doğru geliştirilir ve kanser tedavisi için potansiyel hedefleri ortaya koyar.

Metabolitler genel olarak inorganik olmasına rağmen amino ve yağ asitleri, karbonhidratlar, vitaminler, lipitler ve birçok elementel türler içerir. Proteomiks ve transkriptomiks ile karşılaştırıldığında çok çeşitli atomik düzenlemeler oluşturur ve bu da moleküler ağırlık, polarite, çözünürlük gibi kimyasal özellikleri ile uçuculuk gibi fiziksel özelliklerinden dolayı geniş çeşitlilik sağlar. Metabolomiks uygulamalar, mikroplarda, bitkilerde ve hayvanlarda, genomiks ,proteomiks ve transkriptomiks tekniklerine tamamlayıcı olarak genişletilmiş birçok farklı uygulamalar da gerçekleştirmektedir.

Omiks teknolojilerinde, metabolit dinamiklerini yansız bir şekilde ortaya koyabilmek, metabolitlerin hızlı, doğru ve kesin analizini sağlamak, biyolojik numunelerin aralarındaki örüntülerini tanımlayabilmek, biyobelirteçlerin tanımlanabilmesi ve ilaç tedavilerinin biyokimyasal sonuçları için kullanılan analitsel yöntemler;

- Kütle spektrometrisi(MS)
- Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi (GC-MS)

- Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ve farklı iyonlaştırma teknikleri kullanılarak elektrosprey iyonizasyonu (ESI-MS) veya daha az tipik olarak atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI-MS)
- Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle spektroskopisi,(UPLC-MS)
- Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi LC-MS/MS
- LC-MS sisteminin uygulama alanları olarak iyon tuzakları,4-Kutuplu Kütle Spektrometresi (Quadropole) ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresidir (TOF),hibrid dört kutuplu (QTOF) analizörleri
- MALDI-TOF-MS
- Kapiller elektroforez-kütle spektrometresi (CE-MS)
- Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FTICR) –MS
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)
- NMR spektroskopisi
- Kapiler elektroforez (CE)
- Raman spektroskopisi

2.14. Mide Kanseri Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan Başlıca Analitiksel Yöntemler

2.14.1. NMR Spektroskopisi

NMR spektroskopisi, en yaygın kullanılan spektroskopik analitik tekniklerinden biri olup, minimum örnek hazırlama gerektiren, hızlı, yüksek verimli ve mikro-molar aralıktaki çok çeşitli bileşikleri benzersiz şeklide eş zamanlı olarak tanımlayabilen bir yöntemdir. NMR spektroskopisi, yüksek verimli bir parmak izi tekniğidir ve NMR bazlı metabolomikler belirli koşullar altında metabolitlerin bütünsel bir görünümü sağlayabilir bu nedenlerden dolayı metabolomiks çalışmalar için uygun ve avantajlıdır. Biyo akışkan veya dokuların analizi için metabolomiks alan dahilinde, NMR, biyomateryalleri

tahribatsız olarak ve zengin yapısal bilgileri ölçmesinden dolayı klinik ve farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Metabolomların yapısal ve işlevsel karakterizasyonunu geliştirmek için eşsiz fırsatlar sunduğunu yapılan çalışmalar göstermektedir.[39]

Mide kanseri metabolomiks çalışmalarında kullanılan NMR yönteminde, idrar, plazma ve doku örnekleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan mide kanseri için olası biyobelirteçleri tanımlamada fare modellleri üzeinden H-NMR tabanlı metabolomiks çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Mide kanseri tespiti için fareler üzerinde tümörler oluşturulduktan sonra idrar örnekleri toplanmıştır ve endojen metabolitler için hedeflenmiş profil doğrultusunda analizler yapılmıştır. Kanser ve kontrol grupları için NMR spektrumlarının karşılaştırılması değerlendirilmiş ve OPLS-DA ile profillemeyi hedeflemede, TMAO, 3-inoksilsülfat, hippürat, 2-oksoglutarat ve sitrat seviyeleri, insan mide tümörü taşıyan ve normal fareler arasında önemli ölçüde farklı olduğu görülmüş ve bu beş metabolitin yararlı biyobelirteçler olarak kullanılabileceği önerilmiştir.[40]

2.14.2. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektroskopisi iyonları kütle/yük oranını esas alarak sıralayan yüksek seçicilik ve hassasiyet ile metabolitleri tanımlama potansiyeli olan kantitatif analiz yöntemidir. Kütle spektroskopisi ayırma tekniği farklı kombinasyonlarla kullanılarak metabolit ayrışmasına bağlı kütle spektromlarının karmaşıklığını azaltır ve metabolitlerin fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgili ek bilgiler sunar. Metabolit kayıplarına neden olabilen ve örnek giriş sistemine ve kullanılan iyonizasyon tekniğine bağlı olarak, spesifik metabolit sınıfları ayırt edilebilir. Çok sayıda farklı MS analiz yöntemi mevcuttur fakat mide kanseri metabolomiks çalışmalarında en çok kullanılanlar; gaz kromatografisi (GC-

MS), sıvı kromatografisi (LC-MS), kapiller elektroforez-kütle spektroskopisi(CE-MS), gaz kromotoğrafisi-uçuş zamanlı kütle spektroskopisi GC-TOF-MS.(57)

2.14.3. Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS)

Düşük molekül ağırlıklı yani doğada uçucu halde bulunan yağ asitleri, organik asitler ve şekerler bulunduğu metabolitlerin analizi için uygun bir yöntemdir. Kanser çalışmalarında yeni biyobelirteçlerin keşfi için yapılan çalışmalar mevcuttur. Numunelerde tsespit edilen kimyasal aralığı genişletmek için analizden önce genellikle kimyasal türevlendirme yapılmaktadır. GC-MS analizleri her ne kadar hassas, niceliksel, tekrarlanabilir ve alanlarındaki diğer tekniklere göre daha gelişmiş bileşikleri tanımlasa da numulerde yapılan örnek işleme ve farklı fonksiyonel gruplara sahip bileşikler için farklı türevlendimelerin ortaya çıkması spektrumların yorumlanmasını zor hale getirmektedir. [40]

Wu ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada normal ve malign gastrik doku arasındaki metabolomiks profil farkını ve tümör biyobelirteçlerini belirleyebilmek için uygun bir kimyasal türevlendirme ile gaz kromatografisi-kütle spektroskopi analiz yöntemi kullanılmıştır. Erken tanı ve tümör derecelendirmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varmışlardır ve birçok potansiyel biyobelirteç listeleri önermişlerdir.[40]

2.14.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS)

LC-MS uçucu olmayan kimyasallar için kullanışlı olup GC-MS yöntemini tamamlayıcı bir tekniktir. Çeşitli kütle analizörleri kullanarak hem pozitif hem negatif iyon modunda analiz edebilir. Yüksek duyarlılığı ve seçiciliği nedeniyle karmaşık karışımlardaki çok çeşitli metabolitleri hem hedeflenmiş metabolomiks hem de hedeflenmemiş metabolomiks yöntemleri ile analiz edebilen analitik bir cihazdır.[41]

Liang ve ark. [42] gastrik kanser hastalarından tanı ve tedavi için topladıkları idrar örneklerinden duyarlı ve spesifik GC biyobelirteçlerini yüksek verimli sıvı kromotografi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile analiz etmişlerdir. 16 metabolit farklı şekillerde eksprese edilmiş ve bu nedenle insan GC'si için potansiyel idrar biyobelirteçleri olarak hizmet edilebildiği görülmüştür. Yapılan araştırmada karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir ve eşleştirilmiş kontrol deneklerinden GC'li hastaları açıkça ayırt etmek için şekil tanıma yaklaşımı ve ağ analizi birleştirilmiş ve bu ağ analizi ile belirlenmiş metabolitler ve çeşitli biyolojik süreçlerdeki değiştirilmiş metabolik yollar arasındaki yakın bir ilişki olduğu görülmüştür.

2.14.5. Kapiller Elektroforez-Kütle Spektroskopisi (CE-MS)

CE-MS, düşük örnek hacimlerdeki polar veya iyonik bileşiklerin ayrıştırılması ve saptanması için ideal olarak uygundur. CE-MS temelli metaboliks çalışmalarda hem hedeflenmiş hem de hedeflenmemiş yaklaşımlarda kullanılmaktadır. Diğer analitik tekniklerle karşılaştırıldığında daha az kullanılmaktadır. Katyonik, anyonik ve nötr metabolitleri ayırmak için karşılaştırmalı profilleme çalışmalarında üç adet CE-MS yöntemi kullanılmaktadır. Çeşitli analitik tekniklerde, örnek enjeksiyon hacimlerinde çeşitlilikler vardır. CE-MS çalışmalarında enjeksiyon hacmi sadece birkaç nL'dir. Bu da metabolomiks çalışmalarında sınırlı örneklerin analizini (örneğin beyin omurilik sıvısı, doku) kolaylaştırır.[43, 44]

2.14.6. Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (TOF-MS)

Geniş spektrum analizi, geniş bir molekül ağırlık aralığı, kütle hassasiyeti ve kütle çöznürlüğü, duyarlılık, hızlı kazanım ve artan dinamik aralığından dolayı metabolomiks alanında önemli yere sahip olmaya başlamıştır. Bir TOF aparatı ile birleştirilmiş diğer

analitik platformlar son zamanlarda metabolomiks çalışmalarındaki analizler için gerekli olan kütle doğruluğu ve çözünürlük seviyesine ulaşmıştır.[45]

Jiye Aa ve ark.[46] tarafından yapılan bir çalışmada gastrik kanser (GC), postoperatif GC hastaları ve kronik superficial gastritli (CSG) kontrol hastalarından alınan doku ve plazmadaki metabolitleri belirleyebilmek için GC-TOF/MS cihazı kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar toplam iyon akımı (TIC) profilleri ile gösterilmiştir. Kromatogramların görsel incelemesi, dokular ve plazmalar yani GC hastalarının ve CSG kontrollerinin dokuları, GC hastalarının plazma ve CSG kontrolleri ile GC hastalarının ve postoperatif GC hastalarının plazma arasındaki farklılıkların ortaya çıktığı görülmüştür. Yapılan bu çalışma mide kanserinin klinik tanısı için alternatif bir yöntem olacağı düşünülmüştür.

CE-TOF/MS metabolik çalışmalarda kansere özgü çeşitli metabolik özellikleri tanımlaya yardımcı olduğu için kullanılan analitik tekniklerden biridir.

Hirayama ve ark.[47] kolon ve mide kanserinde kantitatif metabolom profili için 16 kolon 12 mide kanseri hastasından elde edilen tümörlü ve normal dokulardaki seviyeleri aynı anda ölçmek için yüklü metabolitlerin kapsamlı ve kantitatif analizini sağlayan kapiller elektroforezi zamana-göre kütle spektrometresi ile analiz etmişlerdir. CE-TOF/MS kullanımı ile yeni anti kanser ajanlarının geliştirilmesinde güçlü bir araç olabileceğini göstermişlerdir.

Sıvı kromatografisi ile dört kutuplu uçuş zamanı kütle spektrometresi (QTOF-LC/MS) ile yapılan hedeflenmemiş analizler, metabolitlerin karakterizasyonunu kolaylaştırır, geniş bir tarama sağlar, çoğu biyolojik örnekte oran ve tutulma süresini rutin olarak tespit eder. Q-TOF ‘un metabolomiks çalışmalarında en büyük faydası hızdır.[48]

2.15. Metabolomiks Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Mevcut metabolik çalışmalarda yapılan biyomarker analizinde üç önemli adım bulunmaktadır. İlk olarak biyomarker seçimi, hastalıklı ve sağlıklı biyolojik örnekler arasında maksimum ayırt edici gücü sağlayacak özelliklerin en optimal şekilde oluşturulacak alt kümesinin tanımlanmasını içerir. Daha sonraki adım performans değerlendirmesidir. Birinci adımda önerilen biyobelirteçlerin değerlendirilmesini, metabolomlar arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılmasını, spesifik fenotipik özelliklerin karakterize edilmesini ve onaylanmasını içerir. Son adımda ise nihai model oluşturma ile belirli bir hedef popülasyondan ölçülen sonuçlar göz önüne alındığında, seçilen biyobelirteçlerin veya metabolik yolakların sonucunu anlamlı hale getirebilmek için tek bir test skoruyla birleştiren sabit bir matematiksel denklem veya bilgisayar algoritması geliştirmeyi içerir.[49]

2.15.1. Veri Analizi ve Algoritma Seçimi

a) Tek Değişkenli Analiz

Metabolomiks çalışmalarında yapılan deneyler çok değişkenli veriler oluşturmuş olsa da, farklı gruplar arasında artmış veya azalmış olan metabolitleri bireysel olarak test etmek için tek değişkenli analiz yöntemleri çoklu hipotez konuları ele alınarak kullanılabilir. Bu testler en yaygın şekilde kullanılan varyans analizi ANOVA, t-testleri, z-testleri gibi parametrik yöntemler içerir. Elde edilen verilerin normal dağılımı kabul edilmediğinde ise Kruskal-Wallis testi kullanılabilir veya veri setinin logaritması alınarak verilerin normal dağılıma yöntendirilmesi sağlanabilir. Tek değişkenli veri analizinde, tek moleküllü seviyede çok küçük farklılıklar varsa çoklu molekül kombinasyonları ile sistem düzeyinde tanımlanabilir fakat gruplar arasında ayrım yapamaz. Bu yüzden tek değişkenli analizlere dayalı biyobelirteç seçimi yapmak uygun değildir, çünkü tek birçok

değişkenli modelde birleştirildiğinde, izolasyonda anlamlı olmayan metabolitler ortaya çıkar. Tek değişkenli analiz sadece çok sayıda ölçülmüş analitin yalnızca araştırılan koşullar altında en güçlü cevabına indirgemek için kullanılır. Tek değişkenli veri analizi yöntemi her geçen gün geliştirilmektedir.[31, 49]

c) Çok Değişkenli Analiz

Metabolomiks veriler çok değişkenli verilerden oluşmaktadır. Çok değişkenli analizlerde sadece farklı gruplar arasındaki tek metaboliti değil, aynı zamanda tek moleküller arasındaki yapıları da kullanmayı amaçlamaktadır. Metabolik alanda uygulanan çok değişkenli analiz teknikleri; temel bileşen analizi (PCA), kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) ve küme analizidir.

Temel bileşen analizi PCA, bir veri kümesindeki değişkenleri, daha az sayıda karşılıklı olarak birbiriyle ilişkili ana bileşenler (PC) ile açıklamaya çalışmak ve boyut indirgemek için kullanılan yaklaşımlardan bir tanesidir. PCA, gerçek özvektör tabanlı çok değişkenli analizlerde en çok uygulanan analizlerden biridir. Tüm PC'ler doğrusal olarak ilişkisiz bütün değişkenlerin bir değerler kümesine dönüştürülmesi için birbirleriyle ortogonal yani eşlenimli olacak ve açıkladıkları varyans miktarına göre sıralanacak şekilde yapılanmaktadır. Metabolomiks veriler konusunda, ana bileşenler metabolit katkılarının vektörleridir. PCA'daki ileşenlerin sayısı veya kendini organize eden parametreleri optimal olarak tanımlar böylece veriler üzerinde en etkili görsel hale gelmiş olur.

Denetimsiz yöntem olarak kullanılan diğer bir yöntem küme analizidir. Kümeleme analizleri hiyerarşik ve hiyerarşik olmayan yöntemler olarak iki sınıfa ayrılabilir. Her bir örneklemi sınıflandırabilmek ve kümeler arasındaki benzerlikleri yani hiyerarşik küme analizini kullanarak değerlendirmek için küme analizi kullanılmaktadır. Hiyerarşik kümeleme yönteminde bileşenlerin birbirlerine en benzer olanlardan başlayarak

oluşturulan gruplardan daha az benzerlik gösterenlerin daha büyük grup oluşturarak bir grup altında toplanması temeline dayanmaktadır. Hiyerarşik kümeleme yönteminde ise genel olarak değerlendirilir ve gruplandırılır. Her iki kümeleme yönteminde örneklem gruplamalarından bağımsız ölçülen numunelerdeki içsel benzerliklerine göre gruplandırılır ve görselleştirilir.

PLS regresyonu, denetimli doğrusal karışım modelleri sınıfına ait olan, bir matris yanıtı ile tahmini veri setinin optimize edilmesinde kullanılır. Denetimli yöntem olan PLS-DA'nın genel fikri önceden tanımlanmış yanıt yapısı ile güçlü bir şekilde ilişkili olan ayrı metabolit profilleri gibi içsel kalıpları çözmektir. PLS-DA 'da değişken seçimleri yapılırken kullanılan yöntemler de sınıflandırma amaçları için ya önceden belirlenmiş örnek grupları arasındaki ayrımı en üst düzeye çıkaran değişkenleri ortaya çıkarmak ya da bilinen sınıf dağılımının kalibrasyon setine dayanan sınıflanmamış örneklerin sınıf ilişkilerini tahmin etmek için kullanılır yani bu yöntem hem belirli bir model için hangi değişkenlerin seçildiğini belirten bilgileri hem de model performansını optimize etmeyi amaçlamaktadır. [31, 49, 50]

2.16. Mide Kanseri Çalışmalarında Biyobelirteçlerin Keşfi ve Metabolomiks Çalışmaları Üzerine Yapılmış Olan Araştırmalar

1956 yılında Otto Warburg kanserli hücreler ile normal hücreler arasında belirgin bir metabolik fark olduğunu, kanser hücrelerinin aynı anda aerobik glikoliz ve solunum yaptıklarını yani fizyolojik oksijen seviyeleri altında bile enerji kaynağı olarak anaerobik metabolizmaya bağlı olduğunu ileri sürmüştür. Tümör baskılayıcılar ve onkogenlerin genetik değişiklikleri üzerine yapılan çalışmaların yetersiz olduğunu ortaya koymuşlardır ve bunu takiben yapılan araştırmalar üzerine tümör baskılayıcılar ve onkogenlerin metabolizma üzerinde doğrudan etkiler gösterildiği ve kanserin çok çeşitli metabolik süreçleri içerdiği, bunların birçoğunun da aydınlatılmadığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar ile kanser metabolomunun araştırılmasında özellikle metabolit

konsantrasyonlarındaki küçük değişikliklerin izlenebilir olması, bir dizi kanser için tanısal ve prognoz amaçlı taramalarda kullanılabilmesi, spesifik biyobelirteçlerin ortaya çıkabileceği düşüncesi metabolomiks çalışmalarını en hızlı gelişen disiplin olarak kabul edilmektedir.[5, 24, 51]

Yapılan çalışmalar da dokuya özgü metabolik parmak izlerini belirlemek için doku örnekleri kullanılabileceğini, belirli hastalıkları incelemede başarılı sonuçlar vereceğini ve tıp, toksikoloji ve çevre bilimleri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmalarda örnek hazırlama için doğrulanmış bir örnek hazırlama olmadığı gözlemlenmiş ve bu çalışmaların devamı olarak 2007 yılında Lin ve ark. balık, karaciğer ve kas dokuları üzerinde iki farklı laboratuvarda aynı örnek hazırlama protokollerini kullanarak bir karşılaştırma yapmışlar ve iki farklı laboratuvarda iki farklı doku üzerinde yaptıkları çalışmanın evrensel olduğunu, sadece bir laboratuvara özgü sonuçlar olmadığını göstermeyi amaçlamışlar. Metabolitlerin öğütülmüş ıslak dokudan, öğütülmüş kuru dokudan ve homojenize ıslak dokudan çıkararak bunlar arasında karşılaştırma yapmışlar. Hidrofilik metabolitler 1 boyutlu (1D) 1 kullanılarak analiz etmişler. 2 boyutlu J-resolved (p-JRES) NMR'nin H nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve projeksiyonları ve ana bileşenler analizi kullanılarak spektrumları değerlendirmişlerdir. Kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin tutarlı olduğunu ve verim açısından ıslak dokuların homojenize edilmesinin daha uygun olcağını ileri sürmüşlerdir.[52]

2009 yılında Hirayama ve ark [47]. tarafından 16 kolon, 12 mide kanseri hastalarından aldıkları tümörlü ve sağlıklı doku örneklerini metabolom analizi için ekstrakte ederek, kapsamlı bir şekilde kantitatif analizini sağlayan kapiler elektroforezi zamana göre kütle spektroskopisini (CE-TOF/MS) uygulayarak metabolitleri elde etmişlerdir. Glikoliz, pentoz fosfat yolu, TCA ve üre döngülerinde midede 95 metabolit,

kolonda 94 metabolit miktarları, aminoasit ve nükleotid metabolizmaları, kansere özgü çeşitli metabolik özellikleri tanımlamışlardır. Her iki kanser türünde de glikoz konsantrasyonları tümörlü dokularda normal dokulara göre daha düşük olduğunu tespit ederek ‘’Warburg etkisini’’ doğrulamışlardır. Tümörlü dokularda glutamin dışında tüm aminoasitlerin birikmesi kanser hücrelerinin enerji üretimini glutamini glutamata haline dönüştürerek kullandığı sonucunu ortaya çıkarmışlardır. Aeorobik solunum üzerinde oksijen seviyesine göre, TCA döngüsü ara düzeylerinde önemli derecede mide de ve kolonda spesifik farklılıklar gösterdiği gözlemlenmiştir. Dokulardaki enerji metabolitlerinin seviyelerini belirlemek için kullanılan CE-TOF/MS ile yeni antikanser ajanlarının geliştirilebileceği, kansere ve organa özgü karakteristik enerji metabolizmasının ortaya çıkarılabileceği gösterilmiştir.

Wu ve ark. [4] 11 erkek 7 kadın toplam 18 mide kanserli hastanın mide mukozasından aldıkları tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri arasındaki metabolomiks profil farkını ve tümör biyobelirteçlerinin bilgilerini elde etmek için (GC-MS) kullanarak çalışmışlardır. Doku örneklerine GC-MS için gerekli olan ekstrakte yöntemleri uygulandıktan sonra % 1 TMCS ve BSTFA ile kimyasal türevlendirme kullanılarak cihazda analizi yapılmıştır. GC-MS ‘de analizi yapılan numunelerden 70 tane sinyal elde edilmiştir. Cihazın kütüphanesi tarafından bu sinyaller belirlenerek listeler haline getirilmiştir. Verilerin normalleştirilmesinden sonra biyobelirteçleri bulabilmek için Wilcoxon rank sum testi kullanmışlardır. Sağlıklı dokularda L-altrose, L -mannofuranose, myo -inositol, tümörlü olmayan grupta daha yüksek seviyelerdeyken, belirlenen diğer metabolitler tümörlü dokularda daha yüksek seviyelerdedir. Diğer metabolik farlılıklarda tümör dokularında invaziv ile invaziv olmayanlar arasında tespit edilmiştir. Mide kanseri çalışmasında tanısal bir model oluşturabilmek için temel bileşen analizi (PCA) kullanılmış alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrileri ile değerlendirilmiştir. Bunun

sonucunda insan mide tümörlerinde valin katabolizmasının metabolomiks profillemede önemli rol oynadığı görülmüştür. Bu çalışmada gastrik kanser örneklerinde serin ve fosfoserin seviyelerinin artmış olduğu ve buna glikolizin sebep olduğu düşünülmüştür. Glikoliz seviyesindeki değişim ve TCA döngüsündeki bozulmaların karbonhidrat metabolizmasındada değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir.

2010 yılında Kim ve ark.[40] yaptığı çalışmada 10 tane kontrol ve kanser grubuna rastgele bölünmüş fare de insan mide kanseri modeli oluşturarak farelerin idrar örnekleri üzerinde kemometrik-metabolomiks yaklaşım ile insan mide kanserinin saptanması için biyobelirteçlerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Farelere insan mide kanseri ksenogreft modeli olarak saline veya AGS hücreleri ile enjekte etmişlerdir. Numuneleri idrar örnekleri üzerinden toplamalarının sebebi invaziv olmaması, metabolitlerin konsantre olması ve örnek hazırlamanın basit olması nedeniyle seçmişlerdir. Toplanan numuneler toksikametabolomiks çalışması için 'H-Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopi kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol ve tümör taşıyan fareler arasında ayrı ayrı kümelenerek gösterilmiş, temel bileşen analizi PCA, kısmi en küçük kareler-diskriminant analizi (PLS-DA) ve (OPLS-DA) için ortogonal projeksiyonlar ile birleştirilen global profilleme kullanılarak sonuçlar yorumlanmıştır. Hedeflenen profilde insan mide kanseri hücreleri taşıyan farelerde kontrol grubuna kıyasla trimetilamin oksit (TMAO), hippurat seviyelerinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine tümör taşıyan farelerde 3-inoksilsülfat, 2-oksoglutarat, sitrat seviyelerinde artış gözlemlemişlerdir ve bunların yararlı üriner biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

2011 yılında Hu ve ark.[53] insan mide kanseri SGC-7901 hücrelerini rastgele 8 tane metastaz grubuna 8 tane metastaz olamayan gruba ve 8 tane de kontrol grubu olacak şekilde 24 tane fare üzerinde model oluşturmuşlardır. Ciddi kombine immün yetmezlik (SCID) fareleri kullanarak metastaz modeli oluşturmuşlardır. Farelerde topladıkları idrar

örneklerini kimyasal türevlendirme yaparak GC-MS cihazında analiz etmişlerdir. Üç grup arasındaki metabolik farklılıklar temel bileşenler analizi (PCA) ile karakterize etmişlerdir. Metastasik olmayan ve metastatik gastrik kanseri ayırt edebilmek için 7 metabolit tespit etmişlerdir. Bunlar PCA analizinin yanısıra ROC analizi ile doğrulanmıştır. Metastaz grubunda alanin, gliserol, L-prolin seviyesini daha düşük bulmuşlardır. Yine metastaz grubunda idrardaki yüksek miyo-inositol seviyesini potansiyel bir gösterge olarak yorumlamışlardır. Butanedioik asit, malik asit ve sitrik asit seviyeleri, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ara maddeleri de mide kanseri farelerinde daha yüksek bulmuşlardır. GC-MS ile elde edilen bu verilerin erken tanı ve metastaz taraması veya mide kanserinin nüksetmesinde önemli bir rol oynayacağını ileri sürmüşlerdir.

Miyagi ve ark. [54] akciğer, mide, kolorektal, meme ve prostat kanseri olan 200 tane hastadan topladıkları plazma örnekleri ile plazma serbest amino asit (PFAA) profillenmesi üzerine çalışmışlardır. Kanser hastalarında PFAA profillerinde değişiklik olduğuna dair bilgiler üzerine PFAA profillerinin tanı için kullanımını araştırmaya başlamışlardır. ‘‘AminoIndex Teknolojisi’’ olarak bilinen PFAA konsantrasyonlarına dayanan bir tanı indeksi oluşturmuşlardır ve ön bilgileri elde etmişlerdir. Hastalardan kolayca topladıkları plazma örneklerini daha sonra aminoasitleri yüksek doğrulukla analiz edebilmek için için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), -elektrosprey iyonizasyon (ESI), kütle spektrometrisi (MS) kullanarak metabolik değişiklikleri tek değişkenli ve çok değişkenli analizler kullanarak kanser hastaları ve kontroller arasında karşılaştırmışlardır. Kanser hastalarının PFAA profillerinde her bir kanser türüne göre değişiklikler gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır. Kanser hastalarının PFAA profillerinde iki tip değişim olduğunu göstermişlerdir. Gözlemledikleri bu farklılıklar birçok kanserde görüülen metabolik değişiklikleri ortaya çıkarırken, diğerleri her bir kanser türüne özgü olduğunu ileri sürmüşlerdir. PFAA profilinin aydınlatılması yönünde yapılan bu çalışma

kanserin erken evre hastalarında, hastalığın doğası hakkında bilgileri ortaya çıkarmasına, kanseri önleme, prognoz, izleme ve tedavisine bir basamak olacağını savunmuşlardır.

Aa ve ark.[46] gastrik kanser (GC), postoperatif GC hastaları ve kronik superficial gastritli (CSG) kontrol hastalarından alınan doku ve plazma örneklerini kimyasal bir türevlendirmeyle hazırladıktan sonra GC-TOF/MS ile analiz ederek metabolitleri belirlemişlerdir. Doku ekstratlarının ve kan plazmasındaki yapılan ölçümleri toplam iyon akımı (TIC) profilleri ile gösterilmiş olup toplam 79 özgün pik tanımlamışlardır. PCA ile plazma ve doku örnekleri iki kümeye ayırmışlar ve buradaki metabolomları ayrıntılı şekilde sunmuşlardır. Plazmadaki metabolik farklılıkların dokulardaki kadar önemli olmadığını ileri sürmüşlerdir. Gastrik kanser hastalarının dokularının metabolizmasında yüksek glikoliz, TCA ve aminoasitler gözlemlemişlerdir. Glukoz, gastrik kanser hastalarının doku ve plazmasında kontrollere göre daha düşük seviyerlerde olduğunu, CSG hastalarının da plazmalarında daha düşük konsantrasyonda olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Üç serbest yağ asidi, heksadekenoik asit, dokosaheksaenoik asit ve heptanoik asit ile β-hidroksibutiratın tepe alanları, GC dokularında CSG dokularından önemli ölçüde daha fazla olduğu sonucuna varmışlar ve bununla birlikte, miyo-inositol-1-fosfat, esterlenmemiş kolesterol ve gliserik asit-2,3-difosfat seviyeleri daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. GC dokularında lipitlerin daha yoğun ayrıştığını ileri sürmüşlerdir. Sonuç olarak GC'i karakterize eden metabolitlerin seviyeleri, hastalardan aldıkları doku ve plazma örneklerinde pozitif bir korelasyon göstermemesi sonucuna varmışlardır.

2011 yılında Ikeda ve ark.[55] özofagus, mide ve kolorektal kanserli hastalardan aldıkları serum örnekleriyle metabolom analizini gerçekleştirmişlerdir. 15 özofagus kanseri hastası, 11 mide kanseri hastası, 12 kolorektal kanser hastası ve 12 sağlıklı gönüllülerden alınan serum örneklerini GC / MS ile ölçmüşlerdir. Kanser hastalarından

alınan örnekler için başka dokulara metastaz olmadığını bildirmişlerdir. GC-MS ile ölçümü yapılan örneklerin TIC kromatogramlarından metabolik parmak izi yöntemi olarak ayrım yapmak için PCA uygulamışlardır. Kanser hastaları ile gönüllü hastalar arasında metabolomik farklılıkları göstermişler ve metabolit profillemeyi ortaya koymuşlardır.58 metabolit tespit etmişlerdir. Daha sonra, her bir kansere özgü metabolitler hakkında bilgi edinmek için PLS - DA kullanmışlardır. PLS - DA yükleme grafikleri ve Steel-Dwass testi ile yapılan istatistiksel değerlendirme ile özofagus kanser hastalarında gözlemlenen malonik asit ve l-serin seviyelerindeki değişimleri ortaya çıkarmışlardır. Mide kanseri hastalarında ise 3 - hidroksipropionik asit ve piruvik asit seviyelerindeki değişiklikleri karakterize ederlerken kolorektal kanser hastalarında l-alanin, glukuronoik lakton ve l-glutamin seviyelerindeki değişimleri rapor haline getirmişlerdir. Sonuçlar daha sonra alıcı işletim karakteristik eğrileri ile değerlendirilmiştir. Özofagus kanseri hastalarında, 58 metabolitin dokuzu, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırıldığında anlamlı şekilde değişmiştir ($p < 0.05$). Mide kanseri hastalarında 58 metabolitin beşi, kolorektal kanser hastalarında ise 12'si anlamlı olarak değiştiğini ileri sürmüşlerdir ($p < 0.05$). Belirledikleri yedi metabolitin serum seviyelerinde kanserin erken evresinde tanı olarak uygulanabilirliğini araştırmışlar ve kanser hastalarının birinci evresinde 3-hidroksipropionik asit, pirüvik asit, l-alanin, glukuronoik lakton ve l-glutamin düzeyleri, sağlıklı gönüllülere göre anlamlı olarak değiştiğini ileri sürmüşlerdir.

2012 yılında Song ve ark.[56] 30 mide kanserli hastadan 30 sağlıklı kontrollerden aldıkları numuneleri analiz etmek için gaz kromatografisi / kütle spektrometresi (GC / MS) kullanmışlardır. Aldıkları numuneleri TNM sınıflandırmasına göre katogorize etmişlerdir. Numuneler GC-MS analizi için hazırlanırken gerekli homojenizasyon yapıldıktan sonra amino asitler (metiyonin, fenilalanin, prolin, lisin, tirosin ve glutamat),

yağ asitleri (laurik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit, arakidonik asit), glukoz ve kolesterol içeren bir mg referans standardı için 200 µg/mL final konsantrasyonuna 5 mL piridin eklenerek çözülmüştür ve türevlendirme işleminden sonra analize verilmiştir. Her numune veya referans standardı bir GC / MS toplam iyon akımı (TIC) kromatogramı ile göstermişler tespit edilen tüm pikleri normalize ettikten sonra ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (OPLS-DA) değerlendirmişlerdir. 60'tan fazla sinyal saptamışlar ve amino asitler, organik asitler, karbohidratlar, yağ asitleri ve steroidler gibi toplam 44 endojen metabolit, ardışık olarak tespit etmişlerdir. Gastrik kanser hastaları ve normal kontroller arasındaki biyomoleküllerin farklılıklarını araştırmak için Wilcoxon testi ($P < 0.05$) kullanmışlar ve karbonhidratlar, amino asitler, yağ asitleri ve steroidler dahil olmak üzere toplam 18 farklı metabolit tespit etmişlerdir. Yağ asitlerindeki seviyelerin kanserli hastalardan alınan serumlarda daha düşük olduğunu, mide kanserinde sindirim glikoz yerine sarkozin mide kanseri serumunda anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, yine gastrik kanser serumunda fumarik asit seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını, artmış glikoliz nedeniyle kanser dokusunda valinde bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Valin, sarkozin, heksanedioik asit ve kolesterol gibi metabolitler muhtemelen potansiyel biyobelirteç olacağını ileri sürmüşler ve alınan dokularda TNM sınıflandırmasının kullanılmasının bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır.

2016 yılında Hu ve ark.[57] fareler üzerinde histolojik olarak dört patolojik model ile birlikte kontrol fareleri de kullanarak bir metabolik çalışma yapmışlardır. Fareleri gastrit, GS; düşük dereceli gastrik displazi, LGD; yüksek dereceli gastrik displazi, HGD; ve normal kontrol grubu (CON) olarak gruplara ayırarak metabolik profillerini ortaya çıkarmışlardır. Mide karsinogenezi oluşturulan farelerde toplanan serum örnekleri NMR tabanlı spektrum analizi ile gerçekleştirmişlerdir. Yapılan önceki çalışmalarda gözlemledikleri OR-STOCSY yaklaşımı kullanarak biyolojinin ilgisini bozan

tedirginlikler ile ilişkili olan ilişkili metabolitleri ortaya çıkarmayı ve ayrıca herhangi bir ön bilgi olmaksızın paramparça olan metabolik ağların kurulmasını sağlamayı amaçlamaktadırlar. Ve böylece NMR tabanlı metabolik analizin yanı sıra inter-metaboliti tanımlamak için OR-STOCSY analizini kullanarak sonuçları yorumlamışlardır. Elde edilen spektrumları İnsan Metabolom Veri Tabanı ve 2D 1 H- 1 H Total Correlated Spectroscopy (TOCSY) spektrumlarının bileşimine dayanarak 1D 1 H CPMG spektrumunda ortaya çıkan metabolitleri değerlendirmişler ve NMR spektrumlarında amino asitler ve karboksilik asitlerden gelen sinyalleri domine etmişlerdir. Metabolik profillerin kapsamlı bir karşılaştırmasını elde etmek için PCA uygulamışlardır. Bunlardan elde ettiklerini SRV kümelerinin verilerine göre araştırmışlardır. Daha sonra Beş grup arasında metabolik profillerin farklılıklarını araştırmak için çift yönlü PLS-DA modelleri ve karşılık gelen tepki permütasyon testleri (RPT) kullanmışlardır. Kontrol fareleri ile model fareler arasındaki metabolik değişiklikleri vurgulamak, patolojik bir etki gibi spesifik faktörlere karşılık gelen metabolik varyasyonları hedeflemek ve izole etmek için OPLS-DA analizini gerçekleştirmişlerdir. PCA, PLS-DA ve OPLS-DA analizleri ile oluşturdukları beş fare grubunda da metabolik profillerin açıkça ayırt edilebildiğini ortaya koymuşlardır. GS grubundaki farelere yüksek tuz diyeti ve pylori enfekteyle indüklenmiş ve DNA hasarı ile ilişkili olduğunu gözlemlemişler ve DNA'da yüksek düzeyde 8-oksodG belirteci tespit etmişlerdir. GS modeli oluşturulan farelerde yağ asidi metabolizmasındaki değişiklikleri rapor etmişlerdir. İki displazi aşamasındaki LGD, HGD grubundaki fareler de özellikle HGD grubunda artan aminoasit seviyelerini gözlemlemişler ve aminoasitler ile TCA ara maddeleri arasında metabolit bir bağ olduğunu ileri sürmüşler, bunun yanı sıra GS'den GC'ye ilerlemede oksidatif strese bağlı metabolik yolların, kolin fosforilasyonu ve yağ asidi yıkımının sürekli bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Son olarak bu çalışmada yeniden yapılandırılmış metabolik ağlar da

yer alan enzimlerin ekspresyon seviyeleri ve aktivitelerinin ölçümleri olmaksızın metabolit seviyelerini tespit etmişlerdir.

Choi ve ark.[58] yaptıkları çalışmada mide kanseri hastalarından aldıkları örnekler ile gastrik ülser hastalarından aldıkları mide suyu örneklerinde triptofan metabolizmasındaki değişiklikler ve mide kanseri için biyobelirteçlerin keşfi üzerine kantitatif bir yöntem geliştirmişlerdir. Önceki yapılan araştırmalar ışığında mide suyunun floresan spektrumlarının mide malignitesi ve benign hastalık olan hastalar arasında önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiş ve bunun üzerine mide suyunun, mide kanseri erken teşhisi için önemli bir biyolojik sıvı olduğunu düşünmüşlerdir. Triptofan ve onun ilgili amino asitlerini serum ve mide suyunda eş zamanlı olarak analiz etmek için LC-MS / MS tekniği kullanılmıştır. Triptofan, indol-3-laktik asit, antranilik asit, serotonin, nikotinik asit, kynurenik asit, kynurenin ve 3-inoksil sülfatın bulunduğu sekiz metaboliti iki iç standart bulunan stok çözeltileri belirli bir konstrasyonda hazırlamışlardır. Kalibrasyon ve kalite kontrol (QC) için, serumun boş matrisini geliştirmek için BSA çözeltisi kullanmışlar ve mide suyu kalibrasyon ve kalite kontrol çözeltileri için mide suyunun pH koşullarını taklit ederek yapay mide suyu hazırlamışlardır. Kalibrasyon ve QC numuneleri için, sekiz metabolit karışım standardını da hazırlayarak LC-MS/MS için gerekli numune hazırlama protokolünü kullanmışlardır. Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrik koşulları ayarlanmış ve her bir analit polarizasyon anahtarlaması kullanılarak alternatif pozitif / negatif iyonizasyon modunu kullanarak aminoasitlerin tek bir çalışmada tespit edilmesini sağlamışlardır. Triptofan katabolizmasındaki başlıca metabolik yol kynurenin yolu olup yapılan bu araştırmada kynurenine yolağı tarafından üretilen metabolitlerin serum ve mide suyu konsantrasyonlarında değişiklik olduğunu gözlemlemişlerdir. Mide suyu konsantrasyonlarında Kynurenik asit, antranilik asit ve nikotinik asit seviyelerinde artış gözlemlemişler. Triptofan metabolizmasının kynurenine

yolunda hız sınırlayıcı bir enzim olan IDO üzerinde etkilerini araştırmışlar, serum ve mide suyunda IDO'nun enzim aktivitesini yansıtan KYN/TRP'nin metabolik seviyelerini rapor haline getirmişlerdir.

2017 yılında Shangli ve ark.[59] 90 tane gastrik kanser (GC) hastaları ile 30 tane de gönüllülerden topladıkları 120 tane plazma numunesinde bulunan küçük molekülleri H'-NMR kullanarak metabolomiks çalışması yapmışlardır. Gastrik kanser hastaları GC-1,GC-2 ve GC-3 olarak gruplandırmışlar ve gruplandırılan gastrik hastalarının bütün evrelerinde yüzde farklılık değerler analizi ve metabolik analizinde biyobelirteç olarak belirlenen prolinin seviyelerini araştırmışlardır. H-NMR ile plazma örneklerinden belirlenen moleküller GC-1,GC-2,GC-3 ve gönüllüler arasında ANOVA ve OPLS-DA istatiksel analizler uygulayarak ve 30 tane metabolik molekül tanımlamışlardır. Her bir molekülün nicel konsantrasyonları ve metabolik değişikliklerin seviyeleri belirlemişler ve GC ile gönüllüler arasında farlı 18 molekül tanımlamışlardır. Metabolik haritalama ile molekülleri glikoliz yollar ile ilişkili yollar, temel amino asitlerle ilişkili yollar ve prolin ve glutamin metabolizması ile ilişkili yollar diye üç ana grupta toplayarak rapor haline getirmişlerdir. GC- 1 aşamasındaki hastalarda glikoliz ile ilişkili yolaklarda bir artış gözlemlerken GC-2 hastalarında aminoasitlerde bir artış gözlemlemişlerdir. GC hastalarında biyobelirteç olarak glutamine ve glutamat seviyelerinde bir düşüş olduğunu proline seviyelerinde ise büyük oranda artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Gastrik kanser evrelerinde moleküler farklılıkların metabolik seviyelerini ortaya çıkarmışlar ve böylece yüzde farklılık değerlerini hesaplayabilmişlerdir. Yüzde farklılık değeri ile ortaya çıkan sonuçta da pirolin seviyesinin en yüksek olduğu ve gastrik kanserde biyobelirteç olarak kullanılabileceği yönünde olmuştur. Prolinin kümeleme yöntemiyle gösterilmesi sonucu alt gruplarında da farklılıklar olduğunu gözlemlemişlerdir ve böylece bütün örneklerde

Prolin konsantrasyonunu iki alt gruba ayırmışlardır.1. gruptaki prolin seviyesini 2.gruba göre daha fazla olduğunu rapor haline getirmişlerdir.

Kajı ve ark.[60] 162 tane mide kanserli hastalardan cerrahi işlem sonrası kanserli dokuları ve komşu olmayan kanserli dokuları alarak homojenize edip CE-TOF/MS yöntemini uygulayarak analiz etmişlerdir. Alınan iki farklı numunenin metabolik profillerini karşılaştırmak için PCA ve hiyerarşik kümeleme analizi kullanmışlar ve kanserin nüks varlığını veya yokluğunu değerlendirmek için parametrik olmayan Mann-Whitney U – testini kullanmışlardır. 96 tane metabolit tespit etmişler, kanserli dokularda laktat/piruvat seviyesinin yüksek olduğunu gözlemlerken Komşu olmayan kanserli dokularda adenilat enerji yükünün düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Nüks olmayan kanserli dokularda mide kanserli dokulara göre β-Ala, Asp, GDP ve Gly'nin tümör konsantrasyonları daha düşük seviyelerde olduğunu rapor etmişler ve Metabolik profilleri çıkartılan doku örneklerinde mide kanserli dokularla nüks olmayan kanserli dokular arasında kullanılabilecek farklılıkların biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

2018 yılında Corona ve ark. yüksek risk altında olan birinci dereceden akrabalarla gastrit kanser hastaları arasında serum metabolik profillerini araştırmışlar ve kullanılan biyobelirteçlere ek olarak yeni biyobelirteçler bularak gastrit kanserin erken teşhisinde önemli bir adım olacağını düşünmüşlerdir. Deneyleri 49 tane gastrit kanser hastası (GC) 37 tane de birinci dereceden akraba (FDR) grupları oluşturmuşlar ve bunlardan bağımsız kontrol grupları için 22 tane GC ve 12 tane de FDR serum örnekleri doğrulama seti olarak seçilmiş ve bunlar üstünden çalışmalar yapılmıştır. Serum örneklerini, hedefli metabolomik profilleri tanımlama kullanılarak tandem kütle spektroskopisi ile analiz etmişler ve temel olarak fosfolipidler ve asilkarnitin sınıflarına ait 40 metabolit GC ve FDR arasında farklı şekilde eksprese etmişlerdir. 40 metabolitten 9'u kontrol grubu

arasında doğrunlanmıştır. GC ve FDR örnekleri arasındaki maksimum ayrımı kısmi en küçük kareler ayırma analizi (PLS-DA) kullanılarak analiz edilmiştir. İki grup arasındaki metabolik profiller karşılaştırılmış ve metabolitler tanımlanmıştır. Çok değişkenli analiz ile serumda bulunan metabolitleri ilişkilendirebilecekleri yaş, PG düzeyleri, cinsiyet, h.bakteri enfeksiyonu gibi risk faktörleri kullanılmıştır. GC hastalarındaki metabolik değişiklikler asilkarnitinleri, sfingomiyelinleri ve fosfatidilkolinlerin olduğu tespit edilmiş ve bunların risk biyobelirteçleri olacağını ileri sürmüşlerdir. GC hastalarında h.pylori enfeksiyonuna göreC18: 1, C18: 1 (OH) ve C16 asilkarnitin seviyelerinde artış gözlemlenmiş ve C16 asilkarnitin ile yaş arasında pozitif bir korelasyon gözlemlemişlerdir. Bazı fosfatidilkolin türevlerinde GC hastalarının serumlarında düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir.[6]

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Metabolomiks çalışması için kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri kaynaklar şunlardır; Asetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), %98 'lik Formik asit (Riedel-de-Haën™ , Honeywell,), deiyonize su (R > 18.2 MΩ cm-1; PURELAB Ultra system; Elga Labwater, Ede, The Netherlands), İç standart olarak olanzapin etkin maddesi kullanıldı.

Çalışmada kullanılan malzemeler; 1.5 mL ve 2 mL konik tabanlı vida kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA), tek kullanımlık steril pipetler (0.1, 1.5, 10 mL'lik), 96 kuyucuklu hücre kültür plakları (Eppendorf, UK), 1.5 mL 'lik tek kullanımlık tüp (Eppendorf, UK), 0,45 µ'luk şırınga filtre uçları (membran) kullanıldı.

3.1.2. Cihazlar

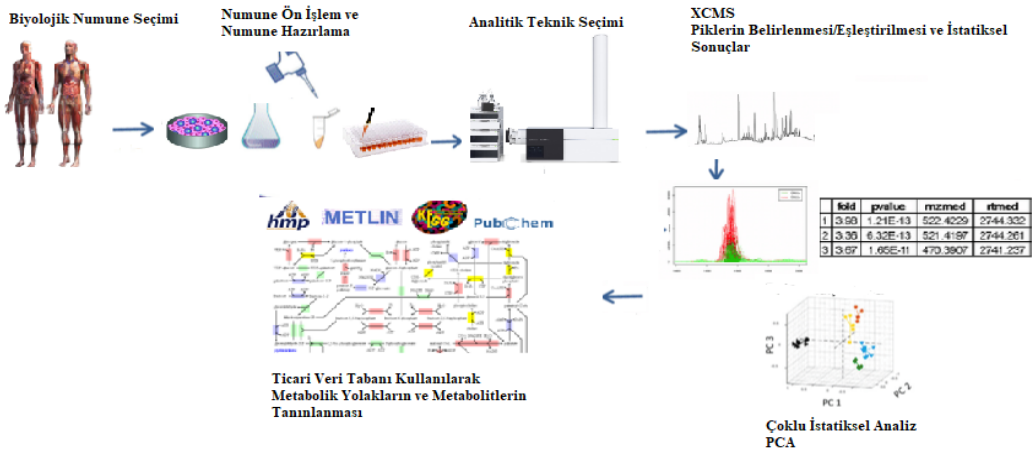
Doku örneklerinin parçalanması ve homojenize edilmesi için kullanılan elektrikli homojezinatör BeadBlaster 24 (Benchmark scientific, USA), doku parçalama işleminden sonra çöktürme işlemi ve süpernatantları elde etmek için kullanılan santrifüj cihazı Micro 220R Hettich/Zentrifugen (Hettich, Germany), toplanan süpernatantları buharlaştırmak için kullanılan vakum konsantratör Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), hazırlanan çözelitileri karıştırmak için kullanılan ısı ayarlı ThermoMixer® C, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), hazırlanan numunelerin analizi için kullanılan Agilent 1290 Infinity LC sistemi (Agilent Technologies, ABD) ile birlikte kullanılan Q-TOF kütle spektrometre sistemi sistemi (Agilent 6530 Accurate-Mass. Agilent Technologies, USA). Bunlarla birlikte kullanılmış olan hassas terazi (KERN,

ABJ 220-4M,Germany), Otomatik pipet (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), vortex-mixer (witeg Wisd Vortex Mixer VM-10,Germany) cihazları kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Genel Deneysel Prosedür

Hedeflenmemiş metabolomiks analizi için ilk olarak biyolojik numunenin seçimi daha sonra çalışılacak olan numunenin ön işlemi, hazırlanan numunelerin analizi için kullanılacak olan analitiksel platformun seçilmesi, verilerin istatistiksel olarak sonuçlandırılması ve son olarak ticari veri tabanı veya analitik araçlar kullanarak önemli ayırt edici metabolitlerin tanımlanması gibi önemli adımları içermektedir.



Şekil 3.1. Genel Deneysel Prosedürün şematik gösterimi

3.2.2. Doku Örneklerinin Toplanması

Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği Yoğun Bakım servisinde yatmakta olan evre II ve evre III mide kanseri teşhisi konulmuş ve cerrahi müdahale kararı alınmış 9 kadın 10 erkek hastadan alınan doku parçaları cerrah tarafından <1 cm kesilerek kanserli ve kansersiz olarak ayrılmış hemen sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Dondurulan parçalar metabolit ekstraksiyon işlemine kadar -80 ° C'de saklandı.

3.2.3. Cerrahi Müdahale Kararı Alınmış Hasta Bilgileri

Total ve subtotal gastrektomi yapılmış ve 19 kontrol 19 kanserli doku örnekleri aynı hastalardan alınmıştır. Bu hasta bilgileri tablo halinde gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hasta Bilgileri

Hasta No	Cinsiyet/ Yaş(yıl)	Histoloji	Tümör boyutu (cm)	İşgal Derinliği	Lenf Nodu Metastazı	TNM evre
1	K/59	A	<5	T2	N0	II
2	K/37	ODA	3,5×2.5×2	T3	N2	III
3	E/47	ADA	2.5×2.5×1.5	T3	N1	II
4	E/54	KDA	2.5	T3	N2	III
5	K/62	ODA	2.5×2×1	T3	N1	II
6	E/54	ODA	2×1.5	T3	N0	II
7	E/81	ODA	3×2×1.5	T3	N2	III
8	K/53	ODA	3	T3	N2	III
9	E/52	A	<3	T3	N2	III
10	K/65	A	2.5×2.5×1	T4	N2	III
11	E/75	ODA	6×5×2	T3	N2	III
12	E/51	KDA	6.5×5.5×1.5	T3	N0	III
13	K/47	KDA	4×1.5×0.7	T4	N0	III
14	K/65	ODA	3×2×1.5	T3	N0	III
15	E/54	ODA	2.5×2×1.5	T4	N2	III
16	E/58	ODA	4×2.5	T3	N2	III
17	K/48	KDA	4×1.5×1	T4	N0	III
18	K/64	A	<5	T2	N0	II
19	E/71	A	<5	T2	N0	II

A; Adenokarsinom, **ODA;** Orta derecede diferansiye adenokarsinom, **ADA;**Az diferansiye adenokarsinom, **KDA;** Kötü diferansiye adenokarsinom

3.2.4. Doku Numunelerinin Hazırlanması ve Metabolit Ekstraksiyonu

-80 ° C'den çıkarılan bütün doku örnekleri yaklaşık olarak 50 mg olacak şekilde tartıldı. Dokuların parçalanması işlemi sırasında proteinlerin çökmesi ve metabolitlerin

ekstrakte edilmesi için tartılan örneklerin üzerine 750 µL asetonitril, 20 µL formik asit eklenerek elektirikli homojenizatöre yerleştirildi. 3000 rpm, 5 cycle olup her cycle 1dk ve her cycle arası 10 sn olacak şekilde cihaz ayarlandı ve dokular homojen hale getirildi. Elde edilen homojenatta tamamen proteinleri çöktürmek için 10000 g 4 ° C'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında toplanan süpernatantlar vakumlu konsantratörde 30° C ‘de 2 saat boyunca V-Aqua modunda tamamen kuruyuncaya kadar uçurma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5. Q-TOF LC/MS Sistemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması

%95 Milli-Q su, %5 ACN, %0,1 formik asit ve 50 ng/mL iç standart olarak kullandığımız olanzapin etkin maddesi 100 mL balon joje içerisinde hazırlandı. Bu hazırladığımız çözeltiden 1 mL eppendorf tüplere alındı ve kör numune olarak kullanıldı. Dokuların homojenizasyonu ve ekstraksiyon işleminden sonra kurutulan 38 tane örneğin üzerine hazırlanan mobil faz çözeltisinden 300 µL eklendi. ThermoMixer C karıştırıcıda 4 dk 2000 rpm’de karıştırıldı. QTOF-LC/MS analizi için 96 kuyucuklu platelere bu numuneler 0,45 µ’luk şırınga filtre uçlarından süzülerek 300 µL olacak şekilde alındı.

3.2.6. Hedeflenmemiş Metabolomiks Çalışmalarında Yöntem Validasyonu

Hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarında amaç alınan biyolojik örneklerden olabildiğince maksimum düzeyde alınan sinyalin istatiksel olarak yorumlanması ve yeni biyobelirteçlerin ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda analitiksel yöntemin ve kullanılan yaklaşımın doğrulanması için kalite kontrol örnekleri (QC) kullanılmaktadır. Standartı sağlayabilmek için kullanılan QC’ler incelenecek olan biyolojik örneklerden kendi içerisinde temsili bir toplu kontrol örneğinden yapılan numune havuzudur. Yapılan çalışmamızda doku örnekleri stok çözeltilerle hazırlandıktan sonra 38 örneğin hepsinden 20 µL alarak farklı bir eppendorf tüpte toplanmış ve vortex-mixer ile karıştırılmıştır.

Oluşturulan bu havuzdan 2'şer tane QC numuneleri hazırlanmıştır. QC'ler sistemi stabilize etmek ve validasyonu sağlayabilmek için analiz sırasında düzenli aralıklarla tekrar tekrar analiz edilmiştir.

3.2.7. QTOF-LC/MS Analizi İçin Yöntem Şartları

Hazırlanan numunelerin analizi Agilent 1290 Infinity LC sistemi ile birlikte kullanılan Agilent 6530 Doğru Kütle Q-TOF kütle spektrometresinde gerçekleştirildi. Kromotografik ayrım için Hypersil C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.9 um) kolonu kullanıldı. Mobil faz olarak ACN ve ultra saf su içerisine % 0.1 formik asit ilave edilerek kullanıldı. Gradiyen elüsyon yöntemiyle metabolitler analiz edildi. Gradiyent elüsyon zaman çizelgesi Tablo 3.2'de verilmiştir. Akış hızı 0.4 mL/dak. Olarak ayarlandı. Q-TOF kütle spektrometre sistemi için Dual Agilent Jet Stream Elektrosprey İyonizasyon (AJS ESI) iyon modu seçildi. Sistem 350 ° C'de,11 L / dk kurutma gazı (N2) akışında ve pozitif iyon modunda 3.5 kV pozitif kılcal gerilimde optimize edildi. Nebulizer basıncı 45 psig olarak düzenlendi.

Tablo 3.2. Gradiyent Elüsyon Zaman Çizelgesi

A (%)	B (%)	Zaman (dk)
15	85	5
95	5	10
5 dk yeniden mobil fazın eski haline dönüşü		

Hareketli faz olarak A) 0.1 M formik asit içeren su ve B) 0.1 M formik asit içeren asetonitril

3.2.8 Metabolit Profillemede Kullanılan Çoklu Analiz ve İstatiksel Veri Analizi

QTOF-LC/MS cihazında analizi yapılan kör numune, kalite kontrol (QC) numuneleri ve doku örneklerinin kromatogramları, Agilent MassHunter Yazılım versiyonu B.02.00 (Agilent Technologies, ABD) ile değerlendirildi. Piklerin doğrulanması için XCMS yazılım programı kullanıldı. Biyobelirteç potansiyeli olan metabolitleri belirleyebilmek için bütün örnekler için; $p<0.01$ ve fold analizi >1.5 olacak kriterlerini sağlayan m/z değerleri dikkate alındı. Şartları sağlayan veriler İnsan Metabolom Veri Tabanı (HMDB) ve METLIN veritabanları vasıtasıyla incelendi ve kimliklendirilme işlemi gerçekleştirildi. Tanımlanan metabolitleri doğrulamak için MS / MS spektrumları da kullanıldı. Veri toplama ve ekstrakte edilen metabolitlerin kümelenmesi OPLS-DA algoritması ve MATLAB R2017a programı ile gerçekleştirildi. Metabolik yol analizi, Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) yol veritabanı ve Metaboanalyst 4.0 kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

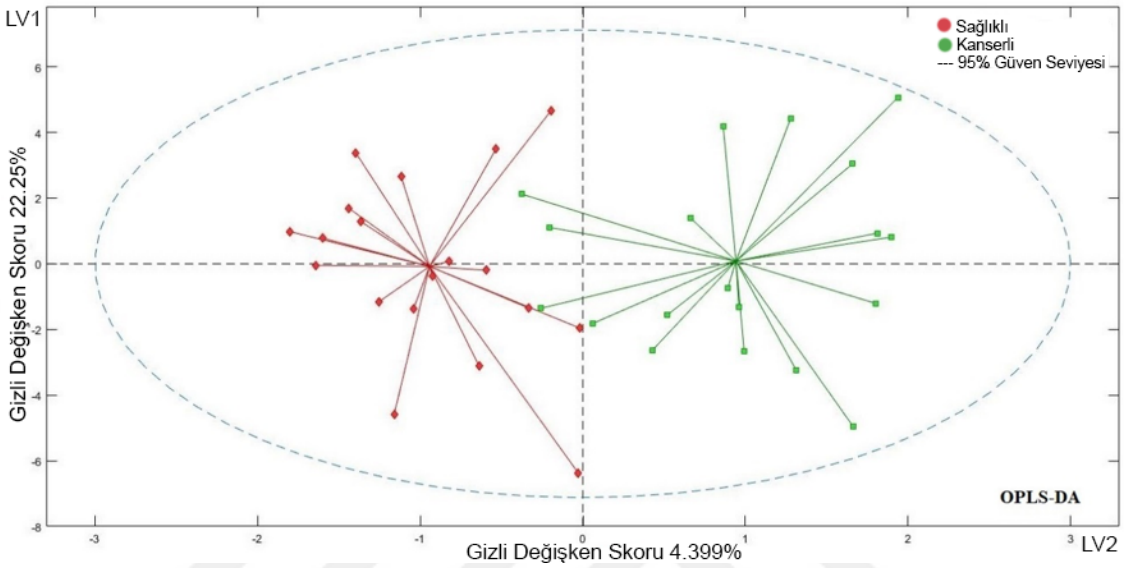
4.1. Doku Örneklerinin Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşımı

Cerrahi işlem kararı alınmış her bir hastadan alınan kanserli ve kansersiz doku örnekleri analiz edilecek şekilde hazırlandıktan sonra QTOF-LC/MS ile analiz edildi ve analiz edilmiş olan kör numune, kalite kontrol numuneleri ve doku numunelerinin sonuçları Agilent MassHunter Yazılım versiyonu B.02.00 ile değerlendirildi. Metabolitleri tanımlamak için m/z oranları kullanıldı. Elde edilen piklerin doğrulanması ve düzenlenmesi için XCMS yazılım programı kullanıldı. XCMS yazılım programı ile bir liste elde edildi ve yapılan çalışma ile ilgisi bulunmayan maddeler ve karakteristik kütle fragmanı bilgisi olmayan maddeler listeden çıkarıldı. Listeyi oluştururken dedektör tarafından yaklaşık olarak 340 farklı değer tespit edilirken bunlardan fold değeri>1.5 ve p değeri $p<0.01$ şartlarını taşıyan ve potansiyel biyobelirteç metabolitleri olduğu düşünülen değerler tespit edildi. Doğru kütle ve yapı bilgileri, HMDB ve METLIN gibi veri tabanlarından elde edilen literatürdeki değerlerle eşleştirildi. Değerlendirme sonucu 80 tane metabolit tespit edildi. Bu metabolitlerden 31 tanesi tanımlanırken 49 tanesi tanımlanamamıştır. Doku örneklerinde tanımlanan metabolitler tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Doku örneklerinde tanımlanan metabolitler

Metabolitler	Fold	P Değeri	Düzenleme (Artış/Azalış)	m/z med	Rtmed
C16 sphingan	6.0	0.02117	Artış	539.9300	12.27
4,8,12-trimethyl-tridekanoik asid	1.6	0.0	Azalış	256.43	11.30
L-Valin	1.8	0.00512	Artış	156.0434	9.35
L-Alanin	1.98	0.00402	Azalış	156.0434	9.80
Glisin	2.0	0.32287	Artış	799.5100	10.12
Palmitik Asit	1.92	0.35845	Artış	836.9420	9.97
Miristik Asit	2.05	0.02287	Artış	228.3765	12.36
L-Serin	3.2	0.037	Azalış	144.1030	8.32
L-Izolösin	1.7	0.0023	Artış	131.1564	11.29
L-Lösin	1.806	0.0085	Azalış	131.1759	8.96
L-Sistein	1.68	0.69050	Artış	121.1545	11.57
Glutamin	1.802	0.002	Azalış	146.1464	5.82
Glutamat	1.76	0.02615	Artış	147,1354	4.56
Glikoz	1.709	0.0009	Azalış	180.1562	7.65
Oktadekonik Asit	1.4	0.0485	Artış	284.4846	6.72
L-Treonin	1.308	0.2690	Azalış	116.0715	3.10
L-Prolin	1.685	0.0003	Azalış	156.0434	3.50
Deoksikorkosteron	1.423	0.41071	Azalış	437.4362	13.33
N-oleoil Fenilalanin	1.6	0.68450	Azalış	429.6450	10.60
Heptadekanoil karnitin	1.5	0.54443	Azalış	452.3142	11.87
PA(19:0/0:0)	1.6	0.80809	Artış	435.2874	12.01
N-nervonoyl-D-eritro-sfingosin	1.41	0.97426	Artış	630.6179	13.13
PE(16:1(9Z)/P-18:1(11Z))	1.5	0.63723	Artış	722.5057	13.18
İzopropil tetradekanoat	1.72	0.06572	Artış	288.2930	13.03
Dekanoik Asit	1.840	0.03844	Artış	172.268	14.01
Oleik Asit	2.6	0.00421	Artış	523.3654	14.20
13,13-dimetil-tetradekanoik Asit	1.75	0.00628	Azalış	256.4367	7.30
2-propil-tridekanoik Asit	1.456	0.00041	Azalış	214.3494	7.40
L-Aspargin	2.608	0.04589	Artış	132.1195	3.54
L-Askorbik Asit	3.41	0.05689	Artış	176.1245	5.68
D-ribofuranoz	1.906	0.00968	Artış	150.1386	14.58

Tanımlanan metabolitlerin pik alanları MATLAB R2017a programına aktarıldı. Ortogonal projeksiyonlar diskriminant analizi (OPLS-DA) kullanılarak doku örneklerinin kanserli ve kansersiz olarak gruplara ayrılmasında önemli olan metabolitler ve bu grupların regresyon katsayıları bulundu.

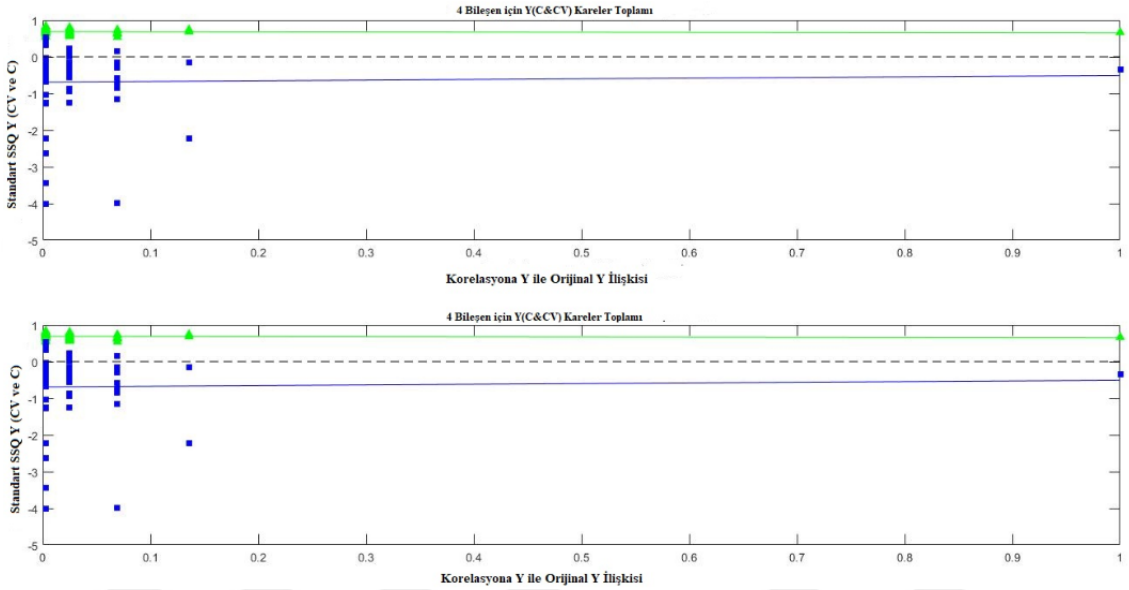


Şekil 4.1. Kanserli-Sağlıklı Doku Örneklerinin OPLS-DA Grafiği

Gizli değişken skoru 1'e (LV1) karşı, gizli değişken skoru 2 (LV2) grafiği iki küme sergiledi. Bu kümelerde gösterilen (Şekil 4.1) kırmızı spotlar sağlıklı, yeşil spotlar kanserli bölgelerden elde edilen metabolizma profillerini vermiştir. OPLS-DA analizi ile kanserli-sağlıklı bölgelerin metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Önerilen modeli açıklamak için dört gizli değişken, en düşük kök ortalama kare kalibrasyon hatası (RMSEC) seçildi. RMSEC: 0.318607, 0.318607 değerleri elde edildi. Validasyon hatası için RMSECV: 0.743269 0.743269 değerleri rapor edildi. OPLS-DA modeli ile X bloğunun ön işlenmesi için Ortogonal Sinyal Düzeltme (OSC) seçildi. Matrisin, Y bloğu için de 1 ve 0 yapay değişken olarak oluşturuldu. Modelin öngörüsünü değerlendirmek için çapraz doğrulama yapıldı. Her y bloğu sütunu için istatistikler: 0.842-0.789 hassasiyet, 0.789-0.842 özgüllük değerleri

elde edildi. Varyansın hassasiyeti 0.368-0.579 ve özgüllüğü 0.579-0.368 sonuçları elde edildi.

Çapraz doğrulamada, mevcut numunenin sınıflandırma modelinin doğrulanması için permütasyon stratejisi kullanıldı. Validasyonun doğrulanması için toplam tahmin hatası hesaplandı ve en düşük toplam tahmin hatası olan model en iyisi olarak seçildi.



Şekil 4.2. Validasyon Doğrulama Grafiği

Tahmin edilen parametrelerin değişkenliğini ve tahmin üzerine etkisi değerlendirildi. Permütasyon testine göre değerlerin 0.2 altında kaldığı görüldü**.**

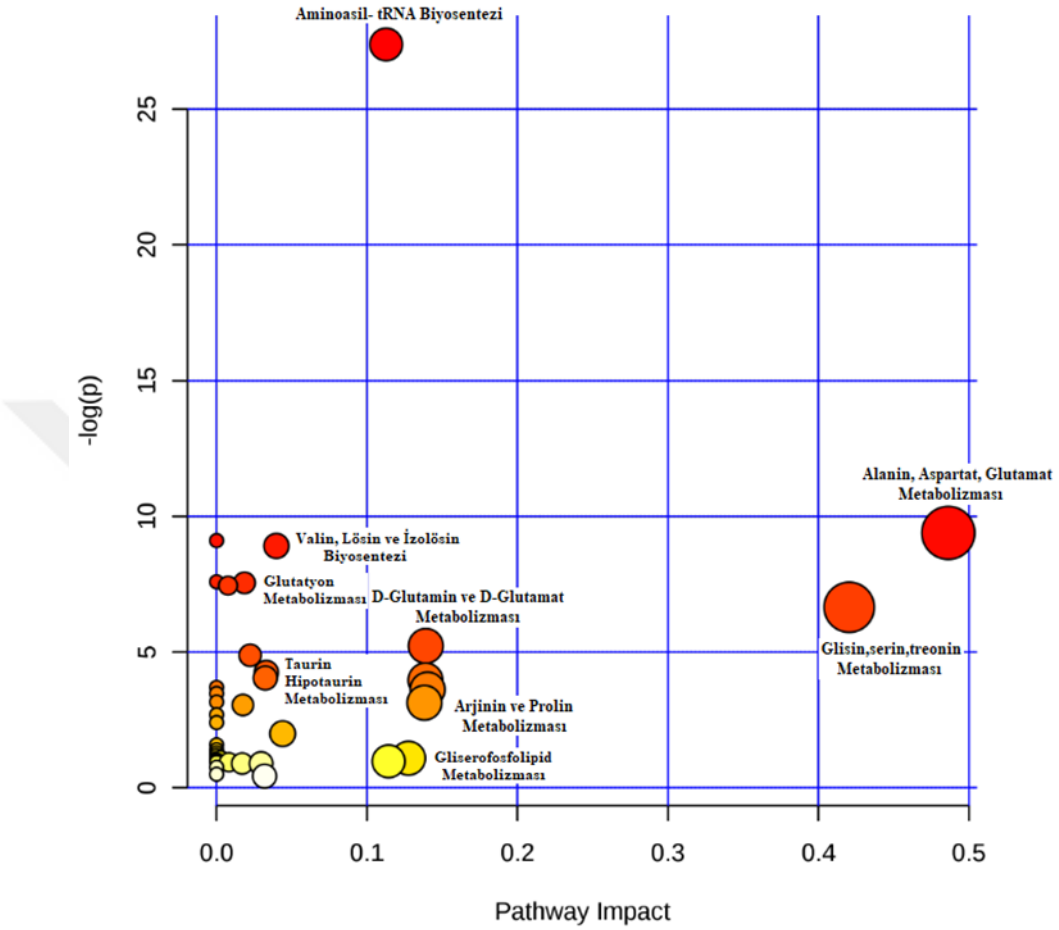
4.2. Metabolitlerin Yolak Analizi

Tanımlanan metabolitlerin birçok yolak üzerinde etkili olduğu görüldü. Aralarında anlamlı fark bulunan metabolitlerin, ilgili Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG)ve Metaboanalyst 4.0 kullanılarak detaylı yolak analizi ile ilgili yollar ve etkileri şekil ile gösterildi. Metabolitlerin ilişkili olduğu yolaklar analiz edildiğinde aminoaçil t-RNA biyosentezi, alanine, aspartate, glutamate metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması ve valin, lösin, izolösin biyosenteziyle anlamlı derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir

Tablo 4.2. Metabolom Analizinde Doku Örneklerinin Yolak Analizi

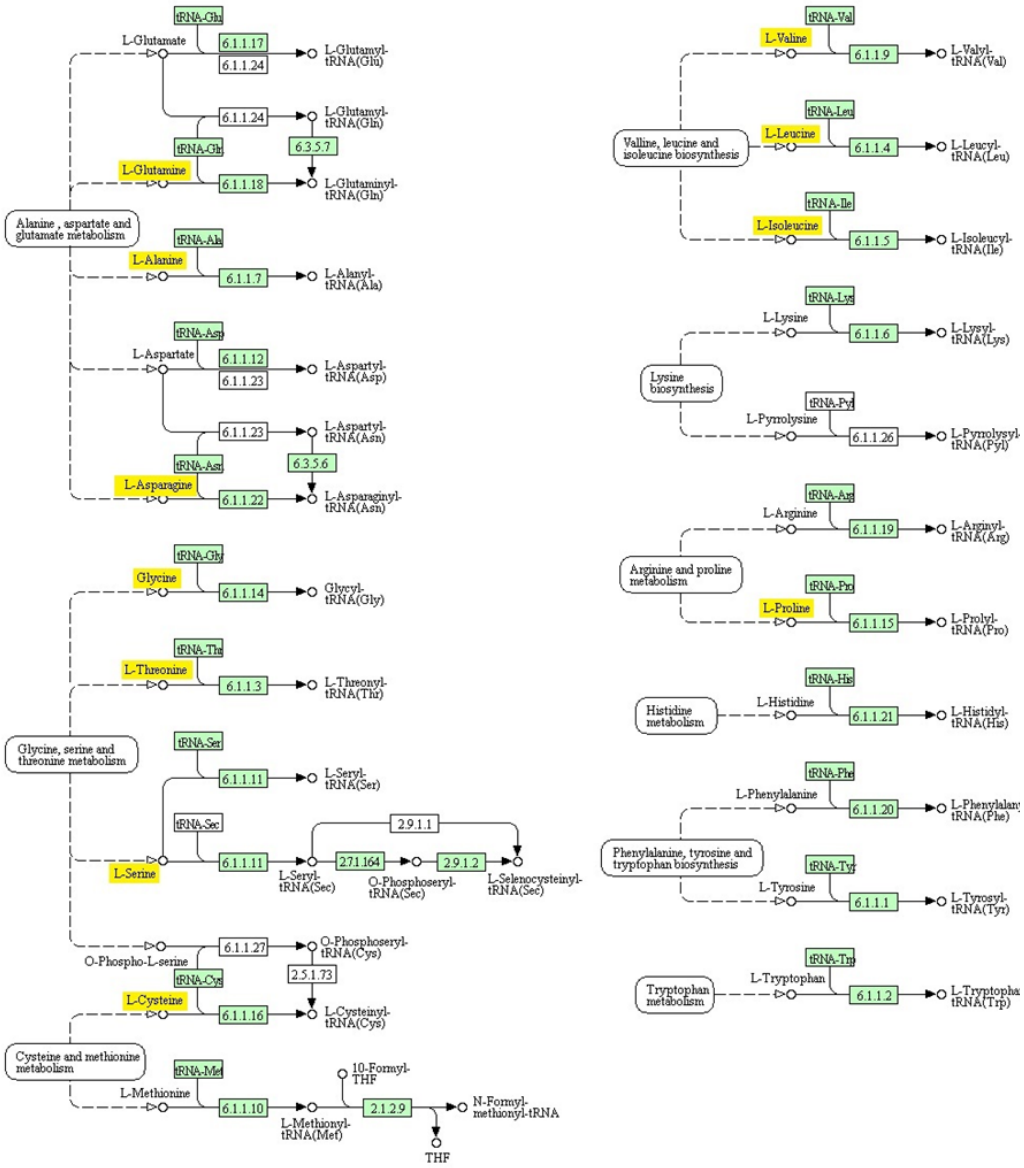
Yolak İsmi	Eşleşen Metabolit	P Değeri	-Log(p)
Aminoaçil-tRNA Biyosentezi	12/75	1.2842×10^{-12}	27.381
Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması	4/24	8.373×10^{-5}	9.3879
Yağ asidi Biyosentezi	5/49	1.1112×10^{-4}	9.1049
Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi	4/27	1.3541×10^{-4}	8.9072
Siyanoamino Asit Metabolizması	3/16	5.0737×10^{-4}	7.5863
Glutatyon Metabolizması	4/38	5.2717×10^{-4}	7.548
Azot Metabolizması	4/39	5.8331×10^{-4}	7.4468
Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması	4/48	0.0012954	6.649
D-Glutamin ve D-glutamat Metabolizması	2/11	0.0053801	5.225
Valin, Lösin ve İzolösin Bozulması	3/40	0.0075922	4.8806
Sfingolipid Metabolizması	2/25	0.026852	3.6174

Metabolitlerin ilişkili olduğu yolaklar analiz edildiğinde anlamlı derecede ilişkili oldukları yolaklar şekil4.3'de gösterilmiştir



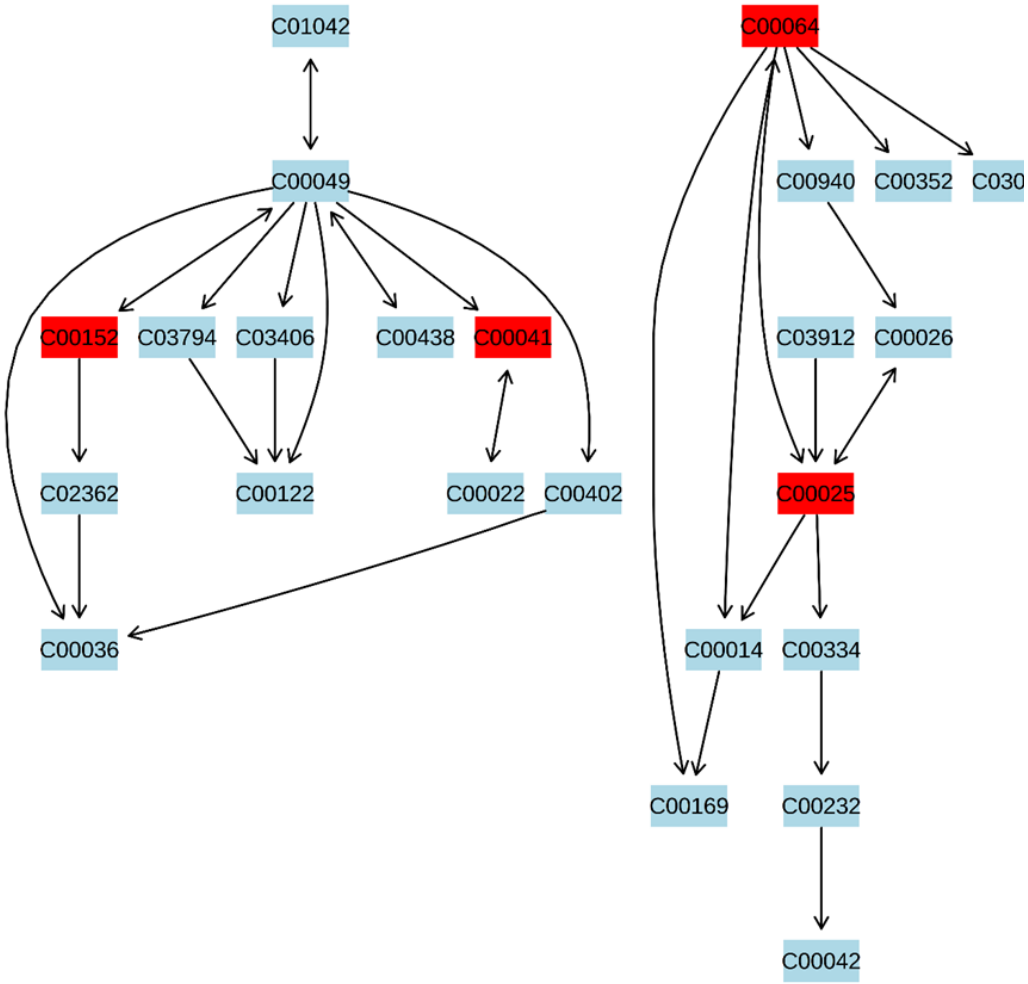
Şekil 4.3. Doku Örneklerinin Yolak Etki Değerleri

4.2.1. Aminoaçil-tRNA Biyosentezi



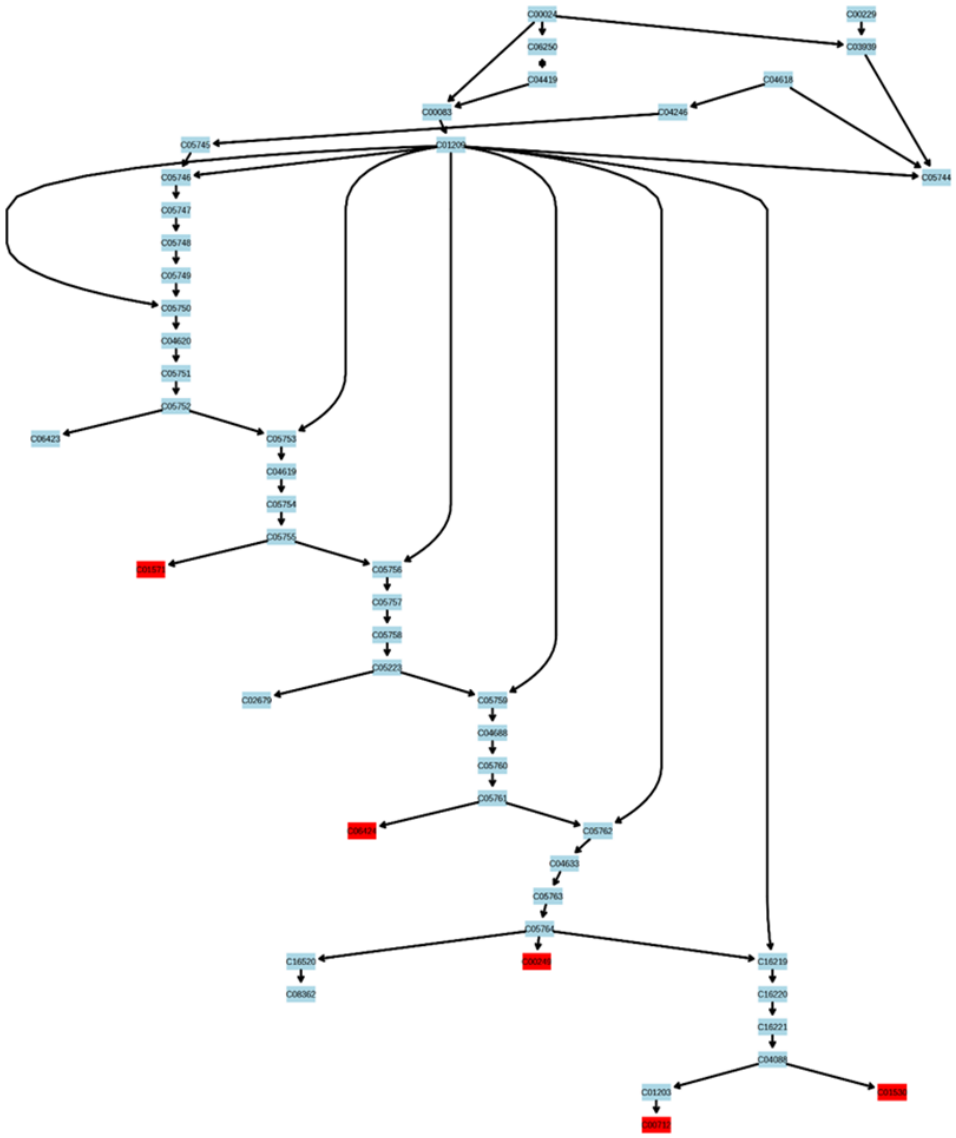
Şekil 4.4. Mide kanseri ile ilişkili ana metabolik yollar; L-Glutamin, L-Alanin, L-Asparjin, Glisin, L-treonin, L-serin, L-sistein, L-valin, L-lösin, L-izolösin, L-prolin

4.2.2. Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması



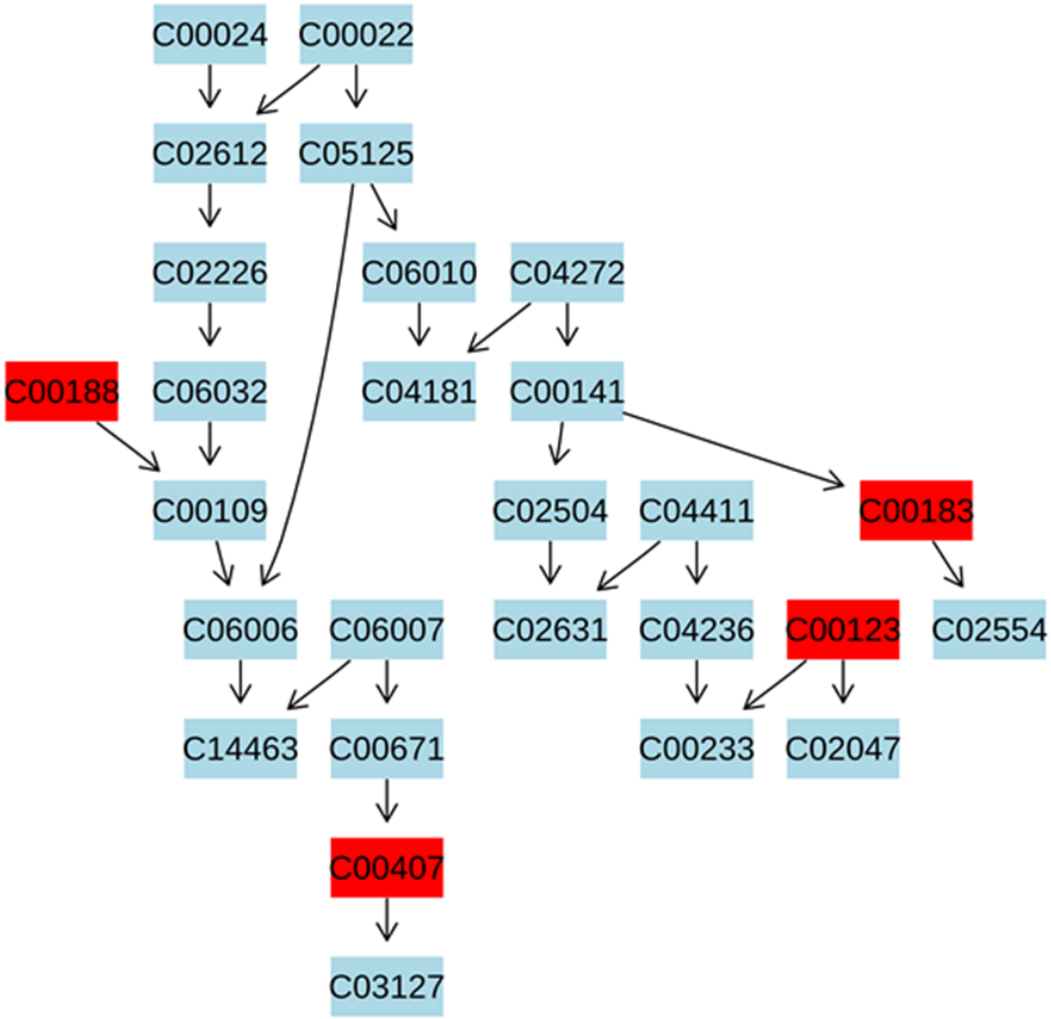
Şekil 4.5. Mide kanseri ile ilişkili Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizmasında etkili metabolitler C00152(L-asparajin), C00041(L-Alanin), C00064(L-Glutamin), C00025(L-Glutamik asit)

4.2.3. Yağ Asidi Metabolizması



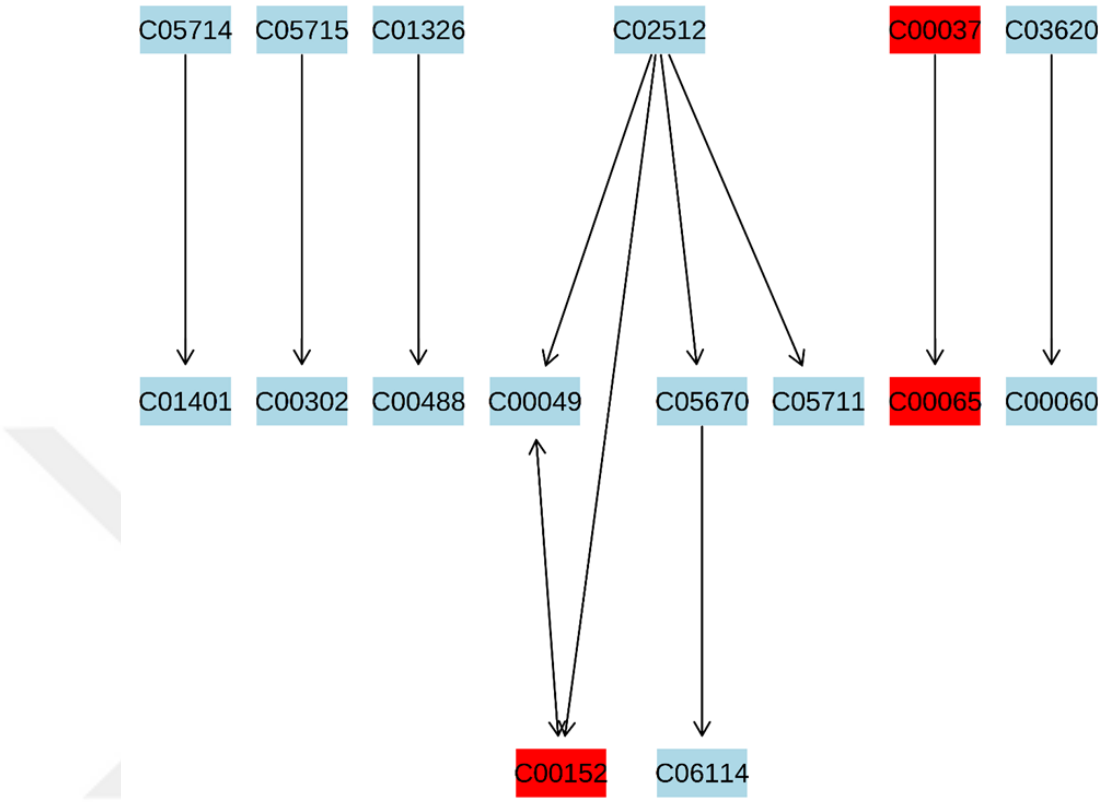
Şekil 4.6. Mide Kanseri ile ilişkili Yağ Asidi Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C01571(Kaprik Asit), C06424(Myristik Asit), C00249(Palmitik Asit), C00712(Oleik Asit), C01530(Steroik Asit)

4.2.4. Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi



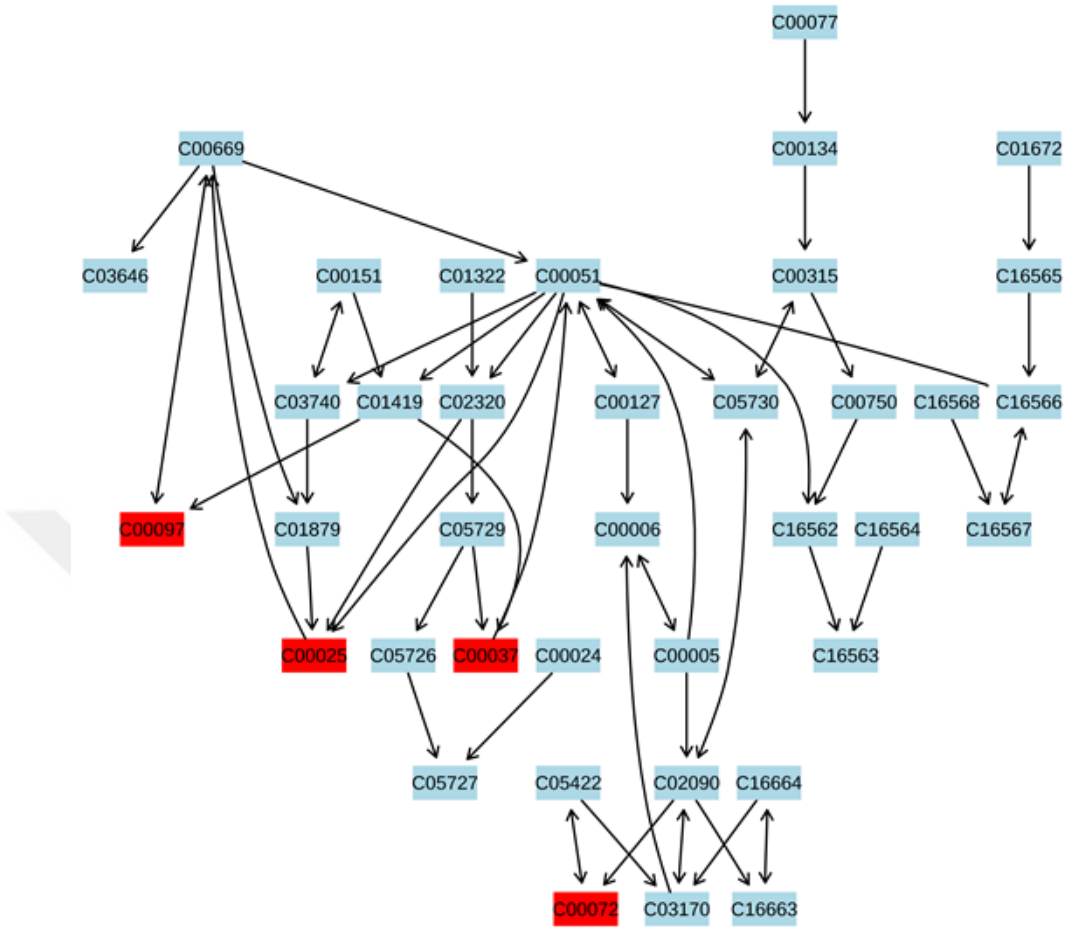
Şekil 4.7. Mide Kanseri ile ilişkili Valin, Lösin ve İzolösin Biyosentezi Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00188(L-treonin), C00407(L-izolösin), C00123(L-Lösin), C00183(L-valin)

4.2.5. Siyanoamino Asit Metabolizması



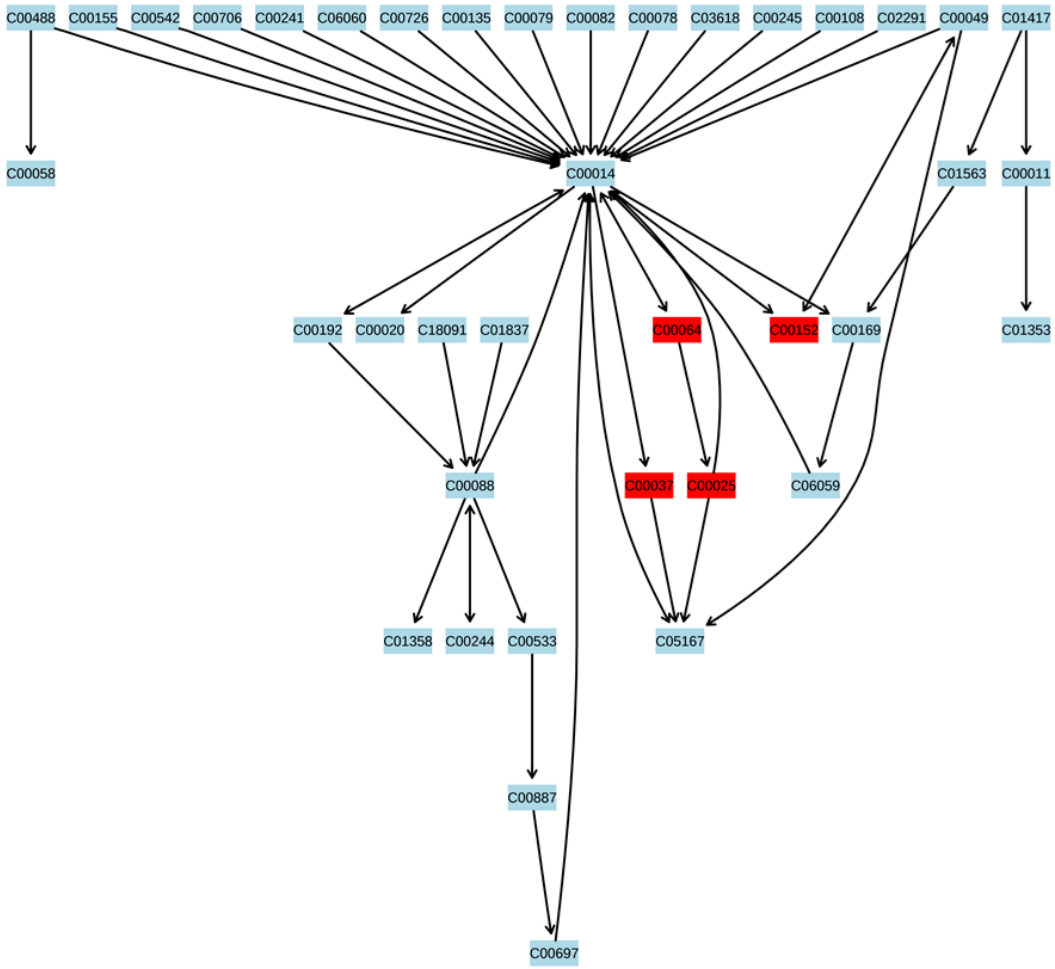
Şekil 4.8. Mide Kanseri ile ilişkili Siyanoamino Asit Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00152(L-Asparajin), C00065(L-Serin), C00037(Glisin)

4.2.6. Glutatyon Metabolizması



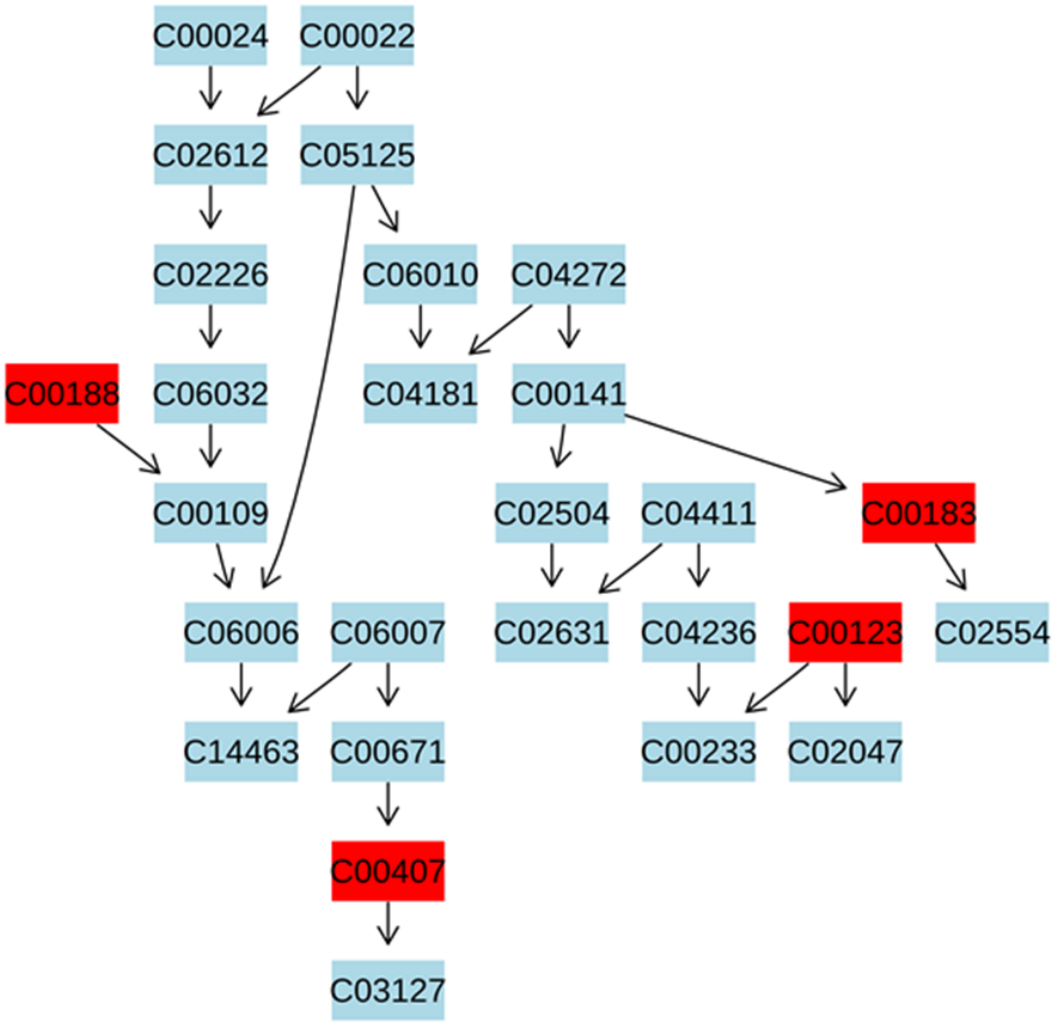
Şekil 4.9. Mide Kanseri ile ilişkili Glutatyon Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00097(L-sistein), C00025(L-Glutamik Asit), C00037(Glisin), C00072(Askorbik Asit)

4.2.7. Azot Metabolizması



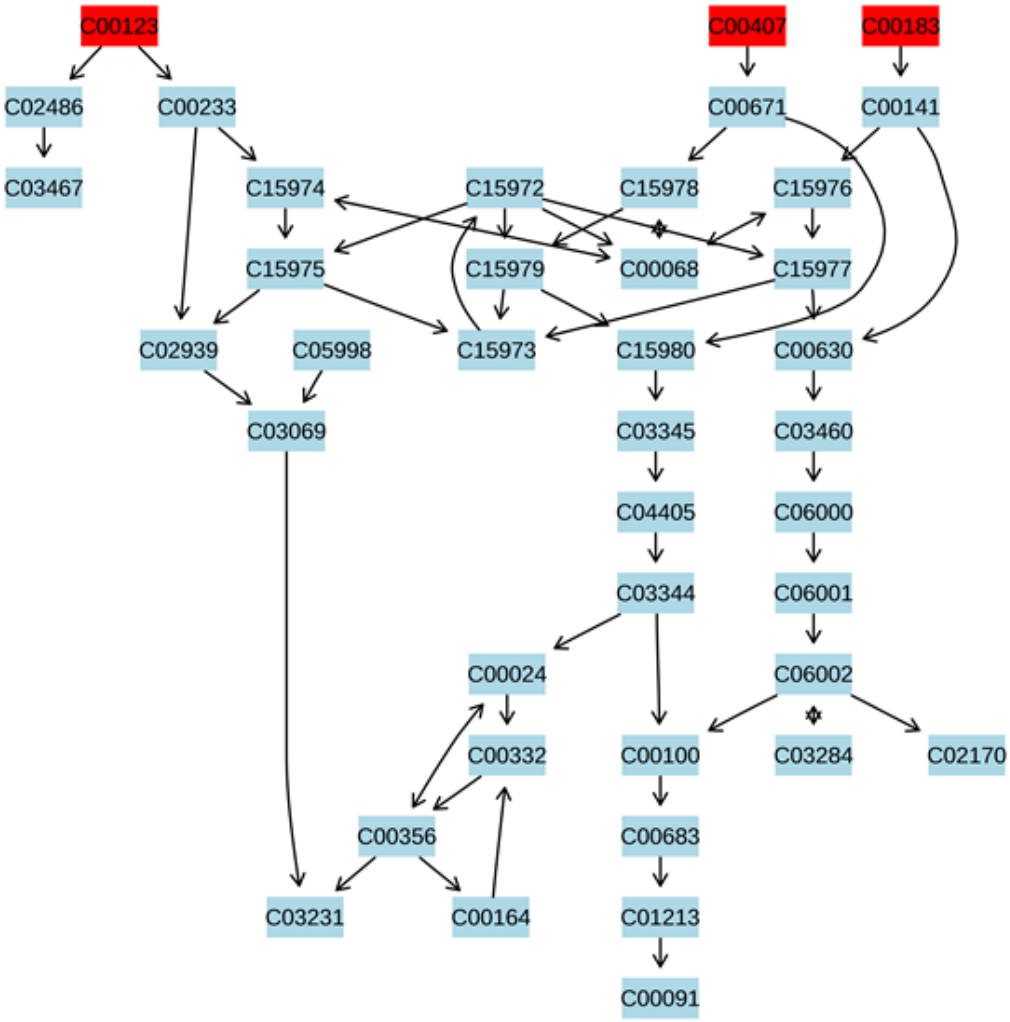
Şekil 4.10. Mide Kanseri ile ilişkili Azot Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00064(L-Glutamin), C00162(L-asparajin), C00037(Glisin), C00026(L-Glutamik Asit)

4.2.8. Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması



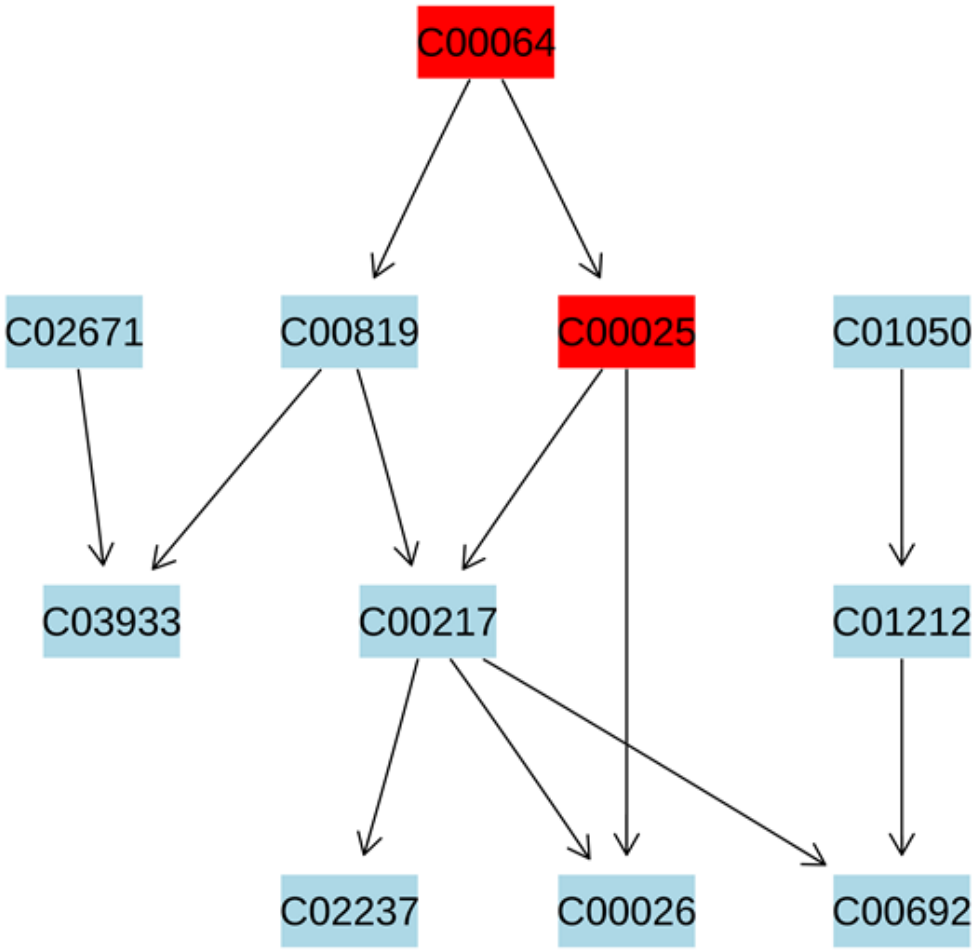
Şekil 4.11. Mide Kanseri ile ilişkili Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00188(L-Treonin), C00037(Glisin), C00065(L-Serin), C00097(L-Sistein)

4.2.9. Valin, Lösin ve İzolösin Bozulması



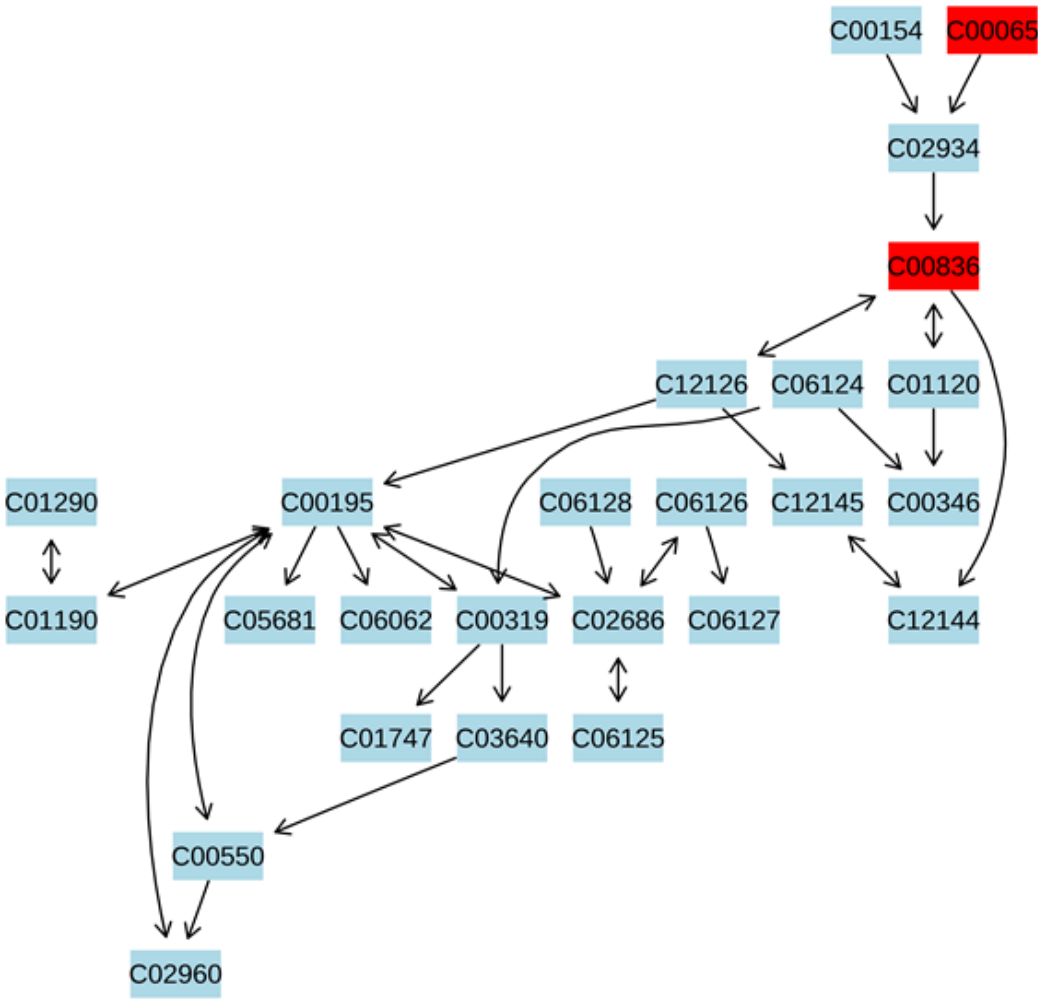
Şekil 4.12. Mide Kanseri ile ilişkili Valin, Lösin ve İzolösin Bozulması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00123(L-Lösin), C00407(L-İzolösin), C00183(L-Valin)

4.2.10. D-Glutamin ve D-glutamat Metabolizması



Şekil 4.13. Mide Kanseri ile ilişkili D-Glutamin ve D-glutamat Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00064(L-Glutamin), C00025(L-Glutamik Asit)

4.2.11. Sfingolipid Metabolizması



Şekil 4.14. Mide Kanseri ile ilişkili Sfingolipid Metabolizması Yolak Analizinde etkili olan metabolitler; C00065(L-Serin), C00836(Sifingonin)

5. TARTIŞMA

Biyolojik sistemlerin karmaşıklığını aydınlatmaya çalışarak, biyolojik sıvıların ve dokuların moleküler profillerinde spesifik değişimlere spesifik cevaplar bulmaya çalışan ve hızla ilerleyen omiks devrimi sağladığı geniş bir biyokimyasal bilgi birikimini ayırmak için bütüncül bir yaklaşım sunar. İnsan genom projesi ile genomlar karakterize edilerek bireylerin ilgili genetik kararlılığı olan hastalıklara yatkınlığını tanımlayarak uzun vadeli risklerin ortaya çıkmasında etkili olmuştur. Transkriptomide ise herhangi bir anda aktif olarak eksprese edilen genlerin mikrodizileri ve gen aktivitesinin bir özeti olarak paketlenmiş mRNA'yı ölçmektedir. Fakat mikroarray teknolojisindeki gelişmeler genomik ve transkriptomide ilerleme kaydetmiş olsa da elde edilen verilerin yorumlanmasında eksiklik olduğunu düşündürmüştür. Bunun üzerine hücre, doku veya organizmada ifade edilen bütün proteinlerin bilgi akışını karakterize etmek üzere proteomik incelemeler başlamıştır. Proteom hem genlerin hem de çevrenin dinamik bir yansıması olmasına rağmen düşük verimli proteinlerin kesin olarak ölçülememesi global metabolit profillerinin ortaya çıkmasında etkili olmuştur. Diğer omiks yaklaşımlara göre bir takım avantajlara sahip olan metabolomiks alanı diğer omiks çalışmalarını tamamlayıcı hale gelmiştir. Gen transkripsiyonunun son alt ürünüdür. Metabolomikler, genetik düzenlemeyi, enzimlerin değiştirilmiş kinetik aktivitesini ve metabolik reaksiyonlardaki değişiklikleri hesaba katarak acil durum bağlamında hücresel durumun global değerlendirmesine izin verir. Bu nedenle, genomik veya proteomik ile karşılaştırıldığında, metabolomik fenotipteki değişiklikleri yansıtır ve bu nedenle tamamlayıcı bir tekniktir.[27, 38]

Çeşitli vücut sıvısını ve doku bileşenlerini kantitatif olarak profillemenin birincil pratik amacı, sağlık ve hastalıktaki biyokimyasal durumu tanımlamak olmuştur. Bu durumu tanımlamak için hastalıklı ve sağlıklı bireylerden elde edilen örneklerden,

fizyolojik durumu kesin olarak tanımlayan biyolojik işaretler yani biyobelirteçler kullanılmaktadır. Biyobelirteçler, bir hastalık veya ilerleyişinin bir sonucu olarak karmaşık bir sistemde biyolojik bir işlem veya bozulmanın göstergesidir. Bunlar, genler, proteinler veya proteinlerin benzersiz post-translasyonel modifikasyonları veya küçük biyolojik moleküller ve diğer metabolik yolak ürünleri olabilir. Biyobelirteçlerin hassasiyeti ve spesifikliği yüksek olmalıdır. Özellikle kanser araştırmalarında biyobelirteçler hastalığın erken teşhisi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve klinik sonuçların önceden tahmin edilmesi gibi birçok amaçla kullanılırlar. Kanser çalışmalarında tümör metabolomunu karakterize ederken biyobelirteçler büyük rol oynamaktadır fakat keşfedilen biyobelirteçler hakkında elde edilen bilgilerde eksiklikler bulunmaktadır. Tümör tipleri arasında farklılıklar gösteren biyobelirteçleri hassasiyeti ve spesifikliği yüksek olacak şekilde açıklamak için yöntem geliştirme çalışmaları büyük önem kazanmıştır. Bu amaç doğrultusunda metabolomiks çalışmalarında, kanser durumunu karakterize eden parmak izleri, profiller veya imzalar dahil çok değişkenli biyobelirteçleri tanımlamak için bu teknoloji kullanılmaktadır.[28, 37]

Bu çalışmada mide kanseri tanısı konulan hastalardan cerrahi işlem sonrası alınan doku örnekleri <1 cm kesilerek kanserli ve kansersiz olarak ayrılmış hemen sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Numune ekstraksiyonundan önce, dokuları ve hücreleri parçalanmış ve belirli bir metabolit veya metabolit sınıfı için etkili bir ekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yu ve ark. yaptıkları çalışmada farklı doku örneklerinde farklı doku parçalama yöntemleri ve farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak NMR ile analiz etmişler ve sonuçları bu strateji doğrultusunda değerlendirmişlerdir. Ekstarksiyon yöntemlerinden önce dokuları liyofilize yöntemi, elektirikli doku homojenizatörü ve dokuları sıvı azot içerisinde dondurarak el ile öğütmüşler ve bu üç farklı doku parçalama yönteminden

sonra metabolitleri karşılaştırmak için farklı ekstraksiyon protokolleri kullanmışlardır. Doku parçalma yöntemlerini karşılaştırırken liyofilize edilen dokuların homojenleştirilmiş dokulara göre NMR spektrumları daha düz piklerler verdiği rapor edilmiş ve homojenizatör kullanarak tekrarlanabilirliği, hızlı olması ve kolaylığı bakımından daha avantajlı olduğu öne sürülmüştür. Ekstraksiyon değerlendirilmesinde ise her bir ekstraksiyonun toplam NMR spektral alanı, ekstraksiyonlar arasındaki verimi karşılaştırmak için sinyal alanına ve doku kütlesine normalleştirmişlerdir. Metanol / su (2/1), metanol / kloroform / su ekstraksiyonları ve asetonitril / su (1/1 veya 2/1) hazırlamışlar ve hepsinin iyi tutarlı verimler ürettiği sonucuna varmışlardır ancak asetonitril bazlı ekstraksiyonlar daha fazla lipit elde etme eğiliminde olduğunu ve polar metabolitlerde bulunan makro moleküllerin bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Yu ve ark. [52] yaptıkları bu çalışmada da tüm tekli organik çözücü ekstraksiyonları hem daha kolay hem de daha hızlı olduğu rapor edilmiş ve asetonitril/su çözücü sistemleri kullanılarak ekstrakte edilen dokularda izolösin, alanin ve prolin gibi amino asitlerin diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha farklı etkinliklerde çıktığını ileri sürmüşlerdir. Literatür taraması sırasında kullanılan yöntemlerin de bu doğrultuda olduğu görülmüş ve bu çalışmada da örnek hazırlama ve ekstraksiyon işlemi için hızlı olması ve tekrarlanabilir olması amaçlanmıştır. Ekstraksiyon için -80℃ 'de saklanan doku örnekleri elektirikli homojenizatör kullanılarak parçalanmış ve ekstraksiyon işlemi sırasında proteinlerin çökmesi ve metabolitlerin çıkarılması için asetonitril ve 0.2 % formik asit kullanılmıştır.

Metabolomiks, bütünleşik yaşam sistemlerinin metabolit tamamlayıcısı ve hem endojen hem de eksojen faktörlerin değişimlerine dinamik tepki olarak küresel bir anlayışı temsil eder ve karmaşık sistemler üzerine araştırma için birçok potansiyel uygulamaya ve avantaja sahiptir. Bu karmaşık sistem de düşük molekül ağırlıklı

bileşiklerin analizi için gelişmiş analitik platformlar ve istatistiksel araçlar kullanılmaktadır.[52]

Metabolik parmak izi yani hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarında, örneğin bir hastanın metabolik parmak izini sağlıklı ve hastalıklı konulara kıyasla değerlendirerek bir teşhis aracı olarak kullanılabilir. Ek olarak, tedavi stratejilerinin başarısı, metabolik fenotipin sağlıklı duruma dönüp dönmediğini veya başka bir deyişle, tedaviden sonra bir numunenin sağlıklı denekler kümesinde düşüp düşmediğini gözlemleyerek izlenebilir. Ancak, deney gruplarının kümelenmesine neden olan metabolitleri tanımlamaksızın sadece parmak izi için metabolomikslerin kullanılması, sadece bir sınıflandırma aracı sunacak ancak biyokimyasal bilgiye ve altta yatan etki mekanizmalarının anlaşılmasına doğrudan katkıda bulunmayacaktır. Metabolit kimliği bilgisi ve bunların belirli fenotiplerdeki farklılıkların tanımlayıcıları olarak kantitatif bozulmaları, biyokimyasal yollar ışığında yorumlanabilecek bilgileri sağlayacaktır. Bu nedenle, parmak izi yaklaşımında grup ayrışmasına neden olan metabolitler tanımlanmalı ve bu metabolitlerin ve ilgili bileşiklerin analizi için kantitatif yöntemler geliştirilmelidir.[32]

Hedeflenmemiş metabolomiks çalışmalarında, kütle spektrometresi platformlarındaki son teknolojik gelişmelere rağmen, tek bir analitik platform kullanılmamaktadır. Metabolitlerin bu büyük ölçekli analizleri, kombinasyon halinde kullanılan kütle spektrometresi (MS) teknolojisi analizörlerine yakından bağlıdır. MS ile kombinasyon halde kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), LC-MS, GC-MS, CE-MS yaklaşımları son zamanlarda kullanılmış fakat düşük moleküller ağırlıklı metabolitlerin keşfedilmesine katkıda bulunmak için hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği yüksek tekniklere yönelinmiştir.[61]

Yapılan literatür taramasında kanserli mide dokuları üzerinde hedeflenmemiş metabolomiks çalışmaların da QTOF-LC/MS yönteminin kullanılmadığı görülmüştür. QTOF-LC/MS ile doğru kütle ölçümü ile bilinmeyen metabolitlerin kimlik bilgilerini tanımlama ve bu metabolitlerin ilgili bileşiklerinin analizi için yüksek hassasiyet amaçlanmıştır. QTOF-LC/MS cihazının geniş kütle aralığından dolayı yüksek veri toplama kabiliyeti olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, hedeflenmemiş metabolomiks çalışmaları için QTOF-LC/MS cihazı kullanılmıştır. Mobil faz olarak %0.1 formik asit içeren asetonitril ve % 0.1 formik asit içeren ultra saf su karışımı içeren bir gradiyent elüsyon programı kullanıldı. Q-TOF kütle spektrometre sistemi için Dual Agilent Jet Stream Elektrosprey İyonizasyon (AJS ESI) iyon modu seçildi. Yöntem validasyonu için kalite kontrol örnekleri hazırlandı.

QTOF-LC/MS sonuçları için veri analizlerinde sağlıklı ve kanserli gruplara ait kütle/yük oranları, literatür bilgisi ve online veritabanları üzerinden belirlendi. Kanserli ve kontrol grupları arasında $p<0.01$ seviyesinde amino asitler, organik asitler, karbonhidratlar, yağ asitleri gibi toplam 31 anlamlı metabolitin potansiyel biyobelirteç olabileceği görüldü. Ortogonal projeksiyonlar diskriminant analizi (OPLS-DA)kullanılarak doku örneklerinin kanserli ve kansersiz olarak gruplara ayrılmasında önemli olan metabolitler ve bu grupların regresyon katsayıları bulunmuştur. Metabolik profil için, OPLS-DA modeli, bir iki öngörücü bileşen ve dört ortogonal bileşen kullanarak, iki grubun metabolit profilleri arasında belirgin bir ayrım eğilimi elde eden, tatmin edici modelleme ve öngörücü yetenekleri göstermektedir. Validasyonun doğrulanması için permütasyon testi gerçekleştirildi. Ticari veri tabanları ile tanımlanan metabolitlerin ilgili Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) ve Metaboanalyst 4.0 kullanılarak detaylı yolak analizi gerçekleştirildi. Metabolitlerin ilişkili olduğu yolaklar analiz edildiğinde aminoaçil t-RNA biyosentezi, alanine, aspartate, glutamate

metabolizması, glisin, serin, treonin metabolizması, yağ asidi metabolizması, siyanoamino asit metabolizmması, glutatyan metabolizması, valin, lösin, izolösin biyosentezi, azot metabolizması, D-Glutamin ve D-glutamat metabolizması, sfingolipid metabolizması ile anlamlı derecede ilişkili olduğu rapor edildi.

Çalışmanın veri analizi kısmında kanserli dokular ile kontrol dokular arasında doğru kütle ve yapı bilgileri, HMDB ve METLIN gibi veritabanlarından elde edilmiştir. metabolitlerin eşletirilmesinin ardından elde edilen metabolitlerden dallı zincirli bir amino asit olan izolösinin seviyesi kanserli dokularda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çoğu amino asit ve birincil türevlerinin seviyeleri, tümörlerde kontrol grubuna göre yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmiştir. Kanser hücrelerinde yüksek glutaminaz aktivitesi ve düşük glutamin sentaz aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Kanserli dokulardaki metabolit seviyeleri ile kontrol dokuları arasındaki metabolit seviyeleri karşılaştırıldığında kanserli doku numunelerindeki amino asitlerdeki değişikliklerin karakteristik olduğu gözlemlenmiştir. L-alanin, L-asparajin, L-lösin, L-valin, glisin, L-treonin, gibi amino asitlerin seviyelerinde gözlemlenen metabolik değişikliklerin önemli biyobelirteçler olacağı düşünülmektedir. Song ve ark.[56] yaptığı çalışmada aminoasit metabolizmasının bozulduğunu, sağlıklı kontrollere kıyasla, mide kanseri serumunda valinin anlamlı derecede arttığı, glutaminin ise önemli derecede azaldığını bildirmişler fakat prolin, izolösin ve lösin gibi diğer amino asitler de değiştiğini, ancak istatistiksel olarak anlamlılık göstermediğini öne sürmüşlerdir. Glutamin'i glutatata katalize eden Glutaminaz'ın tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bulmuşlardır. Nitekim bizim yaptığımız çalışmada da glutaminin seviyesinde azalma görülmesi tümörlü dokuların bir enerji kaynağı olarak glutamini kullanıdığını doğrulamıştır.

TCA döngüsüne katılan metabolitlerin konsantrasyonlarında farklılıklar gözlemlendi. Kanserli hücrelerin glikoz tüketmesinden dolayı glukoz konsantrasyonları

tümörlülerde normal dokulara göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Nitekim yapılan çalışmalarda da kanserojenez, glikoz metabolizması ile yakından ilişkili olduğu, "Warburg etkisi" sonuçlarına göre, artmış glikoz tüketimi, artmış glikolitik aktivite ve laktik asit birikimi, kanser hücrelerinin kritik özelliği olduğu bildirilmiştir.[62] Çoğunlukla mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üreten normal hücrelerle karşılaştırıldığında, kanser hücreleri aerobik koşullar altında bile yüksek glikoliz yoluyla ağırlıklı olarak enerji elde eder. Laktat içine glikoz dönüştürme yoluyla glikoliz, ATP üretilmesinde yetersizdir, ancak hücre çoğalmasına neden olan çok sayıda ara ürün üretir. Bu nedenle, anaerobik glikolize yol açan glikoz tüketiminin, mide kanseri hücreleriyle de ilişkileri doğrulanmıştır.

Mide kanserli dokularda bozulan diğer yolaklar ise yağ asidi metabolizması ve siyanoamino asit metabolizması olduğu gözlemlenmiştir. Yağ asidi metabolizmasında etkili olan miristik asit, palmitik asit, oleik asit tümörlü dokularda anlamlı seviyede artış göstermiştir. Diğer yağ asitleri seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir.

Seramid, hücre davranışını düzenlemede kritik rol oynayan önemli bir lipit sinyal molekülüdür. Sfingolipidler, akışkanlığın düzenlenmesinde ve lipit katmanlarının alt-alan yapısının düzenlenmesinde yapısal rollere sahip olan bir membran lipid ailesidir. Seramid, sfingolipid metabolizmasının merkezindedir. Apoptoz, büyüme durması veya yaşlanma gibi faktörlerde önemli rolleri bulunmaktadır. Sfingolipidle düzenlenmiş bu işlemler sırayla kanser gelişiminde ve ilerlemesinde çok önemlidir ve tümör baskılayıcı lipit olarak tanınmaktadır.[63, 64] Nitekim yaptığımız çalışmada da C16 Sfingan seviyelerin de artış olduğu gözlemlenmiştir. Anlamlı derecede yüksek çıkan metabolitlerden C16 Sfinganın sfingolipid metabolizmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular literatürle uyum halindedir. Buna bir örnek Koyanagi ve ark.[65] yaptıkları çalışmadır. Söz konusu çalışmada farelere seramid oluşturarak nasıl kullanıldığını ve oluşumunun nasıl

düzenlendiğini netleştirmek için Sarcoma 180, B16 melanom veya Lewis akciğer karsinom hücreleri aşılamışlar ve dihidroseramid ile seramid seviyelerini belirlemişlerdir. Tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aşılma yaptıkları farelerde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak, C seviyelerini hem tümör kitlelerinde hem de beyin, karaciğer, böbrek ve kas gibi sağlıklı doku örneklerinde LC/MS metodu geliştirerek ölçmüşler ve C16 hücrelerinde seramid seviyelerinin apoptoz sırasında artış olduğunu bildirmişlerdir. Ve tümör kitlelerinin hem dihidroseramid hem de seramid ürettiğini bildirmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada adenokarsinom tanısı konulmuş hastalardan kanserli ve sağlıklı olarak alınan doku örneklerinin hedeflenmemiş metabolomiks yöntemi ile QTOF-LC/MS ile analizleri yapılmıştır. Analiz sonucundan $p<0.001$ seviyesinde amino asitler, organik asitler, karbonhidratlar, yağ asitleri gibi 31 tane anlamlı metabolit tanımlanmış ve bunların istatistiksel analiz sonucu ayrımları gerçekleştirilmiştir. Tanımlanan anlamlı metabolitlerin yolak analizleri gerçekleştirildi ve tespit edilen metabolitlerle bunların etki ettiği yolaklar hakkında literatür bilgileri doğrultusunda

Ⅰ. Kanser hücrelerinde yüksek glutaminaz aktivitesi ve düşük glutamin sentaz aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Glutaminin seviyesinde azalma görülmesi tümörlü dokuların bir enerji kaynağı olarak glutamini kullandığını literatür bilgisi ile doğrulanmıştır.

Ⅱ. L-alanin, l-asparajin, l-lösin, l, valin, glisin, l-treonin, gibi amino asitlerin seviyelerinde gözlemlenen metabolik değişikliklerin önemli biyobelirteçler olacağı düşünülmektedir

Ⅲ. Glukoz konsantrasyonları tümörlülerde normal dokulara göre daha düşük olduğu bulunmuştur.

Ⅳ. Yağ asidi metabolizmasında etkili olan miristik asit, palmitik asit, oleik asitin tümörlü dokularda anlamlı seviyede artış olduğu görülmüştür.

Ⅴ. Sfingolipid metabolizmasında etkili olan C16 sfingan seviyesinde artış olduğu görülmüştür. C16 sfingan metabolitinin mide kanserli dokularda biyobeliteç olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçların mide kanseri dokularındaki metabolit profiline katkıda bulunarak biyobelirteç çalışmaları başta olmak üzere ileri dönemde yapılacak metabolomiks araştırmalara yol göstereceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Garcia M, Jemal A, Ward E, Center M, Hao Y, Siegel R, Thun M. Global cancer facts & figures 2007. *Atlanta, GA: American cancer society*, 2007, 1: 52.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68: 394-424.
3. Song H, Wang L, Liu H-L, Wu X-B, Wang H-S, Liu Z-H, Li Y, Diao D-C, Chen H-L, Peng J-S. Tissue metabolomic fingerprinting reveals metabolic disorders associated with human gastric cancer morbidity. *Oncology Reports*, 2011, 26: 431-438.
4. Wu H, Xue R, Tang Z, Deng C, Liu T, Zeng H, Sun Y, Shen X. Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396: 1385-1395.
5. Group BDW, Atkinson Jr AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, Oates JA, Peck CC, Schooley RT. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2001, 69: 89-95.
6. Corona G, Cannizzaro R, Miolo G, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, Steffan A, De Re V. Use of Metabolomics as a Complementary Omic Approach to Implement Risk Criteria for First-Degree Relatives of Gastric Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 750.
7. Xiao S, Zhou L. Gastric cancer: Metabolic and metabolomics perspectives. *International Journal of Oncology*, 2017, 51: 5-17.

8. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: D521-D526.
9. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16: 373-378.
10. Fernández-Peralbo M, De Castro ML. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 41: 75-85.
11. Tautenhahn R, Cho K, Uritboonthai W, Zhu Z, Patti GJ, Siuzdak G. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*, 2012, 30: 826.
12. Xie G, Plumb R, Su M, Xu Z, Zhao A, Qiu M, Long X, Liu Z, Jia W. Ultra-performance LC/TOF MS analysis of medicinal Panax herbs for metabolomic research. *Journal of Separation Science*, 2008, 31: 1015-1026.
13. Kong F, Singh R. Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 2008, 73: R67-R80.
14. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz M, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992, 13: 795-808.
15. Kushima R, Hattori T. Histogenesis and characteristics of gastric-type adenocarcinomas in the stomach. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1993, 120: 103-111.
16. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 1965, 64: 31-49.

17. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19: 449-490.
18. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of Helicobacter pylori infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Digestive Diseases and Sciences*, 2014, 59: 1698-1709.
19. Forman D, Newell D, Fullerton F, Yarnell J, Stacey A, Wald N, Sitas F. Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*, 1991, 302: 1302-1305.
20. van den Brandt PA, Goldbohm RA. Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2006, 20: 589-603.
21. Minami Y, Kanemura S, Oikawa T, Suzuki S, Hasegawa Y, Miura K, Nishino Y, Kakugawa Y, Fujiya T. Associations of cigarette smoking and alcohol drinking with stomach cancer survival: A prospective patient cohort study in Japan. *International Journal of Cancer*, 2018.
22. Chan D-C, Chen C-J, Chu H-C, Chang W-K, Yu J-C, Chen Y-J, Wen L-L, Huang S-C, Ku C-H, Liu Y-C. Evaluation of serum amyloid A as a biomarker for gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2007, 14: 84-93.
23. Maruyama K. The most important prognostic factors for gastric cancer patients: a study using univariate and multivariate analyses. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1987, 22: 63-68.
24. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*, 2013, 9: 280-299.
25. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic'technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 2011, 13: 189-195.

26. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15: 431-440.
27. Chan AW, Gill RS, Schiller D, Sawyer MB. Potential role of metabolomics in diagnosis and surveillance of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20: 12874.
28. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *International Journal of Genomics*, 2001, 2: 155-168.
29. Ryan D, Robards K. Metabolomics: the greatest omics of them all? *Analytical Chemistry*, 2006, 78: 7954-7958.
30. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 87: 1-11.
31. Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1353: 99-105.
32. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26: 51-78.
33. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, 291: 1304-1351.
34. Ling T, Siew T, Lee N. Quantifying pollutants from household wastewater in Kuching, Malaysia. *World Applied Sciences Journal*, 2010, 8: 449-456.
35. Martin FPJ, Dumas ME, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IK, Tang H, Zirah S, Murphy GM, Cloarec O, Lindon JC. A top-down systems biology view of

microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Molecular systems biology*, 2007, 3: 112.

36. Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20: 557-566.
37. Idle JR, Gonzalez FJ. Metabolomics. *Cell Metabolism*, 2007, 6: 348-351.
38. Lubes G, Goodarzi M. GC–MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 313-322.
39. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 2012, 137: 293-300.
40. Kim K-B, Yang J-Y, Kwack SJ, Park KL, Kim HS, Ryu DH, Kim Y-J, Hwang G-S, Lee BM. Toxicometabolomics of urinary biomarkers for human gastric cancer in a mouse model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2010, 73: 1420-1430.
41. Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today*, 2005, 10: 1551-1558.
42. Liang Q, Wang C, Li B. Metabolomic analysis using liquid chromatography/mass spectrometry for gastric cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176: 2170-2184.
43. Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2010–2012. *Electrophoresis*, 2013, 34: 86-98.
44. Kok MG, Somsen GW, de Jong GJ. The role of capillary electrophoresis in metabolic profiling studies employing multiple analytical techniques. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 61: 223-235.

45. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Baskı. Elsevier, 2011.
46. Aa J, Yu L, Sun M, Liu L, Li M, Cao B, Shi J, Xu J, Cheng L, Zhou J. Metabolic features of the tumor microenvironment of gastric cancer and the link to the systemic macroenvironment. *Metabolomics*, 2012, 8: 164-173.
47. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*, 2009, 69: 4918-4925.
48. Zhu Z-J, Schultz AW, Wang J, Johnson CH, Yannone SM, Patti GJ, Siuzdak G. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature Protocols*, 2013, 8: 451.
49. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and structural biotechnology journal*, 2013, 4: e201301009.
50. Goodacre R, Broadhurst D, Smilde AK, Kristal BS, Baker JD, Beger R, Bessant C, Connor S, Capuani G, Craig A. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics*, 2007, 3: 231-241.
51. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11: 325.
52. Lin CY, Wu H, Tjeerdema RS, Viant MR. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, 2007, 3: 55-67.

53. Hu J-D, Tang H-Q, Zhang Q, Fan J, Hong J, Gu J-Z, Chen J-L. Prediction of gastric cancer metastasis through urinary metabolomic investigation using GC/MS. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2011, 17: 727.

54. Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PloS One*, 2011, 6: e24143.

55. Ikeda A, Nishiumi S, Shinohara M, Yoshie T, Hatano N, Okuno T, Bamba T, Fukusaki E, Takenawa T, Azuma T. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for gastrointestinal cancer. *Biomedical Chromatography*, 2012, 26: 548-558.

56. Song H, Peng J-S, Dong-Sheng Y, Yang Z-L, Liu H-L, Zeng Y-K, Shi X-P, Lu B-Y. Serum metabolic profiling of human gastric cancer based on gas chromatography/mass spectrometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012, 45: 78-85.

57. Gu J, Hu X, Shao W, Ji T, Yang W, Zhuo H, Jin Z, Huang H, Chen J, Huang C. Metabolomic analysis reveals altered metabolic pathways in a rat model of gastric carcinogenesis. *Oncotarget*, 2016, 7: 60053.

58. Choi JM, Park WS, Song KY, Lee HJ, Jung BH. Development of simultaneous analysis of tryptophan metabolites in serum and gastric juice–an investigation towards establishing a biomarker test for gastric cancer diagnosis. *Biomedical Chromatography*, 2016, 30: 1963-1974.

59. Shangli C, Cui D. Metabolic Profiles and High-Accuracy Diagnosis Model Based on Plasma Metabolomics of Gastric Cancer Patients. İçinde:*Gastric Cancer Prewarning and Early Diagnosis System*, Springer, 2017: 83-103.

60. Kaji S, Kusuhara M, Makuuchi R, Yamakawa Y, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Kami K, Ohashi Y. Metabolomic profling in gastric cancer tissues using time-of-flight mass spectrometry. 2017.
61. Dunn WB, Erban A, Weber RJ, Creek DJ, Brown M, Breitling R, Hankemeier T, Goodacre R, Neumann S, Kopka J. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 2013, 9: 44-66.
62. Yuan L-W, Yamashita H, Seto Y. Glucose metabolism in gastric cancer: The cutting-edge. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22: 2046.
63. Pewzner-Jung Y, Park H, Laviad EL, Silva LC, Lahiri S, Stiban J, Erez-Roman R, Brugger B, Sachsenheimer T, Wieland F. A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 2010: jbc. M109. 077594.
64. Ogretmen B. Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy. *FEBS Letters*, 2006, 580: 5467-5476.
65. Koyanagi S, Kuga M, Soeda S, Hosoda Y, Yokomatsu T, Takechi H, Akiyama T, Shibuya S, Shimeno H. Elevation of de novo ceramide synthesis in tumor masses and the role of microsomal dihydroceramide synthase. *International Journal of Cancer*, 2003, 105: 1-6.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Nurgül KIZILTAŞ
Doğum Tarihi	06.08.1992
Doğum yeri	MALATYA
Medeni hali	Bekar
Uyruğu	T.C.
Adres	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, 25240 ERZURUM
Tel	0535 658 07 20
e-mail	nurgul.kzltas@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi
Lisans	Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi/Kimya Mühendisliği (2006-2010)
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2016-2019)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	Orta Derece (YÖKDİL 63.75, Mart 2017)

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/ 129
Konu : Etik Kurul Kararı

29.03.2018

Sayın: Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU
Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz **"Mide Kanseri Dokularında Hedeflenmemiş Metabolomiks Teknolojileri Yardımıyla Alternatif Tanı ve Yöntemlerinin Geliştirilmesi"** isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için **Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan** izin alınması gerekmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı

EK-3. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		**Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU**
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		**Mide Kanseri Dokularında Hedeflenmemiş Metabolomiks Teknolojileri Yardımıyla Alternatif Tanı ve Yöntemlerinin Geliştirilmesi**
KARAR BİLGİLERİ	**Toplantı Sayısı: 3 Karar No: 18**	**Tarih:** 29.03.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin **TÜBİTAK tarafından** karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. **Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.** Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.M.Hamidullah UYANIK
Üye

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Doç.Dr.İlker İNCE
Üye

Doç.Dr.Ayşenur AKSOY
Üye

Dr.Öğr.Üy.Zahide KOŞAN
Üye

Dr.Öğr.Üy.İbrahim KARABULUT
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye